



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110022895 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201780014167.5

(22)申请日 2017.01.06

(30)优先权数据

62/276,722 2016.01.08 US

62/343,514 2016.05.31 US

62/345,476 2016.06.03 US

62/409,180 2016.10.17 US

62/420,969 2016.11.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.08.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/012614 2017.01.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/120527 EN 2017.07.13

(71)申请人 阿布特斯生物制药公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72)发明人 A·库科纳蒂 A·C·H·李

C·A·瑞金布兰德 M·J·索非亚

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

C07K 14/01(2006.01)

C07K 14/02(2006.01)

C12N 15/51(2006.01)

权利要求书11页 说明书125页

(54)发明名称

用于治疗乙型肝炎的治疗组合物和方法

(57)摘要

本发明提供可用于治疗乙型肝炎的治疗组合和治疗方法。

1. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体和至少两种选自由以下组成的组的药剂:

- a) 衣壳抑制剂;
- b) sAg分泌抑制剂;
- c) 逆转录酶抑制剂;
- d) cccDNA形成抑制剂;
- e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和
- f) 免疫刺激剂。

2. 如权利要求1中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种衣壳抑制剂。

3. 如权利要求2所述的药物组合物,其中所述衣壳抑制剂选自Bay-41-4109、AT-61、DVR-01和DVR-23f。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种sAg分泌抑制剂。

5. 如权利要求4所述的药物组合物,其中所述sAg分泌抑制剂选自由PBHBV-001和PBHBV-2-15组成的组。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种逆转录酶抑制剂。

7. 如权利要求6所述的药物组合物,其中所述逆转录酶抑制剂选自由以下组成的组:拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种cccDNA形成抑制剂。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中所述cccDNA形成抑制剂选自CCC-0975和CCC-0346。

10. 如权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。

11. 如权利要求10所述的药物组合物,其包含至少两种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。

12. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自由siRNA 1m至15m的二元siRNA组合组成的组。

13. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自由siRNA 1m至15m的三元siRNA组合组成的组。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的药物组合物,其包含至少一种免疫刺激剂。

15. 如权利要求14所述的药物组合物,其中所述免疫刺激剂选自由IFN基因刺激因子(STING)激动剂和白介素组成的组。

16. 如权利要求1所述的药物组合物,其包含以下药剂的组合:

sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和衣壳抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂;

衣壳抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；或
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂。

17. 如权利要求1所述的药物组合物,其包含以下药剂的组合:

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；

cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；

免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；或
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂。

18. 一种药盒,其包含至少两种选自由以下组成的组的药剂:

- a) 逆转录酶抑制剂;
- b) 衣壳抑制剂;
- c) cccDNA形成抑制剂;
- d) sAg分泌抑制剂;
- e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和
- f) 免疫刺激剂

所述药剂以组合形式用于治疗或预防病毒感染,诸如乙型肝炎。

19. 如权利要求18所述的药盒,其包含至少一种逆转录酶抑制剂。

20. 如权利要求19所述的药盒,其中所述逆转录酶抑制剂选自由以下组成的组:拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。

21. 如权利要求18至20中任一项所述的药盒,其包含至少一种衣壳抑制剂。

22. 如权利要求21所述的药盒,其中所述衣壳抑制剂选自Bay-41-4109、AT-61、DVR-01和DVR-23f。

23. 如权利要求18至22中任一项所述的药盒,其包含至少一种cccDNA形成抑制剂。

24. 如权利要求23所述的药盒,其中所述cccDNA形成抑制剂选自CCC-0975和CCC-0346。

25. 如权利要求18至24中任一项所述的药盒,其包含至少一种sAg分泌抑制剂。

26. 如权利要求25所述的药盒,其中所述sAg分泌抑制剂选自由PBHBV-001和PBHBV-2-15组成的组。

27. 如权利要求18至26中任一项所述的药盒,其包含至少一种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。

28. 如权利要求27所述的药盒,其包含至少两种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。
29. 如权利要求27所述的药盒,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自自由siRNA 1m至15m的二元siRNA组合组成的组。
30. 如权利要求27所述的药盒,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自自由siRNA 1m至15m的三元siRNA组合组成的组。
31. 如权利要求18至30中任一项所述的药盒,其包含至少一种免疫刺激剂。
32. 如权利要求31所述的药盒,其中所述免疫刺激剂选自自由IFN基因刺激因子(STING)激动剂和白介素组成的组。
33. 如权利要求18所述的药盒,其包含以下两种药剂的组合中的一者:
- 衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂;
 - 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和衣壳抑制剂;
 - 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂;
 - 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂;
 - 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂;
 - 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂;
 - 衣壳抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;
 - 衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂;
 - 衣壳抑制剂和免疫刺激剂;
 - 衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂;
 - cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;
 - cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂;
 - cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂;
 - cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂;
 - cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂;
 - sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;
 - sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂;
 - sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂;
 - sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂;
 - sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂;
 - 免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;
 - 免疫刺激剂和衣壳抑制剂;
 - 免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂;
 - 免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂;
 - 免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂;
 - 逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;
 - 逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂;
 - 逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂;
 - 逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂;或
 - 逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂。

34. 如权利要求18所述的药盒,其包含以下三种药剂的组合中的一者:

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂;

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂;

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂;

衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂;

衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂;

衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂;

衣壳抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂;

衣壳抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂;

衣壳抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂;

衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂;

衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂;

衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂;

cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂;

cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂;

cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂;

sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂;

sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂;

sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂;

sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂;

sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂;

sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂;

sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂;

sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂;

sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂;

sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂;

sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂;

sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；或
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂。

35. 一种治疗动物的乙型肝炎的方法，其包括向所述动物施用至少两种选自以下组成的组的药剂：

- a) 逆转录酶抑制剂；
- b) 衣壳抑制剂；
- c) cccDNA形成抑制剂；

d) sAg分泌抑制剂;

e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和

f) 免疫刺激剂。

36. 如权利要求35所述的方法,其中向所述动物施用至少一种逆转录酶抑制剂。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述逆转录酶抑制剂选自由以下组成的组:拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦。

38. 如权利要求35至37中任一项所述的方法,其中向所述动物施用至少一种衣壳抑制剂。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述衣壳抑制剂选自由Bay-41-4109、AT-61、DVR-01和DVR-23f组成的组。

40. 如权利要求35至39中任一项所述的方法,其中向所述动物施用至少一种cccDNA形成抑制剂。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述cccDNA形成抑制剂选自CCC-0975和CCC-0346。

42. 如权利要求35至41中任一项所述的方法,其中向所述动物施用至少一种sAg分泌抑制剂。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述sAg分泌抑制剂选自由PBHBV-001和PBHBV-2-15组成的组。

44. 如权利要求35至43中任一项所述的方法,其中向所述动物施用至少一种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。

45. 如权利要求44所述的方法,其中向所述动物施用至少两种靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸。

46. 如权利要求44所述的方法,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自由siRNA 1m至15m的二元siRNA组合组成的组。

47. 如权利要求44所述的方法,其中所述靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸选自由siRNA 1m至15m的三元siRNA组合组成的组。

48. 如权利要求35至47中任一项所述的方法,其中向所述动物施用至少一种免疫刺激剂。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述免疫刺激剂选自由IFN基因刺激因子(STING)激动剂和白介素组成的组。

50. 如权利要求35至49中任一项所述的方法,其中至少一种药剂是经口施用。

51. 如权利要求35至49中任一项所述的方法,其中至少两种药剂是经口施用。

52. 如权利要求35至51中任一项所述的方法,其中寡聚核苷酸是静脉内施用。

53. 如权利要求35所述的方法,其中向所述动物施用以下两种药剂的组合中的一者:
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和衣壳抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂;

靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂;

衣壳抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；或
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂。

54. 如权利要求35所述的方法，其中向所述动物施用以下三种药剂的组合中的一者：

衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；

cccDNA形成抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
抑制剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和衣壳抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；

免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂和逆转录酶抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
免疫刺激剂和逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和衣壳抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和sAg分泌抑制剂；
逆转录酶抑制剂和cccDNA形成抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和cccDNA形成抑制剂；
逆转录酶抑制剂和sAg分泌抑制剂和免疫刺激剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和衣壳抑制剂；
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和cccDNA形成抑制剂；或
逆转录酶抑制剂和免疫刺激剂和sAg分泌抑制剂。

55. 如权利要求1至54中任一项提供的所述组合不包括仅衣壳抑制剂与干扰素的组合。

用于治疗乙型肝炎的治疗组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2016年1月08日提交的美国申请第62/276,722号和2016年5月31日提交的美国申请第62/343,514号和2016年6月03日提交的美国申请第62/345,476号和2016年10月17日提交的美国申请第62/409,180号和2016年11月11日提交的美国申请第62/420,969号的优先权益,所述申请以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 乙型肝炎病毒(缩写为“HBV”)为嗜肝DNA病毒家族的成员。病毒粒子(有时称为病毒体)包括外部脂质包膜和由蛋白质组成的二十面体核衣壳核心。核衣壳包封病毒DNA和具有逆转录酶活性的DNA聚合酶。外部包膜含有包埋的蛋白质,其参与病毒结合和进入易感细胞(通常为肝细胞)。除感染性病毒粒子之外,在受感染个体的血清中还可发现无核心的丝状体和球状体。这些粒子不具感染性且由脂质和形成病毒体表面的一部分且在病毒的生命周期期间过量产生的蛋白质(其称为表面抗原(HBsAg))组成。

[0004] HBV的基因组由环状DNA构成,但其与众不同,因为DNA不完全为双链的。全长链的一个末端键联至病毒DNA聚合酶。基因组为3020-3320个核苷酸长(对于全长链)和1700-2800个核苷酸长(对于较短链)。负义(非编码)链与病毒mRNA互补。在细胞受到感染后不久便在细胞核中发现病毒DNA。存在四种已知的由基因组编码的基因,称为C、X、P和S。核心蛋白由基因C编码(HBcAg),且其起始密码子前面为产生前核心蛋白的上游框内AUG起始密码子。HBcAg是通过前核心蛋白的蛋白水解加工而产生。DNA聚合酶由基因P编码。基因S为编码表面抗原(HBsAg)的基因。HBsAg基因为一个长的开放阅读框,但含有三个框内“起始”(ATG)密码子,它们将基因划分成三个部分:前S1、前S2和S。由于有多个起始密码子,故产生称为大、中和小的三种不同尺寸的多肽。尚未充分了解由基因X编码的蛋白质的功能,但其与肝癌的发生有关。HBV的复制是一个复杂的过程。虽然复制在肝脏中进行,但病毒扩散至血液,在感染者的血液发现了病毒蛋白和对抗病毒蛋白的抗体。HBV的结构、复制和生物学为综述于D.Glebe和C.M.Bremer, *Seminars in Liver Disease*, 第33卷, 第2期, 第103-112页(2013)中。

[0005] 人感染HBV会引起肝脏的感染性炎症性疾病。受感染个体可能多年不展现症状。据估计,约三分之一的世界人口在其生命中的某个时间点受到感染,包括3.5亿慢性携带者。

[0006] 病毒通过暴露于感染性血液或体液进行传播。围产期感染也可为主要感染途径。急性疾病引起肝脏炎症、呕吐、黄疸,且可能死亡。慢性乙型肝炎可最终引起肝硬化和肝癌。

[0007] 虽然感染HBV的大多数人通过其免疫系统的作用清除感染,但一些感染者遭受侵袭性感染过程(爆发型肝炎);而其他长期感染,从而增加其肝病几率。目前若干药物被批准用于治疗HBV感染,但受感染个体以不同的成功程度对这些药物作出反应,且这些药物中无一者从感染者清除病毒。

[0008] 丁型肝炎病毒(HDV)为一种小的环状包膜RNA病毒,其仅可在乙型肝炎病毒(HBV)存在下繁殖。具体来说,HDV需要HBV表面抗原蛋白来使自身繁殖。与感染单独HBV相比,感染

HBV与HDV两者导致更严重的并发症。这些并发症包括在急性感染中经历肝衰竭的可能性更大和快速发展成肝硬化,并且在慢性感染中发生肝癌的几率增加。与乙型肝炎病毒组合,丁型肝炎在所有肝炎感染中具有最高死亡率。HDV的传播途径类似于HBV。感染很大程度上限制于处于HBV感染高风险的人,特别是注射吸毒者和接受凝血因子浓缩物的人。

[0009] 因此,对用于治疗动物(例如人)的HBV感染以及用于治疗动物(例如人)的HBV/HDV感染的组合物和方法存在持续需要。

发明内容

[0010] 本发明提供可用于治疗诸如HBV的病毒感染的治疗组合和治疗方法。

[0011] 本文所呈现的实例公开了使用针对HBV具有不同作用机制的药剂的众多组合(例如二元组合)研究的结果。如本文所描述,药剂的若干组合显示出意想不到的协同相互作用,且组合通常缺少拮抗作用。

[0012] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗动物的乙型肝炎的方法,其包括向所述动物施用至少两种选自由以下组成的组的药剂:

[0013] a) 逆转录酶抑制剂;

[0014] b) 衣壳抑制剂;

[0015] c) cccDNA形成抑制剂;

[0016] d) sAg分泌抑制剂;

[0017] e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和

[0018] f) 免疫刺激剂。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供一种药盒,其包含至少两种选自由以下组成的组的药剂:

[0020] a) 逆转录酶抑制剂;

[0021] b) 衣壳抑制剂;

[0022] c) cccDNA形成抑制剂;

[0023] d) sAg分泌抑制剂;

[0024] e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和

[0025] f) 免疫刺激剂

[0026] 所述药剂以组合形式用于治疗或预防病毒感染,诸如乙型肝炎。

[0027] 在另一个实施方案中,本发明提供一种药盒,其包含至少三种选自由以下组成的组的药剂:

[0028] a) 逆转录酶抑制剂;

[0029] b) 衣壳抑制剂;

[0030] c) cccDNA形成抑制剂;

[0031] d) sAg分泌抑制剂;

[0032] e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸;和

[0033] f) 免疫刺激剂

[0034] 所述药剂以组合形式用于治疗或预防病毒感染,诸如乙型肝炎。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明提供一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体

和至少两种选自由以下组成的组的药剂：

- [0036] a) 逆转录酶抑制剂；
- [0037] b) 衣壳抑制剂；
- [0038] c) cccDNA形成抑制剂；
- [0039] d) sAg分泌抑制剂；
- [0040] e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；和
- [0041] f) 免疫刺激剂。

[0042] 在另一个实施方案中，本发明提供一种药物组合物，其包含药学上可接受的载体和至少三种选自由以下组成的组的药剂：

- [0043] a) 逆转录酶抑制剂；
- [0044] b) 衣壳抑制剂；
- [0045] c) cccDNA形成抑制剂；
- [0046] d) sAg分泌抑制剂；
- [0047] e) 靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸；和
- [0048] f) 免疫刺激剂。

具体实施方式

[0049] 施用呈药学上可接受的酸式盐或碱式盐形式的化合物可能是适当的。药学上可接受的盐的实例为由形成生理学上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐，所述有机酸加成盐例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 α -甘油磷酸盐。也可形成适合的无机盐，包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。

[0050] 药学上可接受的盐可使用本领域中熟知的标准程序来获得，例如通过使诸如胺的碱性足够大的化合物与适合的酸反应，从而提供生理学上可接受的阴离子。还可制备羧酸的碱金属盐（例如钠盐、钾盐或锂盐）或碱土金属盐（例如钙盐）。

[0051] 逆转录酶抑制剂

[0052] 在某些实施方案中，逆转录酶抑制剂为核苷类似物。

[0053] 在某些实施方案中，逆转录酶抑制剂为核苷类似物逆转录酶抑制剂（NARTI或NRTI）。

[0054] 在某些实施方案中，逆转录酶抑制剂为核苷酸类似物逆转录酶抑制剂（NtARTI或NtRTI）。

[0055] 术语逆转录酶抑制剂包括但不限于：恩替卡韦（entecavir）、克来夫定（clevudine）、替比夫定（telbivudine）、拉米夫定（lamivudine）、阿德福韦（adefovir）和替诺福韦（tenofovir）、替诺福韦二吡呋酯（tenofovir disoproxil）、替诺福韦艾拉酚胺（tenofovir alafenamide）、阿德福韦双吡呋酯（adefovir dipovoxil）、(1R,2R,3R,5R)-3-(6-氨基-9H-9-嘌呤基)-2-氟-5-(羟甲基)-4-亚甲基环戊-1-醇（描述于美国专利第8,816,074号中）、恩曲他滨（emtricitabine）、阿巴卡韦（abacavir）、艾夫他滨（elvucitabine）、更昔洛韦（ganciclovir）、洛布卡韦（lobucavir）、泛昔洛韦（famciclovir）、喷昔洛韦（penciclovir）和安道索韦（amdoxovir）。

[0056] 术语逆转录酶抑制剂包括但不限于恩替卡韦、拉米夫定和(1R,2R,3R,5R)-3-(6-氨基-9H-9-嘌呤基)-2-氟-5-(羟甲基)-4-亚甲基环戊-1-醇。

[0057] 术语逆转录酶抑制剂包括但不限于上述逆转录酶抑制剂的共价结合的氨基磷酸酯部分或氨基磷酸酯部分,或如例如美国专利第8,816,074号、US 2011/0245484 A1和US 2008/0286230A1中所描述。

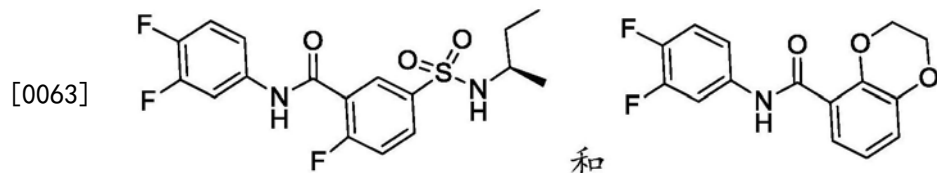
[0058] 术语逆转录酶抑制剂包括但不限于包含氨基磷酸酯部分的核苷酸类似物,诸如((((1R,3R,4R,5R)-3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羟基-2-亚甲基环戊基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-(D或L)-丙氨酸甲酯和((((1R,2R,3R,4R)-3-氟-2-羟基-5-亚甲基-4-(6-氧代-1,6-二氢-9H-嘌呤-9-基)环戊基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-(D或L)-丙氨酸甲酯。还包括其个别非对映异构体,其包括例如((R)-((1R,3R,4R,5R)-3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羟基-2-亚甲基环戊基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-(D或L)-丙氨酸甲酯和((S)-(((1R,3R,4R,5R)-3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-羟基-2-亚甲基环戊基)甲氧基)(苯氧基)磷酰基)-(D或L)-丙氨酸甲酯。

[0059] 术语逆转录酶抑制剂包括但不限于氨基磷酸酯部分,诸如替诺福韦艾拉酚胺,以及描述于US 2008/0286230 A1中的那些。制备立体选择性含氨基磷酸酯或氨基磷酸酯的活性剂的方法描述于例如美国专利第8,816,074号以及US 2011/0245484 A1和US 2008/0286230 A1中。

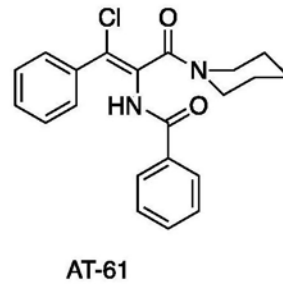
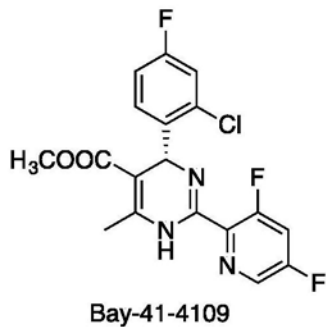
[0060] 衣壳抑制剂

[0061] 如本文所描述,术语“衣壳抑制剂”包括能够直接或间接抑制衣壳蛋白的表达和/或功能的化合物。举例来说,衣壳抑制剂可包括但不限于抑制衣壳组装、诱导非衣壳聚合物形成、促进过量衣壳组装或错误指导的衣壳组装、影响衣壳稳定化和/或抑制RNA的衣壳化的任何化合物。衣壳抑制剂还包括抑制在下游事件中在复制过程内的衣壳功能(例如病毒DNA合成、松弛环状DNA(rcDNA)运送至核中、共价闭合环状DNA(cccDNA)形成、病毒成熟、出芽和/或释放和类似功能)的任何化合物。举例来说,在某些实施方案中,所述抑制剂可检测地抑制如例如使用本文所描述的测定所测量的衣壳蛋白的表达水平或生物活性。在某些实施方案中,所述抑制剂使病毒生命周期的rcDNA和下游产物的水平抑制了至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

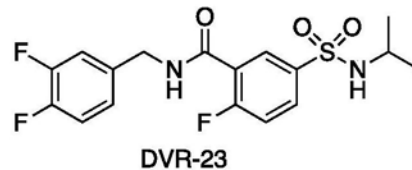
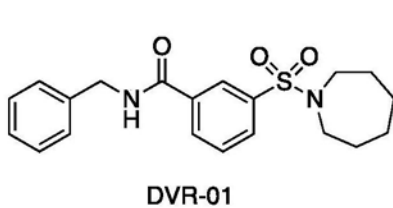
[0062] 术语衣壳抑制剂包括描述于国际专利申请公开案第W02013006394号、第W02014106019号和第W02014089296号中的化合物,包括以下化合物:



[0064] 术语衣壳抑制剂还包括化合物Bay-41-4109(参见国际专利申请公开案第W0/2013/144129号)、AT-61(参见国际专利申请公开案第W0/1998/33501号;和King,RW等人, Antimicrob Agents Chemother.,1998,42,12,3179-3186)、DVR-01和DVR-23(参见国际专利申请公开案第W0 2013/006394号;和Campagna,MR等人,J.of Virology,2013,87,12,6931)及其药学上可接受的盐:



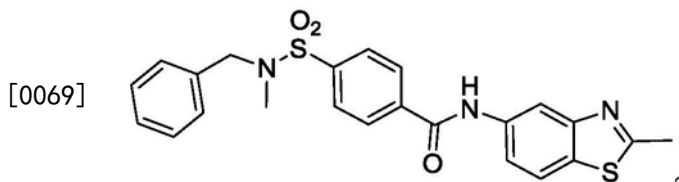
[0065]



[0066] cccDNA形成抑制剂

[0067] 共价闭环状DNA (cccDNA) 是在细胞核中由病毒rcDNA产生且充当病毒mRNA的转录模板。如本文所描述,术语“cccDNA形成抑制剂”包括能够直接或间接抑制cccDNA的形成和/或稳定性的化合物。举例来说,cccDNA形成抑制剂可包括但不限于抑制衣壳分解、rcDNA进入细胞核中和/或rcDNA转化成cccDNA的任何化合物。举例来说,在某些实施方案中,所述抑制剂可检测地抑制如例如使用本文所描述的测定所测量的cccDNA的形成和/或稳定性。在某些实施方案中,所述抑制剂使cccDNA的形成和/或稳定性抑制了至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

[0068] 术语cccDNA形成抑制剂包括描述于国际专利申请公开案第W02013130703号中的化合物,包括以下化合物:



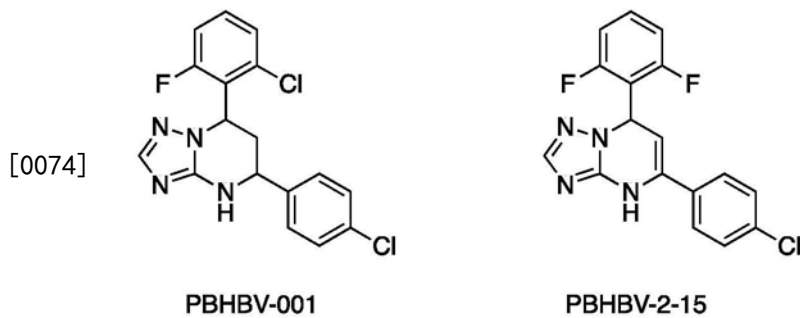
[0070] 术语cccDNA形成抑制剂包括但不限于大体地且特定地描述于美国专利申请公开案第2015/0038515A1号中的那些。术语cccDNA形成抑制剂包括但不限于1-(苯基磺酰基)-N-(吡啶-4-基甲基)-1H-吡啶-2-甲酰胺;1-苯磺酰基-吡咯烷-2-甲酸(吡啶-4-基甲基)-酰胺;2-(2-氯-N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(4-氯-N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-(三氟甲基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-4-甲氧基苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-((1-甲基哌啶-4-基)甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(哌啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)丙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-3-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)

苯基磺酰胺基)-N-(嘧啶-5-基甲基)乙酰胺;2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(嘧啶-4-基甲基)乙酰胺;2-(N-(5-氯-2-氟苯基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基甲基)乙酰胺;2-[(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-(4-氟-苯磺酰基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-乙酰胺;2-[(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-(甲苯-4-磺酰基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-溴-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-[4-(4-甲基-哌嗪-1-基)-苯甲基]-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-苯甲基]-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-苯甲基-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-乙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-丙酰胺;2-[苯磺酰基-(2-氟-5-三氟甲基-苯基)-氨基]-N-吡啶-4-基甲基-乙酰胺;4-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-N-(吡啶-4-基-甲基)丁酰胺;4-((2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-乙酰胺基)-甲基)-1,1-二甲基哌啶-1-鎓氟化物;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-氯-5-三氟甲基-苯基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-甲基-1H-吡啶-5-基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-5-基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-6-基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-(2-甲基-苯并噻唑-6-基)-苯甲酰胺;4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-N-吡啶-4-基甲基-苯甲酰胺;N-(2-氨基乙基)-2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-乙酰胺;N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)-N-(2-(3,4-二氢-2,6-萘啶-2(1H)-基)-2-氧代乙基)苯磺酰胺;N-苯并噻唑-6-基-4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-苯甲酰胺;N-苯并噻唑-6-基-4-(苯甲基-甲基-氨磺酰基)-苯甲酰胺;2-(2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)乙酰胺基)-乙基)氨基甲酸叔丁酯;和4-((2-(N-(2-氯-5-(三氟甲基)苯基)苯基磺酰胺基)-乙酰胺基)-甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯和(任选地)其组合。

[0071] sAg分泌抑制剂

[0072] 如本文所描述,术语“sAg分泌抑制剂”包括能够直接或间接抑制从HBV感染的细胞分泌带有sAg(S、M和/或L表面抗原)的亚病毒粒子和/或含有DNA的病毒粒子的化合物。举例来说,在某些实施方案中,所述抑制剂可检测地抑制sAg的分泌,如例如使用本领域中已知或本文所描述的分析(例如ELISA分析)或通过蛋白质印迹法所测量。在某些实施方案中,所述抑制剂使sAg的分泌抑制了至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。在某些实施方案中,所述抑制剂使患者的血清sAg水平降低至少5%、至少10%、至少20%、至少50%、至少75%或至少90%。

[0073] 术语sAg分泌抑制剂包括描述于美国专利第8,921,381号中的化合物以及描述于美国专利申请公开案第2015/0087659和2013/0303552号中的化合物。举例来说,该术语包括化合物PBHBV-001和PBHBV-2-15,及其药学上可接受的盐:



[0075] 免疫刺激剂

[0076] 术语“免疫刺激剂”包括能够调节免疫反应(例如刺激免疫反应(例如佐剂))的化合物。术语免疫刺激剂包括聚肌苷酸:聚胞苷酸(poly I:C)和干扰素。

[0077] 术语免疫刺激剂包括IFN基因刺激因子(STING)激动剂和白介素。该术语还包括HBsAg释放抑制剂、TLR-7激动剂(GS-9620、RG-7795)、T细胞刺激剂(GS-4774)、RIG-1抑制剂(SB-9200)和SMAC-模拟物(Birinapant)。术语免疫刺激剂还包括抗PD-1抗体及其片段。

[0078] 寡聚核苷酸

[0079] 术语靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸包括Arrowhead-ARC-520(参见美国专利第8,809,293号;和Wooddell CI等人,Molecular Therapy,2013,21,5,973-985)。

[0080] 寡聚核苷酸可经设计以靶向HBV基因组的一个或多个基因和/或转录物。此类siRNA分子的实例为本文在表A中所阐述的siRNA分子。

[0081] 靶向乙型肝炎基因组的术语寡聚核苷酸还包括分离的双链siRNA分子,其各自包括有义链和与有义链杂交的反义链。siRNA靶向HBV基因组的一个或多个基因和/或转录物。siRNA分子的实例为本文在表A中阐述的siRNA分子。

[0082] 在另一方面,该术语包括本文在表B中所阐述的分离的有义链和反义链。

[0083] 术语“乙型肝炎病毒”(缩写为HBV)是指正嗜肝DNA病毒属的病毒种类,其为嗜肝DNA病毒科的病毒的一部分,且能够在人体内引起肝脏炎症。

[0084] 术语“丁型肝炎病毒”(缩写为HDV)是指丁型肝炎病毒属的病毒种类,其能够在人体内引起肝脏炎症。

[0085] 如本文所用的术语“小干扰RNA”或“siRNA”是指能够当siRNA位于与目标基因或序列相同的细胞中时降低或抑制目标基因或序列的表达(例如通过调节与siRNA序列互补的mRNA的降解或抑制其翻译)的双链RNA(即双链体RNA)。siRNA可与目标基因或序列具有实质或完全一致性,或可包含错配的区域(即错配基序)。在某些实施方案中,siRNA的长度可为约19-25个(双链体)核苷酸,且优选地长度为约20-24个、21-22个或21-23个(双链体)核苷酸。siRNA双链体可包含约1个至约4个核苷酸或约2个至约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸酯末端。siRNA的实例包括但不限于由两个单独链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链为有义链而另一条链为互补反义链。

[0086] 优选地,siRNA为化学合成的。也可通过用大肠杆菌(E.coli)RNA酶III或Dicer裂解较长的dsRNA(例如长度大于约25个核苷酸的dsRNA)来产生siRNA。这些酶将dsRNA加工成生物活性siRNA(参见例如Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:9942-9947(2002); Calegari等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:14236(2002); Byrom等人,Ambion TechNotes,10(1):4-6(2003); Kawasaki等人,Nucleic Acids Res.,31:981-987(2003);

Knight等人, *Science*, 293:2269-2271 (2001); 和Robertson等人, *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)。优选地, dsRNA的长度为至少50个核苷酸至约100、200、300、400或500个核苷酸。dsRNA的长度可长达1000、1500、2000、5000个核苷酸或更长。dsRNA可编码整个基因转录物或部分基因转录物。在某些情况下, siRNA可由质粒编码(例如转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。

[0087] 词组“抑制目标基因的表达”是指siRNA使目标基因(例如HBV基因组内的基因)的表达沉默、降低或受到抑制的能力。为检验基因沉默的程度, 将测试样品(例如来自表达目标基因的相关有机体的生物样品或表达目标基因的培养物中的细胞样品)与使目标基因的表达沉默、降低或受到抑制的siRNA接触。将目标基因在测试样品中的表达与目标基因在不与siRNA接触的对照样品(例如来自表达目标基因的相关有机体的生物样品或表达目标基因的培养物中的细胞样品)中的表达相比较。可为对照样品(例如表达目标基因的样品)分配100%的值。在特定实施方案中, 当测试样品的值相对于对照样品(例如仅缓冲液、靶向不同基因的siRNA序列、错义siRNA序列等)为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时达成目标基因的表达的沉默、抑制或降低。适合的测定包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术检验蛋白质或mRNA水平, 诸如本领域技术人员已知的斑点印迹法、Northern印迹法、原位杂交法、ELISA、免疫沉淀法、酶功能测定以及表型测定。治疗性核酸(诸如siRNA)的“有效量”或“治疗有效量”为与在不存在siRNA的情况下检测到的正常表达水平相比足以产生所要效应(例如对目标序列的表达的抑制)的量。在特定实施方案中, 当相对于对照(例如仅缓冲液、靶向不同基因的siRNA序列、错义siRNA序列等)使用siRNA所获得的值为约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或0%时达成对目标基因或目标序列的表达的抑制。适合用于测量目标基因或目标序列的表达的测定包括但不限于使用本领域技术人员已知的技术检验蛋白质或mRNA水平, 诸如本领域技术人员已知的斑点印迹法、Northern印迹法、原位杂交法、ELISA、免疫沉淀法、酶功能测定以及表型测定。

[0088] 如本文所用的术语“核酸”是指呈单链或双链形式的含有至少两个核苷酸(即脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)的聚合物且包括DNA和RNA。“核苷酸”含有脱氧核糖(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基键联在一起。“碱基”包括嘌呤和嘧啶, 其还包括天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物, 其包括但不限于放置诸如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸酯和卤代烷的新的反应基团的修饰形式。核酸包括含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸, 其为合成的、天然存在的和非天然存在的, 且其具有与参考核酸类似的结合特性。此类类似物和/或经修饰残基的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2'-O-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。另外, 核酸可包括一个或多个UNA部分。

[0089] 术语“核酸”包括任何寡核苷酸或多核苷酸, 其中含有至多60个核苷酸的片段通常称为寡核苷酸, 而更长的片段称为多核苷酸。脱氧核糖寡核苷酸由称为脱氧核糖的5-碳糖

在此糖的5'和3'碳处共价连接至磷酸酯以形成交替无枝化聚合物而组成。DNA可呈例如反义分子、质粒DNA、预凝聚DNA、PCR产物、载体、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些基团的衍生物和组合的形式。核糖寡核苷酸由其中5-碳糖为核糖的类似重复结构组成。RNA可呈例如小干扰RNA (siRNA)、Dicer-受质dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、不对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、病毒RNA (vRNA) 及其组合的形式。因此,术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”是指由天然存在的碱基、糖和糖间(主链)键联组成的核苷酸或核苷单体的聚合物或寡聚物。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”还包括包含非天然存在的单体或其类似地发挥作用的部分的聚合物或寡聚物。此类经修饰或取代的寡核苷酸因诸如增强的细胞摄入、降低的免疫原性和在核酸酶存在下增加的稳定性的特性而往往优于天然形式。

[0090] 除非另外指出,否则特定核酸序列也隐式地涵盖其经保守修饰的变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体来说,可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来达成简并密码子取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.,19:5081(1991); Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.,260:2605-2608(1985);Rossolini等人,Mol.Cell.Probes,8:91-98(1994))。

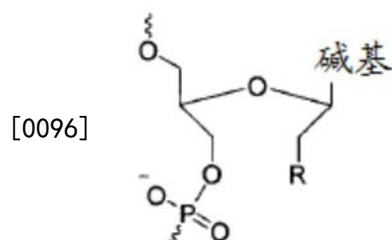
[0091] “分离的”或“纯化的”DNA分子或RNA分子为远离天然环境存在的DNA分子或RNA分子。分离的DNA分子或RNA分子可以纯化形式存在或可存在于非天然环境(诸如转基因宿主细胞)中。举例来说,“分离的”或“纯化的”的核酸分子或其生物活性部分基本上不含其他细胞物质,或当通过重组技术产生时基本上不含培养基,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品。在一个实施方案中,“分离的”的核酸不含在核酸所来源的有机体的基因组DNA中天然地侧接核酸的序列(即位于核酸的5'和3'末端的序列)。举例来说,在不同的实施方案中,分离的核酸分子可含有在核酸所来源的细胞的基因组DNA中天然地侧接核酸分子的小于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的核苷酸序列。

[0092] 术语“基因”是指包含为制备多肽或前体多肽所必需的部分长度或整个长度的编码序列的核酸(例如DNA或RNA)序列。

[0093] 如本文所用,“基因产物”是指基因的产物,诸如RNA转录物或多肽。

[0094] 术语“解锁核碱基类似物”(缩写为“UNA”)是指其中核糖环的C2'和C3'原子未共价键联的非环核碱基。术语“解锁核碱基类似物”包括具有以下识别为结构A的结构核碱基类似物:

[0095] 结构A



[0097] 其中R为羟基,且碱基为任何天然或非天然碱基,诸如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)。UNA包括在美国专利第8,314,227号中识别为非环2'-3'-断-核苷酸单体的分子。

[0098] 术语“脂质”是指一组有机化合物,其包括但不限于脂肪酸的酯且特征在于不溶于

水,但可溶于许多有机溶剂。其通常分成至少三个类别:(1)“简单脂质”,其包括脂肪和油以及蜡;(2)“复合脂质”,其包括磷脂和糖脂;和(3)“衍生脂质”,诸如类固醇。

[0099] 术语“脂质粒子”包括可用于将治疗性核酸(例如siRNA)递送至相关目标部位(例如细胞、组织、器官和类似部位)的脂质制剂。在优选实施方案中,脂质粒子通常由阳离子脂质、非阳离子脂质和任选地存在的防止粒子聚集的缀合型脂质形成。包括核酸分子(例如siRNA分子)的脂质粒子称为核酸-脂质粒子。通常,核酸完全包封于脂质粒子内,由此防止核酸发生酶促降解。

[0100] 在某些情况下,核酸-脂质粒子极其适合用于全身应用,因为其在静脉内(i.v.)注射后可展现延长的循环寿命,其可在远端部位(例如与施用部位实体上隔开的部位)累积,且其可介导目标基因在这些远端部位的表达的沉默。核酸可与凝聚剂复合且包封于脂质粒子内,如PCT公开案第WO 00/03683号中所阐述,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0101] 脂质粒子通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm的平均直径,且为实质上无毒的。此外,核酸当存在于脂质粒子中时在水溶液中能抵抗核酸酶降解。核酸-脂质粒子及其制备方法公开于例如美国专利公开案第20040142025号和第20070042031号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0102] 如本文所用,“包封的脂质”可指为治疗性核酸(诸如siRNA)提供完全包封、部分包封或两者的脂质粒子。在一个优选实施方案中,核酸(例如siRNA)完全包封于脂质粒子中(例如以形成核酸-脂质粒子)。

[0103] 术语“脂质缀合物”是指抑制脂质粒子的聚集的缀合型脂质。此类脂质缀合物包括但不限于PEG-脂质缀合物,诸如偶合至二烷氧基丙基的PEG(例如PEG-DAA缀合物)、偶合至二酰基甘油的PEG(例如PEG-DAG缀合物)、偶合至胆固醇的PEG、偶合至磷脂酰乙醇胺的PEG和结合至神经酰胺的PEG(参见例如美国专利第5,885,613号)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如POZ-DAA缀合物)、聚酰胺寡聚物(例如ATTA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的其他实例描述于PCT公开案第WO 2010/006282号中。PEG或POZ可直接缀合至脂质或可经由接头部分键联至脂质。可使用适合用于将PEG或POZ偶合至脂质的任何接头部分,包括例如不含酯接头部分和含酯接头部分。在某些优选实施方案中,使用不含酯接头部分,诸如酰胺或氨基甲酸酯。

[0104] 术语“两亲性脂质”部分指其中脂质材料的疏水性部分取向至疏水相中,而亲水性部分朝向水相取向的任何适合的材料。亲水性特征源于极性或带电荷基团的存在,诸如碳水化合物、磷酸酯、羧酸、硫酸根合、氨基、硫氢基、硝基、羟基和其他类似基团。可通过包括非极性基团来赋予疏水性,所述非极性基团包括但不限于长链饱和和不饱和脂肪族烃基且此类基团由一个或多个芳族、环脂族或杂环基取代。两亲性化合物的实例包括但不限于磷脂、氨基脂和神经鞘脂。

[0105] 磷脂的代表性实例包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂

酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。不含磷的其他化合物(诸如神经鞘脂、糖神经鞘脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸)也在命名为两亲性脂质的基团内。另外,上文所描述的两亲性脂质可与包括三酸甘油酯和固醇的其他脂质混合。

[0106] 术语“中性脂类”是指在所选pH值下以不带电荷或中性的两性离子形式存在的许多脂质种类中的任一种。在生理pH值下,此类脂质包括例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、神经鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0107] 术语“非阳离子脂质”是指任何两亲性脂质以及任何其他中性脂类或阴离子脂质。

[0108] 术语“阴离子脂质”是指在生理pH值下带负电荷的任何脂质。这些脂质包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)和连接至中性脂质的其他阴离子修饰基团。

[0109] 术语“疏水性脂质”是指具有包括但不限于长链饱和和不饱和脂肪族烃基的非极性基团的化合物,且此类基团任选地由一个或多个芳族、环脂族或杂环基取代。适合的实例包括但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0110] 术语“阳离子脂质”和“氨基脂”在本文中可互换地用于包括具有一个、两个、三个或更多个脂肪酸或脂肪烷基链和pH可滴定的氨基头部基团(例如烷基氨基或二烷基氨基头部基团)的那些脂质及其盐。阳离子脂质在低于阳离子脂质的 pK_a 的pH值下通常为质子化的(即带正电荷的),且在高于 pK_a 的pH值下为实质上中性的。阳离子脂质也可称为可滴定阳离子脂质。在一些实施方案中,阳离子脂质包含:可质子化叔胺(例如pH可滴定)头部基团; C_{18} 烷基链,其中各烷基链独立地具有0至3(例如0、1、2或3)个双键;和头部基团与烷基链之间的醚、酯或缩酮键联。此类阳离子脂质包括但不限于DSDMA、DODMA、DLinDMA、DLenDMA、 γ -DLenDMA、DLin-K-DMA、DLin-K-C2-DMA(也称为DLin-C2K-DMA、XTC2和C2K)、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLen-C2K-DMA、 γ -DLen-C2K-DMA、DLin-M-C2-DMA(也称为MC2)和DLin-M-C3-DMA(也称为MC3)。

[0111] 术语“盐”包括任何阴离子和阳离子复合物,诸如阳离子脂质与一种或多种阴离子之间形成的复合物。阴离子的非限制性实例包括无机和有机阴离子,例如氢离子、氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、草酸根(例如半草酸根)、磷酸根、膦酸根、磷酸氢根、磷酸二氢根、氧离子、碳酸根、碳酸氢根、硝酸根、亚硝酸根、氮离子、亚硫酸氢根、硫离子、亚硫酸根、硫酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根、硫酸氢根、硼酸根、甲酸根、乙酸根、苯甲酸根、柠檬酸根、酒石酸根、乳酸根、丙烯酸根、聚丙烯酸根、富马酸根、顺丁烯二酸根、衣康酸根、羟乙酸根、葡糖酸根、苹果酸根、苦杏仁酸根、惕各酸根、抗坏血酸根、水杨酸根、聚甲基丙烯酸根、过氯酸根、氯酸根、亚氯酸根、次氯酸根、溴酸根、次溴酸根、碘酸根、烷基磺酸根、芳基磺酸根、砷酸根、亚砷酸根、铬酸根、重铬酸根、氰离子、氰酸根、硫氰酸根、氢氧根、过氧离子、高锰酸根及其混合物。在特定实施方案中,本文公开的阳离子脂质的盐为结晶盐。

[0112] 术语“烷基”包括含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状、饱和脂族烃。代表性饱和直链烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基和类似基

团,而饱和支链烷基包括但不限于异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基和类似基团。代表性饱和环状烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基和类似基团,而不饱和环状烷基包括但不限于环戊烯基、环己烯基和类似基团。

[0113] 术语“烯基”包括如上文所定义的烷基,其在相邻碳原子之间含有至少一个双键。烯基包括顺式与反式异构体两者。代表性直链和支链烯基包括但不限于乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基和类似基团。

[0114] 术语“炔基”包括如上文所定义的任何烷基或烯基,其在相邻双键之间另外含有至少一个三键。代表性直链和支链炔基包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基和类似基团。

[0115] 术语“酰基”包括如下文所定义的其中连接点处的碳被氧取代的任何烷基、烯基或炔基。以下为酰基的非限制性实例: $-C(=O)$ 烷基、 $-C(=O)$ 烯基和 $-C(=O)$ 炔基。

[0116] 术语“杂环”包括5元至7元单环、或7元至10元双环、杂环,其为饱和、不饱和或芳族的,且其含有1个或2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子,且其中氮和硫杂原子可任选地被氧化,且氮杂原子可任选地被季铵化,包括其中以上杂环中的任一个与苯环的双环稠合。杂环可经由任何杂原子或碳原子连接。杂环包括但不限于如下文所定义的杂芳基,以及吗啉基、吡咯烷酮基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基(piperizynyl)、乙内酰脲基、戊内酰胺基、氧杂环丙烷基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢噻啶基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢噻唑基、四氢噻吩基、四氢噻喃基和类似基团。

[0117] 术语“任选地取代的烷基”、“任选地取代的烯基”、“任选地取代的炔基”、“任选地取代的酰基”和“任选地取代的杂环”意谓当被取代时,至少一个氢原子被取代基置换。在氧取代基($=O$)的情况下,两个氢原子被置换。在此方面,取代基包括但不限于氧代、卤素、杂环、 $-CN$ 、 $-OR^x$ 、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$,其中 n 为0、1或2, R^x 和 R^y 为相同或不同的且独立地为氢、烷基或杂环,且烷基和杂环取代基中的每一者可进一步被以下中的一者或多者取代:氧代、卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、烷基、 $-OR^x$ 、杂环、 $-NR^xR^y$ 、 $-NR^xC(=O)R^y$ 、 $-NR^xSO_2R^y$ 、 $-C(=O)R^x$ 、 $-C(=O)OR^x$ 、 $-C(=O)NR^xR^y$ 、 $-SO_nR^x$ 和 $-SO_nNR^xR^y$ 。术语“任选地被取代”当在一系列取代基之前使用时意谓系列中的取代基中的每一者可如本文所描述任选地被取代。

[0118] 术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

[0119] 术语“膜融合”是指脂质粒子与细胞的膜融合的能力。膜可为质膜或细胞器(例如核内体、细胞核等)周围的膜。

[0120] 如本文所用,术语“水溶液”是指完全或部分包含水的组合物。

[0121] 如本文所用,术语“有机脂质溶液”是指完全或部分包含具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0122] 术语“电子致密核心”当用于描述脂质粒子时是指当使用低温透射电子显微术(“cryoTEM”)目视观察时脂质粒子的内部部分的深色外观。一些脂质粒子具有电子致密核心且缺少脂质双层结构。一些脂质粒子具有电子致密核心,缺少脂质双层结构,且具有反六方相或立方相结构。虽然不希望受理论限制,但认为非双层脂质填充提供了内部含有水和核酸的脂质圆柱体的3维网状物,即基本上为与含有核酸的含水通道互相渗透的脂质微滴。

[0123] 如本文所用的“远端部位”是指实体上隔开的部位,其不受限于邻近毛细血管床,而包括广泛分布于有机体各处的部位。

[0124] 与核酸-脂质粒子相关的“血清稳定”意谓粒子在暴露于血清或会显著降解游离DNA或RNA的核酸酶测定之后未显著降解。适合的测定包括例如标准血清测定、DNA酶测定或RNA酶测定。

[0125] 如本文所用的“全身递送”是指引起诸如siRNA的活性剂在有机体内的广泛生物分布的脂质粒子递送。一些施用技术会引起某些药剂的全身递送,而其他则不会。全身递送意谓适用量、优选治疗量的药剂暴露于身体的大多数部分。为获得广泛生物分布,通常需要使得药剂在到达施用部位远端的疾病部位之前不被快速降解或清除(诸如通过第一道器官(肝脏、肺等)或通过快速、非特异性细胞结合)的血液寿命。脂质粒子的全身递送可通过本领域中已知的任何手段(包括例如静脉内、皮下和腹膜内)来进行。在一个优选实施方案中,脂质粒子的全身递送是通过静脉内递送进行。

[0126] 如本文所用的“局部递送”是指将诸如siRNA的活性剂直接递送至有机体内的目标部位。举例来说,可通过直接注射至疾病部位、其他目标部位或目标器官(诸如肝脏、心脏、胰腺、肾脏和类似器官)中来局部递送药剂。

[0127] 如本文所用的术语“病毒粒子载量”是指存在于体液(诸如血液)中的病毒粒子(例如HBV和/或HDV)的数目的量度。举例来说,粒子载量可以每毫升例如血液的病毒粒子数目来表示。可使用基于核酸扩增的测试以及不基于核酸的测试来进行粒子载量测试(参见例如Puren等人,The Journal of Infectious Diseases,201:S27-36(2010))。

[0128] 术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物物种,诸如人、小鼠、大鼠、犬、猫、仓鼠、豚鼠、兔、牲畜和类似物种。

[0129] 表A

[0130]

名称	双链体序列	IC 50 (nM)
1m	5' <u>A</u> g G u A U g u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:1) 3' <u>U</u> <u>U</u> U C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:2)	1.43
2m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:3) 3' U U C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:4)	0.37
3m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u u C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:5) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:6)	0.06
4m	5' <u>G</u> C u c A g U U U A C U A G U G C c A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:7) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g A G U C A A A u G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:8)	0.31

5m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:9) 3' U U G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:10)	0.06
6m	5' <u>C</u> u g g C U C A G U U U A C u A g U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:11) 3' U U G A C C g A g U C A A A U g A U C A C 5' (SEQ ID NO:12)	0.05
7m	5' <u>C</u> C G U g u G C A C U u C G C u U C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:13) 3' <u>U</u> <u>U</u> G g C A C A C g U G A A G C G A A G U 5' (SEQ ID NO:14)	0.06
8m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:15) 3' <u>U</u> <u>U</u> C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:16)	0.24
9m	5' <u>A</u> g G u A U G u U G C C C g U u U G U <u>U</u> <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:17) 3' <u>U</u> <u>U</u> u C C A u A C A A C G G g C A A A C A 5' (SEQ ID NO:18)	0.13
10m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:19) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:20)	0.34

[0131]

11m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C g g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:21) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:22)	0.31
12m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:23) 3' U U C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:24)	0.16
13m	5' <u>G</u> C C g A u C C A U A C u g C G g A A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:25) 3' <u>U</u> <u>U</u> C g G C U A g G U A U g A C G C C U U 5' (SEQ ID NO:26)	0.2
14m	5' <u>G</u> C u C A g U U U A C u A g U G C C A U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:27) 3' U U C G A G u C A A A U G A U C A C G G U 5' (SEQ ID NO:28)	0.16
15m	5' <u>C</u> u g G C u C A G U U u A C U A G U G U <u>U</u> 3' (SEQ ID NO:29) 3' <u>U</u> <u>U</u> G A C C g A G U C A A A U G A U C A C 5' (SEQ ID NO:30)	0.17

小写=2'-O-甲基修饰
下划线=UNA部分

[0132] 寡核苷酸 (诸如阐述于表B中的有义和反义RNA链) 与目标多核苷酸序列特异性杂交或互补。如本文所用的术语“可特异性杂交”和“互补”指示足以使得DNA或RNA目标与寡核苷酸之间发生稳定和特异性结合的互补程度。应了解,寡核苷酸不需要与其要可特异性杂交的目标核酸序列100%互补。在优选实施方案中,当寡核苷酸结合至目标序列妨碍目标序

列的正常功能从而引起由其产生的效用或表达损失,且存在在需要特异性结合的条件下,即在体内测定或治疗性治疗的情况下的生理条件下或在体外测定的情况下在进行测定的条件下足以避免寡核苷酸非特异性结合至非目标序列的互补程度时,寡核苷酸为可特异性杂交的。因此,寡核苷酸与其所靶向或与其特异性杂交的基因或mRNA序列的区域相比可包括1、2、3或更多个碱基取代。

[0133] 表B.

名称	有义序列(5'-3')	反义序列(5' - 3')
[0134] 1m	<u>AgGuAUguUGCCCgUuUGUUU</u> (SEQ ID NO:1)	<u>ACAAACgGGCAACAuACCUU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:2)
2m	<u>GCucAgUUUACUAGUGCcAUU</u> (SEQ ID NO:3)	<u>UGGCACUAGuAAACUGAgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:4)
3m	<u>CCGUguGCACUuCGCuuCAUU</u> (SEQ ID NO:5)	<u>UGAAGCGAAGUgCACACgGU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:6)
4m	<u>GCucAgUUUACUAGUGCcAUU</u> (SEQ ID NO:7)	<u>UGGCACUAGuAAACUGAgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:8)
5m	<u>CCGUguGCACUuCGCuUCAUU</u> (SEQ ID NO:9)	<u>UGAAGCGAAGUgCACACgGU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:10)
6m	<u>CuggCUCAGUUUACuAgUGUU</u> (SEQ ID NO:11)	<u>CACUAgUAAACUgAgCCAGU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:12)
7m	<u>CCGUguGCACUuCGCuUCAUU</u> (SEQ ID NO:13)	<u>UGAAGCGAAGUgCACACgGU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:14)
8m	<u>GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU</u> (SEQ ID NO:15)	<u>UGGCACUAGUAAACuGAGC</u> <u>UU</u> (SEQ ID NO:16)
9m	<u>AgGuAUGuUGCCCgUuUGUUU</u> (SEQ ID NO:17)	<u>ACAAACgGGCAACAuACCuU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:18)
[0135] 10m	<u>GCCgAuCCAUACugCggAAUU</u> (SEQ ID NO:19)	<u>UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:20)
11m	<u>GCCgAuCCAUACugCggAAUU</u> (SEQ ID NO:21)	<u>UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:22)
12m	<u>GCCgAuCCAUACugCGgAAUU</u> (SEQ ID NO:23)	<u>UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:24)
13m	<u>GCCgAuCCAUACugCGgAAUU</u> (SEQ ID NO:25)	<u>UUCCGCAgUAUGgAUCGgCU</u> <u>U</u> (SEQ ID NO:26)
14m	<u>GCuCAgUUUACuAgUGCCAUU</u> (SEQ ID NO:27)	<u>UGGCACUAGUAAACuGAGC</u> <u>UU</u> (SEQ ID NO:28)
15m	<u>CugGCuCAGUUuACUAGUGUU</u> (SEQ ID NO:29)	<u>CACUAGUAAACUGAgCCAG</u> <u>UU</u> (SEQ ID NO:30)
小写= 2'O-甲基修饰 下划线= UNA 部分		

[0136] 产生siRNA分子

[0137] 可以若干形式提供siRNA,包括例如以一种或多种分离的小干扰RNA(siRNA)双链体的形式、以较长双链RNA(dsRNA)的形式或以在DNA质粒中从转录盒转录的siRNA或dsRNA的形式。在一些实施方案中,可以酶促方式或通过部分/完全有机合成来产生siRNA,且可通过体外酶促或有机合成来引入经修饰的核糖核苷酸。在某些情况下,各链是以化学方式制

备的。合成RNA分子的方法为本领域中已知的,例如如Verma和Eckstein(1998)中所描述或如本文所描述的化学合成方法。

[0138] 分离RNA、合成RNA、杂交核酸、制备和筛选cDNA文库和进行PCR的方法为本领域中熟知的(参见例如Gubler和Hoffman, *Gene*, 25:263-269(1983); Sambrook等人, 同上; Ausubel等人, 同上), PCR方法同样如此(参见美国专利第4,683,195号和第4,683,202号; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis等人编, 1990))。表达文库也是本领域技术人员熟知的。公开常用方法的其他基础文本包括Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第2版1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 和 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人编, 1994)。这些参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0139] 通常, siRNA为化学合成的。包含siRNA分子的寡核苷酸可使用本领域中已知的多种技术中的任一种来合成, 此类技术诸如描述于Usman等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845(1987); Scaringe等人, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433(1990); Wincott等人, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684(1995); 和Wincott等人, *Methods Mol. Bio.*, 74:59(1997)中的那些。寡核苷酸的合成利用常用的核酸保护和偶合基团, 诸如在5'-末端的二甲氧基三苯甲基和在3'-末端的亚磷酰胺。作为非限制性实例, 可在Applied Biosystems合成器上使用0.2 μ mol规模方案进行小规模合成。或者, 可在来自Protogene (Palo Alto, CA)的96孔板合成器上进行0.2 μ mol规模的合成。然而, 更大或更小规模的合成也在范围内。适合用于寡核苷酸合成的试剂、用于RNA去保护的方法和用于RNA纯化的方法为本领域技术人员已知的。

[0140] siRNA分子可由两个不同的寡核苷酸组装而成, 其中一个寡核苷酸包含有义链而另一个包含siRNA的反义链。举例来说, 各链可分开合成且在合成和/或去保护之后通过杂交或连结而连接在一起。

[0141] 含有治疗性核酸的载体系统

[0142] 脂质粒子

[0143] 脂质粒子可包含一种或多种siRNA(例如描述于表A中的siRNA分子)、阳离子脂质、非阳离子脂质和抑制粒子聚集的缀合型脂质。在一些实施方案中, siRNA分子完全包封于脂质粒子的脂质部分内, 使得脂质粒子中的siRNA分子在水溶液中能抵抗核酸酶降解。在其他实施方案中, 本文所描述的脂质粒子对诸如人的哺乳动物为实质上无毒的。脂质粒子通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm或约70至约90nm的平均直径。在某些实施方案中, 脂质粒子具有约30nm至约150nm的中值直径。脂质粒子还通常具有约1:1至约100:1、约1:1至约50:1、约2:1至约25:1、约3:1至约20:1、约5:1至约15:1或约5:1至约10:1的脂质:核酸比率(例如脂质:siRNA比率)(质量/质量比)。在某些实施方案中, 核酸-脂质粒子具有约5:1至约15:1的脂质:siRNA质量比。

[0144] 脂质粒子包括血清稳定的核酸-脂质粒子, 其包含一种或多种siRNA分子(例如如表A中所描述的siRNA分子)、阳离子脂质(例如如本文所阐述的一种或多种式I-III的阳离子脂质或其盐)、非阳离子脂质(例如一种或多种磷脂与胆固醇的混合物)和抑制粒子聚集的缀合型脂质(例如一种或多种PEG-脂质缀合物)。脂质粒子可包含靶向本文所描述的基因中的一者或多者的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种siRNA分子(例如描述于表A中的siRNA分子)。核酸-脂质粒子及其制备方法描述于例如美国专利第5,753,613号; 第5,785,

992号;第5,705,385号;第5,976,567号;第5,981,501号;第6,110,745号;和第6,320,017号;和PCT公开案第W0 96/40964号中,其公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0145] 在核酸-脂质粒子中,一种或多种siRNA分子(例如如表A中所描述的siRNA分子)可完全包封于粒子的脂质部分内,由此防止siRNA发生核酸酶降解。在某些情况下,核酸-脂质粒子中的siRNA在将粒子在37℃下暴露于核酸酶至少约20、30、45或60分钟之后基本上不降解。在某些其他情况下,核酸-脂质粒子中的siRNA在将粒子在37℃下在血清中孵育至少约30、45或60分钟或至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34或36小时之后基本上不降解。在其他实施方案中,siRNA与粒子的脂质部分复合。所述制剂的益处之一是核酸-脂质粒子组合物对诸如人的哺乳动物实质上无毒的。

[0146] 术语“完全包封”表明核酸-脂质粒子中的siRNA(例如如表A中所描述的siRNA分子)在暴露于血清或将大量降解游离DNA或RNA核酸酶测定之后未大量降解。在完全包封的系统中,在一般将降解100%的游离siRNA的治疗中,优选粒子中少于约25%的siRNA降解,更优选粒子中少于约10%,且最优选少于约5%的siRNA降解。“完全包封”还表明核酸-脂质粒子为血清稳定的,即其在体内施用后不快速分解成其组成部分。

[0147] 在核酸的情形中,可通过进行膜不可渗透性荧光染料排除测定来确定完全包封,所述测定使用当与缔合相关时具有增强的荧光的染料。特定染料(诸如OliGreen[®]和RiboGreen[®](Invitrogen Corp.;Carlsbad,CA))可用于质粒DNA、单链脱氧核糖核苷酸和/或单链或双链核糖核苷酸的定量测定。通过添加染料至脂质体制剂,测量所得荧光,且将其与添加少量非离子型洗涤剂后所观测到的荧光相比较来确定包封。洗涤剂介导的脂质体双层破坏释放包封的核酸,从而允许其与膜不可渗透性染料相互作用。核酸包封率可以 $E = (I_0 - I) / I_0$ 形式计算,其中I和I₀是指添加洗涤剂之前和之后的荧光强度(参见Wheeler等人, Gene Ther., 6:271-281(1999))。

[0148] 在一些情况下,核酸-脂质粒子组合物包含完全包封于粒子的脂质部分内的siRNA分子,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(或其任何分数或在其中的范围)的粒子具有包封于其中的siRNA。

[0149] 在其他情况下,核酸-脂质粒子组合物包含完全包封于粒子的脂质部分内的siRNA分子,使得约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约30%至约95%、约40%至约95%、约50%至约95%、约60%至约95%、约70%至约95%、约80%至约95%、约85%至约95%、约90%至约95%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%或至少约30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%(或其任何分数或在其中的范围)的输入siRNA包封于粒子中。

[0150] 视脂质粒子的预期用途而定,可改变组分的比例且可使用例如核内体释放参数(ERP)测定来测量特定制剂的递送效率。

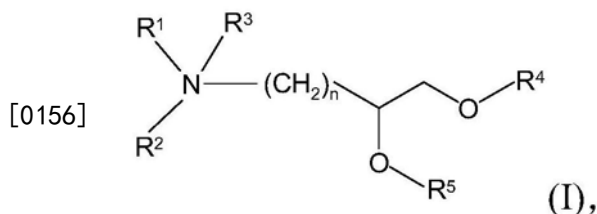
[0151] 阳离子脂质

[0152] 多种阳离子脂质或其盐中的任一种可单独或与一个或多个其他阳离子脂质种类或非阳离子脂质种类组合用于脂质粒子中。阳离子脂质包括其(R)和/或(S)对映异构体。

[0153] 在一个方面,阳离子脂质为二烷基脂质。举例来说,二烷基脂质可包括包含两个饱和或不饱和烷基链的脂质,其中烷基链中的每一者可被取代或未被取代。在某些实施方案中,两个烷基链中的每一者包含至少例如8个碳原子、10个碳原子、12个碳原子、14个碳原子、16个碳原子、18个碳原子、20个碳原子、22个碳原子或24个碳原子。

[0154] 在一个方面,阳离子脂质为三烷基脂质。举例来说,三烷基脂质可包括包含三个饱和或不饱和烷基链的脂质,其中烷基链中的每一者可被取代或未被取代。在某些实施方案中,三个烷基链中的每一者包含至少例如8个碳原子、10个碳原子、12个碳原子、14个碳原子、16个碳原子、18个碳原子、20个碳原子、22个碳原子或24个碳原子。

[0155] 在一个方面,具有以下结构的式I的阳离子脂质:



[0157] 或其盐为适用的,其中:

[0158] R^1 和 R^2 为相同或不同的且独立地为氢(H)或任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基,或 R^1 和 R^2 可连接以形成具有4至6个碳原子和1或2个选自由氮(N)、氧(O)及其混合物组成的组的杂原子的任选地取代的杂环;

[0159] R^3 不存在或为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供季胺;

[0160] R^4 和 R^5 为相同或不同的且独立地为任选地取代的 C_{10} - C_{24} 烷基、 C_{10} - C_{24} 烯基、 C_{10} - C_{24} 炔基或 C_{10} - C_{24} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中的至少一者包含至少两个不饱和部位;且

[0161] n 为0、1、2、3或4。

[0162] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选地取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个优选实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在其他优选实施方案中, n 为1或2。在其他实施方案中,当pH值高于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 不存在,且当pH值低于阳离子脂质的 pK_a 而使氨基头部基团质子化时 R^3 为氢。在一个替代实施方案中, R^3 为任选地取代的 C_1 - C_4 烷基以提供季胺。在其他实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选地取代的 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烷基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 烯基、 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 炔基或 C_{12} - C_{20} 或 C_{14} - C_{22} 酰基,其中 R^4 和 R^5 中的至少一者包含至少两个不饱和部位。

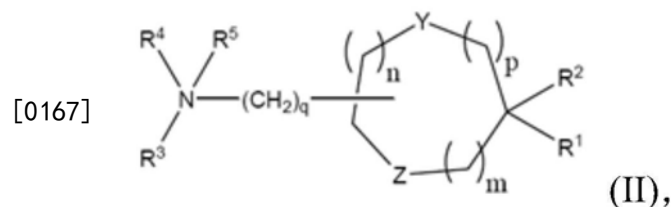
[0163] 在某些实施方案中, R^4 和 R^5 独立地选自由以下组成的组:十二碳二烯基部分、十四碳二烯基部分、十六碳二烯基部分、十八碳二烯基部分、二十碳二烯基部分、十二碳三烯基部分、十四碳三烯基部分、十六碳三烯基部分、十八碳三烯基部分、二十碳三烯基部分、花生四烯酰基部分和二十二碳六烯酰基部分以及其酰基衍生物(例如亚油酰基、亚麻酰基, γ -亚麻酰基等)。在一些情况下, R^4 和 R^5 中的一者包含支链烷基(例如植烷基部分)或其酰基衍

生物(例如植烷酰基部分)。在某些情况下,十八碳二烯基部分为亚油烯基部分。在某些其他情况下,十八碳三烯基部分为亚麻烯基部分或 γ -亚麻烯基部分。在某些实施方案中, R^4 和 R^5 均为亚油烯基部分、亚麻烯基部分或 γ -亚麻烯基部分。在特定实施方案中,式I的阳离子脂质为1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚麻烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二亚油烯基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDMA)、1,2-二亚油酰基氧基-(N,N-二甲基)-丁基-4-胺(C2-DLinDAP)或其混合物。

[0164] 在一些实施方案中,式I的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个特定实施方案中,式I的阳离子脂质为其草酸盐(例如半草酸盐),其优选为结晶盐。

[0165] 诸如DLinDMA和DLenDMA的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于美国专利公开案第20060083780号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如C2-DLinDMA和C2-DLinDAP的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于国际专利申请第W02011/000106号中,所述专利申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0166] 在另一方面,具有以下结构的式II的阳离子脂质(或其盐)为适用的:



[0168] 其中 R^1 和 R^2 为相同或不同的且独立地为任选地取代的 C_{12} - C_{24} 烷基、 C_{12} - C_{24} 烯基、 C_{12} - C_{24} 炔基或 C_{12} - C_{24} 酰基; R^3 和 R^4 为相同或不同的且独立地为任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基或 R^3 和 R^4 可连接以形成具有4至6个碳原子和1或2个选自氮和氧的杂原子的任选地取代的杂环; R^5 不存在或为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供季胺; m 、 n 和 p 为相同或不同的且独立地为0、1或2,前提条件为 m 、 n 和 p 不同时为0; q 为0、1、2、3或4;和Y和Z为相同或不同的且独立地为O、S或NH。在一个优选实施方案中, q 为2。

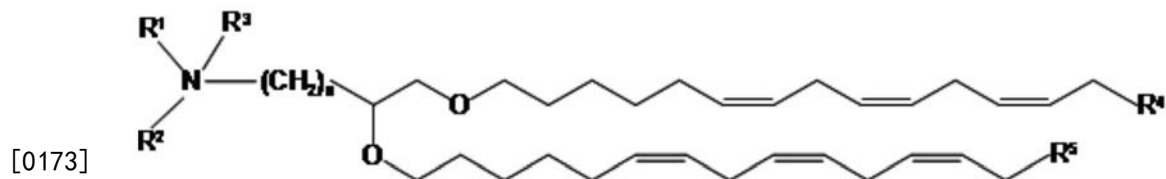
[0169] 在一些实施方案中,式II的阳离子脂质为2,2-二亚油烯基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C2-DMA;“XTC2”或“C2K”)、2,2-二亚油烯基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C3-DMA;“C3K”)、2,2-二亚油烯基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-C4-DMA;“C4K”)、2,2-二亚油烯基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-N-甲基哌嗪并-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-MPZ)、2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-DMA)、2,2-二油酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DO-K-DMA)、2,2-二硬脂酰基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧杂环戊烷(DS-K-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-N-(N-吗啉基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K-MA)、2,2-二亚油烯基-4-三甲基氨基-[1,3]-二氧杂环戊烷氯化物(DLin-K-TMA.Cl)、2,2-二亚油烯基-4,5-双(二甲基氨基甲基)-[1,3]-二氧杂环戊烷(DLin-K²-DMA)、2,2-二亚油烯基-4-甲基哌嗪-[1,3]-二氧杂环戊烷(D-Lin-K-N-甲基哌嗪)或其混合物。在一个实施方案中,式II的阳离子脂质为DLin-K-C2-DMA。

[0170] 在一些实施方案中,式II的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个特定实施方案中,式II的阳离子脂质为其草酸盐(例如半草酸盐),其优选为结

晶盐。

[0171] 诸如DLin-K-DMA的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于PCT公开案第WO 09/086558号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如DLin-K-C2-DMA、DLin-K-C3-DMA、DLin-K-C4-DMA、DLin-K6-DMA、DLin-K-MPZ、DO-K-DMA、DS-K-DMA、DLin-K-MA、DLin-K-TMA.Cl、DLin-K²-DMA和D-Lin-K-N-甲基哌嗪的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于2009年10月9日提交的标题为“Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的PCT申请第PCT/US2009/060251号中,所述申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0172] 在另一方面,具有以下结构的式III的阳离子脂质:



(III)

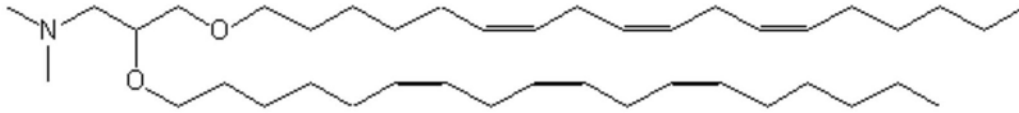
[0174] 或其盐为适用的,其中: R^1 和 R^2 为相同或不同的且独立地为任选地取代的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 烯基或 C_2 - C_6 炔基或 R^1 和 R^2 可连接以形成具有4至6个碳原子和1或2个选自自由氮(N)、氧(O)及其混合物组成的组的杂原子的任选地取代的杂环; R^3 不存在或为氢(H)或 C_1 - C_6 烷基以提供季胺; R^4 和 R^5 不存在或存在且当存在时为相同或不同的且独立地为任选地取代的 C_1 - C_{10} 烷基或 C_2 - C_{10} 烯基;和n为0、1、2、3或4。

[0175] 在一些实施方案中, R^1 和 R^2 独立地为任选地取代的 C_1 - C_4 烷基、 C_2 - C_4 烯基或 C_2 - C_4 炔基。在一个优选实施方案中, R^1 和 R^2 均为甲基。在另一个优选实施方案中, R^4 和 R^5 均为丁基。在另一个优选实施方案中,n为1。在其他实施方案中,当pH值高于阳离子脂质的 pK_a 时 R^3 不存在,且当pH值低于阳离子脂质的 pK_a 而使氨基头部基团质子化时 R^3 为氢。在一个替代实施方案中, R^3 为任选地取代的 C_1 - C_4 烷基以提供季胺。在其他实施方案中, R^4 和 R^5 独立地为任选地取代的 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烷基或 C_2 - C_6 或 C_2 - C_4 烯基。

[0176] 在一个替代实施方案中,式III的阳离子脂质在氨基头部基团与烷基链中的一者或两者之间包含酯键联。在一些实施方案中,式III的阳离子脂质与一种或多种阴离子形成盐(优选结晶盐)。在一个特定实施方案中,式III的阳离子脂质为其草酸盐(例如半草酸盐),其优选为结晶盐。

[0177] 虽然式III中的烷基链中的每一个在位置6、9和12处含有顺式双键(即顺,顺,顺- Δ^6 , Δ^9 , Δ^{12}),但在一个替代实施方案中,在一个或两个烷基链中这些双键中的一个、两个或三个可呈反式构型。

[0178] 在一个特定实施方案中,式III的阳离子脂质具有以下结构:



[0179]

γ -DLenDMA (15)。

[0180] 诸如 γ -DLenDMA (15) 的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于2009年7月1日提交的标题为“Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的美国临时申请第61/222,462号中,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0181] 诸如DLin-M-C3-DMA (“MC3”)的阳离子脂质以及其他阳离子脂质(例如MC3的某些类似物)的合成描述于2009年6月10日提交的标题为“Novel Lipids and Compositions for the Delivery of Therapeutics”的美国临时申请第61/185,800号和2009年12月18日提交的标题为“Methods and Compositions for Delivery of Nucleic Acids”的美国临时申请第61/287,995号中,所述临时申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0182] 可包括于脂质粒子中的其他阳离子脂质或其盐的实例包括但不限于诸如描述于W02011/000106中的那些阳离子脂质,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中;以及诸如以下的阳离子脂质:N,N-二油烯基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-丙铵三氟乙酸盐(DOSPA)、双十八烷基酰胺基甘氨酸精胺(DOGS)、3-二甲基氨基-2-(胆固-5-烯-3- β -氧基丁-4-氧基)-1-(顺,顺-9,12-十八二烯氧基)丙烷(CLinDMA)、2-[5'-(胆固-5-烯-3- β -氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺,顺-9',12'-十八二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油烯基氧基苯甲胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)、1,2-二亚油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-吗啉基)丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油烯基硫-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油烯基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMAP)、1,2-二亚油烯基氧基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷氯盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油烯基氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油烯基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、1,2-二油烯基氨基甲酰基氧基-3-二甲基氨基丙烷(DO-C-DAP)、1,2-二肉豆蔻油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DMDAP)、1,2-二油酰基-3-三甲基氨基

基丙烷氯化物(DOTAP.Cl)、二亚油烯基甲基-3-二甲基氨基丙酸酯(DLin-M-C2-DMA;也称为DLin-M-K-DMA或DLin-M-DMA)及其混合物。可包括于脂质粒子中的其他阳离子脂质或其盐描述于美国专利公开案第20090023673号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0183] 诸如CLinDMA的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于美国专利公开案第20060240554号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如DLin-C-DAP、DLinDAC、DLinMA、DLinDAP、DLin-S-DMA、DLin-2-DMAP、DLinTMA.Cl、DLinTAP.Cl、DLinMPZ、DLinAP、DOAP和DLin-EG-DMA的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于PCT公开案第W0 09/086558号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。诸如DO-C-DAP、DMDAP、DOTAP.Cl、DLin-M-C2-DMA的阳离子脂质以及其他阳离子脂质的合成描述于2009年10月9日提交的标题为“Improved Amino Lipids and Methods for the Delivery of Nucleic Acids”的PCT申请第PCT/US2009/060251号中,所述申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。许多其他阳离子脂质和相关类似物的合成已描述于美国专利第5,208,036号;第5,264,618号;第5,279,833号;第5,283,185号;第5,753,613号;和第5,785,992号;和PCT公开案第W0 96/10390号中,所述专利的公开内容各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。另外,可使用阳离子脂质的许多商业制剂,诸如 **LIPOFECTIN[®]** (包括可购自Invitrogen的DOTMA和DOPE); **LIPOFECTAMINE[®]** (包括可购自Invitrogen的DOSPA和DOPE); 和 **TRANSFECTAM[®]** (包括可购自Promega Corp.的DOGS)。

[0184] 在一些实施方案中,阳离子脂质占存在于粒子中的总脂质的约50mol%至约90mol%、约50mol%至约85mol%、约50mol%至约80mol%、约50mol%至约75mol%、约50mol%至约70mol%、约50mol%至约65mol%、约50mol%至约60mol%、约55mol%至约65mol%或约55mol%至约70mol%(或其任何分数或在其中的范围)。在特定实施方案中,阳离子脂质占存在于粒子中的总脂质的约50mol%、51mol%、52mol%、53mol%、54mol%、55mol%、56mol%、57mol%、58mol%、59mol%、60mol%、61mol%、62mol%、63mol%、64mol%或65mol%(或其任何分数)。

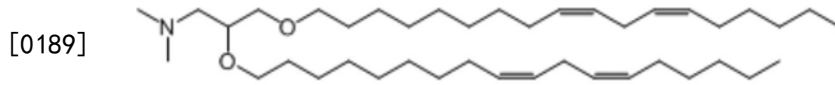
[0185] 在其他实施方案中,阳离子脂质占存在于粒子中的总脂质的约2mol%至约60mol%、约5mol%至约50mol%、约10mol%至约50mol%、约20mol%至约50mol%、约20mol%至约40mol%、约30mol%至约40mol%或约40mol%(或其任何分数或在其中的范围)。

[0186] 适合用于脂质粒子中的其他阳离子脂质百分比和范围描述于PCT公开案第W0 09/127060号、美国公开申请第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国公开申请第US 2011/0076335号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

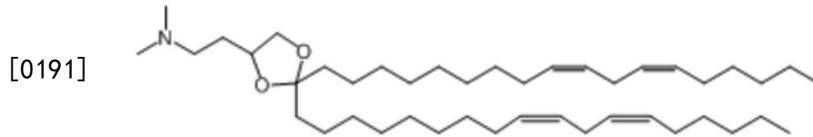
[0187] 应了解,存在于脂质粒子中的阳离子脂质的百分比为目标量,且存在于制剂中的阳离子脂质的实际量可例如按 $\pm 5\text{mol}\%$ 变化。举例来说,在一种示例性脂质粒子制剂中,阳离子脂质的目标量为 $57.1\text{mol}\%$,但阳离子脂质的实际量可为所述目标量 $\pm 5\text{mol}\%$ 、 $\pm 4\text{mol}\%$ 、 $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 或 \pm

0.1mol%，并且余量的制剂由其他脂质组分组成（累加至存在于粒子中的总脂肪物质的100mol%；然而，本领域技术人员将了解，总mol%可因四舍五入而略微偏离100%，例如为99.9mol%或100.1mol%）。

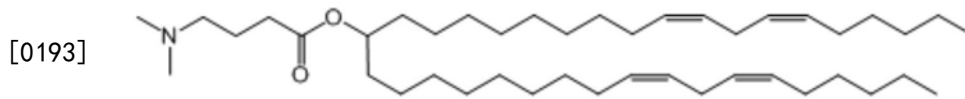
[0188] 以下显示适合包括于脂质粒子中的阳离子脂质的其他实例：



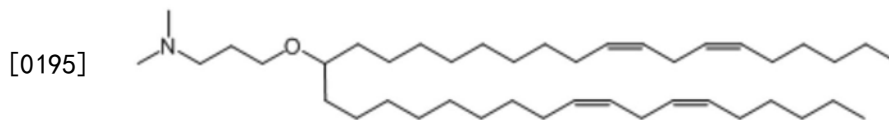
[0190] N,N-二甲基-2,3-双((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基氧基)丙-1-胺(5)



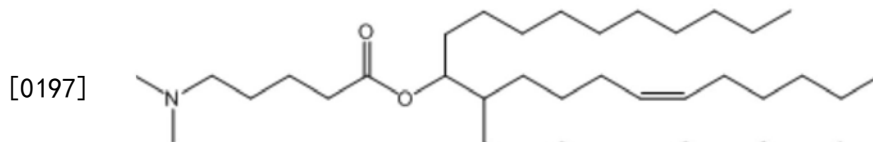
[0192] 2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)-N,N-二甲基乙胺(6)



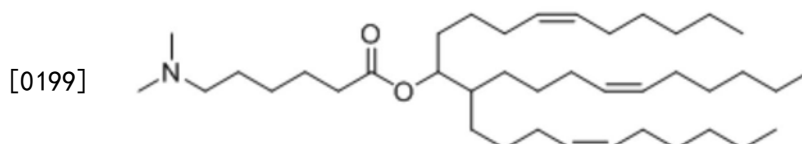
[0194] 4-(二甲基氨基)丁酸(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基酯(7)



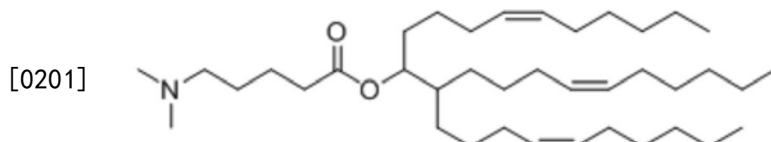
[0196] 3-((6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七-6,9,28,31-四烯-19-基氧基)-N,N-二甲基丙-1-胺(8)



[0198] 5-(二甲基氨基)戊酸(Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-6,16-二烯-11-基酯(53)

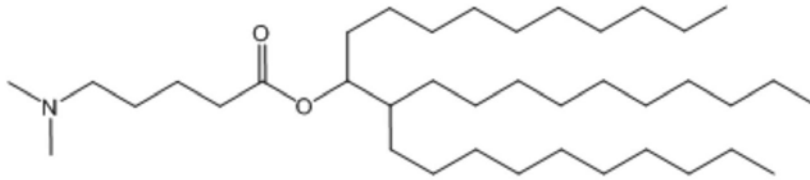


[0200] 6-(二甲基氨基)己酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-6,16-二烯-11-基酯(11)



[0202] 5-(二甲基氨基)戊酸(6Z,16Z)-12-((Z)-癸-4-烯基)二十二-6,16-二烯-11-基酯(13)

[0203]



[0204] 5-(二甲基氨基)戊酸12-癸基二十二-11-基酯(14)。

[0205] 非阳离子脂质

[0206] 用于脂质粒子中的非阳离子脂质可为能够产生稳定复合物的多种中性不带电荷脂质、两性离子脂质或阴离子脂质中的任一种。

[0207] 非阳离子脂质的非限制性实例包括磷脂,诸如卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、神经鞘磷脂、蛋神经鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二鲸蜡基磷酸酯、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰基磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰基磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰基油酰基-磷脂酰甘油(POPG)、磷脂酰乙醇胺4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(DOPE-ma1)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反油烯酰基-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰基油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、溶血磷脂酰胆碱、磷脂酰胆碱及其混合物。也可使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选为衍生自具有C₁₀-C₂₄碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0208] 非阳离子脂质的其他实例包括固醇,诸如胆固醇及其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性实例包括极性类似物,诸如5 α -胆固烷醇、5 β -粪固醇、胆固醇基-(2'-羟基)-乙醚、胆甾烯基-(4'-羟基)-丁醚和6-酮胆固烷醇;非极性类似物,诸如5 α -胆固烷、胆固烯酮、5 α -胆固烷酮、5 β -胆固烷酮和癸酸胆固醇酯;及其混合物。在优选实施方案中,胆固醇衍生物为极性类似物,诸如胆固醇基-(4'-羟基)-丁醚。胆固醇基-(2'-羟基)-乙醚的合成描述于PCT公开案第W0 09/127060号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0209] 在一些实施方案中,存在于脂质粒子中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物或由其组成。在其他实施方案中,存在于脂质粒子中的非阳离子脂质包含一种或多种磷脂或由其组成,例如不含胆固醇的脂质粒子制剂。在其他实施方案中,存在于脂质粒子中的非阳离子脂质包含胆固醇或其衍生物或由其组成,例如不含磷脂的脂质粒子制剂。

[0210] 适合使用的非阳离子脂质的其他实例包括不含磷的脂质诸如,例如硬脂胺、十二胺、十六胺、棕榈酸乙酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、硫酸三乙醇胺-月桂酯、硫酸烷基-芳酯聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八基二甲基溴化铵、神经酰胺、神经鞘磷脂和类似物。

[0211] 在一些实施方案中,非阳离子脂质占存在于粒子中的总脂质的约10mol%至约60mol%、约20mol%至约55mol%、约20mol%至约45mol%、约20mol%至约40mol%、约25mol%至约50mol%、约25mol%至约45mol%、约30mol%至约50mol%、约30mol%至约

45mol%、约30mol%至约40mol%、约35mol%至约45mol%、约37mol%至约45mol%或约35mol%、36mol%、37mol%、38mol%、39mol%、40mol%、41mol%、42mol%、43mol%、44mol%或45mol% (或其任何分数或在其中的范围)。

[0212] 在脂质粒子含有磷脂与胆固醇或胆固醇衍生物的混合物的实施方案中,混合物可占存在于粒子中的总脂质的多至约40mol%、45mol%、50mol%、55mol%或60mol%。

[0213] 在一些实施方案中,混合物中的磷脂组分可占存在于粒子中的总脂质的约2mol%至约20mol%、约2mol%至约15mol%、约2mol%至约12mol%、约4mol%至约15mol%或约4mol%至约10mol% (或其任何分数或在其中的范围)。在某一实施方案中,混合物中的磷脂组分占存在于粒子中的总脂质的约5mol%至约17mol%、约7mol%至约17mol%、约7mol%至约15mol%、约8mol%至约15mol%或约8mol%、9mol%、10mol%、11mol%、12mol%、13mol%、14mol%或15mol% (或其任何分数或在其中的范围)。作为非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质粒子制剂可包含约7mol% (或其任何分数) 的磷脂 (诸如DPPC或DSPC),例如在与占存在于粒子中的总脂质的约34mol% (或其任何分数) 的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物中。作为另一个非限制性实例,包含磷脂与胆固醇的混合物的脂质粒子制剂可包含约7mol% (或其任何分数) 的磷脂 (诸如DPPC或DSPC),例如在与占存在于粒子中的总脂质的约32mol% (或其任何分数) 的胆固醇或胆固醇衍生物的混合物中。

[0214] 再举一例,适用的脂质制剂具有约10:1的脂质与药物 (例如siRNA) 比率 (例如9.5:1至11:1或9.9:1至11:1或10:1至10.9:1的脂质:药物比率)。在某些其他实施方案中,适用的脂质制剂具有约9:1的脂质与药物 (例如siRNA) 比率 (例如8.5:1至10:1或8.9:1至10:1或9:1至9.9:1,包括9.1:1、9.2:1、9.3:1、9.4:1、9.5:1、9.6:1、9.7:1和9.8:1的脂质:药物比率)。

[0215] 在其他实施方案中,混合物中的胆固醇组分可占存在于粒子中的总脂质的约25mol%至约45mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约45mol%、约30mol%至约40mol%、约27mol%至约37mol%、约25mol%至约30mol%或约35mol%至约40mol% (或其任何分数或在其中的范围)。在某些优选实施方案中,混合物中的胆固醇组分占存在于粒子中的总脂质的约25mol%至约35mol%、约27mol%至约35mol%、约29mol%至约35mol%、约30mol%至约35mol%、约30mol%至约34mol%、约31mol%至约33mol%或约30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、34mol%或35mol% (或其任何分数或在其中的范围)。

[0216] 在脂质粒子不含磷脂的实施方案中,胆固醇或其衍生物可占存在于粒子中的总脂质的多至约25mol%、30mol%、35mol%、40mol%、45mol%、50mol%、55mol%或60mol%。

[0217] 在一些实施方案中,不含磷脂的脂质粒子制剂中的胆固醇或其衍生物可占存在于粒子中的总脂质的约25mol%至约45mol%、约25mol%至约40mol%、约30mol%至约45mol%、约30mol%至约40mol%、约31mol%至约39mol%、约32mol%至约38mol%、约33mol%至约37mol%、约35mol%至约45mol%、约30mol%至约35mol%、约35mol%至约40mol%或约30mol%、31mol%、32mol%、33mol%、34mol%、35mol%、36mol%、37mol%、38mol%、39mol%或40mol% (或其任何分数或在其中的范围)。作为非限制性实例,脂质粒子制剂可包含占存在于粒子中的总脂质的约37mol% (或其任何分数) 的胆固醇。作为另一个非限制性实例,脂质粒子制剂可包含占存在于粒子中的总脂质的约35mol% (或其任何分数) 的胆固醇。

[0218] 在其他实施方案中,非阳离子脂质占存在于粒子中的总脂质的约5mol%至约90mol%、约10mol%至约85mol%、约20mol%至约80mol%、约10mol% (例如仅磷脂) 或约60mol% (例如磷脂和胆固醇或其衍生物) (或其任何分数或在其中的范围)。

[0219] 适合用于脂质粒子中的其他非阳离子脂质百分比和范围描述于PCT公开案第W0 09/127060号、美国公开申请第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国公开申请第US 2011/0076335号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0220] 应了解,存在于脂质粒子中的非阳离子脂质的百分比为目标量,且存在于制剂中的非阳离子脂质的实际量可例如按 $\pm 5\text{mol}\%$ 、 $\pm 4\text{mol}\%$ 、 $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 或 $\pm 0.1\text{mol}\%$ 变化。

[0221] 脂质缀合物

[0222] 除阳离子脂质和非阳离子脂质之外,脂质粒子可进一步包含脂质缀合物。缀合型脂质为适用的,因为其阻止粒子聚集。适合的缀合型脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、POZ-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物、阳离子-聚合物-脂质缀合物(CPL)及其混合物。在某些实施方案中,粒子包含PEG-脂质缀合物或ATTA-脂质缀合物以及CPL。

[0223] 在一个优选实施方案中,脂质缀合物为PEG-脂质。PEG-脂质的实例包括但不限于例如PCT公开案第W0 05/026372号中所描述的偶合至二烷氧基丙基的PEG (PEG-DAA)、例如美国专利公开案第20030077829号和第2005008689号中所描述的偶合至二酰基甘油的PEG (PEG-DAG)、偶合至磷脂诸如磷脂酰乙醇胺的PEG (PEG-PE)、例如美国专利第5,885,613号中所描述的缀合至神经酰胺的PEG、缀合至胆固醇或其衍生物的PEG及其混合物。这些专利文件的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0224] 适合使用的其他PEG-脂质包括但不限于mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-氨基甲酰基甘油酯(PEG-C-DMG)。PEG-C-DMG的合成描述于PCT公开案第W0 09/086558号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。其他适合的PEG-脂质缀合物包括但不限于1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧基)-甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨基甲酰基- ω -甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG的合成描述于美国专利第7,404,969号中,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0225] PEG为具有两个端羟基的亚乙基PEG重复单元的线性水溶性聚合物。通过分子量对PEG进行归类;例如PEG 2000具有约2,000道尔顿的平均分子量,且PEG 5000具有约5,000道尔顿的平均分子量。PEG可从Sigma Chemical Co.和其他公司商购获得且包括但不限于以下物质:单甲氧基聚乙二醇(MePEG-OH)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸酯(MePEG-S)、单甲氧基聚乙二醇-琥珀酸琥珀酰亚胺酯(MePEG-S-NHS)、单甲氧基聚乙二醇-胺(MePEG-NH₂)、单甲氧基聚乙二醇-三氟乙基磺酸酯(MePEG-TRES)、单甲氧基聚乙二醇-咪唑基-羰基(MePEG-IM)以及含有末端羟基而非末端甲氧基的此类化合物(例如HO-PEG-S、HO-PEG-S-NHS、HO-PEG-NH₂等)。其他PEG(诸如描述于美国专利第6,774,180号和第7,053,150号中的那些,例如mPEG(20KDa)胺)也可用于制备PEG-脂质缀合物。这些专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。此外,单甲氧基聚乙二醇-乙酸(MePEG-CH₂COOH)特别适合于制备PEG-脂质缀合物,包括例如PEG-DAA缀合物。

[0226] 本文所描述的PEG-脂质缀合物的PEG部分可包含在约550道尔顿至约10,000道尔

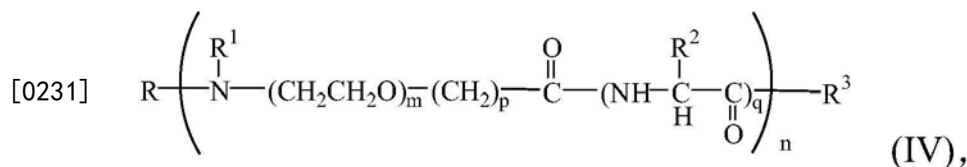
顿范围内的平均分子量。在某些情况下,PEG部分具有约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)的平均分子量。在优选实施方案中,PEG部分具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。

[0227] 在某些情况下,PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。PEG可直接缀合至脂质或可经由接头部分键联至脂质。可使用可用于将PEG偶合至脂质的任何接头部分,包括例如不含酯接头部分和含酯接头部分。在一个优选实施方案中,接头部分为不含酯接头部分。如本文所用,术语“不含酯接头部分”是指不含羧酸酯键(-OC(O)-)的接头部分。适合的不含酯接头部分包括但不限于酰胺基(-C(O)NH-)、氨基(-NR-)、羰基(-C(O)-)、氨基甲酸酯(-NHC(O)O-)、脲(-NHC(O)NH-)、二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、琥珀酰(-C(O)CCH₂CH₂C(O)-)、琥珀酰氨基(-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-)、醚、二硫化物以及其组合(诸如含有氨基甲酸酯接头部分与酰胺基接头部分的接头)。在一个优选实施方案中,使用氨基甲酸酯接头将PEG偶合至脂质。

[0228] 在其他实施方案中,使用含酯接头部分来将PEG偶合至脂质。适合的含酯接头部分包括例如碳酸酯(-OC(O)O-)、琥珀酰基、磷酸酯(-O-(O)POH-O-)、磺酸酯及其组合。

[0229] 具有具不同链长度和饱和度的多个酰基链基团的磷脂酰乙醇胺可缀合至PEG以形成脂质缀合物。此类磷脂酰乙醇胺可商购获得,或可使用本领域技术人员已知的常规技术分离或合成得到。含有碳链长度在C₁₀至C₂₀范围内的饱和或不饱和脂肪酸的磷脂酰基-乙醇胺为优选的。也可使用具有单不饱和脂肪酸和或双不饱和脂肪酸以及饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的混合物的磷脂酰乙醇胺。适合的磷脂酰乙醇胺包括但不限于二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)。

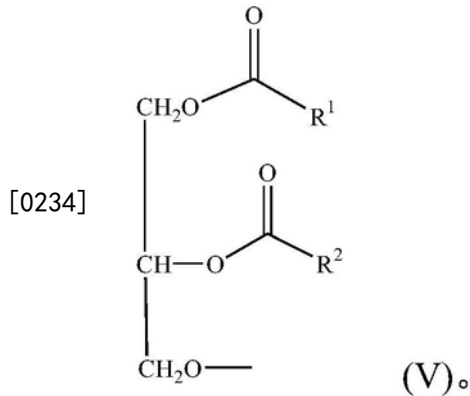
[0230] 术语“ATTA”或“聚酰胺”包括但不限于描述于美国专利第6,320,017号和第6,586,559号中的化合物,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。这些化合物包括具有以下化学式的化合物:



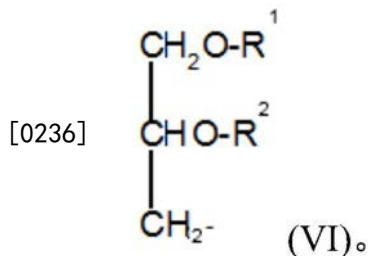
[0232] 其中R为选自由氢、烷基和酰基组成的组的成员;R¹为选自由氢和烷基组成的组的成员;或任选地,R和R¹和与其结合的氮形成叠氨基部分;R²为选自以下的基团的成员:氢、任选地取代的烷基、任选地取代的芳基和氨基酸的侧链;R³选自由以下组成的组的成员:氢、卤素、羟基、烷氧基、巯基、胍基、氨基和NR⁴R⁵,其中R⁴和R⁵独立地为氢或烷基;n为4至80;m为2至6;p为1至4;且q为0或1。其他聚酰胺对本领域技术人员将是显而易见的。

[0233] 术语“二酰基甘油”或“DAG”包括具有2个脂肪酰基链R¹和R²的化合物,这2个脂肪酰基链独立地具有通过酯键键结至甘油的1位和2位的2个至30个碳。酰基可为饱和的或具有不同的不饱和度。适合的酰基包括但不限于月桂酰基(C₁₂)、肉豆蔻酰基(C₁₄)、棕榈酰基(C₁₆)、硬脂酰基(C₁₈)和二十碳酰基(C₂₀)。在优选实施方案中,R¹和R²为相同的,即R¹与R²均为肉豆蔻酰基(即二肉豆蔻酰基),R¹与R²均为硬脂酰基(即二硬脂酰基)等。二酰基甘油具有

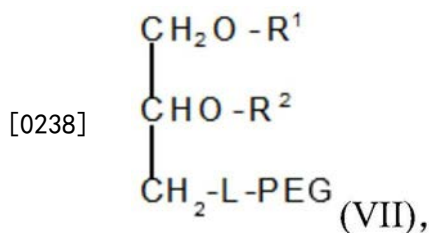
以下通式：



[0235] 术语“二烷氧基丙基”或“DAA”包括具有2个烷基链 R^1 和 R^2 的化合物,这2个烷基链独立地具有2个至30个碳。烷基可为饱和的或具有不同的不饱和度。二烷氧基丙基具有以下通式：



[0237] 在一个优选实施方案中,PEG-脂质为具有下式的PEG-DAA缀合物：



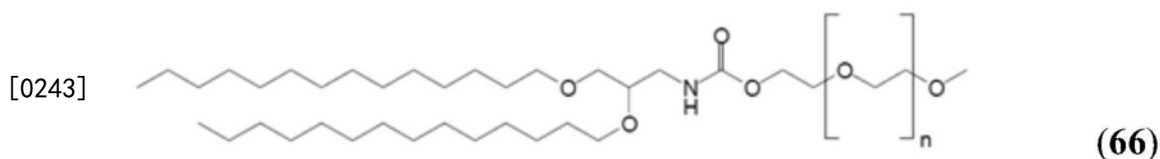
[0239] 其中 R^1 和 R^2 是独立地选择的且为具有约10个至约22个碳原子的长链烷基;PEG为聚乙二醇;且L为如上文所描述的不含酯接头部分或含酯接头部分。长链烷基可为饱和或不饱和的。适合的烷基包括但不限于癸基(C_{10})、月桂基(C_{12})、肉豆蔻基(C_{14})、棕榈基(C_{16})、硬脂基(C_{18})和二十碳基(C_{20})。在优选实施方案中, R^1 和 R^2 为相同的,即 R^1 与 R^2 均为肉豆蔻基(即二肉豆蔻基), R^1 与 R^2 均为硬脂基(即二硬脂基)等。

[0240] 在以上式VII中,PEG具有在约550道尔顿至约10,000道尔顿范围内的平均分子量。在某些情况下,PEG具有约750道尔顿至约5,000道尔顿(例如约1,000道尔顿至约5,000道尔顿、约1,500道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约3,000道尔顿、约750道尔顿至约2,000道尔顿等)的平均分子量。在优选实施方案中,PEG具有约2,000道尔顿或约750道尔顿的平均分子量。PEG可任选地被烷基、烷氧基、酰基或芳基取代。在某些实施方案中,末端羟基经甲氧基或甲基取代。

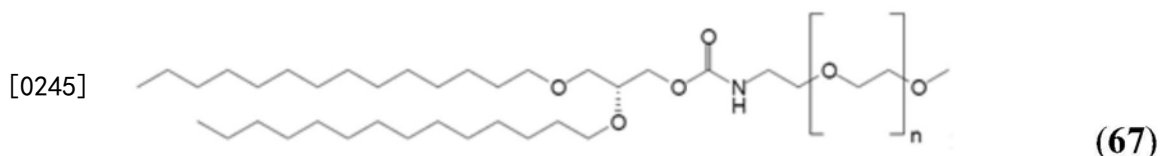
[0241] 在一个优选实施方案中,“L”为不含酯接头部分。适合的不含酯接头包括但不限于酰胺基接头部分、氨基接头部分、羰基接头部分、氨基甲酸酯接头部分、脲接头部分、醚接头部分、二硫化物接头部分、琥珀酰胺基接头部分及其组合。在一个优选实施方案中,不含酯

接头部分为氨基甲酸酯接头部分(即PEG-C-DAA缀合物)。在另一个优选实施方案中,不含酯接头部分为酰胺基接头部分(即PEG-A-DAA缀合物)。在另一个优选实施方案中,不含酯接头部分为琥珀酰胺基接头部分(即PEG-S-DAA缀合物)。

[0242] 在特定实施方案中,PEG-脂质缀合物选自:



[0244] (PEG-C-DMA); 和



[0246] (PEG-C-DOMG)。

[0247] PEG-DAA缀合物是使用标准技术和本领域技术人员已知的试剂来合成。应认识到,PEG-DAA缀合物将含有各种酰胺、胺、醚、硫基、氨基甲酸酯和脲键联。本领域技术人员将认识到,用于形成这些键的方法和试剂为熟知且可易于获得。参见例如March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); 和Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 第5版 (Longman 1989)。还应了解,存在的任何官能基可能需要在合成PEG-DAA缀合物的不同时间点进行保护和去保护。本领域技术人员将认识到,此类技术是众所周知的。参见例如Green和Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991)。

[0248] 优选地,PEG-DAA缀合物为PEG-二癸氧基丙基(C₁₀)缀合物、PEG-二月桂基氧基丙基(C₁₂)缀合物、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基(C₁₄)缀合物、PEG-二棕榈基氧基丙基(C₁₆)缀合物或PEG-氧基丙基(C₁₈)缀合物。在这些实施方案中,PEG优选具有约750或约2,000道尔顿的平均分子量。在一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG2000-C-DMA,其中“2000”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸酯接头部分,且“DMA”表示二肉豆蔻基氧基丙基。在另一个特别优选的实施方案中,PEG-脂质缀合物包含PEG750-C-DMA,其中“750”表示PEG的平均分子量,“C”表示氨基甲酸酯接头部分,且“DMA”表示二肉豆蔻基氧基丙基。在特定实施方案中,PEG的末端羟基经甲基取代。本领域技术人员将容易地了解,其他二烷氧基丙基可用于PEG-DAA缀合物中。

[0249] 除前述内容之外,本领域技术人员将容易地显而易见可使用其他亲水性聚合物替代PEG。可用于代替PEG的适合的聚合物的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺和聚二甲基丙烯酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸和衍生纤维素,诸如羟甲基纤维素或羟乙基纤维素。

[0250] 除前述组分之外,脂质粒子可进一步包含阳离子聚(乙二醇)(PEG)脂质或CPL(参见例如Chen等人,Bioconj.Chem., 11:433-437(2000); 美国专利第6,852,334号; PCT公开案第W0 00/62813号,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。

[0251] 适合的CPL包括式VIII的化合物:

[0252] A-W-Y (VIII),

[0253] 其中A、W和Y如下文所描述。

[0254] 参考式VIII,“A”为脂质部分,诸如两亲性脂质、中性脂质或疏水性脂质,其充当脂质锚。适合的脂质实例包括但不限于二酰基甘油基、二烷基甘油基、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0255] “W”为聚合物或寡聚物,诸如亲水性聚合物或寡聚物。优选地,亲水性聚合物为生物相容性聚合物,其为非免疫原性的或具有低固有免疫原性。或者,亲水性聚合物如果与适当的佐剂一起使用,则可具弱抗原性。适合的非免疫原性聚合物包括但不限于PEG、聚酰胺、聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸/聚乙醇酸共聚物及其组合。在一个优选实施方案中,聚合物具有约250至约7,000道尔顿的分子量。

[0256] “Y”为聚阳离子部分。术语聚阳离子部分是指在所选pH值、优选生理pH值下具有正电荷、优选至少2个正电荷的化合物、衍生物或官能基。适合的聚阳离子部分包括碱性氨基酸及其衍生物,诸如精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和组氨酸;精胺;亚精胺;阳离子树枝状聚合物;聚胺;聚胺糖;和氨基多糖。聚阳离子部分的结构可为线性的(诸如线性四聚赖氨酸)、枝化的或树状聚合的。聚阳离子部分在所选pH值下具有约2个至约15个正电荷,优选约2个至约12个正电荷,且更优选约2个至约8个正电荷。选择何种聚阳离子部分来采用可由所要粒子应用的类型决定。

[0257] 聚阳离子部分上的电荷可分布在整个粒子部分周围,或者其可在粒子部分的一个特定区域为不连续浓度的电荷密度,例如电荷尖峰。如果电荷密度分布于粒子上,则电荷密度可均等分布或不均等分布。涵盖聚阳离子部分的电荷分布的所有变化形式。

[0258] 脂质“A”和非免疫原性聚合物“W”可通过各种方法且优选通过共价连接进行连接。可使用本领域技术人员已知的方法进行“A”与“W”的共价连接。适合的键联包括但不限于酰胺、胺、羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、酯和脰键联。本领域技术人员将显而易见,“A”与“W”必须具有互补官能基以实现键联。此两个基团(一个在脂质上而另一个在聚合物上)的反应将提供所要键联。举例来说,当脂质为二酰基甘油,且末端羟基由例如NHS和DCC活化以形成活性酯,且然后与含有氨基的聚合物,诸如与聚酰胺反应时(参见例如美国专利第6,320,017号和第6,586,559号,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中),这两个基团之间将形成酰胺键。

[0259] 在某些情况下,聚阳离子部分可具有连接的配体,诸如目标配体或用于络合钙的螯合部分。优选地,在连接配体之后,阳离子部分维持正电荷。在某些情况下,连接的配体具有正电荷。适合的配体包括但不限于具有反应性官能基的化合物或装置且包括脂质、两亲性脂质、载体化合物、生物亲和性化合物、生物材料、生物聚合物、生物医学装置、可分析检测到的化合物、治疗活性化合物、酶、肽、蛋白质、抗体、免疫刺激剂、放射性标记物、荧光团、生物素、药物、半抗原、DNA、RNA、多糖、脂质体、病毒体、胶束、免疫球蛋白、官能基、其他靶向部分或毒素。

[0260] 在一些实施方案中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占存在于粒子中的总脂质的约0.1mol%至约3mol%、约0.5mol%至约3mol%或约0.6mol%、0.7mol%、0.8mol%、0.9mol%、1.0mol%、1.1mol%、1.2mol%、1.3mol%、1.4mol%、1.5mol%、1.6mol%、1.7mol%、1.8mol%、1.9mol%、2.0mol%、2.1mol%、2.2mol%、2.3mol%、2.4mol%、2.5mol%、2.6mol%、2.7mol%、2.8mol%、2.9mol%或3mol%(或其任何分数或在其中的范

围)。

[0261] 在其他实施方案中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占存在于粒子中的总脂质的约0mol%至约20mol%、约0.5mol%至约20mol%、约2mol%至约20mol%、约1.5mol%至约18mol%、约2mol%至约15mol%、约4mol%至约15mol%、约2mol%至约12mol%、约5mol%至约12mol%或约2mol%(或其任何分数或在其中的范围)。

[0262] 在其他实施方案中,脂质缀合物(例如PEG-脂质)占存在于粒子中的总脂质的约4mol%至约10mol%、约5mol%至约10mol%、约5mol%至约9mol%、约5mol%至约8mol%、约6mol%至约9mol%、约6mol%至约8mol%或约5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%或10mol%(或其任何分数或在其中的范围)。

[0263] 应了解,存在于脂质粒子中的脂质缀合物的百分比为目标量,且存在于制剂中的脂质缀合物的实际量可例如按 $\pm 5\text{mol}\%$ 、 $\pm 4\text{mol}\%$ 、 $\pm 3\text{mol}\%$ 、 $\pm 2\text{mol}\%$ 、 $\pm 1\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.75\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.5\text{mol}\%$ 、 $\pm 0.25\text{mol}\%$ 或 $\pm 0.1\text{mol}\%$ 变化。

[0264] 适合用于脂质粒子中的其他脂质缀合物百分比和范围描述于PCT公开案第W0 09/127060号、美国公开申请第US 2011/0071208号、PCT公开案第W02011/000106号和美国公开申请第US 2011/0076335号中,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0265] 一般本领域技术人员将了解,脂质缀合物的浓度可视所采用的脂质缀合物和使脂质粒子变得膜融合的速率而变化。

[0266] 通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可控制使脂质缀合物从脂质粒子中交换出来的速率和进而使脂质粒子变得膜融合的速率。举例来说,当PEG-DAA缀合物用作脂质缀合物时,可例如通过改变脂质缀合物的浓度、通过改变PEG的分子量或通过改变PEG-DAA缀合物上的烷基的链长度和饱和度来改变使脂质粒子变得膜融合的速率。此外,可使用包括例如pH值、温度、离子强度等的其他变量来改变和/或控制使脂质粒子变得膜融合的速率。在阅读本发明后,可用于控制使脂质粒子变得膜融合的速率的其他方法对于本领域技术人员将变得显而易见。另外,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可控制脂质粒度。

[0267] 其他载体系统

[0268] 适合使用的其他基于脂质的载体系统的非限制性实例包括脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20030203865号;和Zhang等人,J.Control Release,100:165-180(2004))、pH值敏感型脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20020192275号)、可逆遮蔽型脂质复合物(参见例如美国专利公开案第20030180950号)、基于阳离子脂质的组合物(参见例如美国专利第6,756,054号;和美国专利公开案第20050234232号)、阳离子脂质体(参见例如美国专利公开案第20030229040号、第20020160038号和第20020012998号;美国专利第5,908,635号;和PCT公开案第W0 01/72283号)、阴离子脂质体(参见例如美国专利公开案第20030026831号)、pH值敏感型脂质体(参见例如美国专利公开案第20020192274号;和AU 2003210303),抗体包被型脂质体(参见例如美国专利公开案第20030108597号;和PCT公开案第W0 00/50008号)、细胞类型特异性脂质体(参见例如美国专利公开案第20030198664号)、含有核酸和肽的脂质体(参见例如美国专利第6,207,456号)、含有由可释放亲水性聚合物衍生的脂质的脂质体(参见例如美国专利公开案第20030031704号)、脂质俘获型核酸(参见例如PCT公布第W0 03/057190号和第W0 03/059322号)、脂质包封型核酸(参见例如美

国专利公开案第20030129221号;和美国专利第5,756,122号)、其他脂质体组合物(参见例如美国专利公开案第20030035829号和第20030072794号;和美国专利第6,200,599号)、脂质体与乳液的稳定混合物(参见例如EP1304160)、乳液组合物(参见例如美国专利第6,747,014号)和核酸微乳液(参见例如美国专利公开案第20050037086号)。

[0269] 适合使用的基于聚合物的载体系统的实例包括但不限于阳离子聚合物-核酸复合物(即多聚复合物(polyplex))。为形成多聚复合物,核酸(例如siRNA分子,诸如描述于表A中的siRNA分子)通常与具有线性、枝化、星形或树状聚合结构的阳离子聚合物复合,从而使核酸凝聚成能够与细胞表面的阴离子蛋白聚糖相互作用且通过胞吞作用进入细胞的带正电荷的粒子。在一些实施方案中,多聚复合物包含与诸如以下的阳离子聚合物复合的核酸(例如siRNA分子,诸如描述于表A中的siRNA分子):聚乙烯亚胺(PEI)(参见例如美国专利第6,013,240号;可自Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA)以In vivo jetPEI™(PEI的线性形式)形式商购获得)、聚丙烯亚胺(PPI)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚L-赖氨酸(PLL)、二乙氨基乙基(DEAE)-右旋糖酐、聚(β-氨基酯)(PAE)聚合物(参见例如Lynn等人, J. Am. Chem. Soc., 123: 8155-8156 (2001))、壳聚糖、聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物(参见例如Kukowska-Latallo等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 4897-4902 (1996))、卟啉(参见例如美国专利第6,620,805号)、聚乙烯醚(参见例如美国专利公开案第20040156909号)、多环脒鎓(参见例如美国专利公开案第20030220289号)、包含伯胺、亚胺、胍和/或咪唑基团的其他聚合物(参见例如美国专利第6,013,240号;PCT公开案第W0/9602655号;PCT公开案第W095/21931号;Zhang等人, J. Control Release, 100: 165-180 (2004);和Tiera等人, Curr. Gene Ther., 6: 59-71 (2006))及其混合物。在其他实施方案中,多聚复合物包含如美国专利公开案第20060211643号、第20050222064号、第20030125281号和第20030185890号和PCT公开案第W03/066069号中所描述的阳离子聚合物-核酸复合物;如美国专利公开案第20040071654号中所描述的生物可降解的聚(β-氨基酯)聚合物-核酸复合物;如美国专利公开案第20040142475号中所描述的含有聚合物基质的微粒;如美国专利公开案第20030157030号中所描述的其他微粒组合物;如美国专利公开案第20050123600号中所描述的凝聚核酸复合物;和如AU 2002358514和PCT公开案第W0 02/096551号中所描述的纳米胶囊和微胶囊组合物。

[0270] 在某些情况下,siRNA可与环糊精或其聚合物复合。基于环糊精的载体系统的非限制性实例包括描述于美国专利公开案第20040087024号中的环糊精修饰型聚合物-核酸复合物;描述于美国专利第6,509,323号、第6,884,789号和第7,091,192号中的线性环糊精共聚物-核酸复合物;和描述于美国专利第7,018,609号中的环糊精聚合物-复合剂-核酸复合物。在某些其他情况下,siRNA可与肽或多肽复合。基于蛋白质的载体系统的实例包括但不限于描述于PCT公开案第W095/21931号中的阳离子寡肽-核酸复合物。

[0271] 脂质粒子的制备

[0272] 其中核酸(例如如表A中所描述的siRNA)被俘获于粒子的脂质部分内且防止降解的核酸-脂质粒子可通过本领域中已知的任何方法来形成,包括但不限于连续混合法、直接稀释法和管内稀释法。

[0273] 在特定实施方案中,阳离子脂质可包含单独或与其他阳离子脂质组合的式I-III的脂质或其盐。在其他实施方案中,非阳离子脂质为蛋神经鞘磷脂(ESM)、二硬脂酰基磷脂

酰胆碱 (DSPC)、二油酰基磷脂酰胆碱 (DOPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰胆碱 (POPC)、二棕榈酰基-磷脂酰胆碱 (DPPC)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、14:0PE (1,2-二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺 (DMPE))、16:0PE (1,2-二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺 (DPPE))、18:0PE (1,2-二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺 (DSPE))、18:1PE (1,2-二油酰基-磷脂酰乙醇胺 (DOPE))、18:1反式PE (1,2-二反油烯酰基-磷脂酰乙醇胺 (DEPE))、18:0-18:1PE (1-硬脂酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺 (SOPE))、16:0-18:1PE (1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰乙醇胺 (POPE))、基于聚乙二醇的聚合物 (例如PEG 2000、PEG 5000、PEG修饰的二酰基甘油或PEG修饰的二烷氧基丙基)、胆固醇、其衍生物或其组合。

[0274] 在某些实施方案中,经由连续混合法产生核酸-脂质粒子,例如包括以下的方法:提供包含siRNA的水溶液于第一储集器中,提供有机脂质溶液于第二储集器中(其中存在于有机脂质溶液中的脂质溶解于有机溶剂中,例如低碳数烷醇,诸如乙醇),和混合水溶液与有机脂质溶液,使得有机脂质溶液与水溶液混合,以便即刻大量产生脂质囊泡(例如脂质体),从而将siRNA封装于脂质囊泡内。此方法和用于执行此方法的设备详细描述于美国专利公开案第20040142025号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0275] 将脂质和缓冲溶液连续引入混合环境中(诸如混合室中)的动作使得脂质溶液用缓冲溶液连续稀释,由此在混合后即刻大量产生脂质囊泡。如本文所用,词组“用缓冲溶液连续稀释脂质溶液”(和变化形式)通常意谓在水化过程中用足以实现囊泡产生的力足够快速地稀释脂质溶液。通过将包含核酸的水溶液与有机脂质溶液混合,有机脂质溶液在缓冲溶液(即水溶液)存在下经历连续逐步稀释以产生核酸-脂质粒子。

[0276] 使用连续混合法形成的核酸-脂质粒子通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm(或其任何分数或在其中的范围)的尺寸。因此形成的粒子不聚集且任选地经尺寸调节以达成均匀粒度。

[0277] 在另一个实施方案中,经由包括以下的直接稀释法产生核酸-脂质粒子:形成脂质囊泡(例如脂质体)溶液和即刻且直接将脂质囊泡溶液引入容纳受控量的稀释缓冲液的收集容器中。在优选方面,收集容器包括被构造为搅拌收集容器的内容物以促进稀释的一个或多个组件。在一个方面,存在于收集容器中的稀释缓冲液的量实质上等于向其中引入的脂质囊泡溶液的体积。作为非限制性实例,于45%乙醇中的脂质囊泡溶液在引入容纳相等体积的稀释缓冲液的收集容器时将有利地产生更小粒子。

[0278] 在另一个实施方案中,经由管内稀释法产生核酸-脂质粒子,其中容纳稀释缓冲液的第三储集器流体联接至第二混合区。在此实施方案中,在第一混合区中形成的脂质囊泡(例如脂质体)溶液即刻且直接与第二混合区中的稀释缓冲液混合。在优选方面,第二混合区包括被布置为使得脂质囊泡溶液与稀释缓冲液流按反向180°流相遇的T形连接器;然而,可使用提供更浅角度(例如约27°至约180°(例如约90°))的连接器。泵机构将可控制的缓冲液流递送至第二混合区。在一个方面,控制提供至第二混合区的稀释缓冲液的流速以大体

上等于从第一混合区引入其中的脂质囊泡溶液的流速。此实施方案有利地允许更多地控制与第二混合区中的脂质囊泡溶液混合的稀释缓冲液的流动,且因此也更多地控制在第二混合制程中缓冲液中的脂质囊泡溶液的浓度。对稀释缓冲液流速的此种控制有利地允许在降低的浓度下的小粒度形成。

[0279] 这些方法和用于执行这些直接稀释和管内稀释法的设备详细描述于美国专利公开案第20070042031号中,所述专利公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0280] 使用直接稀释和管内稀释法形成的核酸-脂质粒子通常具有约30nm至约150nm、约40nm至约150nm、约50nm至约150nm、约60nm至约130nm、约70nm至约110nm、约70nm至约100nm、约80nm至约100nm、约90nm至约100nm、约70至约90nm、约80nm至约90nm、约70nm至约80nm、小于约120nm、110nm、100nm、90nm或80nm或约30nm、35nm、40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm(或其任何分数或在其中的范围)的尺寸。因此形成的粒子不聚集且任选地经尺寸调节以达成均匀粒度。

[0281] 可通过可用于对脂质体进行尺寸调节的方法中的任一种对脂质粒子进行尺寸调节。可进行尺寸调节以达成所要尺寸范围和相对窄的粒度分布。

[0282] 可使用若干技术来将粒子尺寸调节至所要尺寸。用于脂质体且同样适用于本发明的粒子的一种尺寸调节方法描述于美国专利第4,737,323号中,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。通过浴超声处理或探针超声处理对粒子悬浮液进行超声处理产生低至尺寸小于约50nm的粒子的渐进尺寸减小。均质化为另一方法,其依赖于剪切能来将较大粒子片段化成较小粒子。在典型均质化程序中,使粒子再循环穿过标准乳液均质器直至观测到通常在约60与约80nm之间的所选粒度。在两种方法中,可通过常规激光束粒度辨别或QELS来监测粒度分布。

[0283] 粒子通过小孔隙聚碳酸酯膜或不对称陶瓷膜挤出也是使粒度减小到相对明确界定的尺寸分布的有效方法。通常,使悬浮液循环穿过膜一次或多次直至达成所要粒度分布。可使粒子通过逐级更小的孔隙膜挤出,以达成尺寸的逐步减小。

[0284] 在一些实施方案中,如例如美国专利申请第09/744,103号中所描述存在于粒子中的核酸(例如siRNA分子)是预凝聚的,所述专利申请的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0285] 在其他实施方案中,所述方法可进一步包括添加适用于使用本发明组合物实现细胞的脂质体转染的非脂质聚阳离子。适合的非脂质聚阳离子的实例包括海地美溴铵(hexadimethrine bromide)(以商标名POLYBRENE[®]出售,Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA)或海地美铵(hexadimethrine)的其他盐。其他适合的聚阳离子包括例如聚L-鸟氨酸、聚L-精氨酸、聚L-赖氨酸、聚D-赖氨酸、聚烯丙基胺和聚乙烯亚胺的盐。这些盐的添加优选在已形成粒子之后进行。

[0286] 在一些实施方案中,所形成的核酸-脂质粒子中的核酸(例如siRNA)与脂质比率(质量/质量比)将在约0.01至约0.2、约0.05至约0.2、约0.02至约0.1、约0.03至约0.1或约0.01至约0.08范围内。起始物质(输入)的比率也属于此范围。在其他实施方案中,粒子制备使用每10mg总脂质约400 μ g核酸或约0.01至约0.08且更优选约0.04的核酸与脂质质量比,

其对应于每50 μ g的核酸1.25mg的总脂质。在其他优选实施方案中,粒子具有约0.08的核酸:脂质质量比。

[0287] 在其他实施方案中,所形成的核酸-脂质粒子中的脂质与核酸(例如siRNA)比率(质量/质量比)将在约1(1:1)至约100(100:1)、约5(5:1)至约100(100:1)、约1(1:1)至约50(50:1)、约2(2:1)至约50(50:1)、约3(3:1)至约50(50:1)、约4(4:1)至约50(50:1)、约5(5:1)至约50(50:1)、约1(1:1)至约25(25:1)、约2(2:1)至约25(25:1)、约3(3:1)至约25(25:1)、约4(4:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约25(25:1)、约5(5:1)至约20(20:1)、约5(5:1)至约15(15:1)、约5(5:1)至约10(10:1)范围内,或为约5(5:1)、6(6:1)、7(7:1)、8(8:1)、9(9:1)、10(10:1)、11(11:1)、12(12:1)、13(13:1)、14(14:1)、15(15:1)、16(16:1)、17(17:1)、18(18:1)、19(19:1)、20(20:1)、21(21:1)、22(22:1)、23(23:1)、24(24:1)或25(25:1),或其任何分数或在其中的范围。起始物质(输入)的比率也属于此范围。

[0288] 如先前所论述,缀合型脂质可进一步包括CPL。本文论述了多种用于制备脂质粒子-CPL(含CPL脂质粒子)的常用方法。两种常用技术包括“后插入”技术,即将CPL插入例如预成型的脂质粒子中;和“标准”技术,其中CPL在例如脂质粒子形成步骤期间包括于脂质混合物中。后插入技术产生主要在脂质粒子双层膜之外部面具有CPL的脂质粒子,而标准技术提供在内部与外部面均具有CPL的脂质粒子。该方法尤其可用于由磷脂(其可含有胆固醇)制成的囊泡以及含有PEG-脂质(诸如PEG-DAA和PEG-DAG)的囊泡。制备脂质粒子-CPL的方法教示于例如美国专利第5,705,385号;第6,586,410号;第5,981,501号;第6,534,484号;和第6,852,334号;美国专利公开案第20020072121号;和PCT公开案第W0 00/62813号中,所述专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0289] 脂质粒子的施用

[0290] 脂质粒子(例如核酸脂质粒子)可吸附至与其混合或接触的几乎任何细胞类型。吸附后,粒子即可由细胞的一部分胞吞,与细胞膜交换脂质,或与细胞融合。转移或并入粒子的siRNA部分可经由这些途径中的任一种来进行。具体来说,当进行融合时,粒子膜整合至细胞膜中且粒子的内容物与细胞内流体组合。

[0291] 脂质粒子(例如核酸-脂质粒子)可单独或以与根据施用途径和标准制药惯例所选择的药学上可接受的载体(例如生理盐水或磷酸盐缓冲液)的混合物的形式施用。一般来说,将采用普通缓冲盐水(例如135-150mM NaCl)作为药学上可接受的载体。其他适合的载体包括例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸和类似物,包括用于获得增强的稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。其他适合的载体描述于例如REMYNTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 第17版(1985)中。如本文所用,“载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、媒介物、包衣剂、稀释剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体和类似物。词组“药学上可接受”是指当向人施用时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0292] 药学上可接受的载体通常在脂质粒子形成之后添加。因此,在形成脂质粒子之后,可使粒子稀释至药学上可接受的载体(诸如普通缓冲盐水)中。

[0293] 药物制剂中的粒子的浓度可广泛地变化,即自小于约0.05重量%,通常等于或至少约2重量%至5重量%,至多达约10重量%至90重量%,且将根据特定所选的施用模式主要通过流体体积、粘度等来加以选择。举例来说,可增加浓度以降低与治疗相关的流体载

量。在患有动脉粥样硬化相关充血性心脏衰竭或严重高血压的患者中此可为尤其需要的。或者,可将由刺激性脂质组成的粒子稀释至低浓度以减轻施用部位处的炎症。

[0294] 药物组合物可通过常规、熟知杀菌技术进行灭菌。水溶液可经包装供使用或在无菌条件下过滤且冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。组合物可按需要含有诸如以下的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件:pH调节和缓冲剂、张力调节剂和类似物,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾和氯化钙。另外,粒子悬浮液可包括脂质保护剂,其防止脂质在储存时发生自由基和脂质过氧化损伤。亲脂性自由基淬灭剂(诸如 α 生育酚)和水溶性铁专一性螯合剂(诸如铁草胺)是适合的。

[0295] 体内施用

[0296] 已使用核酸-脂质粒子(诸如描述于PCT公开案第WO 05/007196、WO 05/121348、WO 05/120152和WO 04/002453号中的那些,所述公开案的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)达成用于体内治疗的全身递送,例如本文所描述的siRNA分子(诸如描述于表A中的siRNA)经由身体系统(诸如循环)至远端目标细胞的递送。

[0297] 对于体内施用,施用可以本领域中已知的任何方式来进行,例如通过注射、经口施用、吸入(例如鼻内或气管内)、经真皮施加或经直肠施用。施用可经由单次或分次剂量来实现。药物组合物可肠胃外施用,即关节内、静脉内、腹膜内、皮下或肌肉内。在一些实施方案中,药物组合物是通过快速注射静脉内或腹膜内施用(参见例如美国专利第5,286,634号)。细胞内核酸递送也已论述于Straubinger等人,Methods Enzymol.,101:512(1983);Mannino等人,Biotechniques,6:682(1988);Nicolau等人,Crit.Rev.Ther Drug Carrier Syst.,6:239(1989);和Behr,Acc.Chem.Res.,26:274(1993)中。施用基于脂质的治疗剂的其他方法描述于例如美国专利第3,993,754号;第4,145,410号;第4,235,871号;第4,224,179号;第4,522,803号;和第4,588,578号中。脂质粒子可通过在疾病部位直接注射或通过疾病部位远端的部位注射来施用(参见例如Culver,HUMAN GENE THERAPY,MaryAnn Liebert,Inc.,Publishers,New York.第70-71页(1994))。以上所描述的参考文献的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0298] 在脂质粒子是静脉内施用的实施方案中,在注射之后约8、12、24、36或48小时时粒子总注射剂量中的至少约5%、10%、15%、20%或25%存在于血浆中。在其他实施方案中,在注射之后约8、12、24、36或48小时时脂质粒子总注射剂量中的超过约20%、30%、40%和多达约60%、70%或80%存在于血浆中。在某些情况下,在施用之后约1小时时多个粒子中的超过约10%存在于哺乳动物的血浆中。在某些其他情况下,在施用粒子之后至少约1小时时可检测到脂质粒子的存在。在一些实施方案中,在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时时在细胞中可检测到siRNA分子的存在。在其他实施方案中,在施用之后约8、12、24、36、48、60、72或96小时时可检测到由siRNA分子引起的诸如病毒或宿主序列的目标序列的表达的下调。在其他实施方案中,由siRNA分子引起的诸如病毒或宿主序列的目标序列的表达的下调优先在受感染细胞和/或能够受感染的细胞中发生。在其他实施方案中,在施用之后约12、24、48、72或96小时或在约6、8、10、12、14、16、18、19、20、22、24、26或28天时在施用部位的近端或远端部位处可检测到细胞中siRNA分子的存在或影响。在其他实施方案中,脂质粒子是肠胃外或腹膜内施用。

[0299] 可将单独或与其他适合的组分组合的组合物制成要经由吸入(例如鼻内或气管

内)施用的气溶胶制剂(即其可经“雾化”(参见Brigham等人,Am.J.Sci.,298:278(1989))。可将气溶胶制剂放入加压的可接受的推进剂(诸如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气和类似物)中。

[0300] 在某些实施方案中,药物组合物可通过鼻内喷雾、吸入和/或其他气溶胶递送媒介物来递送。经由经鼻气溶胶喷雾将核酸组合物直接递送至肺的方法已描述于例如美国专利第5,756,353号和第5,804,212号中。同样地,使用鼻内微粒树脂和溶血磷脂酰基-甘油化合物递送药物(美国专利5,725,871)也是制药领域中熟知的。同样地,以聚四氟乙烯支撑基质形式进行的透粘膜药物递送描述于美国专利第5,780,045号中。以上所描述的专利的公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中。

[0301] 可用于诸如通过关节内(在关节中)、静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内和皮下途径肠胃外施用的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预定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。

[0302] 一般来说,当静脉内施用,脂质粒子制剂是用适合的药物载体配制。适合的制剂可见于例如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,Mack Publishing Company,Philadelphia,PA,第17版(1985)中。可使用多种水性载体,例如水、缓冲水、0.4%生理盐水、0.3%甘氨酸和类似物,且可包括用于能提高稳定性的糖蛋白,诸如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等。一般来说,将采用普通缓冲盐水(135-150mM NaCl)作为药学上可接受的载体,但其他适合的载体将满足要求。这些组合物可通过诸如过滤的常规脂质体灭菌技术进行灭菌。组合物可按需要含有包括以下的药学上可接受的辅助物质以接近生理条件:pH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂和类似物,例如乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、去水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯等。这些组合物可使用上文所提及的技术进行灭菌,或者其可在无菌条件下产生。所得水溶液可经包装供使用或在无菌条件下过滤且冻干,在施用之前将冻干制剂与无菌水溶液组合。

[0303] 在某些应用中,本文所公开的脂质粒子可经由向个体经口施用来递送。粒子可与赋形剂合并且以可摄取的片剂、口含片、片剂、胶囊、丸剂、糖锭、酏剂、洗口水、混悬剂、口腔喷雾、糖浆、糯米纸囊剂和类似物的形式使用(参见例如美国专利第5,641,515号、第5,580,579号和第5,792,451号,其公开内容出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。这些口服剂型还可含有以下物质:粘合剂、明胶;赋形剂、润滑剂和/或调味剂。当单位剂型为胶囊时,其除上文所描述的材料之外还可含有液体载体。各种其他材料可以包衣形式存在或以其他方式改变剂量单位的物理形式。当然,制备任何单位剂型时所用的任何材料均应为药学纯的且所采用的量应为实质上无毒的。

[0304] 通常,这些口服制剂可含有至少约0.1%的脂质粒子或更多,但当然,粒子的百分比可变化且可适宜地占总制剂的重量或体积的约1%或2%与约60%或70%之间或更多。理所当然,可制备的各治疗适用的组合物中的粒子的量使得将以任何给定单位剂量的化合物获得适合的给药。制备此类药物制剂的技术人员将考虑诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑因素的因素,且因此多种剂量和治疗方案可为所需的。

[0305] 可用于经口施用的制剂可由以下各项组成:(a)液体溶液,诸如悬浮于诸如水、生理盐水或PEG 400的稀释剂中的有效量的经包装的siRNA分子(例如描述于表A中的siRNA分

子); (b) 胶囊、扁囊剂或片剂,其各自含有预定量的siRNA分子,呈液体、固体、颗粒或明胶形式; (c) 在适当的液体中的悬浮液;和 (d) 适合的乳液。片剂形式可包含以下中之一者或多者:乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、磷酸钙、玉米淀粉、马铃薯淀粉、微晶纤维素、明胶、胶态二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸和其他赋形剂、染色剂、填充剂、粘合剂、稀释剂、缓冲剂、湿润剂、防腐剂、调味剂、染料、崩解剂和药学上相容的载体。糖锭形式可包含于调味剂(例如蔗糖)中的siRNA分子;以及包含于除siRNA分子之外还含有本领域中已知的载体的惰性基质(诸如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶乳液、凝胶和类似物)中的治疗性核酸的软片剂。

[0306] 在其用途的另一实例中,脂质粒子可并入广泛范围的局部用剂型中。举例来说,含有核酸-脂质粒子的悬浮液可以凝胶、油、乳液、局部用乳霜、糊剂、软膏、洗剂、泡沫剂、慕斯和类似物形式进行配制和施用。

[0307] 施用的粒子的量将取决于siRNA分子与脂质的比率;所用的特定siRNA;待处理的HBV菌株;患者的年龄、体重和病状;和临床医师的判断,但通常将在每公斤体重约0.01与约50mg之间,优选在每公斤体重约0.1与约5mg之间,或每次施用(例如注射)约 10^8 - 10^{10} 个粒子。

[0308] 以下描述选自称为1m至15m的一组siRNA(参见表A)的两种不同siRNA的所有可能的“二元”组合。术语“组合”意谓组合的siRNA分子一起存在于同一物质组合物中(例如一起溶解在同一溶液内;或一起存在于同一脂质粒子内;或一起存在于同一脂质粒子的药物制剂中,但各药物制剂内的脂质粒子可能包括或可能不包括siRNA组合的各种不同的siRNA)。组合的siRNA分子通常不共价键联在一起。

[0309] 如表A中所示,个别siRNA各个是用名称1m至15m识别。组合内的各siRNA编号用短划线(-)隔开;例如符号“1m-2m”表示siRNA编号1m与siRNA编号2m的组合。短划线不意谓组合内的不同siRNA分子彼此共价键联。不同的siRNA组合通过分号隔开。组合中siRNA编号的顺序并不重要。举例来说,组合1m-2m等效于组合2m-1m,因为这些符号两者描述siRNA编号1m与siRNA编号2m的同一组合。

[0310] 二元和三元siRNA组合可用于例如治疗人的HBV和/或HDV感染,和改善与HBV感染和/或HDV感染相关的至少一种症状。

[0311] 在某些实施方案中,siRNA是经由核酸脂质粒子施用。

[0312] 在某些实施方案中,相对于包括使用包封于脂质粒子内的siRNA混合物的方法,不同siRNA分子共-包封于同一脂质粒子中。

[0313] 在某些实施方案中,相对于包括使用包封于脂质粒子内的siRNA混合物的方法,存在于混合物中的各类型的siRNA物质包封于其自己的粒子中。

[0314] 在某些实施方案中,相对于包括使用包封于脂质粒子内的siRNA混合物的方法,一些siRNA物质共包封于同一粒子中而其他siRNA物质包封于不同粒子中。

[0315] 两种或更多种药剂的配制和施用

[0316] 应了解,药剂可一起配制成单一制剂或其可分开配制,且因此同时或依序分开施用。在一个实施方案中,当药剂为依序(例如在不同时间)施用时,可施用药剂以使得其生物效应重叠(即各药剂在单一给定时间产生生物效应)。

[0317] 药剂可视所选药剂而定被配制成用于任何可接受的施用途径且使用任何可接受

的施用途径施用。举例来说,适合的途径包括但不限于经口、舌下、经颊、局部、经真皮、肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,且如果希望局部治疗则病灶内施用。在一个实施方案中,本文识别的小分子药剂可经口施用。在另一个实施方案中,寡聚核苷酸可通过注射(例如注入血管,诸如静脉中)或皮下施用。在一些实施方案中,向有需要的个体经口施用一种或多种药剂(例如以丸剂形式),并且通过注射或皮下施用一种或多种寡聚核苷酸。

[0318] 通常,靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸是例如以脂质纳米粒子制剂形式静脉内施用,然而,本发明不限于包含寡聚核苷酸的静脉内制剂或静脉内施用寡聚核苷酸的治疗方法。

[0319] 可通过在周围温度下在适当pH值下且在所要纯度下与生理学上可接受的载体(即在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒的载体)混合来个别地配制药剂。制剂的pH值主要取决于特定用途和化合物浓度,但可在约3至约8内的任何地方变化。药剂通常将以固体组合物形式储存,但冻干制剂或水溶液为可接受的。

[0320] 包含药剂的组合物可以与良好医疗实践一致的方式配制、给予和施用。此背景下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个别患者的临床病状、病症的病因、施用部位、施用方法、施用时程和执业医师已知的其他因素。

[0321] 可以任何合宜的施用形式施用药剂,例如片剂、粉末、胶囊、溶液、分散体、悬浮液、糖浆、喷雾、栓剂、凝胶、乳液、贴片等。此类组合物可含有药物制剂中的常规组分,例如稀释剂、载体、pH调节剂、甜味剂、膨化剂和其他活性剂。如果需要肠胃外施用,则组合物将为无菌的且呈适合于注射或输注的溶液或悬浮液的形式。

[0322] 适合的载体和赋形剂为本领域技术人员熟知的且详细描述于例如Ansel, Howard C.等人, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004; Gennaro, Alfonso R.等人 Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2000; 和Rowe, Raymond C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Chicago, Pharmaceutical Press, 2005中。制剂还可包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、避光剂、助流剂、加工助剂、染色剂、甜味剂、芳香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的赋予药物的精美外观或帮助制造药物产品(即药剂)的添加剂。

[0323] 通常以至少等于达到所要生物效应的水平给予药剂。因此,有效给药方案将给予达到所要生物效应的至少最低量,或生物学有效剂量,然而,剂量不应高到不可接受的副作用超过了生物效应的益处。因此,有效给药方案将给予不超过最大耐受剂量("MTD")。最大耐受剂量定义为产生可接受的剂量限制性毒性("DLT")发生率的最高剂量。引起不可接受的DLT率的剂量被视为不耐受的。通常,特定时程的MTD是在1期临床试验中确定。通常如下在患者中进行这些给药:以在啮齿动物中(以mg/m²计)的严重毒性剂量的1/10("STD10")的安全起始剂量开始且以三个一组群自然增加患者,根据改良的斐波那契数列逐步增加剂量,其中不断更高的逐步增加步骤具有不断降低的相对增量(例如剂量增加为100%、65%、50%、40%且其后为30%至35%)。以三个患者一组群持续剂量逐步增加直至达到不耐受剂量。接下来产生可接受的DLT率的较低剂量水平被视为MTD。

[0324] 施用药剂的量将取决于所用的特定药剂;待处理的HBV菌株;患者的年龄、体重和

病状;和临床医师的判断,但通常将在每天约0.2至2.0克之间。

[0325] 药盒

[0326] 一个实施方案提供一种药盒。药盒可包括包含所述组合的容器。适合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。容器可由诸如玻璃或塑料的多种材料形成。容器可容纳有效治疗病状的组合且可具有无菌进入孔(例如容器可为静脉内溶液袋或具有皮下注射针头可刺穿的塞子的小瓶)。

[0327] 药盒可进一步包括位于容器上或与容器相关联的标签或包装插页。术语“包装插页”用于指照例包括于治疗剂的商业包装中的说明书,其含有关于涉及此类治疗剂的使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌和/或警告的信息。在一个实施方案中,标签或包装插页指示治疗剂可用于治疗病毒感染,诸如乙型肝炎。

[0328] 在某些实施方案中,药盒可用于递送固体口服形式的治疗剂,诸如片剂或胶囊。此类药盒优选包括许多单位剂量。此类药盒可包括具有按其预期用途的顺序调整的剂量的卡片。此类药盒的实例为“泡罩包装”。泡罩包装为包装工业中熟知的且广泛用于包装药物单位剂型。如果需要,则可提供记忆辅助物,例如以数字、字母或其他记号的形式或使用日历插页,从而指明治疗时程中可施用剂量的日期。

[0329] 根据另一个实施方案,药盒可包括(a)其中含有一种药剂的第一容器;和(b)其中含有第二药剂的第二容器。或者或另外,药盒可进一步包括包含药学上可接受的缓冲液(诸如抑细菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液)的第三容器。从商业和用户观点来看其可进一步包括其他所需材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0330] 药盒可进一步包括关于治疗剂的施用的指导。举例来说,药盒可进一步包括关于向有需要的患者同时、连续或分开施用治疗剂的指导。

[0331] 在某些其他实施方案中,药盒可包括用于容纳分开的组合物的容器,诸如分装瓶或分装箔袋,然而,分开的组合物也可含于单一分装容器内。在某些实施方案中,药盒包括关于分开的治疗剂的施用的指导。所述药盒形式在分开的治疗剂优选以不同剂型施用(例如经口和肠胃外)、以不同剂量时间间隔施用时或在处方医师需要滴定组合中的个别治疗剂时为特别有利的。

[0332] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗动物的乙型肝炎的方法,其包括向动物施用至少两种选自由以下组成的组的药剂:化合物3、化合物4、恩替卡韦、拉米夫定和SIRNA-NP。

[0333] 在一个实施方案中,本发明的方法排除包括以下的治疗动物的乙型肝炎的方法:向动物施用协同有效量的i)共价闭环状DNA的形成抑制剂和ii)核苷或核苷酸类似物。

[0334] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物排除包含以下的组合物:i)共价闭环状DNA的形成抑制剂和ii)作为仅有的活性乙型肝炎治疗剂的核苷或核苷酸类似物。

[0335] 在一个实施方案中,本发明的药盒排除包含以下的药盒:i)共价闭环状DNA的形成抑制剂和ii)作为仅有的乙型肝炎药剂的核苷或核苷酸类似物。

[0336] 在一个实施方案中,本发明的方法排除包括以下的治疗动物的乙型肝炎的方法:向动物施用i)靶向乙型肝炎病毒的一种或多种siRNA和ii)逆转录酶抑制剂。

[0337] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物排除包含以下的组合物:i)靶向乙型肝炎

炎病毒的一种或多种siRNA和ii)作为仅有的活性乙型肝炎治疗剂的逆转录酶抑制剂。

[0338] 在一个实施方案中,本发明的药盒排除包含以下的药盒:i)靶向乙型肝炎病毒的一种或多种siRNA和ii)作为仅有的活性乙型肝炎药剂的逆转录酶抑制剂。

[0339] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗动物的乙型肝炎的方法,其包括向动物施用至少两种选自由以下组成的组的药剂:

[0340] a) 逆转录酶抑制剂;

[0341] b) 衣壳抑制剂;

[0342] c) cccDNA形成抑制剂;

[0343] d) sAg分泌抑制剂;和

[0344] e) 免疫刺激剂。

[0345] 在一个实施方案中,本发明提供一种药盒,其包含至少两种选自由以下组成的组的药剂:

[0346] a) 逆转录酶抑制剂;

[0347] b) 衣壳抑制剂;

[0348] c) cccDNA形成抑制剂;

[0349] d) sAg分泌抑制剂;和

[0350] e) 免疫刺激剂。

[0351] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗动物的乙型肝炎的方法,其包括向动物施用靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和至少一种选自由以下组成的组的其他药剂:

[0352] a) 逆转录酶抑制剂;

[0353] b) 衣壳抑制剂;

[0354] c) cccDNA形成抑制剂;

[0355] d) sAg分泌抑制剂;和

[0356] e) 免疫刺激剂。

[0357] 在一个实施方案中,本发明提供一种药物组合物,其包含靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和至少一种选自由以下组成的组的其他药剂:

[0358] a) 逆转录酶抑制剂;

[0359] b) 衣壳抑制剂;

[0360] c) cccDNA形成抑制剂;

[0361] d) sAg分泌抑制剂;和

[0362] e) 免疫刺激剂。

[0363] 在一个实施方案中,本发明提供一种药盒,其包含靶向乙型肝炎基因组的寡聚核苷酸和至少一种选自由以下组成的组的其他药剂:

[0364] a) 逆转录酶抑制剂;

[0365] b) 衣壳抑制剂;

[0366] c) cccDNA形成抑制剂;

[0367] d) sAg分泌抑制剂;和

[0368] e) 免疫刺激剂。

[0369] 治疗剂的组合治疗乙型肝炎的能力可使用此项技术熟知的药理学模型来确定。

[0370] 现将通过以下非限制性实施例来说明本发明。

[0371] 实施例

[0372] 实施例中提及以下化合物。化合物3-4可使用已知程序制备。国际专利申请公开案第W02014/106019号和第W02013/006394号也描述了可用于制备化合物3-4的合成方法。

化合物编号或名称	结构
3	
4	
恩替卡韦	
拉米夫定	

[0375] 实施例1

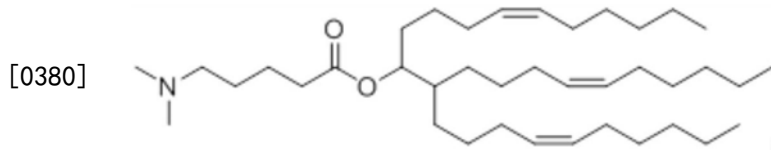
[0376] 使用乙型肝炎病毒 (HBV) 小鼠模型来评估免疫刺激剂和靶向HBV的siRNA作为独立处理和彼此组合的抗HBV效果。

[0377] 使用以下脂质纳米粒子 (LNP) 制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0378]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.1	55.0	33.0	11.0

[0379] 阳离子脂质具有以下结构 (13)：



[0381] 使用三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物。以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
[0382]	<u>CCGU</u> guGCACUuCG <u>Cuu</u> CAUU	UGAAGCGAAGUgCACACg <u>GUU</u>
	<u>Cugg</u> CUCAGUUUACuAgUGUU	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
	<u>GCCg</u> AuCCAUA <u>Cug</u> CGgAAUU	UUCCGCAGUAUGgAUCGgCUU
	小写= 2'-O-甲基修饰 下划线=解锁核碱基类似物(UNA)部分	

[0383] 在第27天,经由水动力注射(HDI;快速1.3mL注入尾部静脉)向C3H/HeN小鼠施用10微克质粒pAAV/HBV1.2(获自Pei-Jer Chen博士,最初描述于Huang,LR等人,Proceedings of the National Academy of Sciences,2006,103(47):17862-17867)中)。此质粒带有HBV基因组的1.2倍过长拷贝且除其他HBV产物外表达HBV表面抗原(HBsAg)。小鼠中的血清HBsAg表达是使用酶免疫测定来监测。基于血清HBsAg水平将动物分选(随机化)至多个组中,使得a)所有动物经证实表达HBsAg,且b)HBsAg组平均值在处理开始之前彼此相似。

[0384] 如下将动物用免疫刺激剂处理:在第0天,经由HDI施用20微克高分子量聚肌苷酸:聚胞苷酸(poly(I:C))。如下将动物用脂质纳米粒子(LNP)包封的靶向HBV的siRNA处理:在第0天、第7天和第14天中的每一天,静脉内施用等效于1mg/kg siRNA的量的测试物品。包括阴性对照组,因为在此HBV小鼠模型中HBsAg表达水平不完全稳定;在个别动物中血清HBsAg的绝对浓度通常随时间推移而下降。为证实处理特定效果,将处理组与阴性对照动物相比较。

[0385] 处理效果是通过在第0天(处理前)、第3天、第7天、第14天和第21天收集少量血液且分析其血清HBsAg含量来确定。适当时稀释样品以在可能的情况下产生定量测定范围内的值。将降到定量下限(LLoQ)以下的个别值设定为LLoQ的一半。表1显示以占第0天个别动物处理前基线值的百分比表示的处理组平均(n=4或5;±平均值的标准误差)血清HBsAg浓度。

[0386] 数据证实响应于HBV siRNA与poly(I:C)的组合的HBsAg降低程度,以及降低效果的持续时间。两种处理的组合产生比任一单独处理大的效果。

[0387] 表1.在HBV感染小鼠模型中三种HBV siRNA和免疫刺激剂Poly(I:C)的单一和组合处理对血清HBsAg的影响

[0388]

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

[0389] 实施例2

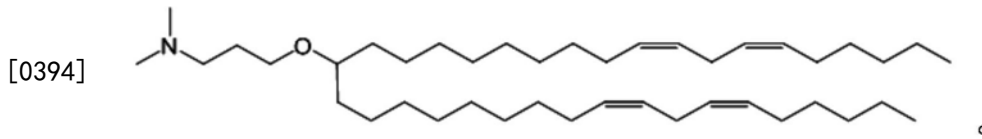
[0390] 使用乙型肝炎病毒(HBV)小鼠模型来评估HBV衣壳化小分子抑制剂(化合物3)和靶向HBV的siRNA作为独立处理和彼此组合的抗HBV效果。

[0391] 使用以下脂质纳米粒子(LNP)制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0392]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0393] 阳离子脂质具有以下结构(7)：



[0395] 使用三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物。以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
	<u>CCGU</u> guGCACUuCGCuuCAUU	UGAAGCGAAGUgCACACgGUU
	<u>Cugg</u> CUCAGUUUACuAgUGUU	CACUAgUAAACUgAgCCAGUU
[0396]	<u>GCCg</u> AuCCAUA <u>Cug</u> CGgAAUU	U <u>UCCG</u> CAgUAUGgAUCGgCUU
	小写=2'-O-甲基修饰	
	下划线=解锁核碱基类似物(UNA)部分	

[0397] 在第7天,经由水动力注射(HDI;快速1.6mL注入尾部静脉)向NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J小鼠施用10微克质粒pHBV1.3(按照Guidotti,L.,等人,Journal of Virology,1995,69(10):6158-6169)。此质粒带有HBV基因组的1.3倍过长拷贝,其当表达时,除其他HBV产物之外产生包括HBV DNA的乙型肝炎病毒粒子。作为各种处理的抗HBV效果的读出,小鼠中的血清HBV DNA浓度是使用定量PCR测定由总提取DNA测量(引物/探针序列来自Tanaka,Y.,等人,Journal of Medical Virology,2004,72:223-229)。

[0398] 如下将动物用化合物3处理:在第0天开始,在第0天与第7天之间以每天两次的频率向动物经口施用50mg/kg或100mg/kg剂量的化合物3,持续总共十四个剂量。将化合物3溶解于共溶剂配制物中以便施用。为阴性对照动物施用单独的共溶剂配制物或生理盐水。如下将动物用脂质纳米粒子(LNP)包封的靶向HBV的siRNA处理:在第0天,静脉内施用等效于0.1mg/kg siRNA的量的测试物品。在此HBV小鼠模型中HBV表达水平不完全稳定;为证实处理特定效果,在此将处理组与阴性对照动物相比较。

[0399] 这些处理的效果是通过在第0天(处理前)、第4天和第7天收集血液且分析其血清HBV DNA含量来确定。表2显示以占第0天个别动物处理前基线值的百分比表示的处理组平均(n=7或8;±平均值的标准误差)血清HBV DNA浓度。

[0400] 数据证实响应于化合物3与HBV siRNA的组合的血清HBV DNA降低程度,以及降低效果的持续时间。两种处理的组合产生比任一单独处理大的效果。

[0401] 表2.在HBV感染小鼠模型中化合物3与三种HBV siRNA的单一和组合处理对血清HBV DNA的影响

	处理 1 (经口)	处理 2 (静脉内)	第 0 天	第 4 天	第 7 天
	生理盐水	(无)	100 ± 0	69 ± 16	70 ± 14
	媒介物配制物	(无)	100 ± 0	56 ± 15	47 ± 9
[0402]	化合物 3, 50 mg/kg	(无)	100 ± 0	13 ± 4	33 ± 9
	化合物 3, 100 mg/kg	(无)	100 ± 0	8.6 ± 1.5	12 ± 5
	(无)	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	9.4 ± 5.3	5.6 ± 1.2
	化合物 3, 50 mg/kg	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.4
[0403]	化合物 3, 100 mg/kg	HBV siRNA, 0.1 mg/kg	100 ± 0	0.77 ± 0.15	0.88 ± 0.28

[0404] 实施例3

[0405] 使用乙型肝炎病毒 (HBV) 小鼠模型来评估HBV衣壳化小分子抑制剂 (化合物3) 作为独立处理和与经批准化合物恩替卡韦 (ETV) 组合的抗HBV效果。

[0406] 在第7天, 经由水动力注射 (HDI; 快速1.6mL注入尾部静脉) 向NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J小鼠施用10微克质粒pHBV1.3 (按照Guidotti, L., 等人, Journal of Virology, 1995, 69 (10): 6158-6169)。此质粒带有HBV基因组的1.3倍过长拷贝, 其当表达时, 除其他HBV产物之外产生包括HBV DNA的乙型肝炎病毒粒子。作为各种处理的抗HBV效果的读出, 小鼠中的血清HBV DNA浓度是使用定量PCR测定由总提取DNA测量 (引物/探针序列来自Tanaka, Y., 等人, Journal of Medical Virology, 2004, 72: 223-229)。

[0407] 如下将动物用化合物3处理: 在第0天开始, 在第0天与第7天之间以每天两次的频率向动物经口施用100mg/kg剂量的化合物3, 持续总共十四个剂量。将化合物3溶解于共溶剂配制物中以便施用。为阴性对照动物施用单独的共溶剂配制物或生理盐水。如下将动物用ETV处理: 在第0天开始, 在第0天与第6天之间以每天一次的频率向动物经口施用100ng/kg或300ng/kg剂量的ETV, 持续总共七个剂量。将ETV在DMSO中溶解至2mg/mL且然后在生理盐水中稀释以便施用。在此HBV小鼠模型中HBV表达水平不完全稳定; 为证实处理特定效果, 在此将处理组与阴性对照动物相比较。

[0408] 这些处理的效果是通过在第0天 (处理前)、第4天和第7天收集血液且分析其血清HBV DNA含量来确定。将Ct值低于定量下限 (LLOQ) 的样品设定为LLOQ的一半以便计算组平均值。表3显示以占第0天个别动物处理前基线值的百分比表示的处理组平均 (n=5-8; ±平均值的标准误差) 血清HBV DNA浓度。

[0409] 数据证实响应于化合物3与ETV的组合的血清HBV DNA降低程度, 以及降低效果的持续时间。两种处理的组合产生比任一单独处理大的效果。

[0410] 表3. 在HBV感染小鼠模型中化合物3和ETV的单一和组合处理对血清HBV DNA的影响

处理 1	处理 2	第 0 天	第 4 天	第 7 天
生理盐水	(无)	100 ± 0	67 ± 18	22 ± 8
媒介物配制物	(无)	100 ± 0	41 ± 7	14 ± 3
化合物 3, 100 mg/kg	(无)	100 ± 0	9.3 ± 2.5	1.2 ± 0.3
[0411] (无)	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	21 ± 5	3.5 ± 0.7
(无)	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	1.6 ± 0.3	0.88 ± 0.31
化合物 3, 100 mg/kg	ETV, 100 ng/kg	100 ± 0	1.4 ± 0.4	0.48 ± 0.18
化合物 3, 100 mg/kg	ETV, 300 ng/kg	100 ± 0	0.70 ± 0.16	0.32 ± 0.07

[0412] 实施例4-6

[0413] 体外组合研究目标:

[0414] 在体外使用HBV细胞培养模型系统来确定HBV衣壳化的小分子抑制剂(化合物3)、恩替卡韦(ETV)、HBV聚合酶的逆转录酶抑制剂和SIRNA-NP(旨在促进有效敲低所有病毒mRNA转录物和病毒抗原的siRNA)中的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

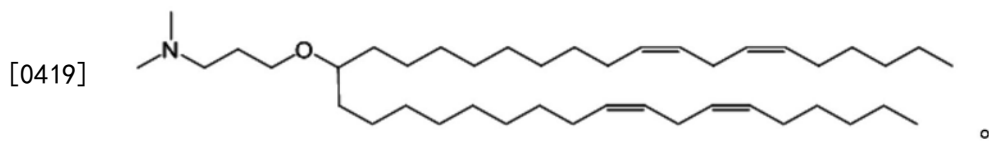
[0415] SIRNA-NP的组成:

[0416] SIRNA-NP为三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物的脂质纳米粒子制剂。在本文报告的实验中使用以下脂质纳米粒子(LNP)制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0417]

PEG (20000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0418] 阳离子脂质具有以下结构(7):



[0420] 以下显示所述三种siRNA的序列。

有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUmGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUmUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrUmGrAmGrCmCrArGrUrU
rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrGmCrAmGrAmGrGrUrUrU
rN = 碱基 N 的 RNA	
mN = 碱基 N 的 2'O-甲基修饰	

[0422] 体外组合实验方案:

[0423] 使用Prichard和Shipman的方法进行体外组合研究(Prichard MN和Shipman C Jr., *Antiviral Research*, 1990, 14 (4-5), 181-205; 和Prichard MN等人, *MacSynergy II*)。如Campagna等人中所描述研发AML12-HBV10细胞株(Campagna等人, *J. Virology*, 2013, 87 (12), 6931-6942)。其为由HBV基因组稳定转染的小鼠肝细胞株,且其可表达HBV前基因组RNA并以四环素调控的方式帮助HBV rcDNA(松弛环状DNA)合成。将AML12-HBV10细胞在不含四环素的补充有10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日,为细胞更换新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理,且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育48h的持续时间。将抑制剂在100%DMSO(ETV和化合物3)或生长培养基(SIRNA-NP)中稀释,且测定中的最终DMSO浓度≤0.5%。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂,所述组合是以棋盘方式进行使得各浓度的抑制剂A与各浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制rcDNA产生的影响。在48小时孵育之后,使用bdNA测定(Affymetrix)用HBV特异性定制探针组和制造商的说明书测量存在于抑制剂处理孔中的rcDNA水平。以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算由各孔产生的RLU数据且使用MacSynergy II程序分析以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性:在95%CI下协同作用体积<25μM²% (log体积<2) = 可能不显著;25-50μM²% (log体积>2且<5) = 微小但显著,50-100μM²% (log体积>5且<9) = 中度,在体内可为重要的;超过100μM²% (log体积>9) = 强协同作用,在体内可能为重要的;体积接近1000μM²% (log体积>90) = 异常地高,查验数据。同时,使用用于使用cell-titer glo试剂(Promega)按照制造商的说明书测定作为细胞活力的量度的ATP含量的重复板来评估抑制剂组合对细胞活力的影响。

[0424] 实施例4:化合物3与恩替卡韦的体外组合:

[0425] 将化合物3(浓度范围对于2倍稀释系列中2.5μM至0.01μM且进行9点滴定)与恩替卡韦(浓度范围对于3倍稀释系列中0.075μM至0.001μM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物3或恩替卡韦处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表1中。化合物3和恩替卡韦的EC₅₀值显示于表4中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较(表1)时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性的(表4)。

[0426] 实施例5:化合物3与SIRNA-NP的体外组合:

[0427] 将化合物3(浓度范围对于2倍稀释系列中2.5μM至0.01μM且进行9点滴定)与SIRNA-NP(浓度范围对于3倍稀释系列中0.5μg/mL至0.006μg/mL且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物3或SIRNA-NP处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表2中。化合物3和SIRNA-NP的EC₅₀值显示于表4中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较(表2)时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性的(表4)。

[0428] 实施例6:恩替卡韦与SIRNA-NP的体外组合:

[0429] 将恩替卡韦(浓度范围对于3倍稀释系列中0.075μM至0.001μM且进行5点滴定)与SIRNA-NP(浓度范围对于2倍稀释系列中0.5μg/mL至0.002μg/mL且进行9点滴定)组合进行

测试。使用单独或组合形式的恩替卡韦或SIRNA-NP处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表3中。恩替卡韦和SIRNA-NP的EC₅₀值显示于表4中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较(表3)时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性的(表4)。

[0430] 表1:恩替卡韦(ETV)与化合物3的体外组合

[0431]

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.500	rcDNA的平均抑制%	化合物3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	74.32	68.07	68.39	75.14	76.89	87.27	88.19	91.48	92.88	92.19		
0.025	63.25	64.7	58.68	63.39	64.91	75.73	86.18	89.9	91.41	93.94		
0.008	48.01	49.89	54.26	52.73	62.62	74.73	82.42	85.21	89.65	90.77		
0.003	18.71	11.06	25.23	22.45	46.04	57.94	77.01	85.49	86.6	90.86		
0.001	21.63	-4.69	-0.73	9.56	30.07	52.94	74.38	83.54	89.68	91.05		
0	0	-3.19	0.62	7.38	-1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47		

[0432]

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	平均抑制%	化合物3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	8.58	8.77	16.02	8.3	7.66	7.17	4.93	3.16	1.57	3.14		
0.025	13.67	10.43	13.89	13.82	12.17	7.61	3.09	2.63	1.7	0.94		
0.008	18.71	22.38	19.17	15.26	9.56	8.73	4.65	1.94	3.91	0.91		
0.003	35.13	24.05	20.09	22.35	16.24	10.98	7.82	4.84	3.77	3.64		
0.001	26.12	20.67	22.56	24.1	15.68	8.42	2.57	4.25	1.74	2.61		
0	0	42.74	22.32	20.39	23.53	22.08	7.85	2.94	1.46	2.2		

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.3125	0.625	1.25	2.5	相加性抑制	化合物3 (μM)
ETV (μM)												
0.075	74.32	73.5	74.48	76.22	73.86	83.44	92.54	95.06	96.59	97.55		
0.025	63.25	62.08	63.48	65.96	62.58	76.31	89.33	92.93	95.12	96.5		
0.008	48.01	46.35	48.33	51.85	47.07	66.48	84.9	90	93.1	95.05		
0.003	18.71	16.12	19.21	24.71	17.24	47.59	76.39	84.36	89.21	92.25		
0.001	21.63	19.13	22.12	27.41	20.21	49.47	77.24	84.92	89.6	92.53		
0	0	-3.19	0.62	7.38	-1.81	35.53	70.96	80.76	86.73	90.47		

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	协同作用 曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 (Bonferroni Adj.)	96%
ETV (μM)												
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	协同作用	0
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log体积	0
0.008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.28519		
0.003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	-1.29
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log体积	-0.19
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0433] 表2:化合物3与SIRNA-NP的体外组合

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.250	2.5	rcDNA的平均抑制%	化合物3
SIRNA-NP												
$\mu\text{g/mL}$												μM
0.5	96.25	95.01	95.45	96.35	95.83	96.38	96.15	97.02	96.88	96.9		
0.167	92.38	90.74	91.26	92.35	90.9	94.41	95.28	95.7	96.58	96.63		
0.056	68.59	66.89	75.99	72.21	81.66	83.57	90.29	92.61	94.84	95.99		
0.019	29.18	30.74	29.09	33.68	43.8	68.05	83.12	87.88	93.48	94.35		
0.006	14.92	0.31	-4.48	6.12	19.44	49.81	78.77	85.37	90.66	92.09		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	20.07	37.11	59.39	79.86	88.12	89.67		
[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	标准偏差(%)	化合物3
SIRNA-NP												
$\mu\text{g/mL}$												μM
0.5	1.42	1.64	1.15	0.66	0.89	1.23	1.26	1.22	1.07	0.87		
0.167	3.23	3.02	1.2	3.25	1.88	1.47	1.05	0.87	0.9	1.16		
0.056	9.74	8.53	3.59	6.15	5.55	3.84	2.37	2.44	1.82	1.48		
0.019	31.44	16.24	17.69	9.21	14.48	11.22	6.35	5.11	1.1	1.48		
0.006	25.79	18.47	16.92	29.8	15.19	13.5	4.32	0.73	3.01	3.58		
0	0	16.14	29.67	32.34	27.28	28.62	12.94	5.47	5.83	2.5		
[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	相加性抑制	化合物3
SIRNA-NP												
$\mu\text{g/mL}$												μM
0.5	96.25	96.18	95.48	95.61	97	97.64	98.48	99.24	99.55	99.61		
0.167	92.38	92.23	90.81	91.09	93.91	95.21	96.91	98.47	99.09	99.21		
0.056	68.59	67.97	62.14	63.27	74.89	80.25	87.24	93.67	96.27	96.76		
0.019	29.18	27.78	14.63	17.18	43.39	55.46	71.24	85.74	91.59	92.68		
0.006	14.92	13.24	-2.56	0.5	32	46.49	65.45	82.86	89.89	91.21		
0	0	-1.98	-20.54	-16.95	20.07	37.11	59.39	79.86	88.12	89.67		

[0434]

[0435]

[药物]	0	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 96%
SIRNA-NP μg/mL											
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	协同作用 2.14
0.167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 体积 0.31
0.056	0	0	2.03531	0	0	0	0	0	0	0	
0.019	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.006	0	0	0	0	0	0	0	0.10757	0	0	log 体积 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0436] 表3:恩替卡韦与SIRNA-NP的体外组合

[药物]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.250	0.500	rcDNA 的 平均抑制%
ETV μM											SIRNA-NP μg/mL
0.075	74.9	77.52	75.42	79.02	85.16	86.59	92.73	95.09	96.6	96.66	
0.025	64.1	64.59	65.95	68.92	75.31	80.87	90.12	93.84	95.54	96.72	
0.008	37.88	42.67	48.08	54.27	70.87	75.26	85.26	92.63	95.6	96.12	
0.003	37.81	25.05	31.15	33.55	48.32	68.45	81.86	91	94.63	96.08	
0.001	9.06	11.49	1.57	22.41	33.41	61.88	77.03	90.37	93.93	95.14	
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02	

[0437]

[药物]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	标准偏差(%)
ETV μM											SIRNA-NP μg/mL
0.075	5.4	2.5	2.4	3.43	3.56	4.59	1.42	0.92	1.29	1.35	
0.025	8.24	8.69	2.67	5.28	1.81	3.19	0.79	1.39	1.72	1.28	
0.008	5.43	9.21	4.64	3.19	7.48	2.52	0.29	2.33	0.59	0.95	
0.003	8.11	11.06	14.06	2.97	7.32	2.97	1.89	1.3	0.73	0.7	
0.001	9.35	11.3	8.13	9.32	7.82	3.96	3.32	1.43	0.81	1.16	
0	0	17.52	8.77	13.87	26.87	5.59	5.05	1.56	1.06	1.33	

[0438]

[药物]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	相加性抑制
ETV											SIRNA-NP $\mu\text{g/mL}$
μM											
0.075	74.9	72.65	72.93	80.14	83.04	86.46	93.21	96.84	98.32	98.75	
0.025	64.1	60.89	61.28	71.6	75.74	80.63	90.29	95.48	97.6	98.21	
0.008	37.88	32.32	33	50.86	58.03	66.49	83.19	92.17	95.84	96.91	
0.003	37.81	32.24	32.92	50.8	57.98	66.45	83.17	92.16	95.84	96.9	
0.001	9.06	0.92	1.91	28.06	38.55	50.94	75.39	88.54	93.92	95.47	
0	0	-8.95	-7.86	20.89	32.43	46.05	72.94	87.4	93.31	95.02	

[药物]	0	0.002	0.004	0.008	0.016	0.032	0.063	0.125	0.25	0.5	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 96%
ETV											协同作用 1.59 \log 体积 0.23 拮抗作用 -7.48 \log 体积 -1.07
μM											
0.075	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.008	0	0	0	0	0	0.47668	1.11561	0	0	0	
0.003	0	0	0	7.47573	0	0	0	0	0	0	
0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0439] 表4:使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在AML12-HBV10细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总:

抑制剂 A	抑制剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (μM)	抑制剂 B EC ₅₀ (μM 或 $\mu\text{g/mL}$)	协同作用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	协同作用 Log 体积	拮抗作用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	拮抗作用 Log 体积	结论
[0440] 化合物 3	恩替卡韦 (ETV)	0.231	0.012	0	0	-1.29	-0.19	相加性
化合物 3	SIRNA-NP**	0.250	0.032	2.14	0.31	0	0	相加性
恩替卡韦 (ETV)	SIRNA-NP**	0.012	0.031	1.59	0.23	-7.48	-1.07	相加性

[0441] *在99.9%置信区间

[0442] ** $\mu\text{g/mL}$

[0443] 实施例7-9

[0444] 体外组合研究目标:

[0445] 为了确定使用两种化合物组合的组合处理对HBV DNA复制的过程、cccDNA形成和cccDNA表达和稳定性的影响。研究了化合物3和4 (HBV衣壳化的两种小分子抑制剂);恩替卡韦 (ETV) 和拉米夫定 (3TC) (两种FDA批准的HBV聚合酶的逆转录酶抑制剂);和SIRNA-NP (脂

质纳米粒子 (LNP 配制的病毒mRNA的siRNA抑制剂) 和病毒抗原表达。本研究旨在在体外使用HBV细胞培养模型系统确定所述组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

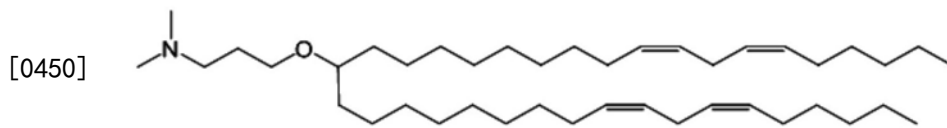
[0446] LNP制剂:

[0447] SIRNA-NP为三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物的脂质纳米粒子制剂。在本文报告的实验中使用以下脂质纳米粒子 (LNP) 制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0448]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0449] 阳离子脂质具有以下结构 (7) :



[0451] SiRNA

[0452] 以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5' - 3')
[0453]	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUmUr CmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmUm GrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrUm UrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCrU mGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrAm	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrG
[0454]	ArUmCrArUrCrUrCrUrU	mCrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 碱基 N 的 RNA	
	mN = 碱基 N 的 2'O-甲基修饰	

[0455] 体外组合实验方案:

[0456] 使用描述于Cai等人 (Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2012. 第56卷 (8) : 4277-88) 中的测定系统的改进形式进行体外组合研究。先前研发的HepDE19细胞培养系统 (Guo等人J.Virology (2007) 81 (22) :12472-12484) 以四环素 (Tet) 调控的方式帮助HBV DNA复制和cccDNA形成, 且产生可检测的报告分子, 此取决于cccDNA的产生和维持。

[0457] 在HepDE19细胞培养系统中, 报告基因为前核心RNA及其同源蛋白质产物 (所分泌的HBV“e抗原” (HBeAg))。在HepDE19细胞中, 前核心RNA和HBeAg仅由cccDNA环状模板产生, 因为HBeAg的ORF与其5' RNA前导序列在整合病毒基因组的相对端之间为隔开的, 且仅在形成cccDNA的情况下变得邻接。虽然基于HepDE19细胞培养系统的测定对于测定活性来说为有效的, 但高通量筛检的结果可能为复杂的, 因为HBeAg ELISA与病毒HBeAg同系物交叉反应, 所述病毒HBeAg同系物为在HepDE19细胞中主要以非cccDNA依赖性方式表达的核心抗原 (HBcAg)。为克服此困难, 已研发出替代细胞培养系统 (本文中命名为DESHAe82细胞培养系统且描述于PCT/EP/2015/06838中), 其在DESHAe82细胞的转基因中的HBeAg的N端编码序列中包括框内HA表位标签, 而不会干扰对于HBV复制、cccDNA转录和HBeAg分泌来说关键的任

何顺式组件。

[0458] 已研发出用于使用HA抗体充当捕获抗体且HBeAg充当检测抗体来检测经HA标记的HBeAg的化学发光ELISA测定 (CLIA), 从而消除来自HBcAg的污染信号。与HA-HBeAg CLIA测定联合的DESHAe82细胞株展现高水平的cccDNA合成和HA-HBeAg产生和分泌, 以及高特异性读出信号和低噪声。此外, 研发了专门用于检测DE19或DESHAe82细胞中的前核心RNA的用于定量逆转录和聚合酶链反应 (qRT-PCR) 的方案且还用该方案检测了经翻译以产生HBeAg或HA-HBeAg的cccDNA依赖性mRNA (前核心RNA)。

[0459] 为测试化合物组合, 将DESHAe82或DE19细胞 (如实施例中所指示) 在含Tet的补充有10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中, 且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日, 为细胞更换不含Tet的新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理, 且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育48h的持续时间。将抑制剂在100%DMSO (ETV、3TC、化合物3和化合物4) 或生长培养基 (SIRNA-NP) 中稀释且测定中的最终DMSO浓度为0.5%。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂, 所述组合是以棋盘方式进行使得各测试浓度的抑制剂A与各测试浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制cccDNA形成和表达的影响。各板上在多个孔中包括未处理的阴性对照样品 (0.5%DMSO或仅培养基)。在9天孵育之后, 移除培养基且对细胞进行RNA提取以测量cccDNA依赖性前核心mRNA水平。总细胞RNA是使用96孔形式总RNA分离试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, 产品目录740466.4) 通过遵循制造商的说明书来提取 (真空歧管加工, 再进行两次额外的缓冲液RA4洗涤)。在不含RNA酶的水中洗脱RNA样品。使用Roche LightCycler480和RNA Master水解探针 (目录号04991885001, Roche) 使用用于cccDNA依赖性前核心RNA的特异性检测的引物和条件进行定量实时RT-PCR。还通过标准方法检测了GAPDH mRNA水平且用于标准化前核心RNA水平。以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算前核心RNA水平的抑制且因此计算cccDNA表达, 且使用Prichard-Shipman组合模型使用MacSynergy II程序分析 (Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. 第14卷 (4-5): 181-205; Prichard MN, Aseltine KR和Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992) 以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性: 在95%CI下协同作用体积 $<25\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 <2) = 可能不显著; 25-50 (\log 体积 >2 且 <5) = 微小但显著, 50-100 (\log 体积 >5 且 <9) = 中度, 在体内可为重要的; 超过100 (\log 体积 >9) = 强协同作用, 在体内可能为重要的; 体积接近1000 (\log 体积 >90) = 异常地高, 查验数据。

[0460] 同时, 以两种方式评估抑制剂组合对细胞活力和增殖的影响: 1) 直接显微镜观察测试孔, 和2) 使用以10-20%细胞密度接种的重复板, 在4天之后使用Cell-Titer Glo试剂 (Promega) 按照制造商的说明书测定其细胞内ATP含量。以占未处理的阴性对照孔的百分比的形式计算细胞活力和密度。

[0461] 实施例7: 化合物3与恩替卡韦的体外组合:

[0462] 将化合物3 (浓度范围于半对数稀释系列中10 μM 至0.0316 μM 且进行6点滴定) 与恩替卡韦 (浓度范围于半对数3.16倍稀释系列中0.010 μM 至0.00003 μM 且进行6点滴定) 组合进行测试。此组合的抗病毒活性显示于表7a中; 协同作用和拮抗作用体积显示于表7b中。由根据Prichard和Shipman进行的协同作用和拮抗作用体积测量的2次重复产生的组合结

果和解释显示于表9d中。在此测定系统中,此组合产生前核心RNA表达的协同抑制。通过显微术未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0463] 表7a. 化合物3与恩替卡韦的组合的抗病毒活性:

[0464] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=2个样品/数据点)

[0465]	ETV	0.01	86.940	97.010	97.490	95.900	97.120	98.240	99.220
	, μM	0.0032	81.510	61.730	69.510	62.570	98.550	97.820	97.690
		0.001	73.320	77.600	86.990	66.700	94.490	89.590	91.710
		0.0003	69.090	78.290	58.730	55.160	92.360	91.290	93.110
		0.0001	-8.990	39.460	55.700	44.430	45.680	73.420	91.580
		3E-05	-133.220	-313.960	20.870	49.930	8.740	68.590	72.590
		0	0.000	-26.280	-86.920	36.240	67.120	90.600	84.340
			0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10

[0466]	化合物	化合物 3, μM
--------	------------	--

[0467] 表7b. 化合物3与恩替卡韦的组合的MacSynergy体积计算:

[0468] 在99.99%置信水平下“大于相加性”的抑制水平

[0469]	ETV,	0.01	0	3.75864	13.8041	1.86048	0	0	0.74344
	μM	0.0032	0	0	0	0	0.87826	0	0
		0.001	0	9.05212	27.6452	0	0	0	0
		0.0003	0	0.40426	6.01171	0	0	0	0
		0.0001	0	75.9052	125.983	0	0	0	0
		3E-05	0	0	322.705	90.4025	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10
	化合物	化合物 3, μM							

[0470] 实施例8: 化合物4与恩替卡韦的体外组合:

[0471] 将化合物4 (浓度范围于半对数稀释系列中10 μM 至0.0316 μM 且进行6点滴定) 与恩替卡韦 (浓度范围于半对数3.16倍稀释系列中0.010 μM 至0.00003 μM 且进行6点滴定) 组合进行测试。此组合的抗病毒活性显示于表8a中; 协同作用和拮抗作用体积显示于表8b中。由根据Prichard和Shipman进行的协同作用和拮抗作用体积测量的2次重复产生的组合结果和解释显示于表9d中。在此测定系统中,此组合产生前核心RNA表达的协同抑制。通过显微术未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0472] 表8a. 抗病毒活性, 化合物4与恩替卡韦的组合:

[0473] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=2个样品/数据点)

[0474]	ETV,	0.01	96	92.03	89.04	98.02	97.16	97.18	96.46
	μM	0.0032	95.31	93.96	93.11	89.34	91.81	97.7	97.74
		0.001	80.83	94.74	94.25	95.49	98.64	98.14	98.7
		0.0003	39.01	95.61	92.25	97.73	97.85	97.68	95.26
		0.0001	64.23	78.08	98.62	96.63	89.34	98.87	95.3
		3E-05	-32.56	-53.69	58.53	97.04	97.7	96.9	95.1
		0	0	-49.48	66.78	94.67	93.92	97.88	97.53
			0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10

[0475]

化合物	化合物4, μM
------------	---------------------------------------

[0476] 表8b. 化合物4与恩替卡韦的组合物MacSynergy体积计算:

[0477] 在99.99%置信区间下“大于相加性”的抑制水平

[0478]	ETV, μM	0.01	0	-1.99	-9.63	-1.77	-2.6	-2.74	-3.44
	0.0032	0	0.97	-5.33	-10.41	-7.9	-2.2	-2.14	
	0.001	0	23.4	0.62	-3.49	-0.19	-1.45	-0.83	
	0.0003	0	86.78	12.51	0.98	1.56	-1.03	-3.23	
	0.0001	0	31.55	10.5	-1.46	-8.49	-0.37	-3.82	
	3E-05	0	44.46	2.57	4.11	5.76	-0.29	-1.63	
	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0.032	0.100	0.317	1.001	3.165	10	
化合物	化合物4, μM								

[0479] 实施例9: 化合物3与SIRNA-NP的体外组合:

[0480] 将化合物3 (浓度范围于半对数稀释系列中10 μM 至0.0316 μM 且进行6点滴定) 与SIRNA-NP (浓度范围于半对数3.16倍稀释系列中0.10 μM 至0.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 且进行6点滴定) 组合进行测试。此组合的抗病毒活性显示于表9a中; 协同作用和拮抗作用体积显示于表9b中。由根据Prichard和Shipman进行的协同作用和拮抗作用体积测量的4次重复产生的组合结果和解释显示于表9d中。在此测定系统中, 此组合产生前核心RNA表达的协同抑制。通过显微术或Cell-Titer Glo测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制 (表9c)。

[0481] 表9a. 化合物3与SIRNA-NP的组合物抗病毒活性:

[0482] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0483]	化合物3, μM	10.00	76.180	76.580	93.33	97.17	94.67	97.12	98.640
	0				0	0	0	0	
	3.165	73.120	93.950	95.50	97.73	98.12	99.16	98.620	
	1.001	88.510	95.740	97.34	97.88	98.62	99.41	98.150	
	0.317	77.070	96.440	93.72	98.34	98.39	99.26	97.820	
	0.100	71.330	87.960	91.49	87.11	97.70	97.79	95.920	

[0484]				0	0	0	0	
	0.032	35.570	-56.280	64.87	86.08	90.92	86.33	89.560
	0	0.000	3.930	-46.4	35.73	87.37	72.72	99.230
		0	0.0003	0.001	0.003	0.010	0.032	0.100
化合物	SIRNA-NP ($\mu\text{g}/\text{mL}$)							

[0485] 表9b. 化合物3与SIRNA-NP的组合物MacSynergy体积计算:

[0486] 在99.99%置信水平下“大于相加性”的抑制水平

[0487]	化合物 3, μM	10.000	0.000	0.000	13.805	4.977	0.000	0.000	-0.061
		3.165	0.000	2.558	28.321	9.580	0.000	4.779	0.000
		1.001	0.000	1.416	10.254	1.969	0.000	0.697	0.000
		0.317	0.000	11.954	12.984	9.921	0.000	3.677	0.000
		0.100	0.000	0.000	1.985	0.000	0.000	3.438	0.000
		0.032	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
			0	0.0003	0.001	0.003	0.010	0.032	0.100
化合物	SIRNA-NP ($\mu\text{g/mL}$)								

[0488] 表9c. 化合物3与SIRNA-NP的组的细胞毒性: 相较于对照的平均细胞活力百分比

[0489]	化合物 3, μM	10.000	110.5	112.6	120.6	124.0	115.0	89.1
		3.165	105.9	116.1	119.5	120.6	117.3	95.1
		1.001	109.0	118.6	115.9	114.9	116.3	91.5
		0.317	110.0	111.8	119.7	117.2	109.7	90.3
		0.100	99.3	107.2	115.1	119.5	119.9	93.5
		0.032	99.3	107.7	122.6	127.1	123.0	85.9
化合物		0.0003	0.001	0.003	0.010	0.032	0.100	

[0490] 表9d. 通过qRT-PCR进行的cccDNA衍生的前核心RNA定量的情况下DESHAe82细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总

	抑制剂 A (化合物 编号)	抑制剂 B	协同作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)	协同作 用 Log 体积	拮抗作 用 ($\mu\text{M}^2\%$)	拮抗 作用 Log 体 积	解释
[0491]	3	恩替卡韦 (ETV)	679.15	169.58	0	0	协同
[0492]	4	恩替卡韦 (ETV)	225.77	56.44	-76.43	-19.11	作用 协同 作用
	3	SIRNA-N P	122.31	30.54	-0.06	-0.01	协同 作用

[0493] 实施例10

[0494] 本实施例的目的为比较包括化合物3 (HBV衣壳化的小分子抑制剂) 和SIRNA-NP (包封靶向HBV的siRNA的脂质纳米粒子制剂) 的不同组合处理的抗HBV活性; 以及已确立的HBV照护标准处理: 恩替卡韦 (ETV) (抑制HBV DNA聚合酶活性的核苷(酸)类似物) (de Man RA等人, Hepatology, 34 (3), 578-82 (2001)) 和聚乙二醇化干扰素 α -2a (pegIFN α -2a), 其经由1型干扰素受体活化限制病毒散播 (Marcellin等人, N Engl J Med., 51 (12), 1206-17 (2004))。将这些组合的效能与使用单独的化合物3、SIRNA-NP和ETV的单一治疗处理相比较, 并且与使用化合物3的媒介物的阴性对照处理条件相比较。

[0495] 在充分确立的慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的人源化肝脏嵌合小鼠模型中进行此

工作(Tsuge等人,Hepatology,42(5),1046-54(2005))。在于第0天开始的处理期之前确定动物中的HBV感染持久水平。测试物品剂量如下:化合物3,口服,100mg/kg,每天两次;SIRNA-NP,静脉内,3mg/kg,每2周一次;ETV,口服,1.2 μ g/kg,每天一次;pegIFN α -2a,皮下,30 μ g/kg,每周两次。

[0496] 基于以下各项来评估抗HBV效果:血清HBsAg水平,使用来自Bio-Rad Laboratories的GS HBsAg EIA 3.0酶联免疫吸附测定试剂盒按照制造商的说明书;和使用定量PCR测定(引物/探针序列来自Tanaka等人,Journal of Medical Virology,72,223-229(2004))由总提取DNA测量的血清HBV DNA水平。

[0497] 如由相对于所研究的单一治疗处理更强的血清HBV DNA水平降低所例示,双重和三重组合处理产生更大的抗病毒活性。具体来说,在第28天,与使用ETV或化合物3或SIRNA-LNP的单一治疗处理观测到的1.0至1.5log₁₀降低相比,在用化合物3与SIRNA-LNP或化合物3与pegIFN α -2a的组合处理后血清HBV DNA水平降低超过2.5log₁₀,而在用化合物3与ETV的组合处理后降低2log₁₀。使用化合物3和SIRNA-NP和ETV或化合物3和SIRNA-NP和pegIFN α -2a的三重组合处理对HBV DNA水平展现相对于二重组合成处理到第28天时略微提高的影响。如由血清HBsAg水平所例示的SIRNA-NP抑制乙型肝炎蛋白质(抗原)产生的能力得以维持(当与其他抗病毒剂处理组合共施用)。

[0498] 表10a:组合和单一治疗处理对血清HBV DNA水平的影响

组编号	处理	血清 HBV DNA (拷贝数/mL± SEM)				
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
[0499]	化合物 3 的媒介物对照	1.50E+08 ± 1.82E+07	1.65E+08 ± 2.78E+07	1.45E+08 ± 1.50E+07	2.13E+08 ± 3.01E+07	2.13E+08 ± 2.63E+07
	化合物 3	1.70E+08 ± 2.16E+07	1.33E+07 ± 1.85E+06	1.28E+07 ± 1.78E+06	1.02E+07 ± 4.24E+06	1.17E+07 ± 5.20E+06
	SIRNA -NP	1.88E+08 ± 4.52E+07	5.18E+06 ± 1.50E+06	6.40E+06 ± 9.67E+05	2.24E+06 ± 5.51E+05	6.86E+06 ± 2.26E+06
	化合物 3 + SIRNA -NP	1.56E+08 ± 2.25E+07	8.64E+06 ± 2.48E+06	2.02E+06 ± 5.08E+05	4.36E+05 ± 1.18E+05	3.64E+05 ± 1.00E+05
	化合物 3 + SIRNA -NP + ETV	1.66E+08 ± 1.33E+07	6.82E+06 ± 1.64E+06	1.57E+06 ± 2.19E+05	3.70E+05 ± 8.96E+04	1.68E+05 ± 4.00E+04
	化合物 3 + SIRNA -NP	2.42E+08 ± 5.70E+07	7.75E+06 ± 2.03E+06	1.79E+06 ± 4.53E+05	5.48E+05 ± 1.12E+05	2.90E+05 ± 2.52E+04
[0500]	+ pegIFN α-2a					
	化合物 3 + ETV	1.96E+08 ± 2.46E+07	1.70E+07 ± 4.13E+06	5.22E+06 ± 1.06E+06	2.34E+06 ± 4.06E+05	1.80E+06 ± 3.67E+05
	化合物 3 + pegIFN α-2a	1.67E+08 ± 2.54E+07	8.50E+06 ± 1.64E+06	1.39E+06 ± 3.71E+05	4.98E+05 ± 1.25E+05	3.01E+05 ± 8.11E+04
	ETV	1.48E+08 ± 1.18E+07	2.35E+07 ± 2.47E+06	1.38E+07 ± 1.65E+06	1.35E+07 ± 6.45E+05	9.33E+06 ± 3.20E+05

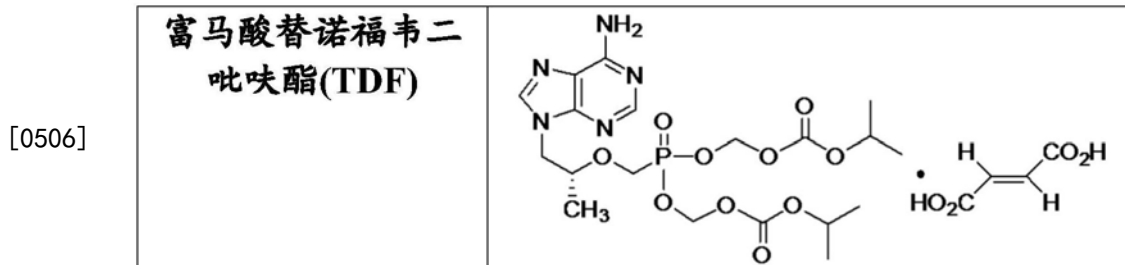
[0501] 表10b:组合和单一治疗处理对血清HBsAg水平的影响

组编号	处理	血清 HBsAg (IU/mL ± SEM)			
		第 0 天		第 21 天	
1	化合物 3 的媒介物对照	2761	± 388	4065	± 338
2	化合物 3	2965	± 616	4158	± 355
3	SIRNA-NP	3352	± 812	44	± 11
4	化合物 3 + SIRNA-NP	3436	± 498	58	± 8
[0502] 5	化合物 3 + SIRNA-NP + ETV	2795	± 309	96	± 24
6	化合物 3 + SIRNA-NP + pegIFN α-2a	3965	± 734	37	± 4
7	化合物 3 + ETV	3965	± 779	5822	± 1490
8	化合物 3 + pegIFN α-2a	3154	± 521	3621	± 683
9	ETV	2649	± 282	2975	± 629

[0503] 实施例11

[0504] 体外组合研究目标：

[0505] 在体外使用HBV细胞培养模型系统来确定HBV衣壳化的小分子抑制剂(化合物3)与替诺福韦(TDF)(HBV聚合酶的核苷类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。



[0507] 体外组合实验方案：

[0508] 使用Prichard和Shipman的方法进行体外组合研究(Prichard MN和Shipman C Jr., Antiviral Research, 1990, 14 (4-5), 181-205; 和Prichard MN等人, MacSynergy II)。HepDE19细胞培养系统为HepG2(人肝癌)衍生的细胞株,其以四环素(Tet)调控的方式帮助HBV DNA复制和cccDNA形成且产生HBV rcDNA和可检测报告分子,此取决于cccDNA的产生和维持(Guo等人2007. J. Virol 81:12472-12484)。将HepDE19(50,000个细胞/孔)涂铺于96孔胶原蛋白涂布组织培养处理微量滴定板中在补充有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素和1μg/ml四环素的DMEM/F12培养基中且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日,为细胞更换不含四环素的新鲜培养基且在37°C和5%CO₂下孵育4h。然后为细胞更换不含四环素的新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理,且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育7天的持续时间。将抑制剂替诺福韦(TDF)和化合物3在100%

DMSO中稀释且测定中的最终DMSO浓度 $\leq 0.5\%$ 。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂,所述组合是以棋盘方式进行使得各浓度的抑制剂A与各浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制rcDNA产生的影响。在用化合物组合将细胞7天孵育之后,使用Quantigene 2.0bDNA测定试剂盒(Affymetrix,Santa Clara,CA)使用HBV特异性定制探针组和制造商的说明书测量存在于抑制剂处理孔中的rcDNA的水平。使用Victor发光读板仪(PerkinElmer型号1420多标记物计数器)读取板,且以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算由各孔产生的相对发光单位(RLU)数据,且使用MacSynergy II程序分析以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性:在95%CI下协同作用体积 $< 25\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 < 2) =可能不显著;25-50 $\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 > 2 且 < 5) =微小但显著,50-100 $\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 > 5 且 < 9) =中度,在体内可为重要的;超过100 $\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 > 9) =强协同作用,在体内可能为重要的;体积接近1000 $\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 > 90) =异常地高,查验数据。在微软Excel中使用XL-Fit模块分析单一化合物处理的细胞的RLU数据以使用4参数曲线拟合算法来确定EC₅₀值。同时,使用重复板评估化合物对细胞活力的影响,以5,000个细胞/孔的密度涂铺且孵育4天,以使用cell-titer glo试剂(CTG;Promega Corporation, Madison, WI)按照制造商的说明书测定作为细胞活力的量度的ATP含量。

[0509] 化合物3与替诺福韦(TDF)的体外组合:

[0510] 将化合物3(浓度范围于3倍稀释系列中3 μM 至0.037 μM 且进行5点滴定)与替诺福韦(浓度范围于2倍稀释系列中1 μM 至0.004 μM 且进行9点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物3或TDF处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表11a中。此实验中测定的化合物3和TDF的EC₅₀值显示于表11b中。当在以上浓度范围内基于各化合物的个别贡献将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用所预测的值相比较(表11b)时,如上文所描述按照MacSynergy II分析且使用Prichard和Shipman(1992)的解释准则发现组合为相加性的(表11a和b)。

[0511] 表11a. 在使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在HepDE19细胞培养模型中化合物3与TDF的组合的抗病毒活性:相较于阴性对照的平均抑制百分比(n=4个样品/数据点)

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

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

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

[0512]

[药物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	协同作用曲线(99.9%)	TDF
化合物 3												
MM												
3	0	0	0.20747	0	0	0	0	0	0	0	协同作用	12.07
1	0	0	5.08557	6.78128	0	0	0	0	0	0	LOG 体积	1.73
0.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.111	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LOG 体积	0
0.037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

[0513] 表11b:使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在HepDE19细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总:

[0514] 抑制 抑制 抑制 抑制 协同作用 协同 拮抗作用 拮抗 结论

	剂 A	剂 B	剂 A EC ₅₀ (MM)	剂 B EC ₅₀ (MM)	体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	作用 LOG 体积	体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	作用 LOG 体积	
[0515]	化合物 3	TDF	0.454	0.088	12.07	1.73	0	0	相加性

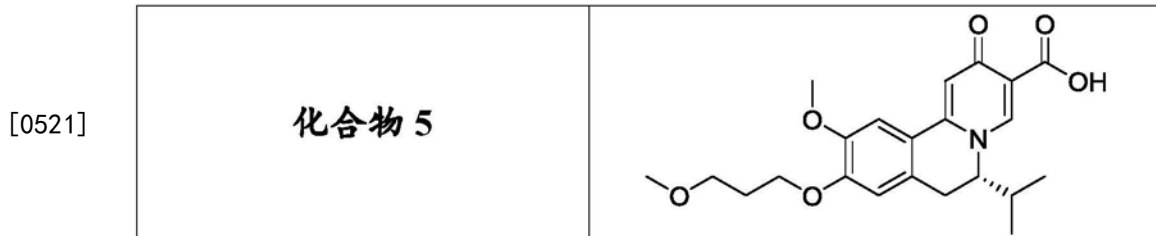
[0516] *在99.9%置信区间

[0517] 实施例12

[0518] 体外组合研究目标:

[0519] 为了确定组合处理中的两种化合物在乙型肝炎病毒 (HBV) 转染细胞培养物中将产生协同性、拮抗性抑或相加性作用。所述化合物 (化合物5) 为乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 分泌的小分子抑制剂, 而SIRNA-NP为脂质纳米粒子 (LNP) 包封的RNAi抑制剂, 其靶向病毒mRNA和病毒抗原表达。在此体外研究中使用HBV细胞培养系统来测定组合处理的影响。

[0520] 小分子化学结构:



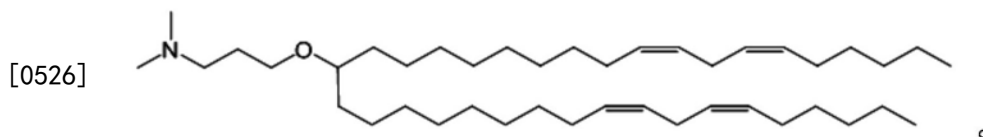
[0522] LNP制剂:

[0523] SIRNA-NP为三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物的脂质纳米粒子制剂。在本文报告的实验中使用以下脂质纳米粒子 (LNP) 产物来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。二硬脂酰基磷脂酰胆碱缩写为DSPC。

[0524]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0525] 阳离子脂质具有以下结构:



[0527] siRNA

[0528] 以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUm UrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmU mGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
[0529]	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrU mUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCr UmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrA mArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGr GmCrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 碱基 N 的 RNA	
	mN = 碱基 N 的 2'O-甲基修饰	

[0530] 体外组合实验方案:

[0531] 使用Prichard和Shipman的方法进行体外组合研究(Prichard MN和Shipman C Jr., Antiviral Research, 1990, 14(4-5), 181-205; 和Prichard MN等人, MacSynergy II)。HepG2.2.15细胞培养系统为衍生自人肝母细胞瘤HepG2细胞的细胞株, 如Sells等人先前解释其已用adw2-亚型HBV基因组稳定转染(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1987. 第84卷: 1005-1009)。HepG2.2.15细胞分泌Dane样病毒粒子, 产生HBV DNA, 且还产生了病毒蛋白乙型肝炎抗原(HBeAg)和乙型肝炎表面抗原(HBsAg)。

[0532] 为测试化合物组合, 将HepG2.2.15 (30,000个细胞/孔) 在补充有1%青霉素-链霉素、20 μ g/mL遗传霉素(G418)、10%胎牛血清的RPMI+L-谷氨酰胺培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中, 且在湿润孵育器中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育隔夜。次日, 为细胞补充新鲜培养基随后添加溶解于100%DMSO中的0.1 μ M至0.000015 μ M的浓度范围的化合物5。将SIRNA-NP溶解于100%RPMI培养基中且以2.5nM至0.025nM的浓度范围添加至细胞。将微量滴定细胞板在湿润孵育器中在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育6天的持续时间。连续稀释跨越各化合物的EC₅₀值各自的浓度范围, 并且测定的最终DMSO浓度为0.5%。除以棋盘方式对化合物的组合测试之外, 还单独测试了化合物5与SIRNA-NP。

[0533] 各板上在多个孔中包括未处理的阳性对照样品(于培养基中的0.5%DMSO)。在6天孵育之后, 从经处理的细胞移除培养基用于HBsAg化学发光免疫测定(CLIA)(Autobio Diagnostics, 目录号CL0310-2)。生成HBsAg标准曲线以证实HBsAg定量的水平在测定的检测限值以内。通过使用Cell-Titer Glo试剂(Promega)按照制造商的说明书测定细胞内三磷酸腺苷(ATP)且在抑制剂处理的持续时间内通过对细胞的显微镜分析来评估其余抑制剂处理的细胞的细胞毒性。以占未处理的阳性对照孔的百分比的形式来计算细胞活力。

[0534] 使用EnVision多模式读板仪(PerkinElmer型号2104)来读取板。使用各孔产生的相对发光单位(RLU)数据以占未处理的阳性对照孔的抑制百分比的形式计算HBsAg水平, 且使用Prichard-Shipman组合模型使用MacSynergyII程序分析(Prichard MN, Shipman C Jr. Antiviral Research, 1990. 第14卷(4-5): 181-205; Prichard MN, Aseltine KR和Shipman, C. MacSynergy II. University of Michigan 1992)以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性: 在95%CI下协同作用体积<25 μ M²% (log体积<2) = 可能不显著; 25-50 (log体积>2且<5) = 微小但显著, 50-100 (log体积>5且<9) = 中度, 在体内可为重要的; 超过100 (log体积>9) = 强协同作用, 在体内可能为重要的; 体积接近1000 (log体积>90) = 异常地高, 查验数据。在微软Excel中使用XL-Fit模块

分析单一化合物处理的细胞的RLU数据以使用4参数曲线拟合算法来确定EC₅₀值。

[0535] 将化合物5 (浓度范围于半对数3.16倍稀释系列中0.1μM至0.000015μM且进行8点滴定) 与SIRNA-NP (浓度范围于半对数3.16倍稀释系列中2.5nM至0.025nM且进行6点滴定) 组合进行测试。组合结果是一式三份地完成, 并且各测定由4次技术性重复组成。根据Prichard和Shipman进行的协同作用和拮抗作用体积的测量结果和解释显示于表12e中。此组合的抗病毒活性显示于表12a1、12a2和12a3中; 协同作用和拮抗作用体积显示于表12b1、12b2和12b3中。此组合的相加性抑制活性显示于表12d1、12d2和12d3中。在此测定系统中, 组合产生HBsAg分泌的相加性抑制。通过显微术或Cell-Titer Glo测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制(表12c1、12c2和12c3)。

[0536] 试验1

[0537] 表12a1. 化合物5与SIRNA-NP的组的抗病毒活性:

[0538] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0539]	SIRNA-NP, μM	0.00	86.5	85.6	87.3	88.3	89.	90.4	90.8	89.	91.	86.5
		25	2	9	2	1	63	2	6	67	42	2
		0.00	77.5	77.9	78.7	80.6	85.	87.6	88.9	89.	90.	77.5
		079	4	3	7	5	38	1	7	29	33	4
		0.00	58.3	51.6	58.0	66.9	71.	78.6	82.9	85.	85.	58.3
		025	3	5	1	9	54	8	9	31	23	3
		7.9E-05	32.2	31.0		56.2	67.	74.9	81.2	85.		32.2
			8	8	41.8	4	66	8	2	88	85	8
		2.5E-05	23.1	23.8		46.5	60.	70.1	78.4	80.	82.	23.1
			1	1	29.3	4	92	8	5	94	53	1
	0	10.2	15.0	25.3	37.0	55.	66.4	75.9	80.	79.	10.2	
		6	9	7	6	53	3	4	86	69	6	
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.001	0.01	0.03	0.1	
	化合物	化合物 5, μM										

[0540] 表12b1. 化合物5与SIRNA-NP的组的MacSynergy体积计算: 99.99%置信区间 (邦弗朗尼调整96%)

[0541]	SIRNA-NP, μM	0.0025	0	0	0	0	0	0	-0.92	0	0
		0.000	0	0	0	0	0	0	-1.51	0	-0.7

[0542]	协同作用	79									9
	用 0	0.000									
	Log 体积	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	拮抗作用	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3.69	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Log 体积	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
-0.92		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
化合物	化合物 5, μM										

[0543] 表12c1. 化合物5与SIRNA-NP的组合的细胞毒性:

[0544] 相较于对照的平均细胞活力百分比

[0545]	SIRNA-NP, μM	0.0025	103	97	102	102	100	101	105	109	107	123
	平均细胞活力 %	0.0079	103	92	99	96	105	106	101	109	101	98
		0.0025	101	47	122	107	59	109	100	115	104	104
		7.9E-05	104	128	120	109	152	107	109	106	95	101
		2.5E-05	95	100	111	107	95	96	100	102	98	115
		0	100	113	109	99	100	92	111	112	110	136
			0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1
	化合物	化合物 5, μM										

[0546] 表12d1. 化合物5与SIRNA-NP的组合的抗病毒活性:

[0547] 相较于阴性对照的相加性抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0548]	SIRNA-NP, μM	0.0025	83.8	85.5		87.9	89.8	92.	94.5	96.1	96.9	96.
	相加性抑制%	0.00079	73.9	76.6	86.3	80.5		88.	91.2	93.7	95.0	94.
		0.00025	49.3	54.5	57.0	62.2	68.1	77.	83.0	87.8	90.3	89.
		7.9E-05	23.9	31.7	35.4	43.2	52.1	66.	74.4		85.4	84.
		2.5E-05	12.1	21.1	25.3	34.4	44.6	60.		78.8	83.1	82.
		0		10.2	15.0	25.3	37.0	55.	66.4	75.9	80.8	79.
			0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.1

[0549]	化合物	化合物 5, μM									
--------	------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0550] 试验2

[0551] 表12a2. 化合物5与SIRNA-NP的组合的抗病毒活性:

[0552] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0553]	SIRNA-NP, μM	0.00	77.		80.5	81.5	84.8	83.9	84.2	87.	86.0	84.0
		25	7	81.95	1	8	3	7	6	08	3	1
	平均抑制 %	0.00	69.		58.3	75.3	79.5	83.6	85.3	87.	86.1	86.8
		079	06	70.21	3	8	2	6	1	4	2	3
		0.00	43.		58.3	58.0	67.9		79.6	82.	84.3	86.4
		025	84	47.41	8	3	2	76.4	9	57	9	6
		7.9E-05	25.		40.6	46.8		70.5	73.3	84.	88.2	87.0
			14	44.78	1	7	58.4	7	1	9	9	5
	2.5E-05	14.		38.4	45.7	55.8		77.3	78.	83.6	86.1	
		38	27.11	9	3	8	65.5	7	71	2	4	
	0			22.1		43.6	50.1	69.2	79.	83.3	82.3	
		0	6.2	5	31.5	1	9	1	59	2	6	
		0	1.00	3.16	1.0E-05	3.17	0.00	0.00	0.0	0.00	0.1	
			E-06	E-06		E-05	01	0316	01	316		
化合物	化合物 5, μM											

[0554] 表12b2. 化合物5与SIRNA-NP的组的MacSynergy体积计算:99.9%置信区间(邦弗朗尼调整96%)

[0555]	SIRNA-NP, μM	0.00										
		25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	协同作用	0.00										
	0	079	0	0	0	0	0	0	0	0	-3.6	0
	Log 体积	0.00										
	0	025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	拮抗作用	7.9E-05										
	-3.62		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Log 体积	2.5E-05											
-0.9		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0											
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	1.00	3.16	1.0E-05	3.17	0.0	0.00	0.0	0.00	0.1	
			E-06	E-06		E-05	001	0316	01	316		
化合物	化合物 5, μM											

[0556] 表12c2. 化合物5与SIRNA-NP的组的细胞毒性:

[0557] 相较于对照的平均细胞活力百分比

[0558]

SIRN A-NP, μM 平均细胞活力 %	0.0025	88	90	74	76	82	77	74	75	90	108	
	0.00079	77	72	67	68	65	67	68	65	71	110	
	0.00025	79	75	66	73	71	67	64	63	74	114	
	7.9E-05	88	75	73	76	55	68	68	64	79	116	
	2.5E-05	90	84	68	74	69	71	66	66	80	110	
	0	100	94	92	113	90	98	109	10	8	112	133
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01	0.1
化合物	化合物 5, μM											

[0559] 表12d2. 化合物5与SIRNA-NP的组合的抗病毒活性:

[0560] 相较于阴性对照的相加性抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0561]

SIRN A-NP, μM 相加性抑制 %	0.0025	77.7	79.08	82.64	84.72	87.43	88.89	93.13	95.45	96.28	96.07
	0.00079	69.06	70.98	75.91	78.81	82.55	84.59	90.47	93.69	94.84	94.54
	0.00025	43.84	47.32	56.28	61.53	68.33	72.03	82.71	88.54	90.63	90.09
	7.9E-05	9.82	15.41	29.79	38.23	49.15	55.08	72.23	81.59	84.96	84.09
	2.5E-05	23.02	27.79	40.07	47.27	56.59	61.66	76.3	84.29	87.16	86.42
	0	0	6.2	22.15	31.5	43.61	50.19	69.21	79.59	83.32	82.36
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01
化合物	化合物 5, μM										

[0562] 试验3

[0563] 表12a3. 化合物5与SIRNA-NP的组合的抗病毒活性:

[0564] 相较于阴性对照的平均抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0565]

SIRN A-NP, μM 平均抑制	0.0025	89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	0.00079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
	0.00025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47

[0566]	%	7.9E-05								93.52	90.87	
		2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
		0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01	0.0316
化合物	化合物 5, μM											

[0567] 表12b3. 化合物5与SIRNA-NP的组的MacSynergy体积计算:99.99%置信区间(邦弗朗尼调整96%)

[0568]	SIRNA-NP, μM	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	协同作用 0	0.00079	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Log 体积 0	0.00025	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	拮抗作用 0	7.9E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Log 体积 0	2.5E-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01
化合物	化合物 5, μM										

[0569] 表12c3. 化合物5与SIRNA-NP的组的细胞毒性:

[0570] 相较于对照的平均细胞活力百分比

[0571]	SIRNA-NP, μM	0.0025	97	116	112	124	112	126	124	122	122	95
	平均细胞活力 %	0.00079	103	115	112	123	109	118	125	127	126	124
		0.00025	115	135	129	140	119	135	129	148	136	122
		7.9E-05	113	129	131	133	130	139	131	138	146	130
		2.5E-05	113	153	140	140	131	134	137	147	143	124
		0	100	131	127	140	131	128	131	141	127	99
		0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01	0.0316

[0572]	化合物	化合物 5, μM										
--------	-----	----------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0573] 表12d3. 化合物5与SIRNA-NP的组的抗病毒活性:

[0574] 相较于阴性对照的相加性抑制百分比 (n=4个样品/数据点)

[0575]	SIRNA-NP, μM	0.0025	89.74	92.07	93.25	94.5	95.52	96.92	98.19	98.87	99	98.59
	相加性抑制%	0.0079	76.48	81.81	84.52	87.38	89.73	92.94	95.86	97.42	97.71	96.77
		0.0025	52.46	63.24	68.71	74.5	79.24	85.73	91.63	94.78	95.37	93.47
		7.9E-05	33.52	48.6	56.24	64.34	70.97	80.05	88.29	92.69	93.52	90.87
		2.5E-05	19.26	37.57	46.86	56.69	64.75	75.77	85.78	91.13	92.14	88.91
		0	0	22.68	34.18	46.36	56.34	69.99	82.39	89.01	90.26	86.26
			0	1.00E-06	3.16E-06	1.0E-05	3.17E-05	0.0001	0.000316	0.001	0.00316	0.01
化合物	化合物 5, μM											

[0576] 表12e. 通过CLIA进行的HBsAg定量的情况下HepG2.2.15细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总

试验 1	化合物 5 EC_{50} (μM)	SIRNA-NP EC_{50} (nM)	协同作用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)	协同作用 Log 体积	拮抗作用 ($\mu\text{M}^2\%$)	拮抗作用 Log 体积	解释
1	0.002	0.00026	0	0	-3.69	-0.92	相加性
2	0.005	0.00035	0	0	-3.62	-0.9	相加性
3	0.002	0.00020	0	0	0	0	相加性

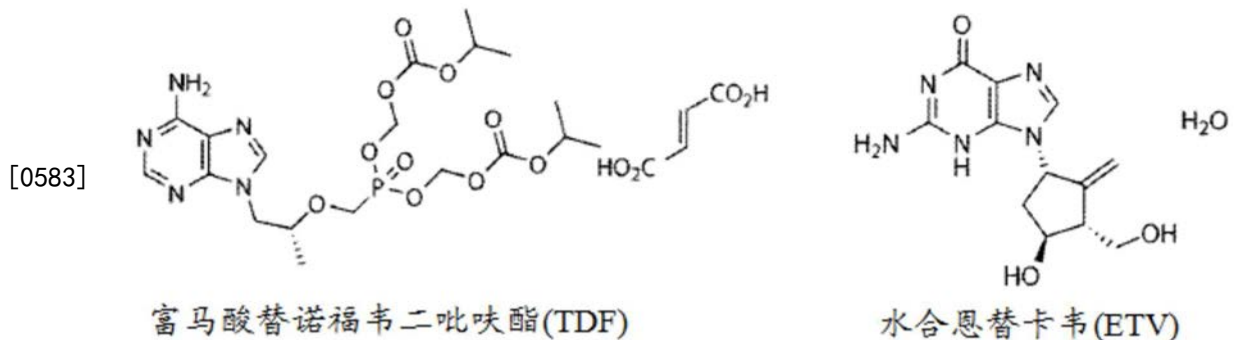
[0578] *在99.9%置信区间

[0579] 实施例13

[0580] 体外组合研究目标

[0581] 此研究的目标为在体外使用HBV细胞培养模型系统来确定替诺福韦(呈前药富马酸替诺福韦二吡啶酯或TDF (HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂) 的形式) 或恩替卡韦(呈水合恩替卡韦或ETV (HBV聚合酶的核苷类似物抑制剂) 的形式) 与SIRNA-NP(旨在促进所有病毒mRNA转录物和病毒抗原的有效敲低的siRNA) 的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0582] 替诺福韦和恩替卡韦的化学结构:



[0584] SIRNA-NP的组成:

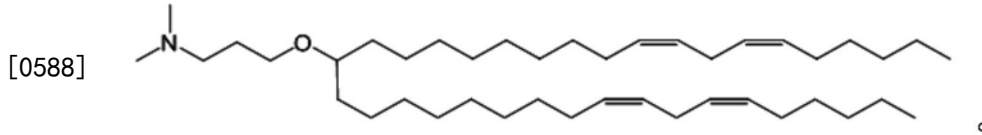
[0585] SIRNA-NP为三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物的脂质纳米粒子制剂。使用以下脂质纳米粒子(LNP) 制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二

硬脂酰基磷脂酰胆碱,而PEG为PEG 2000。

[0586]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0587] 阳离子脂质具有以下结构:



[0589] 以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5' - 3')
[0590]	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrUm UrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmU mGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUrU mUrAmCmUrAmGmUmGrUrU	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCr UmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUrA	rGrArGrArUrGmArUmUrArGrG
[0591]	mArUmCrArUrCrUrCrUrU	mCrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 碱基 N 的 RNA	
	mN = 碱基 N 的 2'O-甲基修饰	

[0592] 体外组合实验方案:

[0593] 使用Prichard和Shipman的方法进行体外组合研究(Prichard MN, Shipman C, Jr., Antiviral Res, 14, 181-205 (1990))。如Guo等人所描述研发HepDE19细胞株(Guo等人, J Virol, 81, 12472-12484 (2007))。其为由HBV基因组稳定转染的人肝癌细胞株,且其可表达HBV前基因组RNA且以四环素调控的方式帮助HBV rcDNA(松弛环状DNA)合成。将HepDE19细胞在不含四环素的补充有10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日,为细胞更换新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理,且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育7天的持续时间。将抑制剂在100%DMSO(ETV和TDF)或生长培养基(SIRNA-NP)中稀释,且测定中的最终DMSO浓度≤0.5%。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂,所述组合是以棋盘方式进行使得各浓度的抑制剂A与各浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制rcDNA产生的影响。在48小时孵育之后,使用bDNA测定(Affymetrix)用HBV特异性定制探针组和制造商的说明书测量存在于抑制剂处理孔中的rcDNA水平。以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算由各孔产生的RLU数据且使用MacSynergy II程序分析以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性:在95%CI下协同作用体积<25μM²% (log体积<2) = 可能不显著;25-50μM²% (log体积>2且<5) = 微小但显著,50-100μM²% (log体积>5且<9) = 中度,在体内可为重要的;超过100μM²% (log体积>9) = 强协同作用,在体内可能为重要的;体积接近1000μM²% (log体积>90) = 异常地高,查验数据。同时,使用用于使用Cell-TiterGlo试剂(Promega)按照制造商的说明书测定作为细胞活力的量度的ATP含量的重复板来评估抑制剂组合对细胞活力的影响。

[0594] 结果和结论:

[0595] TDF与SIRNA-NP的体外组合:

[0596] 将TDF (浓度范围对于2倍稀释系列中1.0 μ M至0.004 μ M且进行10点滴定) 与SIRNA-NP (浓度范围对于3倍稀释系列中25ng/mL至0.309ng/mL且进行5点滴定) 组合进行测试。使用单独或组合形式的TDF或SIRNA-NP处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表13a中。TDF和SIRNA-NP的EC₅₀值显示于表13c中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较(表13a)时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman (Prichard MN.1992.MacSynergy II,University of Michigan) 所描述的解释准则发现组合为相加性的(表13c)。

[0597] 恩替卡韦与SIRNA-NP的体外组合:

[0598] 恩替卡韦(浓度范围对于2倍稀释系列中4.0nM至0.004 μ M且进行10点滴定) 与SIRNA-NP (浓度范围对于3倍稀释系列中25ng/mL至0.309 μ g/mL且进行5点滴定) 组合进行测试。使用单独或组合形式的ETV或SIRNA-NP处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表13b中。ETV和SIRNA-NP的EC₅₀值显示于表13c中。当两种抑制剂以以上浓度范围组合时,按照MacSynergy II分析且使用由Prichard和Shipman (1992) 所描述的解释准则发现浓度组合为相加性的。

[0599] 表13a:替诺福韦双吡唑啉酯富马酸酯与SIRNA-NP的体外组合

[药物]	0	0.004	0.008	0.016	0.031	0.063	0.12	0.25	0.50	1.00	平均抑制%
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	93.58	90.91	94.48	93.31	93.59	95.77	92.3	95.9	94.1	94.9	
8.333	88.63	88.81	88.05	92.79	92.07	92.97	95.6	95.7	94.6	97.0	
2.778	80.6	72.21	73.62	74.95	84.77	86.4	91.2	93.5	95.6	97.5	
0.926	44.48	36.07	41.83	44.94	60.31	76.81	82.6	91.3	95	97.0	
0.309	26.53	13.83	9.48	26.5	32.64	53.59	73.5	82.7	90.8	96.6	
0	0	-5.27	0.67	2.82	6.57	41.67	66.0	81.5	90.8	94.5	

[药物]	0	0.00390	0.0078	0.0156	0.0312	0.062	0.12	0.25	0.5	1	标准偏差(%)
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	8.23	5.78	2.1	5.36	4.44	2.77	5.57	2.31	3.88	1.7	
8.333	5.38	4.15	6.01	5.32	3.97	1.82	2.89	3.61	3.13	2.02	
2.778	13.12	12	6.21	14.12	12.42	5.29	3.1	1.92	1.12	1.34	
0.926	16.91	9.73	29.33	16.45	21.14	5.83	6.39	2.16	2.29	1.2	
0.309	12.04	43.02	33.58	19.89	52.19	25.65	17.4	7	6.61	5.58	1.79
0	0	23.5	44.96	26.95	54.17	21.72	15.9	6	1.64	0.99	

[0600]

[药物]	0	0.00390	0.0078	0.0156	0.0312	0.062	0.12	0.25	0.5	1	相加性抑制
SIRNA-NP											TDF (μM)
ng/mL											
25	93.58	93.24	93.62	93.76	94	96.26	97.8	98.8	99.4	99.6	
8.333	88.63	88.03	88.71	88.95	89.38	93.37	96.1	97.9	98.9	99.3	
2.778	80.6	79.58	80.73	81.15	81.87	88.68	93.4	96.4	98.2	98.9	
0.926	44.48	41.55	44.85	46.05	48.13	67.62	81.1	89.7	94.9	96.9	
0.309	26.53	22.66	27.02	28.6	31.36	57.14	75.0	86.4	93.2	96	
0	0	-5.27	0.67	2.82	6.57	41.67	66.0	81.5	90.8	94.5	

[药物]	0	0.00	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	协同作用 曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 96%
SIRNA-NP											协同作用
ng/mL											log 体积
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[0601] 表13b:恩替卡韦与SIRNA-NP的体外组合

[药物]	0	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.50	1.00	2.00	4.00	平均抑制%
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	94.31	92.38	93.86	94.7	93.85	95.21	92.8 8	95.4 9	94.2 8	95.6 3	
8.333	90.41	91.44	91.71	89.9	90.91	92.34	94.0 3	94.3 3	95.3 7	95.2 1	
2.778	76.74	74.61	62.81	75.26	79.3	82.04	86.3 8	90.7 6	92.0 8	91.1 8	
0.926	46.84	39.16	41.37	58.29	48.88	49.94	62.3 9	72.8 2	82.8 1	86.4 2	
0.309	28.68	27.78	12.18	5.93	8.2	19.18	27.5 5	56.0 1	73.1 1	79.2 3	
0	0	-43.72	-50.07	-30.26	-23.47	-21.25	10.2 4	41.7 1	58.3 5	69.9 9	

[药物]	0	0.01562	0.0312	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	标准偏差(%)
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	1.67	6.18	2.63	3.7	2.4	3.83	4.89	3.65	3.15	1.22	
8.333	2.86	5.03	5.65	8.63	2.5	1.68	2.18	3.07	1.44	2.47	
2.778	12.28	9.65	32.22	11.86	9.31	4.95	4.87	2.25	2.64	6.79	
0.926	17.81	22.17	35.16	8.83	25.87	17.46	17.5	7.78	4.36	5.46	
0.309	12.26	11.58	26.87	28.27	30.31	21.45	38.9 3	12.9 9	12.2 7	6.89 8	
0	0	47.73	38.3	41.27	25.17	56.81	65.1 3	33.5 3	17.7 5	11.4 8	

[0602]

[药物]	0	0.01562	0.0312	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	相加性抑制
SIRNA-NP											ETV (nM)
ng/mL											
25	94.31	91.82	91.46	92.59	92.97	93.1	93.7 3	96.6 8	97.6 3	98.2 9	
8.333	90.41	86.22	85.61	87.51	88.16	88.37	89.4 3	94.4 1	96.0 1	97.1 2	
2.778	76.74	66.57	65.09	69.7	71.28	71.8	74.3 6	86.4 4	90.3 1	93.0 2	
0.926	46.84	23.6	20.22	30.75	34.36	35.54	41.4 1	69.0 1	77.8 6	84.0 5	
0.309	28.68	-2.5	-7.03	7.1	11.94	13.52	21.3 8	58.4 3	70.3 3	78.6 8	
0	0	-43.72	-50.07	-30.26	-23.47	-21.25	10.2 4	41.7 1	58.3 5	69.9 9	

[药物]	0	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.50	1	2	4	协同作用 曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 96%
SIRNA-NP											
ng/mL											
25.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	协同作用 0
8.333	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 体积 0
2.778	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.926	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 体积 0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

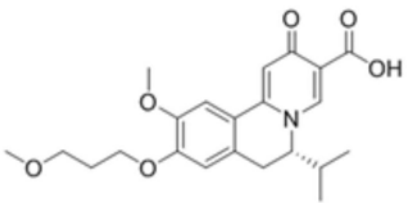
[0603] 表13c:使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在AML12-HBV10细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总:

抑制剂 A	抑制剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (ng/mL)	抑制剂 B EC ₅₀	协同作用体积 *	协同作用 Log 体积	拮抗作用体积 *	拮抗作用 Log 体积	结论
[0604] SIRNA-NP	替诺福韦 (TDF, μM)	0.947	0.089	0	0	0	0	相加性
SIRNA-NP	恩替卡韦 (ETV, nM)	0.906	1.780	5.37	0.77	0	0	相加性

[0605] *在99.9%置信区间

[0606] 实施例14

[0607] 实施例中提及以下化合物。化合物20可使用已知程序制备。举例来说,化合物20可如国际专利申请公开案第W02015113990号中所描述来制备。

化合物编号或名称	结构
[0608] 20	

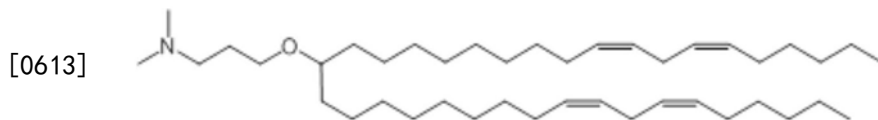
[0609] 使用乙型肝炎病毒 (HBV) 小鼠模型来评估sAg产生的小分子抑制剂和靶向HBV的siRNA (SIRNA-NP) 作为独立处理和彼此组合的抗HBV效果。

[0610] 使用以下脂质纳米粒子 (LNP) 制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0611]

PEG (2000) -C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	9

[0612] 阳离子脂质具有以下结构:



[0614] 经由尾部静脉注射向C57/B16小鼠施用AAV1.2的1E11病毒基因组(描述于Huang, LR等人中Gastroenterology, 2012, 142 (7) :1447-50)。此病毒载体含有HBV基因组的1.2倍过长拷贝且除其他HBV产物外表达HBV表面抗原 (HBsAg)。小鼠中的血清HBsAg表达是使用酶免疫测定来监测。基于血清HBsAg水平将动物分选(随机化)至多个组中,使得a) 所有动物经证实表达HBsAg,且b) HBsAg组平均值在处理开始之前彼此相似。

[0615] 如下将动物用化合物20处理:在第0天开始,在第0天与第28天之间以每天两次的频率向动物经口施用3.0mg/kg剂量的化合物20,持续总共56个剂量。将化合物20溶解于共溶剂形成物中供施用。为阴性对照动物施用单独的共溶剂配制物,或不用任何测试物品处理。如下将动物用脂质纳米粒子 (LNP) 包封的靶向HBV的siRNA处理:在第0天,静脉内施用等效于0.3mg/kg siRNA的量的测试物品。将各处理的HBsAg表达水平与该组第0天(给药前)的值相比较。

[0616] 处理的效果是通过在第0天(处理前)、第7天、第14天和第28天收集血液且分析其

血清HBsAg含量来确定。表14显示以占第0天个别动物处理前基线值的百分比表示的处理组平均(n=5(对于siHBV和媒介物组合处理n=4);±平均值的标准误差)血清HBsAg浓度。

[0617] 数据证实响应于单独和呈组合形式的化合物20与HBV siRNA的组合的血清HBsAg降低的程度。在所测试的每个时间点,化合物20与HBV siRNA的组合的处理产生与个别单一治疗处理一样好或更好的血清HBsAg降低。

[0618] 表14. 在HBV感染小鼠模型中化合物20与三种HBV siRNA的单一和组合处理对血清HBV sAg的影响

	处理 1 (经口)	处理 2 (静脉内)	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
	无	无	100 ± 0	80 ± 12	100 ± 18	72 ± 15	72 ± 16
[0619]	媒介物	无	100 ± 0	37 ± 8	62 ± 9	112 ± 66	127 ± 67
	化合物 20	无	100 ± 0	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
	媒介物	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	3 ± 2	19 ± 9	45 ± 25
	化合物 20	HBV siRNA	100 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	5 ± 2	8 ± 2

[0620] 实施例15-24

[0621] 在原代人肝细胞中进行的研究的材料和方法

[0622] 动物

[0623] FRG小鼠购自Yecuris (Tualatin,OR,USA)。小鼠的详细信息显示于下表中。本研究由WuXi IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC协议R20160314-小鼠) 批准。允许小鼠适应新环境7天。每天监测小鼠的总体健康和生理和行为异常的任何迹象。

[0624] FRG小鼠技术数据

	笼 ID	小鼠 ID	供体 ID	出生日期	移植日期	运输前白蛋白(μg/ml)	性别	运输前 BW (g)
	1	37094	HHM3 0017	12/15/2015	01/28/2016	4887	雄性	24.9
	2	37211	HHM2 7018	01/03/2016	02/24/2016	4284	雄性	23.5
[0625]	3	37258	HHM2 7018	01/06/2016	02/24/2016	4282	雄性	29.4
	4	37611	HHM3 0017	02/22/2016	04/06/2016	6627	雄性	25.3
	5	37955	HHM2 7018	03/31/2016	05/19/2016	5990	雄性	25.5
	6	37900	HHM2 7018	03/23/2016	05/04/2016	4802	雄性	27.1
	7	37976	HHM2 7018	03/20/2016	05/04/2016	4520	雄性	24.7

[0626] 测试物品

[0627] 化合物3、22、23、24和25由Arbutus Biopharma提供。Peg-干扰素α-2a (Roche, 180μg/0.5ml) 由WuXi提供。TAF、恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定和TDF由WuXi以DMSO溶液提供。关于化合物的信息显示于下表中。

[0628] 测试物品的信息

化合物名称	小瓶 ID	分子量	尺寸	供货商
25	031NH	401.19	3.1 mg	Arbutus
3	031NR	386.4	3.8 mg	Arbutus
22	031NP	398.4	2.9 mg	Arbutus
23	031NT	379.3	2.9 mg	Arbutus
24	031NV	396.8	2.6 mg	Arbutus

[0629]

化合物名称	供货商	目录编号	储备液浓度	
聚乙二醇干扰素 α -2a	Roche		180 μ g/0.5ml (5040000 IU/ml)	由 WuXi 提供
TAF	SelleckChem	S7856	10 mM	由 WuXi 提供
TDF	Shanghai Sphchem Co., Ltd.		20 mM	由 WuXi 提供

[0630] 病毒

[0631] 丁型HBV是浓缩自HepG2.2.15培养物上清液。病毒的信息显示于下表中。

[0632] HBV的信息

病毒 ID	批号	血清中的 HBV 效价(GE*/ml)	基因型	来源
[0633] HBV _{2.2.15}	HBV2016 0407	2.00E+09 GE/ml	D (Genebank ID: U95551)	HepG2.2.1 5 上清液
HBV _{2.2.15}	B161011	1.9E+09 GE/ml	D (Genebank	HepG2.2.1 5 上清液

[0634]

			ID: U95551)	
HBV _{2.2.15}	B161129	1.5E+09 GE/ml	D (Genebank ID: U95551)	HepG2.2.1 5 上清液

[0635] *GE, HBV基因组等效物。

[0636] 试剂

[0637] 研究中所用的主要试剂为QIAamp 96DNA血液试剂盒(QIAGEN#51161)、FastStart 常用探针预混液(Roche#04914058001)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(Biolite#35004)、HBeAg ELISA试剂盒(Antu#CL 0312)和HBsAg ELISA试剂盒(Antu#CL 0310)。

[0638] 仪器

[0639] 研究中所用的主要仪器为BioTek Synergy 2, SpectraMax (Molecular Devices)、7900HT快速实时PCR系统 (ABI) 和Quantistudio 6实时PCR系统 (ABI)。

[0640] 收获原代人肝细胞 (PHH)

[0641] 应用小鼠肝脏灌注来分离PHH。通过Percoll进一步纯化分离的肝细胞。用培养基将细胞再悬浮且接种至96孔板 (6×10^4 个细胞/孔) 或48孔板 (1.2×10^5 个细胞/孔) 中。接种后一天 (第1天) 用丁型HBV感染PHH。

[0642] PHH的培养和处理。

[0643] 在第2天, 稀释测试化合物且添加至细胞培养板中。每隔一天更新含有化合物的培养基。在第8天收集细胞培养物上清液用于HBV DNA和抗原测定。

[0644] EC_{50} 值的测定。

[0645] 以7种浓度3倍稀释一式三份地测试化合物。

[0646] 双重组合研究。

[0647] 在三个相同的板中以 5×5 矩阵测试两种化合物。

[0648] 在第8天通过细胞计数试剂盒-8测定细胞毒性

[0649] 从细胞培养板移除培养基, 且然后将CCK8 (Biolite#35004) 工作溶液添加至细胞中。将板在 37°C 下孵育, 且通过SpectraMax在450nm波长下测量吸光度且在650nm波长下测量参考吸光度。

[0650] 通过qPCR定量培养物上清液中的HBV DNA

[0651] 用QIAamp 96DNA血液试剂盒 (Qiagen-51161) 分离在第8天收获的培养物上清液中的DNA。对于各样品, 使用 $100\mu\text{l}$ 的培养物上清液来提取DNA。用 $100\mu\text{l}$ 、 $150\mu\text{l}$ 或 $180\mu\text{l}$ AE洗脱DNA。通过qPCR定量培养物上清液中的HBV DNA。通过MacSynergy软件分析组合影响。下文描述了引物。

[0652] 引物信息

[0653]	引物 R	GACAAACGGGCAACATACCTT
	引物 F	GTGTCTGCGGCGTTTTATCA
	探针	5'FAM CCTCTKATCCTGCTGCTATGCCTCATC 3'TAMRA

[0654] 通过ELISA测量培养物上清液中的HBsAg和HBeAg

[0655] 通过HBsAg/HBeAg ELISA试剂盒 (Autobio) 根据手册测量在第8天收获的培养物上清液中的HBsAg/HBeAg。将样品用PBS稀释以得到在标准曲线范围内的信号。用下式计算抑制率。通过MacSynergy软件分析组合影响。

[0656] $\text{HBsAg抑制}\% = \frac{\text{样品的}1\text{-HBsAg量}}{\text{DMSO对照的HBV量}} \times 100$ 。 $\text{HBeAg抑制}\% = \frac{\text{样品的}1\text{-HBeAg量}}{\text{DMSO对照的HBV量}} \times 100$ 。

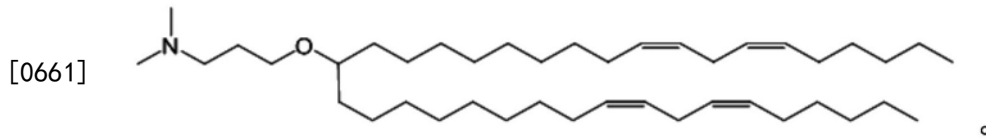
[0657] SIRNA-NP

[0658] SIRNA-NP为三种靶向HBV基因组的siRNA的混合物的脂质纳米粒子制剂。使用以下脂质纳米粒子 (LNP) 制剂来递送HBV siRNA。表中所示的值为摩尔百分比。缩写DSPC意谓二硬脂酰基磷脂酰胆碱。

[0659]

PEG-C-DMA	阳离子脂质	胆固醇	DSPC
1.6	54.6	32.8	10.9

[0660] 阳离子脂质具有以下结构：



[0662] 以下显示所述三种siRNA的序列。

	有义序列(5'-3')	反义序列(5'-3')
	rCrCmGrUmGmUrGrCrArCrU mUrCmGrCmUmUrCrArUrU	rUrGrArAmGrCmGrArArGmU mGrCrAmCrAmCmGrGrUrU
[0663]	rCmUmGmGrCmUrCrArGmUr UmUrAmCmUrAmGmUmGrUr U	rCrArCrUrAmGmUrArArAmCr UmGrAmGrCmCrArGrUrU
	rAmCrCmUrCmUrGmCrCmUr AmArUmCrArUrCrUrCrUrU	rGrArGrArUrGmArUmUrArGr GmCrAmGrAmGrGrUrUrU
	rN = 碱基 N 的 RNA	
	mN = 碱基 N 的 2'O-甲基修饰	

[0664] 聚乙二醇化干扰素 α 2a (IFN α 2a) 的组合物：

[0665] 此试剂购自商业来源：

样品 ID	供货商	尺寸	批号	储备液浓度
聚乙二醇干扰素 α -2a	Roche	180 μ g/0.5ml	B1370	5040000 IU/mL

[0667] 还使用了以下化合物。

化合物名称或 ID 号	结构
3	
22	
23	
24	
25	
富马酸替诺福韦二吡唑啉酯(TDF)	
替诺福韦艾拉酚胺(TAF)	
GLS4 (HAP)	

[0668]

[0669] 实施例15

[0670] 化合物24与TDF的体外组合

[0671] 研究目标

[0672] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物24(属于氨基色满化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和替诺福韦(呈前药富马酸替诺福韦二吡呋酯或TDF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0673] 结果和结论

[0674] 将TDF(浓度范围为于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与24(浓度范围为于3倍稀释系列中1000nM至12.36nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的24或TDF处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表15a、15b和15c中。TDF和24的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表15d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0675] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为协同性或相加性,没有拮抗作用(表15d)。通过显微术或CCK8测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0676] 表15a:在化合物24与TDF的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	平均抑制% 化合物 24 (nM)	
TDF (nM)								
10.00	-15.4	16.23	29.76	33.41	71.99	82.62		
3.33	3.15	24.17	30.1	39.55	71.87	87.48		
1.11	2.49	24.8	24.74	33.45	73.25	86.58		
0.37	-6.24	17.61	35.35	37.05	68.52	87.29		
0.12	-1.16	25.72	25.72	33.54	75.06	86.83		
0.00	0	-37.82	-31.86	-4.54	59.29	81.07		

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	标准偏差(%) 化合物 24 (nM)	
TDF (nM)								
10.00	20.9 5	6.25	5.54	19.51	4.45	1.41		
3.33	2.99 16.5	2.31	4.58	5.73	2.67	0.32		
1.11	2 19.4	2.03	9.07	11.11	3.67	1.02		
0.37	6 21.3	1.06	13.17	2.12	3.62	0.7		
0.12	8	7.78	1.65	6.37	1.38	1.46		
0.00	15.8	17.16	15.42	5.85	4.36	3.8		

[0677]

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	相加性抑制 (nM)	
TDF (nM)								
10.00	-15.4	-59.04	-52.17	-20.64	53.02	78.15		
3.33	3.15	-33.48	-27.71	-1.25	60.57	81.67		
1.11	2.49	-34.39	-28.58	-1.94	60.3	81.54		
0.37	-6.24	-46.42	-40.09	-11.06	56.75	79.89		
0.12	-1.16	-39.42	-33.39	-5.75	58.82	80.85		
0.00	0	-37.82	-31.86	-4.54	59.29	81.07		

[药物]	0	12.346	37.037	111.11	333.33	1000	协同作用 曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TDF (nM)								
10.00	0	54.701 3	63.697 9	0	4.3250 5	0		协同作用 586.54
3.33	0	50.047 8	42.737 2	21.942 6	2.5130 3	4.7568 8		log 体积 133.52
1.11	0	52.509 3	23.470 6	0	0.8720 3	1.6831 8		
0.37	0	60.541 5	32.097 5	41.133 1	0	5.0963		拮抗作用 0
0.12	0	53.679 9	18.326 3	11.698 4	1.1751 4			log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0678] 表15b:在化合物24与TDF的体外组合中对HBsAg的影响

[0679]

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	平均抑制% 化合物 24	
TDF (nM)								
10.00	-6.65	-16.37	-4.65	-5.16	-9.32	22.45		
3.33	-1.28	15.87	17.06	10.42	10.42	34.58		
1.11	-3.54	11.17	11.06	14.54	15.54	33.45		
0.37	-3.32	1.98	7.61	5.28	8.04	35.4		
0.12	-3.31	8.08	-0.03	-1.09	-3.03	29.86		
0.00	0	-17.92	-21.67	-27.16	-25.87	12.01		

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	标准偏差(%) 化合物 24	
TDF (nM)								
10.00	8.24	26.3	12.4	23.19	9.78	5.74		
3.33	8.1	15.58	17.2	4.68	3.18	4.67		
1.11	15.01	5.34	11.05	6.21	3.77	6.92		
0.37	11.33	16.35	16.52	12.36	17.13	6.72		
0.12	14.19	5.14	4.68	11.32	17.36	5.67		
0.00	11.69	23.43	8.53	22.25	22.43	14.73		

[0680]

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.11	333.33	1000.00	相加性抑制 化合物 24	
TDF (nM)								
10.00	-6.65	-25.76	-29.76	-35.62	-34.24	6.16		
3.33	-1.28	-19.43	-23.23	-28.79	-27.48	10.88		
1.11	-3.54	-22.09	-25.98	-31.66	-30.33	8.9		
0.37	-3.32	-21.83	-25.71	-31.38	-30.05	9.09		
0.12	-3.31	-21.82	-25.7	-31.37	-30.04	9.1		
0.00	0	-17.92	-21.67	-27.16	-25.87	12.01		

[药物]	0	12.346	37.037	111.11	333.33	1000	协同作用 曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TDF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0		协同作用 166.48
3.33	0	0	0	23.808	27.434	8.3310		
1.11	0	1	5	9	9	8		log 体积 37.9
0.37	0	0	0	0	0	4.1944		
0.12	0	12.984	10.268	0	0	2.1000		拮抗作用 0
0.00	0	3	1	0	0	3		
0.00	0	0	0	0	0	0		log 体积 0

[0681] 表15c:在化合物24与TDF的体外组合中对HBeAg的影响

[0682]

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.1 1	333.3 3	1000.00	平均抑制% 化合物 24 (nM)
TDF (nM)							
10.00	6.07	-1.44	0.13	0.82	-2.83	22.98	
3.33	11.6 1	19.99	11.19	11.4	7.62	30.62	
1.11	12.0 4	7.84	11.45	7.21	14.03	29.45	
0.37	6.23	1.33	7.42	10.84	16.24	27.43	
0.12	7.02	7.72	1.74	10.06	7.19	22.39	
0.00	0	-2.71	-12.8	-12.74	-14.74	13.04	

[0683]

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.1 1	333.3 3	1000.00	标准偏差(%) 化合物 24 (nM)
TDF (nM)							
10.00	9.14 23.0	8.12	21.17	12.08	22.45	15.84	
3.33	8 15.3	21.21	19.61	18.06	17.88	17.08	
1.11	5 14.7	5.04	7.68	10.99	16.1	14.46	
0.37	5 19.9	11.05	13.95	12.33	18.21	15.12	
0.12	6 19.3	7.42	4.94	17.01	19.91	14.21	
0.00	4	6.37	3.32	18.69	25.64	18.52	

[药物]	0.00	12.35	37.04	111.1 1	333.3 3	1000.00	相加性抑制 化合物 24 (nM)
TDF (nM)							
10.00	6.07 11.6	3.52	-5.95	-5.9	-7.78	18.32	
3.33	1 12.0	9.21	0.3	0.35	-1.42	23.14	
1.11	4	9.66	0.78	0.83	-0.93	23.51	
0.37	6.23	3.69	-5.77	-5.72	-7.59	18.46	
0.12	7.02	4.5	-4.88	-4.83	-6.69	19.14	
0.00	0	-2.71	-12.8	-12.74	-14.74	13.04	

[药物]	0	12.34 6	37.03 7	111.1 1	333.3 3	1000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
TDF (nM)							
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用 0
3.33	0	0	0	0	0	0	log 体积 0
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.12	0	0	0	0	0	0	log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0684] 表15d: 在PHH细胞培养系统中化合物24和TDF的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	协同作 用 Log 体积	拮抗 作用 体积 (μM^2)#	拮抗 作用 Log 体 积	结论
[0685]	HBV DNA	TDF	24	5.16	181.6	586.54	133.52	0	0	协同 作用
	HBs Ag	TDF	24	>100	~1104	166.48	37.9	0	0	协同 作用
[0686]	HBe Ag	TDF	24	>100	1087	0	0	0	0	相加 性

[0687] *在99.9%置信区间

[0688] #在较早的单独实验中测得

[0689] 实施例16

[0690] 化合物23与TDF的体外组合

[0691] 研究目标

[0692] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物23(属于氨基色满化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和替诺福韦(呈前药富马酸替诺福韦二吡啶酯或TDF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0693] 结果和结论

[0694] 将TDF(浓度范围于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物23(浓度范围于3倍稀释系列中2000nM至24.69nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物23或TDF处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表16a、16b和16c中。TDF和化合物23的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表16d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0695] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为协同性或相加性,没有拮抗作用(表16d)。通过显微术或CCK8测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0696] 表16a:在化合物23与TDF的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	平均抑制% 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	22.03	15.63	21.53	50.31	68.1	83.45	
3.33	24.89	11.9	25.62	42.03	71.16	83.1	
1.11	24.36	27.41	25.29	49.82	71.34	85.27	
0.37	-4.64	15.87	10.9	25.68	66.73	79.5	
0.12	19.34	14.57	16.57	17.02	55.55	74.8	
0.00	0	-15.33	-36.58	0.78	30.45	69.97	

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	标准偏差(%) 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	19.88	12.93	22.36	13.69	10.17	4.55	
3.33	25.42	13.82	12.76	20.92	9.9	3.38	
1.11	26.88	5.72	8.4	18.61	10.85	1	
0.37	22.45	24.04	16.71	27.51	6.72	2.89	
0.12	30.56	14.7	14.28	32.63	13.67	7.16	
0.00	28.21	25.59	43.45	19.95	15.55	7.23	

[0697]

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	相加性抑制 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	22.03	10.06	-6.49	22.64	45.77	76.59	
3.33	24.89	13.38	-2.59	25.48	47.76	77.44	
1.11	24.36	12.76	-3.31	24.95	47.39	77.29	
0.37	-4.64	-20.68	-42.92	-3.82	27.22	68.58	
0.12	19.34	-37.63	-62.99	-18.41	17	64.16	
0.00	0	-15.33	-36.58	0.78	30.45	69.97	

[药物]	0	24.691	74.074	222.22	666.67	2000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TDF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0		协同作用 60.83
3.33	0	0	0	0	0	0		log 体积 13.85
1.11	0	0	0.9556	0	0	4.689		
0.37	0	0	0	0	17.3945	1.40901		拮抗作用 0
0.12	0	3.8223	32.5645	0	0	0		log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0698] 表16b:在化合物23与TDF的体外组合中对HBsAg的影响

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	平均抑制% 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	-5.9	-11.76	-17.98	-10.56	-12.07	-5.13	
3.33	-0.9	-8.32	2.74	5.75	3.08	8.14	
1.11	0.79	6.63	9.86	9.96	9.87	13.55	
0.37	-0.3	10.94	6.53	9.48	6.86	12.89	
0.12	3.39	8.13	3.59	3.99	1.92	13.78	
0.00	0	-13.89	-10.9	-11.64	-4.45	0.48	

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	标准偏差(%) 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	11.4 4	13.32	9.26	9.99	12.92	6.2	
3.33	16.1 1	12.81	5.08	1.71	3.38	5.79	
1.11	19.9 9	5.11	10.31	10.32	3.11	4.85	
0.37	21.7 3	2.38	8.21	5.77	9.18	7.38	
0.12	9.05 14.5	3.32	4.82	11.75	7.08	9.54	
0.00	6	6.27	5.47	14.27	11.74	9.35	

[0699]

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.22	666.67	2000.00	相加性抑制 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	-5.9	-20.61	-17.44	-18.23	-10.61	-5.39	
3.33	-0.9	-14.92	-11.9	-12.64	-5.39	-0.42	
1.11	0.79	-12.99	-10.02	-10.76	-3.62	1.27	
0.37	-0.3	-14.23	-11.23	-11.97	-4.76	0.18	
0.12	3.39	-10.03	-7.14	-7.86	-0.91	3.85	
0.00	0	-13.89	-10.9	-11.64	-4.45	0.48	

[药物]	0	24.691	74.07 4	222.22	666.67	2000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
TDF (nM)							
10.00	0	0	0	0	0	0	
3.33	0	0	0	12.762 4	0	0	
1.11	0	2.8029 9	0	0	3.2549 9	0	
0.37	0	17.337 4	0	2.4609 3	0	0	
0.12	0	7.2338 8	0	0	0	0	
0.00	0	0	0	0	0	0	

协同作用	45.85
log 体积	10.44
拮抗作用	0
log 体积	0

[0700] 表16c:在化合物23与TDF的体外组合中对HBeAg的影响

[0701]

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.2 2	666.6 7	2000.00	平均抑制% 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	0.72	-10.51	-5.28	-10.54	-11.8	-5.49	
3.33	9.05	-5.09	3.12	2.98	4.06	4.28	
1.11	12.7 8	7.59	9.52	0.77	7	7.24	
0.37	6.74	4.37	2.31	6.35	6.4	10.51	
0.12	4.4	8.09	5.22	-0.68	6.5	7.62	
0.00	0	-8.82	-6.36	-12.71	-7.94	-1.09	

[0702]

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.2 2	666.6 7	2000.00	标准偏差(%) 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	10.7 8	17.81	6.61	8.4	11.1	15.98	
3.33	9.99	19.89	13.21	11.51	7.78	17.13	
1.11	8.33 12.3	4.36	8.23	7.06	4.64	6.33	
0.37	5	9.41	8.19	15.07	13.35	17.74	
0.12	5.94 16.2	2.55	2.72	11.85	7.25	9.82	
0.00	7	1.94	6.49	8.83	9.47	7.31	

[药物]	0.00	24.69	74.07	222.2 2	666.6 7	2000.00	相加性抑制 化合物 23 (nM)
TDF (nM)							
10.00	0.72	-8.04	-5.59	-11.9	-7.16	-0.36	
3.33	9.05	1.03	3.27	-2.51	1.83	8.06	
1.11	12.7 8	5.09	7.23	1.69	5.85	11.83	
0.37	6.74	-1.49	0.81	-5.11	-0.66	5.72	
0.12	4.4	-4.03	-1.68	-7.75	-3.19	3.36	
0.00	0	-8.82	-6.36	-12.71	-7.94	-1.09	

[药物]	0	24.691	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TDF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用	3.73
3.33	0	0	0	0	0	0	log 体积	0.85
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.12	0	3.7279 5	0	0	0	0	log 体积	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0703] 表16d:在PHH细胞培养系统中化合物23和TDF的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同 作用 体积 (μM^2 %)*	协同 作用 Log 体 积	拮抗 作用 体积 (μM^2 %)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0704]	HBV DNA	TDF	化合 物 23	5.62	229.6	60.83	13.85	0	0	协同 作用
	HBsAg	TDF	化合 物 23	>100	4.36	45.85	10.44	0	0	协同 作用
[0705]	HBeAg	TDF	化合 物 23	>100	4.53	3.73	0.85	0	0	相加 性

[0706] *在99.9%置信区间

[0707] #在较早的单独实验中测得

[0708] 实施例17

[0709] 化合物23与TAF的体外组合

[0710] 体外组合研究目标

[0711] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物23(属于氨基色满化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和替诺福韦(呈前药替诺福韦艾拉酚胺或TAF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0712] 结果和结论

[0713] 将TAF(浓度范围为于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物23(浓度范围为于3倍稀释系列中2000nM至24.69nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物23或TAF处理观测到的HBV DNA和HBsAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表17a和17b中。TAF和化合物23的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表17c中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0714] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性,没有拮抗作用(表17c)。通过显微术或CCK8测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0715] 表17a:在化合物23与TAF的体外组合中对HBV DNA的影响

[0716]

[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.22	666.6 7	2000	
TAF (nM)							平均抑制% 化合物 23 (nM)
0.00							
10.00	43.3 3	52.66	53.67	61.85	59.03	65.33	
3.33	42.6	41.59	42.58	42.01	55.87	53.47	
1.11	2.73 11.5	26	24.84	30.46	45.15	52.57	
0.37	9	10.66	15.11	15.55	38.82	64.27	
0.12	6.36	12.62	-10.64	15.2	36.81	52.56	
0.00	0	-4.57	-2.49	11.13	30.46	58.13	
[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.22	666.6 7	2000	
TAF (nM)							标准偏差(%) 化合物 23 (nM)
10.00	19.2 3	6.09	16.14	6.57	11.43	9.3	
3.33	5.15 16.8	11.48	8.01	13.55	8.93	4.21	
1.11	5	19.39	8.78	4.56	12.22	8.28	
0.37	14.0 7	2.95	9.65	20.83	4.73	0.79	
0.12	4.65	9.48	19.93	6.28	0.72	12.12	
0.00	0.02	8.18	25.79	14.9	9.52	3.29	
[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.22	666.6 7	2000	
TAF (nM)							相加性抑制 化合物 23 (nM)
10.00	43.3 3	40.74	41.92	49.64	60.59	76.27	
3.33	42.6	39.98	41.17	48.99	60.08	75.97	
1.11	2.73 11.5	-1.72	0.31	13.56	32.36	59.27	
0.37	9	7.55	9.39	21.43	38.52	62.98	
0.12	6.36	2.08	4.03	16.78	34.88	60.79	
0.00	0	-4.57	-2.49	11.13	30.46	58.13	
[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.22	666.6 7	2000	
TAF (nM)							协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用 1.89
3.33	0	0	0	0	0	8.644 9	log 体积 0.43
1.11	0	0	0	1.8930 4	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 -8.64
0.12	0	0	0	0	0	0	log 体积 -1.97
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0717] 表17b:在化合物23与TAF的体外组合中对HBsAg的影响

[0718]

[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	平均抑制% 化合物 23 (nM)	
TAF (nM)								
0.00								
10.00	6.38	6.2	3.4	-8.69	5.26	23.51		
3.33	16.12	9.58	9.56	0.37	11.57	28.58		
1.11	29.66	18.05	20.47	9.86	18.31	33.24		
0.37	7.04	11.13	3.66	-2.3	-2.92	22.22		
0.12	22.99	21.29	19.81	16.79	8.85	28.41		
0.00	0	0.77	-5.27	4.83	1.95	22.77		

[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	标准偏差(%) 化合物 23 (nM)	
TAF (nM)								
10.00	3.03	12.27	11.65	6.93	7.08	10.25		
3.33	3.66	2.28	2.6	17.49	9.97	8.2		
1.11	9.01	17.67	8.37	8.64	8.88	5.26		
0.37	9.67	9.77	10.47	17.15	5.76	1.93		
0.12	3.68	9.92	15.76	11.59	9.9	13.42		
0.00	1.83	21.63	8.58	26.08	6.99	7.12		

[0719]

[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	相加性抑制 化合物 23 (nM)	
TAF (nM)								
10.00	6.38	7.1	1.45	10.9	8.21	27.7		
3.33	16.12	16.77	11.7	20.17	17.76	35.22		
1.11	29.66	30.2	25.95	33.06	31.03	45.68		
0.37	7.04	7.76	2.14	11.53	8.85	28.21		
0.12	22.99	23.58	18.93	26.71	24.49	40.53		
0.00	0	0.77	-5.27	4.83	1.95	22.77		

[药物]	0	24.69 1	74.07 4	222.2 2	666.6 7	2000	协同作用曲线(99.9%)	
TAF (nM)							邦弗朗尼调整	98%
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用	0
3.33	0	0	0	0	0	0	log 体积	0
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用	0
0.12	0	0	0	0	0	0	log 体积	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0720] 表17c:在PHH细胞培养系统中化合物23和TAF的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定终 点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM) #	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM) #	协同 作用 体积 (μM^2 %)*	协同 作用 Log 体积	拮抗 作用 体积 (μM^2 %)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0721]	HBV DNA	TAF	化合 物 23	0.405	229.6	1.89	0.43	-8.64	-1.9 7	相加 性
	HBsAg	TAF	化合 物 23	>100	4.36	0	0	0	0	相加 性

[0722] *在99.9%置信区间

[0723] #在较早的单独实验中测得

[0724] 实施例18

[0725] IFN α 2a与化合物25的体外组合

[0726] 研究目标

[0727] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物25(属于二氢喹啉酮化学类别的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的小分子抑制剂)和聚乙二醇化干扰素 α 2a(IFN α 2a,活化肝细胞中的先天免疫通路的抗病毒细胞因子)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0728] 结果和结论

[0729] 将IFN α 2a(浓度范围于3倍稀释系列中10.0IU/mL至0.123IU/mL且进行5点滴定)与化合物25(浓度范围于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的IFN α 2a或化合物25处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表18a、18b和18c中。IFN α 2a和化合物25的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表18d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0730] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为协同性,没有拮抗作用(表18d)。通过显微术或CCK8测定未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0731] 表18a:在IFN α 2a与化合物25的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	平均抑制% 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	58.66	72.01	77.55	74.4	74.57	75.72		
3.33	46.92	70.84	75.67	71.52	79.37	81.47		
1.11	32.66	60.24	64.08	65.29	76.55	76.76		
0.37	22.81	48.83	55.68	55.85	71.09	75.44		
0.12	19.84	40.19	39.08	36.54	65.34	64.9		
0.00	0	-14.4	-9.87	4.3	32.64	53.78		

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	标准偏差(%) 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	8.37	0.96	1.44	5.16	6.13	9.02		
3.33	6.8	2.16	3.21	1.91	3.01	4.5		
1.11	7.03	10.58	6.34	2.57	2.47	2.79		
0.37	6.72	4.66	7.04	12.83	7.17	1.6		
0.12	15.09	10.34	11.46	15.82	5.84	3.79		
0.00	26.83	27.99	12.43	13.96	21.25	5.81		

[0732]

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	相加性抑制 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	58.66	52.71	54.58	60.44	72.15	80.89		
3.33	46.92	39.28	41.68	49.2	64.25	75.47		
1.11	32.66	22.96	26.01	35.56	54.64	68.88		
0.37	22.81	11.69	15.19	26.13	48	64.32		
0.12	19.84	-37.1	-31.67	-14.69	19.28	44.61		
0.00	0	-14.4	-9.87	4.3	32.64	53.78		

[药物]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 96%	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	0	16.1406	18.231	0	0	0		协同作用 314.15
3.33	0	24.4514	23.4259	16.0342	5.21409	0		log 体积 71.51
1.11	0	2.46122	17.2051	21.2721	13.7812	0		
0.37	0	21.8039	17.3214	0	0	5.8544		拮抗作用 0
0.12	0	43.2611	33.0351	0	26.8406	7.81711		log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0733] 表18b: 在IFNa2a与化合物25的体外组合中对HBsAg的影响

[0734]

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	平均抑制% 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	22.77	27.23	22.41	30.25	37.23	63.56		
3.33	18.32	28.86	27.09	35.53	43.71	66.88		
1.11	10.57	27	31.57	31.22	38.7	66.37		
0.37	2.74	18.78	15.98	25.14	34.24	60.44		
0.12	-4.08	11.87	10.92	14.5	34.52	56.65		
0.00	0	-5.64	-7.52	-7.33	8.81	42.49		

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	标准偏差(%) 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	8.68	6.97	2.29	4.73	7.98	4.01		
3.33	9.52	6.19	6.14	6.04	6.94	4.47		
1.11	2.72	4.07	4.71	1.23	4.72	0.28		
0.37	8.08	2.56	1.27	2.26	2.05	4.7		
0.12	6.17	2.65	2.53	0.54	1.95	2.99		
0.00	7	8.29	12.25	8.62	8.49	4.98		

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	相加性抑制 化合物 25 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	22.77	18.41	16.96	17.11	29.57	55.59		
3.33	18.32	13.71	12.18	12.33	25.52	53.03		
1.11	10.57	5.53	3.84	4.01	18.45	48.57		
0.37	2.74	-2.75	-4.57	-4.39	11.31	44.07		
0.12	-4.08	-9.95	-11.91	-11.71	5.09	40.14		
0.00	0	-5.64	-7.52	-7.33	8.81	42.49		

[0735]

[药物]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	0	0	0	0	0	0		协同作用 218.76
3.33	0	0	0	3.32236	0	0		log 体积 49.8
1.11	0	8.07563	12.2294	23.1621	4.71648	16.8785		
0.37	0	13.105	16.3704	22.0923	16.1835	0.9023		拮抗作用 0
0.12	0	13.0989	14.5038	24.4329	23.0126	6.66991		log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0736] 表18c: 在IFNa2a与化合物25的体外组合中对HBeAg的影响

[0737]

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

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	标准偏差(%) 化合物 25 (μ M)
IFNa2a IU/mL							
10.00	11.74	4.4	2.35	5.73	3.68	4.09	
3.33	19.07	8.01	1.6	5.75	14.7	8.73	
1.11	17.14	4.93	2.29	7.45	9.68	6.75	
0.37	26.1	2.4	6.51	8.28	5.47	9	
0.12	25.35	7.46	12.09	14.46	9.05	10.23	
0.00	19.06	11.33	16.27	24	19.27	14.29	

[0738]

[药物]	0.00	0.12	0.37	1.11	3.33	10.00	相加性抑制 化合物 25 (μ M)
IFNa2a IU/mL							
10.00	17.32	8.02	5.9	3.43	11.28	35.54	
3.33	6.47	-4.05	-6.45	-9.24	-0.37	27.08	
1.11	-1.13	-12.51	-15.1	-18.12	-8.52	21.16	
0.37	-12.17	-24.79	-27.66	-31.01	-20.37	12.55	
0.12	-21.05	-34.67	-37.77	-41.39	-29.9	5.63	
0.00	0	-11.25	-13.81	-16.8	-7.31	22.04	

[药物]	0	0.1235	0.3704	1.1111	3.3333	10	协同作用曲线(99.9%)	
IFNa2a IU/mL							邦弗朗尼调整	98%
10.00	0	11.1396	9.09615	3.29257	9.32912	2.96981	协同作用	231.36
3.33	0	2.39909	21.8944	9.37675	0	0	log 体积	52.67
1.11	0	17.8054	25.8136	9.59205	0	4.17575		
0.37	0	27.0916	14.7956	16.2405	16.8182	0	拮抗作用	0
0.12	0	12.0191	1.82181	0	15.6865	0	log 体积	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0739] 表18d: 在PHH细胞培养系统中IFN α 2a和化合物25的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (IU/mL) #	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM) #	协同作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$) *	协同 作用 Log 体积	拮抗作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$) *	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0740]	HBV DNA	IFN α 2a	化合物 25	2.154	0.654	314.15	71.5 1	0	0	协同 作用
	HBs Ag	IFN α 2a	化合物 25	13.8	4.503	218.76	49.8	0	0	协同 作用
	HBe Ag	IFN α 2a	化合物 25	10.24	5.75	231.36	52.6 7	0	0	协同 作用

[0741] *在99.9%置信区间

[0742] #在较早的单独实验中测得

[0743] 实施例19

[0744] 化合物25与化合物3的体外组合

[0745] 研究目标

[0746] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物3(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和化合物25(属于二氢喹啉酮化学类别的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的小分子抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0747] 结果和结论

[0748] 将化合物25(浓度范围于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物3(浓度范围于3倍稀释系列中5000nM至61.73nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物25或化合物3处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表19a、19b和19c中。化合物25和化合物3的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表19d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0749] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为协同性,没有拮抗作用(表19d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0750] 表19a:在化合物25与化合物3的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	28	53.83	59.64	61.48	75.31	83.32		
3.33	15.24	52.77	48.78	55.49	77.84	86.19		
1.11	5.69	32.55	40.25	48.87	68.73	85.52		
0.37	-51.8	21.47	28.54	33.37	64.04	83.77		
0.12	20.98	17.18	18.75	27.78	58.12	84.2		
0.00	0	-28.13	-25.93	-3.32	25.94	74.78		

[0751]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(%) 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	13.66	6.65	4.22	12.05	4.52	3.89		
3.33	15.64	6.92	3.55	5.98	2.73	2.62		
1.11	2.13	7.36	12.67	3.75	8.6	1.07		
0.37	7.11	11.02	11.57	16.68	4.9	3.83		
0.12	6.37	6.92	8.03	5.44	6.89	1.72		
0.00	37.96	6.82	12.75	12.54	6.98	2.18		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	28	7.75	9.33	25.61	46.68	81.84		
3.33	15.24	-8.6	-6.74	12.43	37.23	78.62		
1.11	5.69	-20.84	-18.76	2.56	30.15	76.22		
0.37	-51.8	-94.5	-91.16	-56.84	-12.42	61.72		
0.12	20.98	-55.01	-52.35	-25	10.4	69.49		
0.00	0	-28.13	-25.93	-3.32	25.94	74.78		

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%)	
化合物 25							邦弗朗尼调整	98%
nM								
10.00	0	24.1949	36.422	0	13.7547	0	协同作用	737.8
3.33	0	38.5963	43.837	23.3798	31.6256	0	log 体积	167.96
1.11	0	29.1682	17.313	33.9688	10.2774	5.77863		
0.37	0	79.7032	81.623	35.3161	60.3341	9.44547	拮抗作用	0
0.12	0	49.4163	44.673	3	34.877	25.045	log 体积	0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0752] 表19b:在化合物25与化合物3的体外组合中对HBsAg的影响

[0753]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	32.99	40.09	41.48	45.13	52.34	64.84		
3.33	13.12	26.32	28.85	30.97	34.56	54.59		
1.11	-3.18	21.32	20.73	21.99	32.47	56.21		
0.37	-5.09	13.81	9.92	8.14	27.4	61.59		
0.12	3.68	7.53	8.59	12.88	22.46	48.46		
0.00	0	-20.02	-17.32	-13.99	1.44	28.25		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(% 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	11.76	5.21	4.72	1.8	3.51	4.34		
3.33	6.7	5	8.24	5.49	2.08	2.72		
1.11	2.66	0.74	5.4	3.5	4.64	4.3		
0.37	3.17	7.51	16.06	12.02	5.09	4.62		
0.12	2.76	6.34	8.52	9.71	4.5	5.28		
0.00	26.63	3.49	15.37	12.95	14.94	14.17		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 3 (nM)	
化合物 25								
nM								
10.00	32.99	19.57	21.38	23.62	33.95	51.92		
3.33	13.12	-4.27	-1.93	0.97	14.37	37.66		
1.11	-3.18	-23.84	-21.05	-17.61	-1.69	25.97		
0.37	-5.09	-26.13	-23.29	-19.79	-3.58	24.6		
0.12	3.68	-15.6	-13	-9.8	5.07	30.89		
0.00	0	-20.02	-17.32	-13.99	1.44	28.25		

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
化合物 25								
nM								
10.00	0	3.37389	4.56648	15.5862	6.83859	0		协同作用 257.49
3.33	0	14.1356	3.66216	11.9324	13.3447	7.97848		log 体积 58.62
1.11	0	42.7247	24.0086	28.0815	18.8898	16.0887		
0.37	0	15.2246	0	0	14.2288	11.7856		拮抗作用 0
0.12	0	2.26506	0	0	2.5805	0.19352		log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0754] 表19c:在化合物25与化合物3的体外组合中对HBeAg的影响

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	
化合物 25							平均抑制% 化合物 3 (nM)
nM							
10.00	33.17	29.55	32.13	35.12	45.53	56.72	
3.33	8.74	17.06	14.55	17.58	28.19	41.81	
1.11	4.51	14.84	10.85	17.54	27.32	48.49	
0.37	-0.51	7.18	2.63	7.03	20.64	40.75	
0.12	5.33	4.76	-1.23	8.26	17.34	42.34	
0.00	0	-11.35	-16	-5.39	2.34	27.3	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	
化合物 25							标准偏差(% 化合物 3 (nM)
nM							
10.00	19.04	7.64	7.38	3.04	5.15	8.44	
3.33	17.53	4.42	4.02	3.71	1.17	3.68	
1.11	11.69	1.61	6.69	4.6	2.82	2.79	
0.37	17.52	6.16	9.21	11.25	2.17	4.33	
0.12	17.42	6.48	8.81	8.1	1.87	4.94	
0.00	27.36	3.5	5.88	8.38	7.46	13.79	

[0755]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	
化合物 25							相加性抑制 化合物 3 (nM)
nM							
10.00	33.17	25.58	22.48	29.57	34.73	51.41	
3.33	8.74	-1.62	-5.86	3.82	10.88	33.65	
1.11	4.51	-6.33	-10.77	-0.64	6.74	30.58	
0.37	-0.51	-11.92	-16.59	-5.93	1.84	26.93	
0.12	5.33	-5.42	-9.82	0.23	7.55	31.17	
0.00	0	-11.35	-16	-5.39	2.34	27.3	

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	
化合物 25							协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
nM							
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用 80.56
3.33	0	4.13378	7.18018	1.55039	13.4595	0	log 体积 18.34
1.11	0	15.8715	0	3.0414	11.2994	8.72811	
0.37	0	0	0	0	11.6585	0	拮抗作用 0
0.12	0	0	0	0	3.63583	0	log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0756] 表19d:在PHH细胞培养系统中化合物25和化合物3的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定终 点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作 用体积 (μM ² %)*	协同 作用 Log体 积	拮抗作 用体积 (μM ² %)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0757]	HBV DNA	化合 物 25	化合 物 3	0.654	876.5	737.8	167.96	0	0	协同 作用
	HBsAg	化合 物 25	化合 物 3	4.503	7793	257.49	58.62	0	0	协同 作用
	HBeAg	化合 物 25	化合 物 3	5.75	8850	80.56	18.34	0	0	协同 作用

[0758] *在99.9%置信区间

[0759] #在较早的单独实验中测得

[0760] 实施例20

[0761] 化合物3与TAF的体外组合

[0762] 研究目标

[0763] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物3(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和替诺福韦(呈前药替诺福韦艾拉酚胺或TAF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0764] 结果和结论

[0765] 将TAF(浓度范围于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物3(浓度范围于3倍稀释系列中5560nM至68.64nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的TAF或化合物3处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表20a、20b和20c中。TAF和化合物3的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表20d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0766] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性或协同性,没有拮抗作用(表20d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0767] 表20a:在TAF与化合物3的体外组合中对HBV DNA的影响

[0768]

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	平均抑制% 化合物3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	78.31	76.66	75.83	84	83	87.22	
1.23	63.39	66.71	65.36	76.33	81.98	88.21	
0.41	28.78	50.25	43.6	56.51	77.12	86.4	
0.14	3.84	22.99	19.73	44.15	74.08	86.53	
0.05	-8.77	15.84	18.49	40.03	71.93	83.56	
0.00	0	-2.79	-5.02	34.78	66.43	85.32	

[0769]

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	标准偏差(%) 化合物3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	4.13	5.74	5.65	2.86	6.34	3.87	
1.23	6.26	4	1.75	3.38	2.15	1.61	
0.41	15.82	4.83	4.35	8.44	2.31	0.77	
0.14	5.2	10.08	12.17	5.9	2.81	1.93	
0.05	11.46	2.67	13.74	8.32	4	6.05	
0.00	19.74	24.58	16.02	21.37	3.11	3.19	

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	相加性抑制 化合物3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	78.31	77.7	77.22	85.85	92.72	96.82	
1.23	63.39	62.37	61.55	76.12	87.71	94.63	
0.41	28.78	26.79	25.2	53.55	76.09	89.54	
0.14	3.84	1.16	-0.99	37.28	67.72	85.88	
0.05	-8.77	-11.8	-14.23	29.06	63.49	84.03	
0.00	0	-2.79	-5.02	34.78	66.43	85.32	

[药物]	0	68.642	205.93	617.7 8	1853.3	5560	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
TAF (nM)							
3.70	0	0	0	0	0	0	协同作用 30.5
1.23	0	0	0	0	0	-1.1215	log 体积 6.94
0.41	0	7.5644 7	4.0841 5	0	0	-0.6059	
0.14	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 -1.73
0.05	0	18.853	0	0	0	0	log 体积 -0.39
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0770] 表20b:在TAF与化合物3的体外组合中对HBsAg的影响

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	平均抑制% 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	-6.72	6.49	7.67	0.89	29.25	52.65	
1.23	10.9 7	13.51	15.13	15.13	27.31	58.97	
0.41	11.2 9	12.8	10.81	11.93	27.47	49.79	
0.14	12.8 3	3.2	5.03	3.13	16.78	48.23	
0.05	-7.35	-0.27	0.03	7.65	24.53	50.59	
0.00	0	-16.35	-21.58	-5.12	14.6	43.83	

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	标准偏差(% 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	3.91	5.1	5.03	8.91	7.06	8.33	
1.23	3.52	5.17	5.31	13	7.04	5.03	
0.41	8.18 10.9	13.14	3.12	11.46	12.56	2.98	
0.14	6 11.1	14.74	11.52	2.55	6.84	7.2	
0.05	3 22.1	9.98	4.72	15.21	8.94	3.8	
0.00	7 16.06	23.58	14.67	9.83	6.94		

[0771]

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	相加性抑制 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	-6.72	-24.17	-29.75	-12.18	8.86	40.06	
1.23	10.9 7	-3.59	-8.24	6.41	23.97	49.99	
0.41	11.2 9	-3.21	-7.85	6.75	24.24	50.17	
0.14	12.8 3	-1.42	-5.98	8.37	25.56	51.04	
0.05	-7.35	-24.9	-30.52	-12.85	8.32	39.7	
0.00	0	-16.35	-21.58	-5.12	14.6	43.83	

[药物]	0.00	68.64	205.93	617.7 8	1853.3 3	5560.0 0	协同作用曲线(99.9%)	
TAF (nM)							邦弗弱尼调整	98%
3.70	0	13.875 9	20.8663	0	0	0	协同作用	64.13
1.23	0	0.0855 3	5.89479	0	0	0	log 体积	14.6
0.41	0	0	8.39208	0	0	0	拮抗作用	0
0.14	0	0	0	0	0	0	log 体积	0
0.05	0	0	15.0165	0	0	0		
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0772] 表20c:在TAF与化合物3的体外组合中对HBeAg的影响

[药物]	0.00	68.59	205.7 6	617.2 8	1851.8 5	5555.5 6	平均抑制% 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	11.87	6.27	25.76	19.94	27.49	61.6	
1.23	9.91	11.39	10.58	18.23	26.38	55.2	
0.41	1.76	1.32	-4.69	15.28	22.07	48.25	
0.14	-2.78	-3.24	1.07	13.95	18.72	46.8	
0.05	1.17	3.04	0.21	10.48	17.05	49.18	
0.00	0	-5.05	-6.33	2.77	29.66	40.38	

[药物]	0.00	68.59	205.7 6	617.2 8	1851.8 5	5555.5 6	标准偏差(%) 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	8.54	19.25	17.35	14.39	11.4	3.56	
1.23	13.91	1.05	5.26	6.23	11.06	5.69	
0.41	18.44	7.35	8.98	4.02	7.19	2.75	
0.14	11.41	19.4	4.08	12.99	5.4	4.89	
0.05	16.36	9.09	6.96	4.15	9.2	7.01	
0.00	28.29	2.3	6.31	5.64	11.69	6.37	

[0773]

[药物]	0.00	68.59	205.7 6	617.2 8	1851.8 5	5555.5 6	相加性抑制 化合物 3 (nM)
TAF (nM)							
3.70	11.87	7.42	6.29	14.31	38.01	47.46	
1.23	9.91	5.36	4.21	12.41	36.63	46.29	
0.41	1.76	-3.2	-4.46	4.48	30.9	41.43	
0.14	-2.78	-7.97	-9.29	0.07	27.7	38.72	
0.05	1.17	-3.82	-5.09	3.91	30.48	41.08	
0.00	0	-5.05	-6.33	2.77	29.66	40.38	

[药物]	0.00	68.59	205.7 6	617.2 8	1851.8 5	5555.5 6	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
TAF (nM)							
3.70	0	0	0	0	0	2.4240 4	
1.23	0	2.5744 5	0	0	0	0	
0.41	0	0	0	0	0	0	
0.14	0	0	0	0	0	0	
0.05	0	0	0	0	0	0	
0.00	0	0	0	0	0	0	

协同作用	5
log 体积	1.14
拮抗作用	0
log 体积	0

[0774] 表20d: 在PHH细胞培养系统中TAF和化合物3的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定终 点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作 用体积 (μM ² %)*	协同 作用 Log 体积	拮抗作 用体积 (μM ² %)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0775]	HBV DNA	TAF	化合 物 3	0.405	876.5	30.5	6.94	-1.73	-0.39	协同 作用
	HBsAg	TAF	化合 物 3	>100	7793	64.13	14.6	0	0	协同 作用
	HBeAg	TAF	化合 物 3	>100	8850	5.0	1.14	0	0	相加 性

[0776] *在99.9%置信区间

[0777] #在较早的单独实验中测得

[0778] 实施例21

[0779] IFNα2a与化合物22的体外组合

[0780] 研究目标

[0781] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物22(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和聚乙二醇化干扰素α2a(IFNα2a,活化肝细胞中的先天免疫通路的抗病毒细胞因子)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0782] 结果和结论

[0783] 将IFNα2a(浓度范围对于3倍稀释系列中10.0IU/mL至0.123IU/mL且进行5点滴定)与化合物22(浓度范围对于3倍稀释系列中5000nM至61.721nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的IFNα2a或化合物22处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表21a、21b和21c中。IFNα2a和化合物22的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表21d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0784] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性或协同性,没有拮抗作用(表21d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0785] 表21a:在IFNα2a与化合物22的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物 22 (μM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	59	70.58	67.36	66.34	75.72	83.3	
3.33	52.39	69.79	71.36	68.3	72.01	84.76	
1.11	28.08	59.77	59.61	55.17	63.22	80.59	
0.37	6.59	44.09	42.48	42.82	61.33	75.33	
0.12	-18.56	29.97	23.99	27.7	45.63	78.65	
0.00	0	-9.02	-33.53	-13.72	22.31	69.19	

[0786]

[0787]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(%) 化合物 22 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	7.24	3.95	0.56	10.17	3.06	4.6		
3.33	11.43	3.1	4.52	7.4	11.11	4.42		
1.11	16.44	2.71	2.78	22.26	6.66	1.34		
0.37	33.49	11.81	2.73	7.7	14.25	1.86		
0.12	23.97	16.1	11.97	10.1	9.2	2.49		
0.00	35.38	12.95	29.16	24.96	22.77	2.75		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物 22 (μM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	59	55.3	45.25	53.37	68.15	87.37		
3.33	52.39	48.1	36.43	45.86	63.01	85.33		
1.11	28.08	21.59	3.97	18.21	44.13	77.84		
0.37	6.59	-1.84	-24.73	-6.23	27.43	71.22		
0.12	-18.56	-29.25	-58.31	-34.83	7.89	63.47		
0.00	0	-9.02	-33.53	-13.72	22.31	69.19		

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗弱尼调整 98%	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	0	2.28055	20.267	0	0	0		协同作用 311.72
3.33	0	11.4879	20.0547	0	0	0		log 体积 70.96
1.11	0	29.2614	46.491	0	0	0		
0.37	0	7.06329	58.2256	23.7093	0	0		拮抗作用 0
0.12	0	6.2349	42.9067	29.2909	7.4628	6.98541		log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0788] 表21b:在IFNa2a与化合物22的体外组合中对HBsAg的影响

[0789]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.00	平均抑制% 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	20.1	23.86	18.44	23.51	32.47	46.3	
3.33	10.2	21.09	18.86	23.8	32.72	40.92	
1.11	8.8	17.52	19.02	18.44	29.23	41.77	
0.37	4.6	10.38	12.89	12.73	19.64	32.99	
0.12	-1.67	10.33	10.48	16.18	20.01	33.22	
0.00	0	-13.83	-10.58	-5.08	10.34	23.09	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.00	标准偏差(% 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	13.1	8.15	6.53	2.24	6.55	3.24	
3.33	11.12	8.23	8.23	3.93	10.55	10.22	
1.11	14.56	12.01	8.75	8.2	12.13	11.6	
0.37	9.75	7.48	17.42	8.47	12.45	15.01	
0.12	20.23	10.68	5.97	9.82	12.81	14.29	
0.00	18.63	16.23	12.6	17.72	16.11	15.81	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.00	相加性抑制 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	20.1	9.05	11.65	16.04	28.36	38.55	
3.33	10.2	-2.22	0.7	5.64	19.49	30.93	
1.11	8.8	-3.81	-0.85	4.17	18.23	29.86	
0.37	4.6	-8.59	-5.49	-0.25	14.46	26.63	
0.12	-1.67	-15.73	-12.43	-6.83	8.84	21.81	
0.00	0	-13.83	-10.58	-5.08	10.34	23.09	

[药物]	0	61.72 8	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 99%
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	0	0	0	0.0981 6	0	0	
3.33	0	0	0	5.2263 7	0	0	
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	
0.12	0	0	3.2627 3	0	0	0	
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0790] 表21c: 在IFNα2a与化合物22的体外组合中对HBeAg的影响

[0791]

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	平均抑制% 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	30.13	29.1	26.43	25.51	34.37	48.55	
3.33	17.16	17.85	18	19.33	29.38	39.7	
1.11	15.27	14.17	15.76	10.98	26.67	41.95	
0.37	1.78	2.04	2.11	-0.99	10.34	27.11	
0.12	7.42	11.7	10.2	8.06	14.8	34.39	
0.00	0	-7.2	-9.57	-8.17	5.92	20.93	

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	标准偏差(%) 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	0.33	8.25	5.02	1.12	4.12	3.3	
3.33	5.51	6.25	6.16	6.03	3.41	4.79	
1.11	2.91	12.64	3.52	11.08	6.97	8.93	
0.37	3.5	12.74	8.62	13.47	7.91	4.93	
0.12	6.9	9.72	7.43	4.72	11.46	7.25	
0.00	7.86	5.83	6.88	13.23	8.51	9.89	

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	相加性抑制 化合物 22 (μM)
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	30.13	25.1	23.44	24.42	34.27	44.75	
3.33	17.16	11.2	9.23	10.39	22.06	34.5	
1.11	15.27	9.17	7.16	8.35	20.29	33	
0.37	1.78	-5.29	-7.62	-6.24	7.59	22.34	
0.12	7.42	0.75	-1.44	-0.14	12.9	26.8	
0.00	0	-7.2	-9.57	-8.17	5.92	20.93	

[0792]

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗弱尼调整 98%
IFNα2a							
IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	0	
3.33	0	0	0	0	0	0	
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	
0.12	0	0	0	0	0	0	
0.00	0	0	0	0	0	0	

协同作用	0
log 体积	0
拮抗作用	0
log 体积	0

[0793] 表21d:在PHH细胞培养系统中IFNα2a和化合物22的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (IU/mL) #	抑制剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$) *	协同 作用 Log 体 积	拮抗 作用 体积 (μM^2 %)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0794]	HBV DNA	IFN α 2a	化合 物 22	2.154	1020	311.72	70.96	0	0	协同 作用
	HBs Ag	IFN α 2a	化合 物 22	13.8	12,800	8.59	1.96	0	0	相加 性
	HBe Ag	IFN α 2a	化合 物 22	10.24	10,740	0	0	0	0	相加 性

[0795] *在99.9%置信区间

[0796] #在较早的单独实验中测得

[0797] 实施例22

[0798] 化合物22与TAF的体外组合

[0799] 研究目标

[0800] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物22(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和替诺福韦(呈前药替诺福韦艾拉酚胺或TAF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0801] 结果和结论

[0802] 将TAF(浓度范围为于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物22(浓度范围为于3倍稀释系列中5000nM至61.721nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物22或TAF处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表22a、22b和22c中。TAF和化合物22的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表22d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0803] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为相加性,没有拮抗作用(表22d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0804] 表22a:在化合物22与TAF的体外组合中对HBV DNA的影响

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.56	1666.7	5000	平均抑制% 化合物 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	50.2 1	60.62	59.41	66.66	65.77	71.2 6	
3.33	40.1 6	51.09	48.53	60.14	55.25	70.8 5	
1.11	4.95	25.5	30.09	25.21	42.82	62.1 54.2	
0.37	-1.92	5.92	11.85	14.68	29.37	4	
0.12	-2.6	-5.22	5.12	11.67	36.5	52.5 54.6	
0.00	0	2.38	-3.33	8.01	27.98	6	

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.56	1666.7	5000	标准偏差(%) 化合物 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	1.32 12.3	8.36	3.9	10.1	3.39	11.5 7	
3.33	4 25.3	15.26	5.42	4.38	13.68	7.66 11.3	
1.11	8	8.61	20.31	18.26	6.64	3	
0.37	8.11	10.64	16.41	12.37	11.31	8.93 10.7	
0.12	3.28	6.41	13.44	11.64	0.94	6 17.1	
0.00	0.19	7.49	13.42	18.44	0.83	2	

[0805]

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.56	1666.7	5000	相加性抑制 化合物 22 (nM)
TAF (nM)							
10.00	50.2 1	51.4	48.55	54.2	64.14	77.4 3	
3.33	40.1 6	41.58	38.17	44.95	56.9	72.8 7	
1.11	4.95	7.21	1.78	12.56	31.54	56.9 53.7	
0.37	-1.92	0.51	-5.31	6.24	26.6	9 53.4	
0.12	-2.6	-0.16	-6.02	5.62	26.11	8 54.6	
0.00	0	2.38	-3.33	8.01	27.98	6	

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
TAF (nM)							
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用 8.07
3.33	0	0	0	0.7754 2	0	0	log 体积 1.84
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.12	0	0	0	0	7.2964 6	0	log 体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0806] 表22b:在化合物22与TAF的体外组合中对HBsAg的影响

[0807]

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666 7	5000	平均抑制% 化合物 22 (nM)	
TAF (nM)								
10	7.97	3.97	21.33	7.89	24.84	38.54		
3.333333 3	9.06	-6.48	16.7	16.53	24.27	44.07		
1.111111 1	20.81	13.85	21.8	20.98	27.18	46.11		
0.370370 4	10.78	-3.62	10.04	10.32	23.21	45.05		
0.123456 8	29.82	19.99	14.56	21.8	21.67	48.57		
0	0	-0.32	2.37	-2.17	17.68	20.73		

[0808]

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666 7	5000	标准偏差(%) 化合物 22 (nM)	
TAF (nM)								
10	5.77	2.84	10.6	6.45	2.33	6.64		
3.333333 3	13.78	10.12	9.21	7.53	7.28	4.26		
1.111111 1	5.53	6.36	15.1	9.66	4.2	2.72		
0.370370 4	4.42	15.44	4.26	7.98	7.62	2.68		
0.123456 8	3.67	4.25	4.49	3.91	8.82	1.51		
0	0.59	19.01	7.88	14.89	15.32	16.75		

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666 7	5000	相加性抑制 化合物 22 (nM)	
TAF (nM)								
10	7.97	7.68	10.15	5.97	24.24	27.05		
3.333333 3	9.06	8.77	11.22	7.09	25.14	27.91		
1.111111 1	20.81	20.56	22.69	19.09	34.81	37.23		
0.370370 4	10.78	10.49	12.89	8.84	26.55	29.28		
0.123456 8	29.82	29.6	31.48	28.3	42.23	44.37		
0	0	-0.32	2.37	-2.17	17.68	20.73		

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666 7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TAF (nM)								
0								
10	0	0	0	0	0	0		协同作用 9.09
3.333333 3	0	0	0	0	0	2.1403 4		log 体积 2.07
1.111111 1	0	0	0	0	0	0		
0.370370 4	0	0	0	0	0	6.9501 2		拮抗作用 -2.14
0.123456 8	0	0	2.143 4	0	0	0		log 体积 -0.49
0	0	0	0	0	0	0		

[0809] 表22c:在化合物22与TAF的体外组合中对HBeAg的影响

[0810]

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666. 7	5000	平均抑制% 化合物 22 (nM)	
TAF (nM)								
10.00	22.85	-0.79	17.72	8.41	23.95	42.03		
3.33	19.69	-14.8	8.11	3.2	24.12	36.2		
1.11	22.56	1.31	15.81	20.43	22.71	49.56		
0.37	9.9	-14.54	-2.63	10.7	21.6	42.03		
0.12	26.61	17.84	15.03	21.04	26.27	50.3		
0.00	0	-6.71	-12.41	-5.06	10.1	29.74		

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666. 7	5000	标准偏差(% 化合物 22 (nM))	
TAF (nM)								
10.00	19.83	13.7	2.25	17.67	11.95	8.64		
3.33	9.59	13.32	15.74	3.59	14.71	9.54		
1.11	8.99	14.21	16.19	10.78	1.53	2.78		
0.37	5.26	34.36	16.86	12.05	12.45	7.4		
0.12	4.71	14.39	8.61	5.08	4.18	4.19		
0.00	0.63	20.55	10.69	17.17	20.78	11.65		

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666. 7	5000	相加性抑制 化合物 22 (nM)	
TAF (nM)								
10.00	22.85	17.67	13.28	18.95	30.64	45.79		
3.33	19.69	14.3	9.72	15.63	27.8	43.57		
1.11	22.56	17.36	12.95	18.64	30.38	45.59		
0.37	9.9	3.85	-1.28	5.34	19	36.7		
0.12	26.61	21.69	17.5	22.9	34.02	48.44		
0.00	0	-6.71	-12.41	-5.06	10.1	29.74		

[药物]	0	61.72 8	185.1 9	555.5 6	1666. 7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
TAF (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0		协同作用 0
3.33	0	0	0	0.615 3	0	0		log 体积 0
1.11	0	0	0	0	2.634 8	0		
0.37	0	0	0	0	0	0		拮抗作用 -3.25
0.12	0	0	0	0	0	0		log 体积 -0.74
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0811] 表22d: 在PHH细胞培养系统中化合物22和TAF的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作用 体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	协同 作用 Log 体积	拮抗 作用 体积 ($\mu\text{M}^2\%$)*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0812]	HBV DN A	TAF	化合 物 22	0.405	1020	8.07	1.84	0	0	相加 性
	HBs Ag	TAF	化合 物 22	>100	12,800	9.09	2.07	-2.14	-0.49	相加 性
	HBe Ag	TAF	化合 物 22	>100	10,740	0	0	-3.25	-0.74	相加 性

[0813] *在99.9%置信区间

[0814] #在较早的单独实验中测得

[0815] 实施例23

[0816] 化合物22与化合物25的体外组合

[0817] 研究目标

[0818] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物22(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和化合物25(属于二氢喹啉酮化学类别的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的小分子抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0819] 结果和结论

[0820] 将化合物25(浓度范围于3倍稀释系列中10.0nM至0.12nM且进行5点滴定)与化合物22(浓度范围于3倍稀释系列中5000nM至61.73nM且进行5点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物25或化合物22处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表23a、23b和23c中。化合物25和化合物22的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表23d中;由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0821] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时,按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则发现组合为协同性或相加性,没有拮抗作用(表23d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0822] 表23a:在化合物22与化合物25的体外组合中对HBV DNA的影响

[0823]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	37.39	54.71	52.49	63.54	67.1	85.44	
3.33	16.41	50.43	52.25	53.21	62.83	82.08	
1.11	19.21	32.08	42.5	41.58	57.56	80.93	
0.37	46.48	30.71	23.72	21.3	52.22	73.23	
0.12	42.82	26.46	16.46	27.69	42.07	74.04	
0.00	0	-11.75	-9.12	-12.7	17.94	63.06	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(%) 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	7.33	4.11	2.57	4.94	5.09	1.95	
3.33	6.98	4.36	7.16	4.68	3.23	3.21	
1.11	35.51	7.87	0.68	13.48	7.26	1.34	
0.37	51.6	6.46	0.9	21	7.5	1.71	
0.12	21.05	7.83	6	5.3	0.16	2.16	
0.00	40.03	5.71	4.36	11.48	8.67	2.92	

[0824]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	37.39	30.03	31.68	29.44	48.62	76.87	
3.33	16.41	6.59	8.79	5.79	31.41	69.12	
1.11	19.21	-33.22	-30.08	-34.35	2.18	55.96	
0.37	46.48	-63.69	-59.84	-65.08	-20.2	45.89	
0.12	42.82	-59.6	-55.85	-60.96	-17.2	47.24	
0.00	0	-11.75	-9.12	-12.7	17.94	63.06	

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
化合物25 (nM)							
10.00	0	11.154	12.3521	17.8425	1.72881	2.15255	
3.33	0	29.4912	19.8964	32.0181	20.7901	2.39589	
1.11	0	39.3998	70.3421	31.5673	31.4873	20.5601	
0.37	0	73.1401	80.5981	17.269	47.7375	21.7124	
0.12	0	60.2915	52.564	71.2077	58.7434	19.6914	
0.00	0	0	0	0	0	0	

协同作用	846.13
log体积	192.62
拮抗作用	0
log体积	0

[0825] 表23b:在化合物22与化合物25的体外组合中对HBsAg的影响

[0826]

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	平均抑制% 化合物22 (nM)
10.00	42.95	47.96	44.95	47.05	56.23	64.25	
3.33	20.81	33.92	29.53	31.58	44.61	49.94	
1.11	26.4	29.53	17.24	26.62	40.43	49.49	
0.37	12.93	20.99	10.45	16.99	34.42	42.55	
0.12	9.32	13.24	11.87	15.52	33.87	42.69	
0.00	0	-9.16	-10.21	-3.82	20.61	30.96	

[0827]

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	标准偏差(%) 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	6.31	7.49	10.92	7.96	3.9	3.54	
3.33	6.77	3.56	12.39	9.02	3.89	7.17	
1.11	6.88	5.71	15.84	10.95	8.57	9.32	
0.37	1.49	4.56	17.71	9.5	7.06	8.21	
0.12	7.25	4.15	9.26	8.38	9.2	6.29	
0.00	14.86	17.38	15.2	14.87	11.14	12.14	

[药物]	0.00	61.73	185.1 9	555.5 6	1666.6 7	5000.0 0	相加性抑制 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	42.95	37.72	37.13	40.77	54.71	60.61	
3.33	20.81	13.56	12.72	17.78	37.13	45.33	
1.11	26.4	19.66	18.89	23.59	41.57	49.19	
0.37	12.93	4.95	4.04	9.6	30.88	39.89	
0.12	9.32	1.01	0.06	5.86	28.01	37.39	
0.00	0	-9.16	-10.21	-3.82	20.61	30.96	

[药物]	0	61.728	185.1 9	555.5 6	1666.7	5000	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
化合物25 (nM)								
10.00	0	0	0	0	0	0		协同作用 9.68
3.33	0	8.64404	0	0	0	0		log体积 2.2
1.11	0	0	0	0	0	0		
0.37	0	1.03304	0	0	0	0		拮抗作用 0
0.12	0	0	0	0	0	0		log体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0828] 表23c:在化合物22与化合物25的体外组合中对HBeAg的影响

[0829]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.5 6	1666.6 7	5000.00	平均抑制% 化合物22 (nM)
10.00	28.42	45.7	39.35	42.74	42.65	52.75	
3.33	13.94	29.09	24.19	23.42	24.67	39.67	
1.11	14.98	23.14	18.39	20.55	25.39	36.15	
0.37	2.9	7.24	7.64	4.51	17.83	27.05	
0.12	4.8	7.81	10.06	9.31	20.68	33.46	
0.00	0	-16.81	-14.59	-7.23	8.5	21.68	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.5 6	1666.6 7	5000.00	标准偏差(% 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	3.97	4.42	6.62	8.31	4.59	2.23	
3.33	9.3	1.4	6.29	15.17	11.71	2.03	
1.11	6.16	7.56	9.8	11.54	8.18	9.71	
0.37	10.44	7.8	10.09	14.23	7.82	10.34	
0.12	14.29	8.35	1.66	17.07	9.08	4.79	
0.00	10.71	11.88	5.84	11.39	4.94	6.86	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.5 6	1666.6 7	5000.00	相加性抑制 化合物22 (nM)
化合物25 (nM)							
10.00	28.42	16.39	17.98	23.24	34.5	43.94	
3.33	13.94	-0.53	1.38	7.72	21.26	32.6	
1.11	14.98	0.69	2.58	8.83	22.21	33.41	
0.37	2.9	-13.42	-11.27	-4.12	11.15	23.95	
0.12	4.8	-11.2	-9.09	-2.08	12.89	25.44	
0.00	0	-16.81	-14.59	-7.23	8.5	21.68	

[药物]	0	61.728	185.19	555.5 6	1666.7	5000	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
化合物25 (nM)							
10.00	0	14.763 8	0	0	0	1.47107	
3.33	0	25.012 6	2.10961	0	0	0.38927	
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	
0.12	0	0	13.8869	0	0	0	
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0830] 表23d:在PHH细胞培养系统中化合物22和化合物25的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制 剂 A EC ₅₀ (nM)#	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同 作用 体积 (μM^2 %)*	协同 作用 Log 体积	拮抗作 用体积 (μM^2 %) *	拮抗作 用 Log 体积	结论
[0831]	HBV DNA	化合 物 25	化合 物 22	0.653 5	1020	846.13	19.62	0	0	协同 作用
	HBs Ag	化合 物 25	化合 物 22	4.503	12,80 0	9.68	2.2	0	0	相加 性
	HBe Ag	化合 物 25	化合 物 22	5.75	10,74 0	57.43	13.07	0	0	协同 作用

[0832] *在99.9%置信区间

[0833] #在较早的单独实验中测得

[0834] 实施例24

[0835] IFN α 2a与化合物3的体外组合

[0836] 研究目标

[0837] 在体外在细胞培养模型系统中使用HBV感染的人原代肝细胞来确定化合物3和聚乙二醇化干扰素 α 2a (IFN α 2a, 活化肝细胞中的先天免疫通路的抗病毒细胞因子) 的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0838] 结果和结论

[0839] 将IFN α 2a (浓度范围于3倍稀释系列中10.0IU/mL至0.123IU/mL且进行5点滴定) 与化合物3 (浓度范围于3倍稀释系列中5000nM至61.73nM且进行5点滴定) 组合进行测试。使用单独或组合形式的IFN α 2a或化合物3处理观测到的HBV DNA、HBsAg和HBeAg的平均抑制%和3次重复的标准偏差显示于如下所示的表24a、24b和24c中。IFN α 2a和化合物3的EC₅₀值是在较早的实验中测得且显示于表24d中; 由不同批次的PHH细胞观测到一些偏差。

[0840] 当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由添加性相互作用预测的值相比较时, 按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman (1992) 所描述的解释准则发现组合为协同性, 没有拮抗作用 (表24d)。通过显微术或CCK8测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0841] 表24a: 在IFN α 2a与化合物3的体外组合中对HBV DNA的影响

[0842]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.0 0	平均抑制% 化合物3 (µM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	61.87	71.15	80.53	79.65	80.46	83.13		
3.33	59.88	65.87	74.49	76.8	84.91	87.1		
1.11	43.03	53.87	58.69	73.69	83.9	86.29		
0.37	38.46	40.68	50.62	61.26	79.98	87.96		
0.12	8.4	28.63	36.65	50.15	78.43	86.51		
0.00	0	-11.71	4.14	26.47	69.39	84.26		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.0 0	标准偏差(%) 化合物3 (µM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	5.9	5.47	5.52	2.67	4.37	2.84		
3.33	5.53	2.04	2.64	4.62	3.33	1.29		
1.11	6.9	8.86	6.4	0.85	1.88	1.74		
0.37	4.9	5.86	4.86	5.2	2.07	0.96		
0.12	10.36	7.77	6.24	3.95	6.78	1.78		
0.00	15.33	3.13	10.75	14.76	3.99	2.26		

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.6 7	5000.0 0	相加性抑制 化合物3 (µM)	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	61.87	57.4	63.45	71.96	88.33	94		
3.33	59.88	55.18	61.54	70.5	87.72	93.69		
1.11	43.03	36.36	45.39	58.11	82.56	91.03		
0.37	38.46	31.25	41.01	54.75	81.16	90.31		
0.12	8.4	-2.33	12.19	32.65	71.96	85.58		
0.00	0	-11.71	4.14	26.47	69.39	84.26		

[0843]

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 98%	
IFNa2a								
IU/mL								
10.00	0	0	0	0	0	-1.5236		协同作用 34.73
3.33	0	3.97636	4.26176	0	0	-2.3446		log 体积 7.91
1.11	0	0	0	12.6827	0	0		
0.37	0	0	0	0	0	0		拮抗作用 -3.87
0.12	0	5.38893	3.92416	4.50055	0	0		log 体积 -0.88
0.00	0	0	0	0	0	0		

[0844] 表24b: 在IFNa2a与化合物3的体外组合中对HBsAg的影响

[0845]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物3 (μM)
IFNa2a							
IU/mL							
10.00	24.94	33.38	33.93	39.7	49.84	67.18	
3.33	12.8	24.89	29.71	34.46	45.53	64.96	
1.11	14.91	22.82	26.09	36.42	44.97	67.18	
0.37	6.9	9.75	17.87	27.62	42.09	61.42	
0.12	1.56	10.13	19.07	22.18	42.08	62.05	
0.00	0	-5.49	-1.46	4.63	22.4	51.86	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(% 化合物3 (μM)
IFNa2a							
IU/mL							
10.00	24.86	7.76	9.93	15.02	12.81	9.59	
3.33	18.96	8.14	7.22	2.01	3.5	5.21	
1.11	20.01	4.74	6.41	3.05	5.38	4.26	
0.37	15.28	4.3	7.35	8.74	6.16	2.9	
0.12	16.47	3.75	5.07	7.78	7.65	6.59	
0.00	20.27	8.81	11.41	18.39	12.21	10.78	

[0846]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物3 (μM)
IFNa2a							
IU/mL							
10.00	24.94	20.82	23.84	28.42	41.75	63.87	
3.33	12.8	8.01	11.53	16.84	32.33	58.02	
1.11	14.91	10.24	13.67	18.85	33.97	59.04	
0.37	6.9	1.79	5.54	11.21	27.75	55.18	
0.12	1.56	-3.84	0.12	6.12	23.61	52.61	
0.00	0	-5.49	-1.46	4.63	22.4	51.86	

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
IFNa2a							
IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	0	协同作用 24.11
3.33	0	0	0	11.0051	1.6815	0	log体积 5.49
1.11	0	0	0	7.53245	0	0	
0.37	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 0
0.12	0	1.62875	2.26463	0	0	0	log体积 0
0.00	0	0	0	0	0	0	

[0847] 表24c: 在IFNa2a与化合物3的体外组合中对HBeAg的影响

[0848]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	平均抑制% 化合物3 (µM)
10.00	32.8	31.53	34.56	37.16	47.83	64.68	
3.33	14.38	25.43	28.01	30.3	39.42	61.88	
1.11	19.32	21.29	25.66	31.93	40.01	62.09	
0.37	-2.24	6.43	9.53	18.94	28.32	53.12	
0.12	-9.5	6.23	12.46	18.03	30.27	54.05	
0.00	0	-11.14	-4.9	-1.02	12.42	42.06	

[0849]

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	标准偏差(% 化合物3 (µM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	6.87	6.73	5.55	4.84	7.1	3.14	
3.33	4.07	5.37	7.42	9.41	7.15	1.79	
1.11	7.88	5.45	5.22	7.63	7.94	3.23	
0.37	1.9	2.87	4.47	11.64	7.71	1.12	
0.12	15.48	5.14	3.22	4.52	1.47	2.18	
0.00	8.69	17.68	3.21	3.3	4.7	7	

[药物]	0.00	61.73	185.19	555.56	1666.67	5000.00	相加性抑制 化合物3 (µM)
IFNα2a IU/mL							
10.00	32.8	25.31	29.51	32.11	41.15	61.06	
3.33	14.38	4.84	10.18	13.51	25.01	50.39	
1.11	19.32	10.33	15.37	18.5	29.34	53.25	
0.37	-2.24	-13.63	-7.25	-3.28	10.46	40.76	
0.12	-9.5	-21.7	-14.87	-10.62	4.1	36.56	
0.00	0	-11.14	-4.9	-1.02	12.42	42.06	

[药物]	0	61.728	185.19	555.56	1666.7	5000	协同作用曲线 (99.9%) 邦弗朗尼调整 98%
IFNα2a IU/mL							
10.00	0	0	0	0	0	0	
3.33	0	2.91733	0	0	0	5.59911	
1.11	0	0	0	0	0	0	
0.37	0	10.6148	2.06923	0	0	8.67408	
0.12	0	11.0143	16.733	13.7747	21.3322	10.3156	
0.00	0	0	0	0	0	0	

协同作用	103.04
log体积	23.46
拮抗作用	0
log体积	0

[0850] 表24d: 在PHH细胞培养系统中IFNα2a和化合物3的体外组合研究的结果的汇总:

	HBV 测定 终点	抑制 剂 A	抑制 剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (IU/mL) #	抑制 剂 B EC ₅₀ (nM)#	协同作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)#*	协同 作用 Log 体积	拮抗作 用体积 ($\mu\text{M}^2\%$)#*	拮抗 作用 Log 体积	结论
[0851]	HBV DNA	IFN α 2a	化合 物 3	2.154	876.5	34.73	7.91	-3.87	-0.88	协同 作用
	HBs Ag	IFN α 2a	化合 物 3	13.8	7793	24.11	5.49	0	0	协同 作用
	HBe Ag	IFN α 2a	化合 物 3	10.24	8580	103.04	23.46	0	0	协同 作用
[0852]										

[0853] *在99.9%置信区间

[0854] #在较早的单独实验中测得

[0855] 实施例25

[0856] TAF与SIRNA-NP的体外组合

[0857] 研究目标

[0858] 在体外使用HBV细胞培养模型系统来确定替诺福韦(呈前药替诺福韦艾拉酚胺或TAF形式,HBV聚合酶的核苷酸类似物抑制剂)和SIRNA-NP(旨在促进所有病毒mRNA转录物和病毒抗原的有效敲低的siRNA)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0859] HepDE19实验方案中的体外组合

[0860] 使用Prichard和Shipman(1990) (Prichard MN, Shipman C, Jr. 1990. A three-dimensional model to analyze drug-drug interactions. *Antiviral Res* 14:181-205 以及Prichard MN. 1992. *MacSynergy II*, University of Michigan)的方法来进行体外组合研究。如Guo等人(2007) (Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J Virol* 81:12472-12484)中所描述研发HepDE19细胞株。其为由HBV基因组稳定转染的人肝癌细胞株,且其可表达HBV前基因组RNA且以四环素调控的方式帮助HBV rcDNA(松弛环状DNA)合成。将HepDE19细胞在不含四环素的补充有10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日,为细胞更换新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理,且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育7天的持续时间。将抑制剂在100%DMSO(TAF)或生长培养基(SIRNA-NP)中稀释,且测定中的最终DMSO浓度 \leq 0.5%。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂,所述组合是以棋盘方式进行使得各浓度的抑制剂A与各浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制rcDNA产生的影响。在48小时孵育之后,使用bDNA测定(Affymetrix)用HBV特异性定制探针组和制造商的说明书测量存在于抑制剂处理孔中的rcDNA水平。以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算由各孔产生的RLU数据且使用MacSynergy II程序分析以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性:在95%CI下协同作用体积 $<25\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 <2) = 可能不显著; $25-50\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 >2 且 ≤ 5) = 微小但显著, $50-100\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 >5 且 <9) = 中度,在体内可为重要的;超过 $100\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 >9) = 强协同作用,在体内可能为重要的;体

积接近 $1000\mu\text{M}^2\%$ (\log 体积 >90) = 异常地高, 查验数据。同时, 使用用于使用Cell-TiterGlo试剂 (Promega) 按照制造商的说明书测定作为细胞活力的量度的ATP含量的重复板来评估抑制剂组合对细胞活力的影响。

[0861] 结果和结论

[0862] 将TAF (浓度范围于2倍稀释系列中200.0nM至0.781nM且进行9点滴定) 与SIRNA-NP (浓度范围于3倍稀释系列中60ng/mL至0.741ng/mL且进行5点滴定) 组合进行测试。使用单独或组合形式的TAF或SIRNA-NP处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表25A中。TAF和SIRNA-NP的 EC_{50} 值显示于表25B中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较 (表25A) 时, 按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman (1992) 所描述的解释准则发现组合为相加性, 没有拮抗作用 (表25B)。通过显微术或Cell-TiterGlo测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0863] 表25A: 替诺福韦艾拉酚胺与SIRNA-NP的体外组合

[药物]	0	0.781	1.563	3.125	6.250	12.500	25.000	50.000	100.000	200.000	平均抑制%
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	98.1	98.66	98.73	98.87	99.33	99.41	99.4	99.5	99.58	99.59	
20.000	96.4	95.42	96.67	97.25	98.09	98.71	98.41	98.86	99.28	99.49	
6.667	88.0	88.65	91.24	91.67	94.4	95.11	95.04	95.97	98.26	98.98	
2.222	80.1	72.86	78.16	81.28	82.7	87.98	87.09	91.03	95.81	98.08	
0.741	53.0	55.46	55.43	62.01	63.65	78.75	72.62	82.47	90.47	96.24	
0	0	-4.76	3.49	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	77.59	89.93	

[药物]	0	0.781	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	标准偏差(%)
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	0.64	0.46	0.63	0.55	0.17	0.23	0.1	0.06	0.04	0.1	
20.000	1.07	2.02	1.82	1.42	0.82	0.32	0.56	0.14	0.1	0.06	
6.667	2.35	3.56	4.19	5.97	1.68	0.94	1.45	0.87	0.51	0.12	
2.222	3.54	7.95	10.29	9.62	3.94	3.27	3.67	1.49	0.57	0.48	
0.741	12.8	16.97	11.3	11.62	9.42	10.02	1.77	3.4	0.5	0.83	
0	0	15.54	15.63	12.12	19.07	9.89	8.58	4.92	2.79	2.12	

[0864]

[药物]	0	0.781	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	相加性抑制
SIRNA-NP (ng/mL)											TAF (nM)
60	98.1	98.1	98.25	98.2	98.38	98.71	98.55	99.15	99.59	99.82	
20.000	96.4	96.25	96.54	96.44	96.8	97.44	97.14	98.32	99.2	99.64	
6.667	88.0	87.45	88.44	88.09	89.29	91.45	90.42	94.39	97.32	98.79	
2.222	80.1	79.24	80.87	80.3	82.28	85.85	84.15	90.72	95.56	98	
0.741	53.0	50.82	54.69	53.33	58.02	66.48	62.46	78.03	89.48	95.27	
0	0	-4.76	3.49	0.6	10.59	28.61	20.04	53.2	77.59	89.93	

[药物]	0	0.78	1.56	3.13	6.25	12.50	25.00	50	100	200	协同作用曲线(99.9%) 邦弗朗尼 调整
SIRNA-NP (ng/mL)											96%
60.0	0	0	0	0	0.390	0	0.520	0.152	0	0	协同作用
20.000	0	0	0	0	0	0.216	0	0.079	0	0	log 体积
6.667	0	0	0	0	0	0.566	0	0	0	0	拮抗作用
2.222	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 体积
0.741	0	0	0	0	0	0	4.334	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0865] 表25B:使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在DE19细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总:

[0866]

抑制剂 A	抑制剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (ng/mL)	抑制剂 B EC ₅₀	协同作用体积 (μM ² %)	协同作用 Log	拮抗作用体积 (μM ² %)*	拮抗作用 Log	结论
-------	-------	--------------------------------	------------------------	----------------------------	----------	-----------------------------	----------	----

			(nM)	*	体积	体积			
[0867]	SIRN A-NP	TAF	0.624	44.52	6.26	0.9	0	0	相加性

[0868] *在99.9%置信区间

[0869] 实施例26

[0870] 化合物3与GLS4的体外组合

[0871] 研究目标

[0872] 在体外使用HBV细胞培养模型系统来确定化合物3(属于氨磺酰基苯甲酰胺化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)和GLS4(属于杂芳基二氢嘧啶或HAP化学类别的HBV衣壳化小分子抑制剂)的两种药物组合为相加性、协同性抑或拮抗性。

[0873] HepDE19实验方案中的体外组合

[0874] 使用Prichard和Shipman(1990)的方法进行体外组合研究。如Guo等人(2007)中所描述研发HepDE19细胞株。其为由HBV基因组稳定转染的人肝癌细胞株,且其可表达HBV前基因组RNA且以四环素调控的方式帮助HBV rcDNA(松弛环状DNA)合成。将HepDE19细胞在不含四环素的补充有10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素的DMEM/F12培养基中涂铺于96孔组织培养处理微量滴定板中且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育隔夜。次日,为细胞更换新鲜培养基且用在相应EC₅₀值附近的浓度范围的抑制剂A和抑制剂B处理,且在湿润孵育器中在37°C和5%CO₂下孵育7天的持续时间。将两种抑制剂在100%DMSO中稀释且测定中的最终DMSO浓度≤0.5%。单独地以及以组合形式测试两种抑制剂,所述组合是以棋盘方式进行使得各浓度的抑制剂A与各浓度的抑制剂B组合以确定其组合对抑制rcDNA产生的影响。在48小时孵育之后,使用bDNA测定(Affymetrix)用HBV特异性定制探针组和制造商的说明书测量存在于抑制剂处理孔中的rcDNA水平。以占未处理的对照孔的抑制%的形式计算由各孔产生的RLU数据且使用MacSynergy II程序分析以使用由Prichard和Shipman建立的解释准则如下确定组合为协同性、相加性抑或拮抗性:在95%CI下协同作用体积<25μM²% (log体积<2) =可能不显著;25-50μM²% (log体积>2且<5) =微小但显著,50-100μM²% (log体积>5且<9) =中度,在体内可为重要的;超过100μM²% (log体积>9) =强协同作用,在体内可能为重要的;体积接近1000μM²% (log体积>90) =异常地高,查验数据。同时,使用用于使用Cell-TiterGlo试剂(Promega)按照制造商的说明书测定作为细胞活力的量度的ATP含量的重复板来评估抑制剂组合对细胞活力的影响。

[0875] 结果和结论

[0876] 将化合物3(浓度范围对于3倍稀释系列中3.0μM至0.04μM且进行5点滴定)与GLS4(浓度范围对于2倍稀释系列中2.0μM至0.008μM且进行9点滴定)组合进行测试。使用单独或组合形式的化合物3或GLS4处理观测到的rcDNA的平均抑制%和4次重复的标准偏差显示于表26a中。化合物3和GLS4的EC₅₀值显示于表26b中。当在以上浓度范围内将两种抑制剂组合的观测值与由相加性相互作用预测的值相比较(表26a)时,发现组合为在很大程度上相加性,且非常轻微地拮抗性(表26b);按照MacSynergy II分析且使用上文由Prichard和Shipman(1992)所描述的解释准则,拮抗作用的程度为微小但显著的。通过显微术或Cell-TiterGlo测定在所分析的样品中未观测到细胞活力或增殖的显著抑制。

[0877] 表26a:化合物3与GLS4的体外组合

[0878]

[药物]	0	0.008	0.016	0.031	0.063	0.125	0.250	0.50	1.00	2.00	平均抑制%
化合物 3											GLS-4 (μM)
3								96.8	98.0		
3.000	94.49	94.6	93.75	93.69	93.74	93.46	91.72	6	97	8	
1.000	86.87	85.25	87.63	86.08	84.96	87.22	92.9	9	8	1	
0.330	56.68	56.86	55.08	58.52	73.47	81.88	93.03	3	2	6	
0.110	19.99	13.03	18.43	23.81	53.91	74.43	95.32	5	2	2	
0.040	11.14	-4.48	-1.03	14.94	28.97	73.14	93.01	9	6	7	
0.000	0	-1.17	-5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	8	1	2	

[药物]	0	0.00781	0.0156	0.0312	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	标准偏差(%)
化合物 3											GLS-4 (μM)
3											
3	1.29	1.34	1.38	0.33	0.71	0.37	1.37	0.57	0.95	1.25	
1.000	3.95	5.47	1.98	1.54	3.07	2.38	0.89	0.56	0.8	1.43	
0.330	6.93	11.7	7.92	5.09	4.36	5.69	1.6	0.73	1.02	2.33	
0.110	15.95	12.76	10.23	4.24	14.05	5.6	1.61	0.83	0.72	0.31	
0.040	22.92	26.91	6.36	31.59	16.09	5.54	1.82	0.68	0.72	0.31	
0	0	17.17	15.42	15.34	10.95	6.65	1.39	1.47	0.59	0.35	

[药物]	0	0.00781	0.0156	0.0312	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	相加性抑制
化合物 3											GLS-4 (μM)
3											
3	94.49	94.43	94.17	94.88	96.64	98.78	99.71	99.8	99.9	99.9	
1.000	86.87	86.72	86.11	87.79	91.98	97.09	99.3	99.6	99.8	99.7	
0.330	56.68	56.17	54.16	59.73	73.55	90.39	97.68	98.9	99.3	99.2	
0.110	19.99	19.05	15.33	25.61	51.15	82.25	95.72	97.9	98.8	98.5	
0.040	11.14	10.1	5.97	17.39	45.75	80.29	95.25	97.7	98.6	98.4	
0	0	-1.17	-5.82	7.03	38.95	77.82	94.65	97.4	98.5	98.2	

[0879]

[药物]	0	0.00781	0.0156	0.0312	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	协同作用曲线(95%)
化合物 3											邦弗弱
3											尼调整 -
3	0	0	0	-0.543	-1.508	-4.594	-5.304	-1.882	-1.058	0	协同作用 0
1.000	0	0	0	0	-1.002	-5.205	-4.655	-1.582	-0.752	0	log 体积 0
0.330	0	0	0	0	0	0	-1.514	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 -29.95
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.34	log 体积 -4.13
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[药物]	0	0.01	0.02	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	协同作用曲线(99.9%)
化合物 3											邦弗弱
3											尼调整 96%
3.0	0	0	0	-0.103	-0.563	-4.102	-3.481	-1.124	0	0	协同作用 0
1.000	0	0	0	0	0	-2.037	-3.471	-0.837	0	0	log 体积 0
0.330	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	拮抗作用 -15.72
0.040	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	log 体积 -2.17
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

[0880] 表26b:使用bDNA测定进行rcDNA定量的情况下在DE19细胞培养系统中的体外组合研究的结果的汇总:

	抑制剂 A	抑制剂 B	抑制剂 A EC ₅₀ (μM)	抑制剂 B EC ₅₀ (μM)	协同作用体积 (μM ² %)*	协同作用 Log 体积	拮抗作用体积 (μM ² %)*	拮抗作用 Log 体积	结论
[0881]	化合物 3	GLS4	0.272	0.077	0	0	-15.72	-2.17	相加性*
	化合物 3	GLS4	0.272	0.077	0	0	-29.95	-4.13	微小的拮抗作用 [#]

[0882] *在99.9%置信区间

[0883] [#]在95%置信区间

[0884] 所有公开案、专利和专利文件均以引用的方式并入本文中，免如同其个别地以引用方式并入一般。已参照各种特定和优选实施方案和技术对本发明进行了描述。然而，应了解，可在保持在本发明的精神和范围内的同时作出诸多变化和修改。