

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 9/127 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680026865.9

[43] 公开日 2008 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 101237855A

[22] 申请日 2006.5.16

[21] 申请号 200680026865.9

[30] 优先权

[32] 2005.5.23 [33] US [31] 60/683,878

[32] 2006.3.20 [33] US [31] 11/384,575

[86] 国际申请 PCT/US2006/019118 2006.5.16

[87] 国际公布 WO2006/127360 英 2006.11.30

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.22

[71] 申请人 SDG 公司

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 J·R·劳 W·B·格尔

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 7 页 说明书 58 页 附图 13 页

[54] 发明名称

将干扰素输送到哺乳动物的脂构建体

[57] 摘要

本发明涉及含有与脂构建体相连的干扰素的肝细胞靶向组合物，所述脂构建体含有两亲脂质分子和受体结合分子。该组合物可含有游离干扰素和与络合物相连接的干扰素的混合物。可修饰组合物以保护干扰素和络合物免于降解。本发明也包括制造组合物和将干扰素装载入组合物以及回收组合物各种成分的方法，以及治疗丙型肝炎病毒和其它肝炎病毒感染的个体的方法。

1. 脂构建体, 包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质, 其中所述延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分, 其中所述近侧部分将所述延伸两亲脂质连接到所述构建体, 所述远侧部分将所述构建体靶向肝细胞展示的受体, 而所述中间部分连接所述近侧部分和所述远侧部分。

2. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述干扰素选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素 β -3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素; 干扰素 β -1a; 干扰素 β -1b、 γ 干扰素; 干扰素 γ -1a; 干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

3. 脂构建体, 包括至少一种抗病毒剂、两亲脂质和延伸两亲脂质, 其中所述延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分, 其中所述近侧部分将所述延伸两亲脂质连接到所述构建体, 所述远侧部分将所述构建体靶向肝细胞展示的受体, 而所述中间部分连接所述近侧部分和所述远侧部分, 其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

4. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂, 其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

5. 权利要求 1 所述的脂构建体, 进一步包括不溶形式的至少一种与所述脂构建体连接的活性成分。

6. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述两亲脂质包括至少一种选自下列的脂质: 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-[3-磷酸-rac-(1-甘油)]、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、它们的衍生物和任意前述化合物的混合物。

7. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述延伸两亲脂质的所述近侧部分包括至少一个但不超过两个结合到骨架的长酰基烃链, 其中每一个烃链独立地选自饱和烃链和不饱和烃链。

8. 权利要求 7 所述的脂构建体, 其中所述骨架包括甘油。

9. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述延伸两亲脂质的所述远侧部分包括选自下列的至少一种成员: 生物素、生物素衍生物、亚氨基生物素、亚氨基生物素衍生物、生物胞素、生物胞素衍生物、亚氨基生物胞素、亚氨基生物胞素衍生物和结合到肝细胞上受体的肝细胞特异性分子。

10. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述延伸两亲脂质选自: N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)生物素; 磺基-NHS-生物素; N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素; 磺基-N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素; D-生物素; 生物胞素; 磺基-N-羟基琥珀酰亚胺-S-S-生物素; 生物素-BMCC; 生物素-HPDP; 碘乙酰基-LC-生物素; 生物素-酰肼; 生物素-LC-酰肼; 生物胞素-酰肼; 生物素尸胺; 羧基生物素; 光生物素; 对氨基苯甲酰生物胞素三氟乙酸酯; 对重氮基苯甲酰生物胞素; 生物素 DHPE; 生物素-X-DHPE; 12-((生物素酰)氨基)十二酸; 12-((生物素酰)氨基)十二酸琥珀酰亚胺酯; S-生物素酰高半胱氨酸; 生物胞素-X; 生物胞素-x-酰肼; 生物素乙二胺; 生物素-XL; 生物素-X-乙二胺; 生物素-XX-酰肼; 生物素-XX-SE; 生物素-XX, SSE; 生物素-X-尸胺; α -(t-BOC)生物胞素; N-(生物素酰)-N'-(碘乙酰)乙二胺; DNP-X-生物胞素-X-SE; 生物素-X-酰肼; 降生物素胺氢氯化物; 3-(N-马来酰亚胺基丙酰)生物胞素; ARP; 生物素-I-亚砷; 生物素甲酯; 生物素-马来酰亚胺; 生物素-聚(乙二醇)胺; (+)生物素 4-酰氨基苯甲酸钠盐; 生物素 2-N-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷; 生物素- α -D-N-乙酰神经氨酸苷; 生物素- α -L-岩藻糖苷; 生物素-乳-N-二糖苷; 生物素-路易斯-A 三糖; 生物素-路易斯-Y 四糖; 生物素- α -D-吡喃甘露糖苷; 生物素 6-O-磷酸- α -D-吡喃甘露糖苷; 和聚铬-聚(二)-N-[2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基]亚氨基]双乙酸。

11. 权利要求 1 所述的脂构建体, 其中所述延伸两亲脂质的所述中间部分包含硫代乙酰三甘氨酸聚合物或它的衍生物, 其中所述延伸两亲脂质分子从所述脂构建体的表面向外延伸。

12. 权利要求 1 所述的脂构建体, 进一步包括至少一种与水不溶性靶分子络合物连接的活性成分, 其中所述络合物包括大量连接的独立单元, 其中所述独立单元包括:

a. 选自过渡元素、内过渡元素、所述过渡元素的相邻元素和任意上述元素的混合物的桥连成分; 和

b. 络合成分;

假设当所述过渡元素是铬时, 形成铬靶分子络合物。

13. 权利要求 12 所述的脂构建体, 进一步包括至少一种不与所述靶分子络合

物连接的活性成分。

14. 权利要求 12 所述的脂构建体，其中所述桥连成分是铬。

15. 权利要求 12 所述的脂构建体，其中所述络合成分包括聚(二)- [(N-(2,6-二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸]。

16. 权利要求 51 所述的脂构建体，其中所述脂质成分包括 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇和磷酸联十六烷酯的混和物。

17. 权利要求 1 所述的脂构建体，其中所述延伸两亲脂质的所述远侧成分包括非极性的衍生苯环或杂双环结构。

18. 权利要求 1 所述的脂构建体，其中所述构建体包括正电荷、负电荷或它们的组合。

19. 权利要求 1 所述的脂构建体，其中所述延伸两亲脂质在与所述远侧部分的末端距离约 13.5 埃或更小的位置，包括至少一个羰基部分。

20. 权利要求 1 所述的脂构建体，其中所述延伸两亲脂质包括至少一个含有仲胺的氨基甲酰部分。

21. 权利要求 1 所述的脂构建体，其中所述延伸两亲脂质在中间位置包括带电的铬。

22. 权利要求 1 所述的脂构建体，进一步包括邻苯二甲酸醋酸纤维素。

23. 制造含有至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的脂构建体的方法，其中所述延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中所述近侧部分将所述延伸两亲脂质连接到所述构建体，所述远侧部分将所述构建体靶向肝细胞展示的受体，而所述中间部分连接所述近侧部分和所述远侧部分，包括：

- a. 产生含有所述两亲脂质和所述延伸两亲脂质的混和物；
- b. 在水介质中形成所述脂构建体的悬浮液；和
- c. 将活性成分装载入所述脂构建体。

24. 权利要求 23 所述的方法，其中将所述活性成分装载入所述脂构建体的步骤包括平衡装载和非平衡装载。

25. 权利要求 23 所述的方法，其中将所述活性成分装载入所述脂构建体的步骤包括将含有游离活性成分的溶液加入到所述脂构建体在水介质中的混合物，并且使所述活性成分保持与所述混合物接触，直到达到平衡。

26. 权利要求 25 所述的方法，进一步包括下列步骤：

d. 在所述混合物达到平衡后，停止将所述活性成分装载入所述脂构建体，其中含有游离活性成分的所述溶液从所述构建体被除去，进一步，其中所述构建体包含与所述构建体连接的至少一种活性成分。

27. 权利要求 25 所述的方法，进一步包括步骤：

e. 从含有与所述构建体连接的至少一种活性成分的所述脂构建体中除去含有游离活性成分的所述溶液，这是通过选自快速过滤方法、离心、过滤离心和使用离子交换树脂或链霉抗生物素琼脂糖亲和树脂凝胶的层析法的方法实现的，所述链霉抗生物素琼脂糖亲和树脂凝胶对生物素、亚氨基生物素或它们的衍生物具有亲和性。

28. 权利要求 23 所述的方法，进一步包括步骤：

f. 将含有大量连接的独立单元的铬络合物加入到所述脂构建体。

29. 权利要求 23 所述的方法，进一步包括步骤：

g. 将邻苯二甲酸醋酸纤维素加入到所述脂构建体。

30. 权利要求 23 所述的方法，进一步包括步骤：

h. 从所述方法回收至少一种选自活性成分、离子交换树脂和链霉抗生物素琼脂糖亲和凝胶的材料。

31. 增加患者体内至少一种活性成分的生物利用度的方法，包括：

a. 将至少一种活性成分与脂构建体结合，其中所述脂构建体包括多个非共价多配位基结合位点；和

b. 将含有所述活性成分的所述构建体施用给所述患者。

32. 权利要求 31 所述的方法，进一步包括调节至少一种活性成分的等电点的步骤。

33. 权利要求 31 所述的方法，其中所述活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、

复合干扰素、干扰素 n-3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

34. 权利要求 31 所述的方法，其中所述活性成分是抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

35. 权利要求 31 所述的方法，其中所述活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

36. 权利要求 31 所述的方法，其中所述脂构建体包括干扰素、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-[3-磷酸-rac-(1-甘油)]、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)或其衍生物，以及肝细胞受体结合分子。

37. 形成缓释组合物的方法，所述缓释组合物在宿主中提供至少一种活性成分的生物利用度增加，包括：

- a. 通过含有亚氨基生物素或亚氨基生物素衍生物的脂质将脂构建体结合到 pH9.5 或更高的链霉抗生物素琼脂糖亲和凝胶，从体相介质中除去所述脂构建体；
- b. 从所述体相介质分离所述构建体；和
- c. 通过将所述亲和凝胶的水混合物的 pH 调节到 pH 4.5，从所述亲和凝胶释放所述构建体，其中所述释放的构建体包括至少一种不溶活性成分；

其中将所述构建体施用给温血宿主后，所述不溶活性成分在所述宿主内的生理 pH 条件下重新溶解。

38. 治疗肝炎感染的患者的方法，包括将有效量的脂构建体施用给所述患者，所述脂构建体包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质，其中所述延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中所述近侧部分将所述延伸两亲脂质连接到所述构建体，所述远侧部分将所述构建体靶向肝细胞展示的受体，而所述中间部分连接所述近侧部分和所述远侧部分。

39. 权利要求 38 所述的方法，其中所述患者被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎和庚型肝炎的至少一种的肝炎病毒所感染。

40. 权利要求 38 所述的方法，其中所述活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、

复合干扰素、干扰素 α -3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

41. 权利要求 38 所述的方法，其中所述活性成分是抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

42. 权利要求 38 所述的方法，其中所述活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

43. 权利要求 38 所述的方法，其中所述脂构建体进一步包括靶分子络合物，其中所述络合物包括多个连接的独立单元，进一步地，其中所述连接的独立单元包括：

a. 选自过渡元素、内过渡元素、所述过渡元素的相邻元素和任意上述元素的混合物的桥连成分；和

b. 络合成分；

假设当所述过渡元素是铬时，形成铬靶分子络合物。

44. 权利要求 38 所述的方法，其中所述脂构建体进一步包括不与所述靶分子络合物相连接的至少一种活性成分。

45. 权利要求 38 所述的方法，其中所述给药途径选自经口、肠胃外、皮下、肺部和口腔。

46. 一种方法，用于通过将包含至少一种活性成分、两亲脂质和延伸脂质的脂构建体施用给感染病毒的患者以增强所述至少一种活性成分向所述患者肝脏中肝细胞的输送，其中所述延伸脂质包括结合到肝细胞受体的部分，其中所述脂构建体以多种尺寸存在。

47. 权利要求 46 所述的方法，其中所述患者被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎、或庚型肝炎或前述肝炎病毒的组合的至少一种的病毒所感染。

48. 权利要求 46 所述的方法，其中所述活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素 α -3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇

化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

49. 权利要求 46 所述的方法，其中所述活性成分是抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

50. 权利要求 46 所述的方法，其中所述活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中所述抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

51. 权利要求 46 所述的方法，进一步包括通过提供三维结构排列的脂质分子以便阻止水解酶接近所述活性成分，来保护所述脂构建体内的所述活性成分免于水解降解。

52. 权利要求 46 所述的方法，进一步包括将邻苯二甲酸醋酸纤维素加入到所述脂构建体，以与单个脂质分子反应。

53. 权利要求 46 所述的方法，进一步包括在所述脂构建体内产生不溶剂型的所述活性成分。

54. 用于治疗病毒感染的哺乳动物的试剂盒，所述试剂盒包括脂构建体、生理缓冲溶液、施用器和其使用的说明性材料，其中所述脂构建体包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质，其中所述延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中所述近侧部分将所述延伸两亲脂质连接到所述构建体，所述远侧部分将所述构建体靶向肝细胞展示的受体，而所述中间部分连接所述近侧部分和所述远侧部分。

55. 权利要求 54 所述的试剂盒，进一步包括至少一种活性成分。

56. 权利要求 54 所述的试剂盒，其中所述患者被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎和庚型肝炎的至少一种的病毒所感染。

将干扰素输送到哺乳动物的脂构建体

发明背景

[0001] 丙型肝炎病毒(HCV)感染是美国最普遍的慢性血液感染(bloodborne infection)。疾病控制中心(CDC)估计, 在 20 世纪 80 年代, 每年平均发生 240,000 例新感染。自从 20 世纪 80 年代, 每年新感染的数量在 2003 年已经下降到大约 30,000。估计约占美国人口的 1.8%的大约 3,900,000 美国人已经被 HCV 所感染。这些人中大约 2,700,000 人是慢性感染, 并且因为其临床上不发病, 所以这些人可能没有意识到他们已被感染。在最初感染后的前二十年或更多个十年期间, 感染的人作为传播源传染给其他人, 并且有患慢性肝病或其它 HCV-相关的慢性疾病的风险。

[0002] 对于丙型肝炎目前的治疗方法是基于使用 α 干扰素的各种制剂, 这些制剂通过肌肉或皮下注射进行施用。 α 干扰素是天然发生的糖蛋白, 其在应答病毒感染中由细胞分泌。 α 干扰素, 其具有免疫调节、抗增殖和抗病毒性质, 通过结合到膜受体施加其效应。在保持免疫系统平衡上, α 干扰素起关键作用, 并且其通常以与传统可注射干扰素治疗相比非常低的浓度由机体产生, 这需要施用高剂量以达到疾病部位所需的浓度。如果将 α 干扰素直接施用到血流中, 需要非常高的剂量——数百万国际单位(IU), 以确保足够的量到达患病组织。释放的 α 干扰素到达体内大范围的系统, 而不是输送到机体的靶区域。所需要的是 α 干扰素的组合物, 其中 α 干扰素在延长的期间, 以相对恒定的速率释放, 并且将组合物中一部分 α 干扰素靶向输送到肝脏, 以更好地减少或消除丙型肝炎病毒。

[0003] 在美国, 干扰素 α -2a (ROFERON-A®; Hoffmann-La Roche)、干扰素 α -2b (INTRON-A®; Schering-Plough) 和 复合干扰素 (interferon alfacon-1)(INFERGEN®; Intermune)作为单一药剂被批准用来治疗患有慢性丙型肝炎的成年人。治疗慢性丙型肝炎的干扰素 α -2b 和干扰素 α -2a 的推荐剂量是 3,000,000 单位, 每周三次, 通过皮下或肌肉注射加以施用。进行治疗六个月到两年。对于复合干扰素, 第一次治疗的推荐剂量是 9 微克, 每周三次, 而对于无应答或者复发的患者, 是 15 微克, 每周三次, 又六个月。用干扰素单独治疗在 15% 以下的对象中导致持续应答。三氮唑核苷, 一种具有对抗广谱病毒的活性的合成核苷, 在治疗慢性丙型肝炎中通常与 α 干扰素一起施用。

[0004] 近来, 聚乙二醇化干扰素 α (peginterferon- α), 有时被称聚乙二醇化

干扰素 (pegylated interferon)已被用于治疗慢性丙型肝炎。两种聚乙二醇化干扰素 α 的制剂已在患有丙型肝炎的患者中进行研究：聚乙二醇化干扰素 α -2b (PEG-INTRON®; Schering-Plough) 和聚乙二醇化干扰素 α -2a (PEGASYS®; Hoffmann-La Roche)。聚乙二醇化干扰素 α 与未修饰的 α 干扰素的不同之处在于聚乙二醇分子被连接到干扰素分子。这种结构修饰导致从体内较慢的消除，因此用更低频率的给药达到更高、更恒定的血液 α 干扰素水平。对比于必须一周注射 3 次来治疗慢性丙型肝炎的未修饰的 α 干扰素，聚乙二醇化干扰素 α 仅需要每周注射一次。

[0005] 治疗慢性丙型肝炎的主要目标是从血液消除可检测的病毒 RNA。在完成治疗后六个月血液中可检测的丙型肝炎病毒 RNA 的缺失被称为持续应答。

[0006] 因此，在本领域对治疗丙型肝炎病毒感染的患者的组合物和方法存在未被满足的需求。本发明通过提供被靶向输送到肝脏的长效组合物，来满足这些需求。

发明简述

[0007] 在一方面，本发明包括脂构建体，其包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质，其中延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示 (display) 的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分。

[0008] 在另一方面，干扰素选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素(interferon alfacon-1)、干扰素 n-3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

[0009] 在仍旧另一方面，脂构建体包括至少一种抗病毒剂、两亲脂质和延伸两亲脂质，其中延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0010] 在另一方面，活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0011] 在又另一方面，脂构建体进一步包括不溶形式的至少一种与脂构建体连接的活性成分。

[0012] 在另一方面，两亲脂质包括至少一种脂质，其选自 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-[3-磷酸-rac-(1-甘油)](1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-[3-phospho-rac-(1-glycerol)]、1,2-二硬脂酰-sn-甘油

基-3-磷酸乙醇胺(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(succinyl))、它们的衍生物和任意前述化合物的混合物。

[0013] 在又另一方面,延伸两亲脂质的近侧部分包括至少一个但不超过两个结合到骨架的长酰基烃链,其中每一个烃链独立地选自饱和烃链和不饱和烃链。

[0014] 在仍旧另一方面,骨架包括甘油。

[0015] 在又另一方面,延伸两亲脂质的远侧部分包括选自下列的至少一种:生物素、生物素衍生物、亚氨基生物素、亚氨基生物素衍生物、生物胞素、生物胞素衍生物、亚氨基生物胞素、亚氨基生物胞素衍生物和结合到肝细胞上受体的肝细胞特异性分子。

[0016] 在另一方面,延伸两亲脂质选自N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)生物素;磺基-NHS-生物素;N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素;磺基-N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素;D-生物素;生物胞素;磺基-N-羟基琥珀酰亚胺-S-S-生物素;生物素-BMCC;生物素-HPDP;碘乙酰基-LC-生物素;生物素-酰肼;生物素-LC-酰肼;生物胞素-酰肼;生物素尸胺;羧基生物素;光生物素;对氨基苯甲酰生物胞素三氟乙酸酯;对重氮基苯甲酰生物胞素;生物素DHPE;生物素-X-DHPE;12-((生物素酰)氨基)十二酸;12-((生物素酰)氨基)十二酸琥珀酰亚胺酯;S-生物素酰高半胱氨酸;生物胞素-X;生物胞素-X-酰肼;生物素乙二胺;生物素-XL;生物素-X-乙二胺;生物素-XX-酰肼;生物素-XX-SE;生物素-XX, SSE;生物素-X-尸胺; α -(t-BOC)生物胞素;N-(生物素酰)-N'-(碘乙酰)乙二胺;DNP-X-生物胞素-X-SE;生物素-X-酰肼;降生物素胺氢氯化物;3-(N-马来酰亚胺基丙酰)生物胞素;ARP;生物素-I-亚砷;生物素甲酯;生物素-马来酰亚胺;生物素-聚(乙二醇)胺;(+生物素4-酰氨基苯甲酸钠盐;生物素2-N-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷;生物素- α -D-N-乙酰神经氨酸苷;生物素- α -L-岩藻糖苷;生物素-乳-N-二糖苷;生物素-路易斯-A三糖;生物素-路易斯-Y四糖;生物素- α -D-吡喃甘露糖苷;生物素6-O-磷酸- α -D-吡喃甘露糖苷;和聚铬-聚(二)-N-[2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基]亚氨基]双乙酸。

[0017] 在进一步方面,延伸两亲脂质的中间部分包含硫代乙酰三甘氨酸聚合物或它的衍生物,其中延伸两亲脂质从脂构建体的表面向外延伸。

[0018] 在一方面,脂构建体进一步包括至少一种与水不溶性靶分子络合物连接的活性成分,其中所述络合物包括大量连接的独立单元,其中所述独立单元包括:选自过渡元素、内过渡元素、过渡元素的相邻元素和任意前述元素的混合物的桥连成分,以及络合成分,假设当过渡元素是铬时,形成铬靶分子络合物(target molecule complex)。

[0019] 在又另一方面,脂构建体进一步包括至少一种与靶分子络合物连接的活性成分。

[0020] 在仍旧另一方面，桥连成分是铬。

[0021] 在又另一方面，络合成分包括聚(二)-[(N-(2,6-二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸]。

[0022] 在一方面，延伸两亲脂质的远侧部分包括非极性衍生的苯环或杂双环结构。

[0023] 在另一方面，构建体包括正电荷、负电荷或它们的组合。

[0024] 在又另一方面，延伸两亲脂质在与远侧部分的末端距离约 13.5 埃或更小的位置，包括至少一个羰基部分。

[0025] 在进一步方面，延伸两亲脂质包括至少一个含有仲胺的氨基甲酰部分。

[0026] 在一方面，延伸两亲脂质在中间位置包括带电的铬。

[0027] 在另一方面，脂构建体进一步包括邻苯二甲酸醋酸纤维素。

[0028] 在一方面，本发明包括制造含有至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的脂构建体的方法，其中延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分，这通过在水中形成脂构建体的悬浮液和将活性成分装载入脂构建体实现。

[0029] 在又另一方面，将活性成分装载入脂构建体的步骤包括平衡装载和非平衡装载(equilibrium loading and non-equilibrium loading)。

[0030] 在一方面，将活性成分装载入脂构建体的步骤包括将含有游离活性成分的溶液加入到水中脂构建体的混合物中，并且使活性成分保持与混合物接触，直到达到平衡。

[0031] 在另一方面，制造干扰素结合脂构建体的方法进一步包括在混合物达到平衡后，停止将活性成分装载入脂构建体，其中含有游离活性成分的溶液被从构建体除去，进一步，其中构建体含有结合到构建体的至少一种活性成分。

[0032] 在另一方面，制造干扰素结合脂构建体的方法进一步包括从含有结合到构建体的至少一种活性成分的脂构建体中除去含有游离活性成分的溶液，这是通过选自快速过滤步骤、离心、过滤离心和使用离子交换树脂或链霉抗生物素琼脂糖亲和树脂凝胶的层析法的方法实现的，所述链霉抗生物素琼脂糖亲和树脂凝胶对生物素、亚氨基生物素或它们的衍生物具有亲和性。

[0033] 在又另一方面，制造干扰素结合脂构建体的方法进一步包括将含有大量连接的独立单元的铬络合物加入到脂构建体。

[0034] 在仍旧另一方面，制造干扰素结合脂构建体的方法进一步包括将邻苯二甲酸醋酸纤维素加入到脂构建体。

[0035] 在另一方面，制造干扰素结合脂构建体的方法进一步包括从所述方法回收至少一种选自活性成分、离子交换树脂和链霉抗生物素琼脂糖亲和性凝胶的

材料。

[0036] 在一方面，增加患者体内至少一种有效成分的生物利用度的方法包括：将至少一种活性成分与脂构建体结合，其中脂构建体包括多个非共价多配位基结合位点(multi-dentate binding sites)，并且将含有活性成分的构建体施用给患者。

[0037] 在另一方面，增加生物利用度进一步包括调节至少一种活性成分的等电点的步骤。

[0038] 在又另一方面，活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素n-3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

[0039] 在仍旧另一方面，活性成分是抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0040] 在仍旧另一方面，活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0041] 在仍旧另一方面，脂构建体包括干扰素、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-[3-磷酸-rac-(1-甘油)]、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)或它们的衍生物，以及肝细胞受体结合分子。

[0042] 在一方面，形成在宿主中提供至少一种活性成分的生物利用度增加的缓释组合物的方法，包括：通过含有亚氨基生物素或亚氨基生物素衍生物的脂质将脂构建体结合到 pH9.5 或更高的链霉抗生物素琼脂糖亲和性凝胶，从而从体相介质中除去所述脂构建体；从体相介质分离构建体；通过将亲和凝胶的水混合物的 pH 调节到 pH4.5，从亲和凝胶释放构建体，其中，释放的构建体包含至少一种不溶活性成分；其中将构建体施用给温血宿主后，不溶活性成分在宿主内生理 pH 条件下重新溶解。

[0043] 在另一方面，治疗肝炎感染的患者的方法包括将有效量的脂构建体施用给患者，所述脂构建体包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质，其中延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分，其中近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分。

[0044] 在又另一方面，患者被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎和庚型肝炎的至少一种肝炎病毒所感染。

[0045] 在一方面，活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素n-3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；

干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合物。

[0046] 在另一方面，活性成分是抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0047] 在仍旧另一方面，活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0048] 在又另一方面，脂构建体包括靶分子络合物，其中所述络合物包括多个连接的独立单元，进一步其中所述连接的独立单元包括：选自过渡元素、内过渡元素、过渡元素的相邻元素和任意上述元素的混合物的桥连成分；以及络合成分；假设当过渡元素是铬时，形成铬靶分子络合物。

[0049] 在又另一方面，脂构建体进一步包括不与靶分子络合物相连接的至少一种活性成分。

[0050] 在仍旧另一方面，施用是经口或皮下的。

[0051] 在一方面，本发明包括通过将包含干扰素和延伸脂质分子的脂构建体施用给患者以增强干扰素向肝炎感染的患者的肝脏中肝细胞的输送的方法，所述延伸脂质包括结合到肝细胞受体的部分，其中脂构建体以多种尺寸存在，其中肝细胞受体结合大小优化的构建体，以增大内吞作用和诱导脂构建体的目标药理学作用。

[0052] 在另一方面，患者被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎、或庚型肝炎或前述肝炎病毒的组合的至少一种病毒所感染。

[0053] 在仍旧另一方面，活性成分选自 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素 n-3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素；干扰素 β -1a；干扰素 β -1b、 γ 干扰素；干扰素 γ -1a；干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

[0054] 在又另一方面，活性成分是抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0055] 在仍旧又另一方面，活性成分包括至少一种干扰素和至少一种抗病毒剂，其中抗病毒剂不是干扰素或干扰素衍生物。

[0056] 在另一方面，治疗患者的方法进一步包括通过提供脂质分子的三维结构排列以便阻止水解酶接近活性成分，来保护脂构建体内的活性成分免于水解降解。

[0057] 在仍旧另一方面，该方法进一步包括将邻苯二甲酸醋酸纤维素加入到脂构建体以与单个脂质分子反应。

[0058] 在又另一方面，该方法进一步包括在脂构建体内产生不溶剂型的活性成分。

[0059] 在一方面, 本发明包括用于治疗病毒感染的哺乳动物的试剂盒, 该试剂盒包括脂构建体、生理缓冲溶液、施用器和其使用的说明性材料, 其中脂构建体包括至少一种干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质, 其中延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分, 其中近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体, 远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体, 而中间部分连接近侧部分和远侧部分。

[0060] 在另一方面, 试剂盒进一步包括至少一种活性成分。

[0061] 在又另一方面, 试剂盒是用于治疗被选自甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、戊型肝炎、己型肝炎和庚型肝炎的至少一种病毒所感染的患者。

附图简述

[0062] 为了阐述本发明的目的, 在附图中描述本发明的某些实施方式。然而, 本发明没有限定于在附图中描述的実施方式的精确安排和手段(arrangement and instrumentality)。

[0063] 图 1 是干扰素结合脂构建体的描述, 所述脂构建体包括干扰素、两亲脂质分子和延伸两亲脂质。

[0064] 图 2 是制造生物胞素的途径的描述。

[0065] 图 3 是制造亚氨基生物胞素的途径的描述。

[0066] 图 4 是制造苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸亚氨基生物胞素(BTA-3-甘氨酸-亚氨基生物胞素)的途径的描述。

[0067] 图 5 是制造苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸的途径的描述。

[0068] 图 6 是制造苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸磺基-N-羟基琥珀酰亚胺(BTA-3-甘氨酸-磺基-NHS)的途径的描述。

[0069] 图 7 是制造苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸亚氨基生物胞素(BTA-3-甘氨酸-亚氨基生物胞素)的途径的描述。

[0070] 图 8 是制造脂质锚定和肝细胞受体结合分子(lipid anchoring and hepatocyte receptor binding molecule, LA-HRBM)的途径的描述。

[0071] 图 9 是在邻苯二甲酸醋酸纤维素和干扰素之间的潜在结合位点的描述。

[0072] 图 10 是酸性条件对碱性条件下, 亚氨基生物素的结构变化的描述。

[0073] 图 11 是制造含有两亲脂质和延伸两亲脂质的干扰素结合脂构建体的方法的概要。

[0074] 图 12 由两部分构成。图 12a 表示用 α 干扰素给药的小鼠的肝脏和脾脏中的相对表达水平。图 12b 表示用 α 干扰素和 HDV 给药的小鼠的肝脏和脾脏中的相对表达水平。

[0075] 图 13 表示在小鼠模型中, HDV 靶向对通过 α 干扰素的肝 PKR 活化的影响。

发明详述

[0076] 本发明包括肝细胞靶向药物组合物，其中干扰素在构建体内与水不溶性靶分子络合物相结合，并且组合物被靶向患者肝脏中肝细胞，以提供有效控制丙型肝炎病毒和其它病毒的手段。

[0077] 本发明包括含有干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质(受体结合分子)的脂构建体。延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分。近侧部分将延伸两亲脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分。

[0078] 脂构建体是球形脂质和磷脂颗粒，在其中各个脂质分子协同相互作用，产生两极脂膜，该两极脂膜封入并隔离一部分在其中形成脂构建体的介质。脂构建体可将干扰素靶向输送到肝脏中的肝细胞，并提供持续释放干扰素，以更好地减少或消除丙型肝炎病毒或其它影响肝脏的病毒。

[0079] 本发明的组合物可通过各种途径进行施用，包括皮下或经口，以治疗丙型肝炎病毒和其它病毒感染的哺乳动物。

[0080] 本发明进一步提供制造含有干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的脂构建体的方法。延伸两亲脂质包括近侧部分、中间部分和远侧部分。近侧部分将延伸脂质连接到构建体，远侧部分将构建体靶向肝细胞展示的受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分。

[0081] 本发明也提供制造包括含游离干扰素和与构建体中水不溶性靶分子络合物结合的干扰素的组合物的方法，所述构建体将络合物靶向输送到肝细胞。靶分子络合物由包含于脂构建体基质中的金属络合物形成的多个连接的独立结构单元所构成。

[0082] 另外，本发明提供通过施用有效剂量的含有干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的脂构建体——其被靶向输送到肝细胞，而治疗丙型肝炎病毒和其它病毒感染的个体的方法。

[0083] 另外，本发明还提供通过施用有效剂量的含有干扰素、两亲脂质、延伸两亲脂质和水不溶性靶分子络合物的脂构建体——其被靶向输送到肝细胞，而治疗丙型肝炎病毒和其它病毒感染的个体的方法。

定义

[0084] 除非另有说明，本文使用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的意思。一般而言，本文使用的命名法则和有机化学和蛋白质化学中的实验室方法是本领域公知的和普遍使用的那些。

[0085] 冠词“一个(或种)(a)”和“一个(或种)(an)”用于本文，是指一个(或种)或一个(或种)以上(即，至少一个(或种))该冠词在语法上的对象。作为示例，“一种要素(an element)”意味着一种要素或一种以上要素。

[0086] 术语“活性成分”指干扰素和其它抗病毒化合物。

[0087] 术语“低级(lower)”指描述的基团含有1到6个碳原子。

[0088] 术语“烷基”本身或作为其它取代基的一部分，除非另有说明，指具有指定碳原子数(即 C₁-C₆ 指一到六个碳)的直链、支链或环链烃，并且包括直链、支链或环状基团。实例包括：甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、新戊基、己基、环己基和环丙基甲基。最优选是(C₁-C₃)烷基、特别是乙基、甲基和异丙基。

[0089] 术语“亚烷基”，本身或作为其它取代基的一部分，除非另有说明，指具有两个取代位点的直链、支链或环链烃，例如亚甲基(-CH₂-)、亚乙基(-CH₂CH₂-)、亚异丙基(-CH(CH₃)=CH₂)等。

[0090] 术语“芳基”，单独或与其它术语一起使用，除非另有说明，指饱和或不饱和的环状碳环结构，其包括一个或多个环(一般一个、两个或三个环)，其中这些环可以以侧链的方式连接在一起，例如联苯基，或者可以稠合例如萘。实例包括苯基；蒽基；和萘基。该结构可具有一个或多个取代位点，在那里官能团例如醇、烷氧基、酰胺、氨基、氰化物、卤素和硝基被结合。

[0091] 术语“芳基低碳烷基(aryl lower alkyl)”指官能团，其中芳基被连接到低级亚烷基，例如-CH₂CH₂-苯基。

[0092] 术语“烷氧基”，单独或与其它术语一起使用，除非另有说明，指烷基或含有取代基例如羟基的烷基，其具有指定碳原子数，通过氧原子被连接到该分子的其它部分，例如，-OCHOH-、-OCH₂OH、甲氧基(-OCH₃)、乙氧基(-OCH₂CH₃)、1-丙氧基(-OCH₂CH₂CH₃)、2-丙氧基(异丙氧基)、丁氧基(-OCH₂CH₂CH₂CH₃)、戊氧基(-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、以及高级同系物和异构体。

[0093] 术语“酰基”指具有通式-C(=O)-R 的官能团，其中-R 是氢、烃基、氨基或烷氧基。实例包括乙酰基(-C(=O)CH₃)、丙酰基(-C(=O)CH₂CH₃)、苯甲酰基(-C(=O)C₆H₅)、苯乙酰基(-C(=O)CH₂C₆H₅)、乙氧甲酰基(-CO₂CH₂CH₃)和二甲基氨基甲酰(-C(=O)N(CH₃)₂)。

[0094] 术语“卤(halo)”或“卤素(halogen)”，本身或作为其它取代基的一部分，除非另有说明，指氟、氯、溴或碘原子。

[0095] 术语“杂环(heterocycle)”或“杂环基(heterocyclyl)”或“杂环的(heterocyclic)”，本身或作为其它取代基的一部分，除非另有说明，指取代或未取代的、稳定的、单环或多环杂环体系，其包括碳原子和至少一个选自 N、O 和 S 的杂原子，并且任选地，其中氮和硫杂原子可被氧化，并且任选地氮原子可被季铵化。除非另有说明，杂环体系可在提供稳定结构的任何杂原子或碳原子被连接。实例包括吡咯、咪唑、苯并咪唑、酞、吡啶基、吡喃基、呋喃基、噻唑、噻吩、唑、吡唑、3-吡咯啉、吡咯烷(pyrrolidene)、嘧啶、嘌呤、喹啉、异喹啉、咔唑等。

[0096] 如本文使用的，氨基酸通过其全名、相应的三字母密码表示，如下表

所示:

		三字母	
全名	密码	全名	密码
丙氨酸	Ala	亮氨酸	Leu
精氨酸	Arg	赖氨酸	Lys
天冬酰胺	Asn	甲硫氨酸	Met
天冬氨酸	Asp	苯丙氨酸	Phe
半胱氨酸	Cys	脯氨酸	Pro
胱氨酸	Cys-Cys	丝氨酸	Ser
谷氨酸	Glu	苏氨酸	Thr
谷氨酰胺	Gln	色氨酸	Trp
甘氨酸	Gly	酪氨酸	Tyr
组氨酸	His	缬氨酸	Val
异亮氨酸	Ile		

[0097] 术语“铬靶分子络合物”指包括大量独立单元的络合物，其中，每一单元包含由于多价分子而可接受多达六个配体的铬（Cr）原子，例如来自大量N-(2,6-二异丙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸的分子的配体。独立单元彼此连接，形成以三维排列连接的复杂聚合结构。聚合络合物不溶于水，但是可溶于有机溶剂。

[0098] 术语“脂构建体”指球状脂质和/或磷脂颗粒，其中各个脂质分子协同相互作用，产生两极脂膜，该两极脂膜封入并隔离一部分脂构建体形成于其中的介质。

[0099] 术语“两亲脂质分子”指具有极性端和非极性端的脂质分子。

[0100] 术语“延伸两亲脂质”指两亲分子具有如此结构，当结构作为脂构建体的一部分时，从脂构建体延伸进入构建体周围的介质，并可结合受体或与受体相互作用。

[0101] “络合剂（complexing agent）”是将与选定的金属桥连剂例如铬盐、锆盐等形成聚合络合物的化合物，其表现出聚合性能，其中，聚合络合物基本上不溶于水而可溶于有机溶剂。

[0102] “水介质”指水或含水缓冲液或盐。

[0103] “基本可溶”指材料在室温下表现不溶于水的性能，所述材料例如所生成的聚合铬靶分子络合物或其它金属靶向络合物，其在由络合剂形成的组合物中，可以是晶状的或非晶形的。这样的聚合络合物或其解离的形式当与脂构建体基质连接时，形成运输剂，其行使将干扰素携带和输送到温血宿主肝脏中肝细胞

的功能。

[0104] 使用术语“与...连接(或结合)(associated with)”指将引用的材料并入脂构建体基质, 或者在脂构建体基质的表面上或其中。

[0105] 术语“游离”指引用的材料在溶液中, 并且其不与脂构建体或靶分子络合物相连接。

[0106] 术语“干扰素”指天然或重组形式的干扰素, 包括 α 、 β 、 γ 和其它形式的干扰素、聚乙二醇化干扰素和上述干扰素的衍生物。干扰素的实例包括但不限于 α 干扰素、干扰素 α -1a、聚乙二醇化干扰素 α -1a、干扰素 α -n1、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α -n3、复合干扰素、干扰素 α -n3、聚乙二醇化干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、 β 干扰素; 干扰素 β -1a; 干扰素 β -1b、 γ 干扰素; 干扰素 γ -1a; 干扰素 γ -1b、聚乙二醇化干扰素 β -1a、聚乙二醇化干扰素 β -1b、它们的衍生物和任意前述干扰素的组合。

[0107] 术语“衍生物”指从相似化合物形成的化合物; 可被想象源自另一个化合物的化合物——如果用另一个原子或另一组原子取代一个原子的话; 或者至少理论上可以从指定的化合物形成的化合物。

[0108] 术语“平衡”指游离活性成分与脂构建体连接的速率和与脂构建体相连的活性成分从脂构建体解离成为游离活性成分的速率大致相等的状态。

[0109] 术语“生物利用度”指干扰素或其它抗病毒化合物到达体循环和在作用部位可利用的速率和程度的量度。

[0110] 如本文使用的术语, “调节(to modulate)”生物或化学过程或状态, 或者生物或化学过程或状态的“调节(modulation of)”指改变生物或化学过程的正常过程, 或者将生物或化学过程的状态改变为不同于目前状态的新的状态。例如, 多肽等电点的调节可涉及增加多肽等电点的变化。可选地, 多肽等电点的调节可涉及降低多肽等电点的变化。

[0111] “HDV”或“肝细胞输送载体(Hepatocyte Delivery Vehicle)”是含有脂构建体基质的水不溶性靶分子络合物, 其包括多个连接的、具有由金属桥连剂和络合剂的组合形成的结构的独立单元。“HDV”被描述于 WO 99/59545, 靶向脂质体药物输送系统(Targeted Liposomal Drug Delivery System)。

[0112] “统计结构(statistical structure)”指可以从一个脂构建体迁移至另一脂构建体的分子形成的结构, 并且该结构以高斯分布可表示的多种粒径存在。

[0113] “多配位基结合(Multi-dentate binding)”是化学结合过程, 其使用脂构建体中的多个结合位点, 例如邻苯二甲酸醋酸纤维素、磷脂和干扰素。这些结合位点促进氢键合、离子-偶极和偶极-偶极相互作用, 这里各个分子协力起作用, 以形成用于结合或连接两个或更多个分子的非共价连接。

[0114] 如本文使用的, “治疗”指减低病人经受的疾病症状、病症或不利状况等的频率。

[0115] 如本文使用的，术语“药学上可接受载体”指可与活性成分组合的化学组成，并且在组合之后，该化学组成可被用来将活性成分施用给对象。

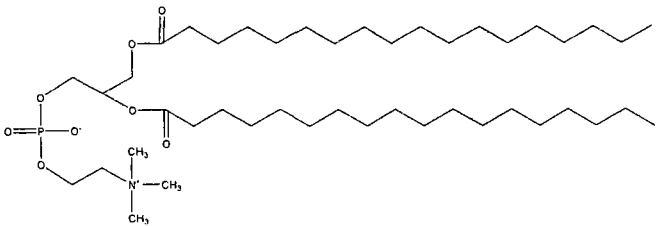
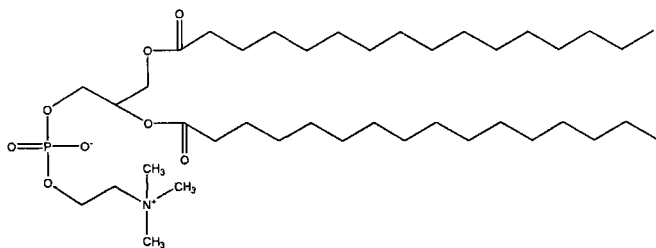
[0116] 如本文使用的，术语“生理上可接受的”指成分不会对组合物施用给的对象有害。

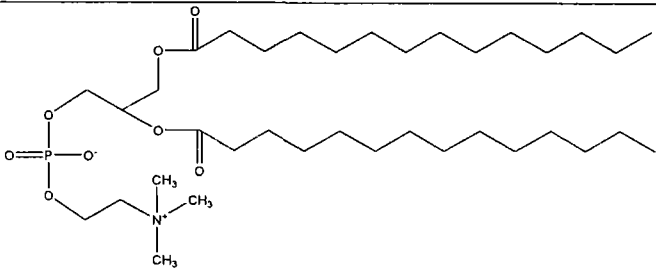
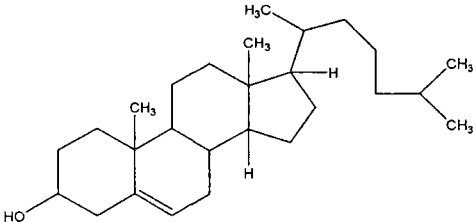
发明描述-组合物

[0117] 含有干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的干扰素结合脂构建体的描述在图 1 中示出。延伸两亲脂质也被称为受体结合分子，包含近侧部分、中间部分和远侧部分，其中近侧部分将延伸脂质连接到构建体，远侧部分将构建体连接到肝脏中肝细胞结合受体，而中间部分连接近侧部分和远侧部分。适合的两亲脂质一般包括极性首基和非极性尾基团，它们通过甘油骨架彼此相连接。

[0118] 适合的两亲脂质包括 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、胆固醇油酸酯、磷酸联十六烷酯、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸酯、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基-3-磷酸酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐)、三乙铵 2,3-二乙酰氧基丙基 2-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺基)磷酸乙酯以及任意前述脂质的混合物或这些脂质的适当衍生物，这在表 1 中给出。

表 1

1	1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 2,3-二(硬脂酰氧基)丙基 2-(三甲铵)磷酸乙酯	
2	1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 2,3-二(棕榈酰氧基)丙基 2-(三甲铵)磷酸乙酯	
3	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油基	

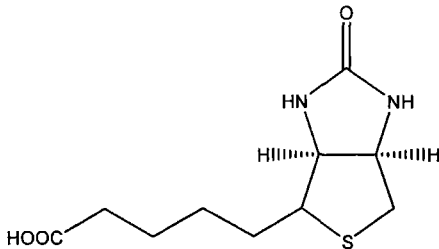
	-3-磷酸胆碱 2,3-二(十四酰氧基)丙基 2-(三甲铵)磷酸乙酯	
4	胆固醇 10,13-二甲基-17-(6-甲基庚 -2-基)-2,3,4,7,8, 9,10,11,12,13,14,15,16,17-十 四氢-1H-环戊二烯并[a]菲 -3-酚	

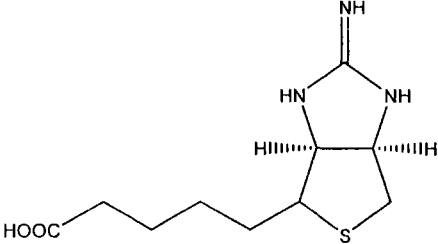
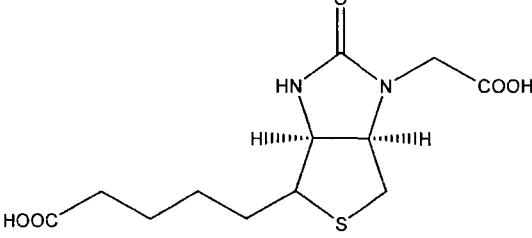
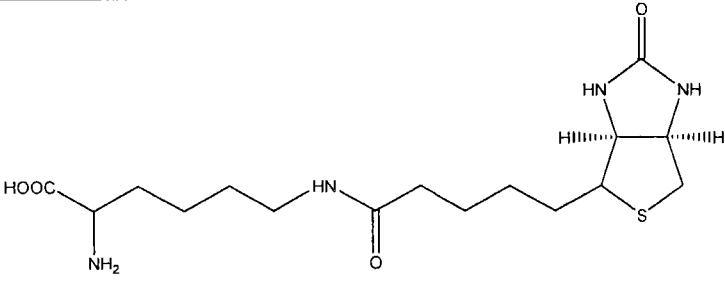
[0119] 在一实施方式，两亲脂质分子包括 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)；1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐)、三乙铵 2,3-二乙酰氧基丙基 2-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)磷酸乙酯以及任意前述脂质的混合物。

[0120] 延伸两亲脂质也被称为受体结合分子，包含近侧部分、中间部分和远侧部分。近侧部分将延伸脂质连接到构建体，远侧部分将构建体连接到肝脏中肝细胞结合受体。近侧部分和远侧部分通过中间部分相连接。下面描述各种受体结合分子的组成。在脂构建体中，下面列出的一个或多个组的肝细胞受体结合分子可以存在，以将构建体结合到肝细胞中的受体。

[0121] 一组肝细胞受体结合分子包括末端生物素或亚氨基生物素部分，以及它们的衍生物。生物素、亚氨基生物素、羧基生物素和生物胞素的结构式在表 2 中示出。

表 2

1	生物素 5-((3aS,6aR)-2-氧代 六氢-1H-噻吩并 [3,4-d]咪唑-4-基)戊 酸	
---	---	--

2	亚氨基生物素 5-((3aS, 6aR)-2-亚氨基六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸	
3	羧基生物素 5-((3aS, 6aR)-1-(羧甲基)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸	
4	生物胞素 2-氨基-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸	

[0122] 使用各种技术可将这些分子连接到磷脂分子，以产生脂质锚定分子，其可被插入脂构建体。这些肝细胞受体结合分子包括位于脂构建体近侧位置的锚定部分。该锚定部分包括两个亲脂烃链，其可与脂构建体内磷脂分子上其它亲脂烃链连接并结合。

[0123] 在优选的实施方式中，第二组肝细胞受体结合分子包括位于脂构建体远侧位置的末端生物素或亚氨基生物素部分。生物素和亚氨基生物素都包含适度亲脂性双环结构，其在双环上 4-碳位置处连接到五碳戊酸链。在一个实施方式中，通过戊酸上羧基与 L-赖氨酸的 N-末端 α -氨基或 ϵ -氨基反应，L-赖氨酸可被共价结合到戊酸 C-末端羧基官能团。使用碳二亚胺连接方法，施行这种偶联反应，并导致在 L-赖氨酸和生物素之间形成酰胺键，如图 2 所阐明。

[0124] 第三组肝细胞受体结合分子包括亚氨基生物素、羧基生物素和生物胞素，其中戊酸侧链通过酰胺键连接到氨基酸 L-赖氨酸的 α -氨基或 ϵ -氨基。一优选的实施方式在形成亚氨基生物胞素部分中，使用亚氨基生物素，如图 3 所示。在肝细胞受体结合分子合成期间，亚氨基生物胞素的 α -氨基可与活化酯苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸-磺基-N-羟基琥珀酰亚胺(BTA-3gly-磺基-NHS)反应形成活性肝细胞结合分子(BTA-3gly-亚氨基生物胞素)，如图 4 所示。BTA-3gly-亚氨基生物胞素行

使分子间隔团的功能，其最终表现出活性亲核巯基官能团，可被用于接下来的偶联反应。该间隔团位于脂构建体的中间位置，并且使末端亚氨基生物胞素部分从脂构建体的表面延伸大约 30 埃，以形成亚氨基生物胞素最适和非限制性的取向，以结合到肝细胞受体。该中间间隔团可包括提供末端生物素部分的正确立体化学取向的其它衍生物。该中间间隔团的主要功能是以线性排列适当和共价连接近侧和远侧部分。

[0125] 肝细胞受体结合分子的 BTA-3gly-磺基-NHS 部分可通过大量方法合成，并且在接下来的步骤中，将其连接到生物胞素和亚氨基生物胞素。起始步骤包括将苯甲酰氯加入到硫代乙酸，以通过亲核加成形成活性硫官能团的保护基。反应的产物是苯甲酰硫代乙酸络合物和盐酸，如图 5 所示。在合成中另外的步骤涉及使用二环己基碳二亚胺或 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺作为偶联剂，将苯甲酰硫代乙酸与磺基-N-羟基琥珀酰亚胺反应，形成苯甲酰硫代乙酰磺基-N-羟基琥珀酰亚胺(BTA-磺基-NHS)，如图 5 所描述的。然后，苯甲酰硫代乙酰磺基-N-羟基琥珀酰亚胺与氨基酸多聚体(甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸)反应。在用三甘氨酸的 α -氨基亲核攻击后，形成苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸(BTA-3gly)，同时用水介质溶解磺基-N-羟基琥珀酰亚胺离去基团，如图 5 所示。苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸再次与二环己基碳二亚胺或 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺反应，以与磺基-N-羟基琥珀酰亚胺形成酯键，如图 6 所示。然后，活化的苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸的磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(BTA-3gly-磺基-NHS)与生物胞素或亚氨基生物胞素的 L-赖氨酸官能团的 α -氨基反应，以形成肝细胞受体结合部分——在图 7 中阐明的苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸-亚氨基生物胞素(BTA-3gly-亚氨基生物胞素)的延伸两亲脂质分子。

[0126] 合成肝细胞受体结合分子的第二主要偶联反应被阐明，其中苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸亚氨基生物胞素通过硫醚键被共价连接到 N-对-马来酰亚胺基苯基丁酸酯磷脂酰乙醇胺——一种优选的磷脂锚定分子。该反应得到在末端亚氨基生物胞素环和脂构建体之间提供正确分子间隔的分子。形成肝细胞受体结合分子的完整的反应方案被描述在图 8 中，所述肝细胞受体结合分子行使延伸两亲脂质分子的功能。在苯甲酰硫代乙酰三甘氨酸亚氨基生物胞素与 N-对-马来酰亚胺基苯基丁酸酯磷脂酰乙醇胺反应形成硫醚键之前，通过加热除去苯甲酰保护基以便暴露游离巯基官能团。该反应应该在无氧的环境中施行，以使巯基氧化成二硫化物最小化。进一步的氧化可导致形成砷、亚砷、次磺酸或磺酸衍生物。

[0127] 在一实施方式中，分子的锚定部分包括形成分子脂质部分的一对酰基烃链。分子的该部分在脂构建体的脂质结构域内被非共价结合。在一实施方式中，锚定部分从 N-对-马来酰亚胺基苯基丁酸酯磷脂酰乙醇胺产生。可以使用其它的锚定分子。在一实施方式中，锚定分子可包括硫代-胆固醇、胆固醇油酸酯、磷酸联十六烷酯；1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸

乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐)和它们的混合物。称为 LA-HRBM 的充分研发的脂质锚定和肝细胞受体结合分子的完整分子结构在图 8 中示出。

[0128] 肝细胞受体结合分子的第四组包括具有水可溶部分和水不可溶部分的两亲有机分子。通过配位作用和生物接枝化学反应 (bioconjugation chemical reaction), 水不可溶部分与中间部分或连接部分反应, 而该水不可溶部分在肝中结合到肝细胞结合受体。所述分子含有远侧成分, 所述远侧成分由非极性衍生苯环结构——例如 2,6-二异丙基苯衍生物——或亲脂杂双环结构所构成。完整的肝细胞受体结合分子拥有固定电荷或瞬变电荷, 其为正的或负的, 或者它们的各种组合。这些分子包含至少一个位于距远侧部分的末端等于或小于但不大于约 13.5 埃处的羰基, 和至少一个含有仲胺和羰基的氨基甲酰部分。氨基甲酰部分或多个氨基甲酰部分的存在增强该有机分子的分子稳定性。在分子中可存在多个仲胺。这些仲胺包括一对未共享电子, 其使与构建体内其它分子发生离子-偶极和偶极-偶极键相互作用。这些胺增强分子稳定性, 并且提供部分产生的负电荷, 所述负电荷与远侧部分相互作用, 促进肝细胞受体结合和特异性。该组受体结合分子的实例为聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸]。在一实施方式中, 铬 III 位于肝细胞受体结合分子的中间位置。肝细胞特异性结合分子的近侧部分含有疏水和/或非极性结构, 其允许分子被插入脂构建体, 并且接下来在脂构建体内被结合。中间和近侧部分也使肝细胞受体结合分子的远侧部分具有正确立体化学取向。

[0129] 脂构建体的结构和性能由脂质的结构和脂质之间的相互作用来控制。脂质的结构主要由共价键合所控制。共价键合是保持分子结构完整性所必需的分子键合力, 所述分子包括脂构建体的各个成分。通过脂质之间的非共价相互作用, 脂构建体保持三维构象。

[0130] 可通过离子-偶极或诱导离子-偶极键, 以及通过与脂质头部上各种极性基团有关的氢键, 以一般性术语表示非共价键。疏水键和范德华相互作用可通过脂质酰基链之间的诱导的诱导偶极缔合而产生。这些键合机制本质上是瞬变的, 并且导致键形成和键断裂过程, 这发生在亚飞秒的时间间隔内。例如范德华相互作用缘自偶极矩的瞬间变化, 该变化源自核外电子向一个原子或分子的一侧的短位移 (brief shift), 这在相邻原子或分子中产生相似的位移。质子呈现 δ^+ 电荷并且单个电子呈现 δ^- 电荷, 因此形成偶极。在两亲脂质分子的酰基链之间, 偶极相互作用以大频率发生。在单独的偶极形成以后, 它们可在含有亚甲基($-\text{CH}_2-$)官能团的相邻原子中, 瞬间诱导新的偶极形成。许多瞬间诱导的偶极相互作用形成于整个脂构建体的酰基脂质链之间。这些诱导的偶极相互作用仅持续一飞秒(1×10^{-15}) 的若干分之一, 但是当协同行使功能时施加强大的力。这些相互作用持续变化, 并且具有共价键强度的大约 1/20 的力。然而, 它们不是稳定共价分子之间的瞬时键

合的原因,所述稳定共价分子确定构建体的三维统计结构和脂构建体内分子的立体特异性分子取向。

[0131] 作为这些诱导偶极相互作用的结果,脂构建体的结构通过构建体之间的脂质成分的交换来保持。当构建体的各个成分的组成固定时,脂构建体的各个成分经历构建体之间的交换反应。当脂质成分离开脂构建体时,这些交换最初受零级动力学支配。在脂质成分从脂构建体释放之后,其可被邻近脂构建体重新捕获。释放成分的重新捕获由二级反应动力学所控制,这受捕获该成分的构建体周围的水介质中释放成分的浓度影响,也受捕获释放成分的脂构建体的浓度影响。

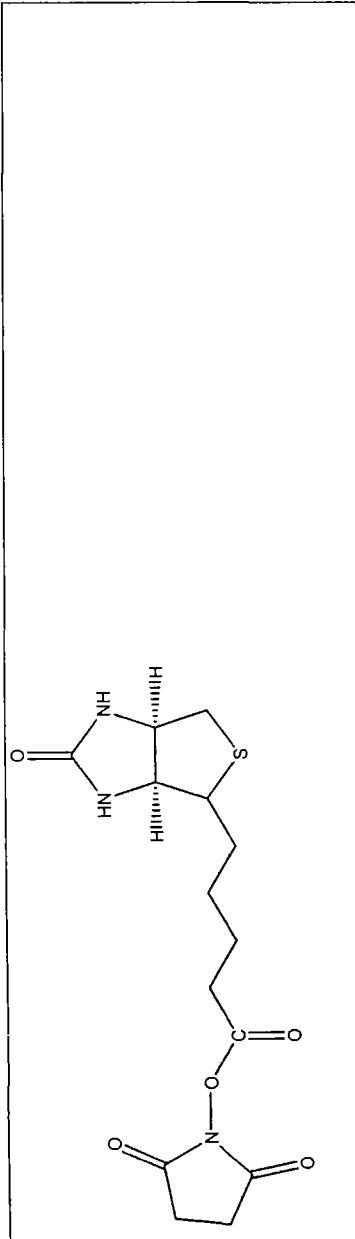
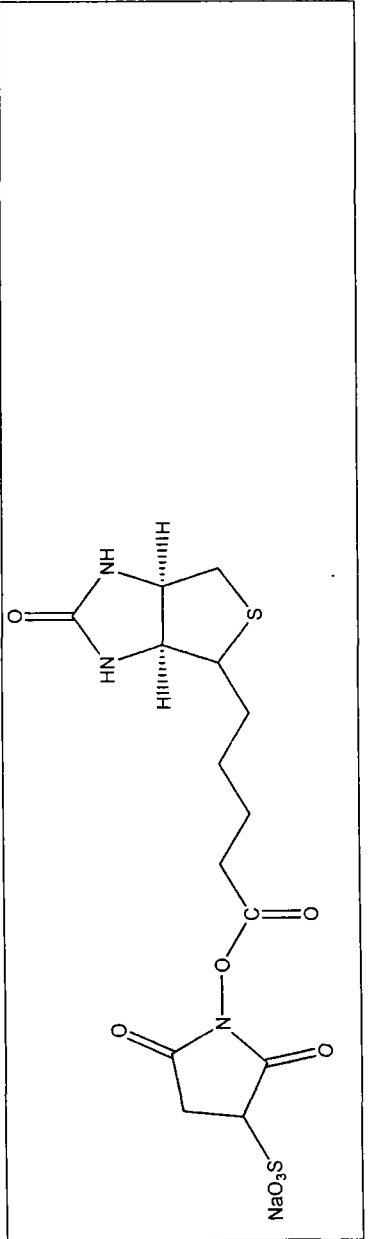
[0132] 延伸两亲脂质和它们各自的数字标识符的实例一起在表3中示出,为: N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)生物素[1]; 磺基-NHS-生物素[2]; N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素[3]; 磺基- N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素[4]; D-生物素[5]; 生物胞素[6]; 磺基-N-羟基琥珀酰亚胺-S-S-生物素[7]; 生物素-BMCC[8]; 生物素-HPDP[9]; 碘乙酰基-LC-生物素[10]; 生物素-酰肼[11]; 生物素-LC-酰肼[12]; 生物胞素-酰肼[13]; 生物素尸胺[14]; 羧基生物素[15]; 光生物素[16]; 对氨基苯甲酰生物胞素三氟乙酸酯[17]; 对重氨基苯甲酰生物胞素[18]; 生物素 DHPE[19]; 生物素-X-DHPE[20]; 12-((生物素酰)氨基)十二酸[21]; 12-((生物素酰)氨基)十二酸琥珀酰亚胺酯[22]; S-生物素酰高半胱氨酸[23]; 生物胞素-X[24]; 生物胞素-X-酰肼[25]; 生物素乙二胺[26]; 生物素-XL[27]; 生物素-X-乙二胺[28]; 生物素-XX-酰肼[29]; 生物素-XX-SE[30]; 生物素-XX, SSE[31]; 生物素-X-尸胺[32]; α -(t-BOC) 生物胞素[33]; N-(生物素酰)-N'-(碘乙酰基)乙二胺[34]; DNP-X-生物胞素-X-SE[35]; 生物素-X-酰肼[36]; 降生物素胺氢氯化物[37]; 3-(N-马来酰亚胺基丙酰)生物胞素[38]; ARP[39]; 生物素-l-亚砷[40]; 生物素甲酯[41]; 生物素-马来酰亚胺[42]; 生物素-聚(乙二醇)胺[43]; (+)生物素 4-酰氨基苯甲酸钠盐[44]; 生物素 2-N-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖苷[45]; 生物素- α -D-N-乙酰神经氨酸苷[46]; 生物素- α -L-岩藻糖苷[47]; 生物素-乳-N-二糖苷[48]; 生物素-路易斯-A 三糖[49]; 生物素-路易斯-Y 四糖[50]; 生物素- α -D-吡喃甘露糖苷[51]; 生物素 6-O-磷酸- α -D-吡喃甘露糖苷[52]; 和聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基]双乙酸[53]。

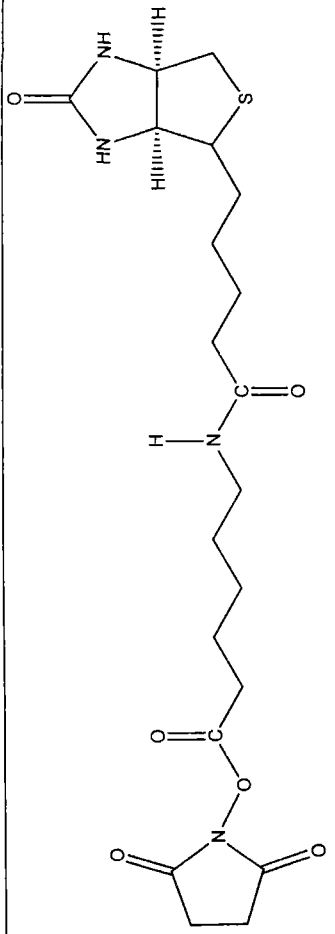
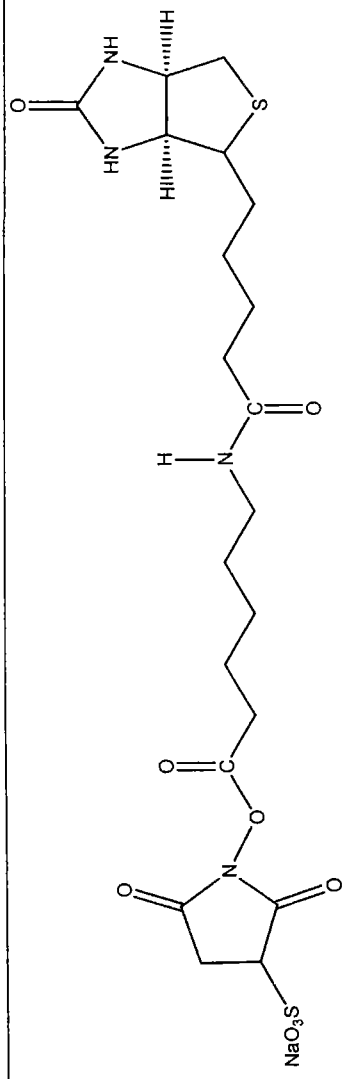
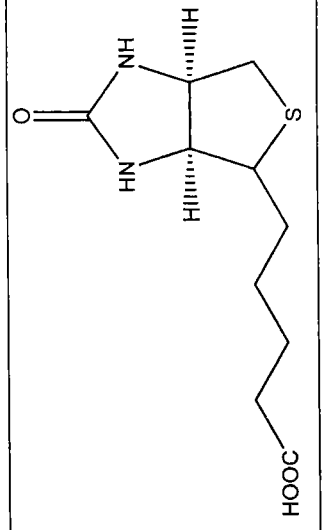
[0133] 在一实施方式中,邻苯二甲酸醋酸纤维素聚合物被引入脂构建体,在那里,其可结合于干扰素分子上的亲水官能团,并且保护干扰素免于水解降解。邻苯二甲酸醋酸纤维素包括聚合排列中 $\beta(1\rightarrow4)$ 连接的两个葡萄糖分子,其中聚合物羟基基团上的一些氢原子被乙酰基官能团(结合于羰基碳的甲基基团)或邻苯二甲酸基团(由在苯环的第一和第二位置具有两个羧基的苯环表示)所取代。邻苯二甲酸醋酸纤维素聚合物的结构式在图9中示出。邻苯二甲酸环结构上仅一个羧基涉及醋酸纤维素分子的共价酯键。另一个羧基——其包括羰基碳和羟基官能团,参与与存在于干扰素和各种脂质分子上的相邻负电偶极和正电偶极间的氢键合。

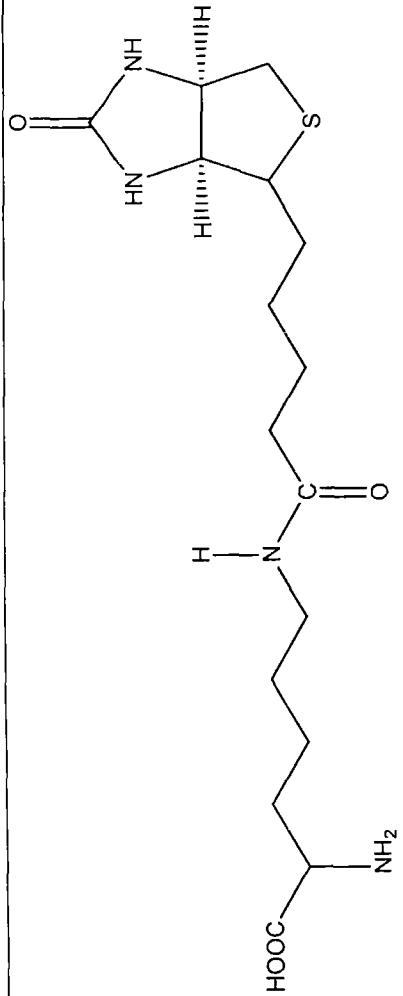
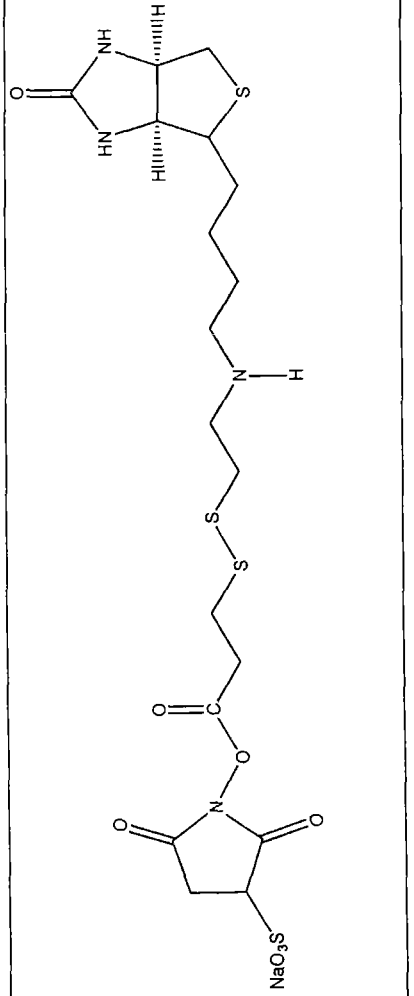
[0134] 在一实施方式中,邻苯二甲酸醋酸纤维素聚合物通过与 1,2-二硬脂酰

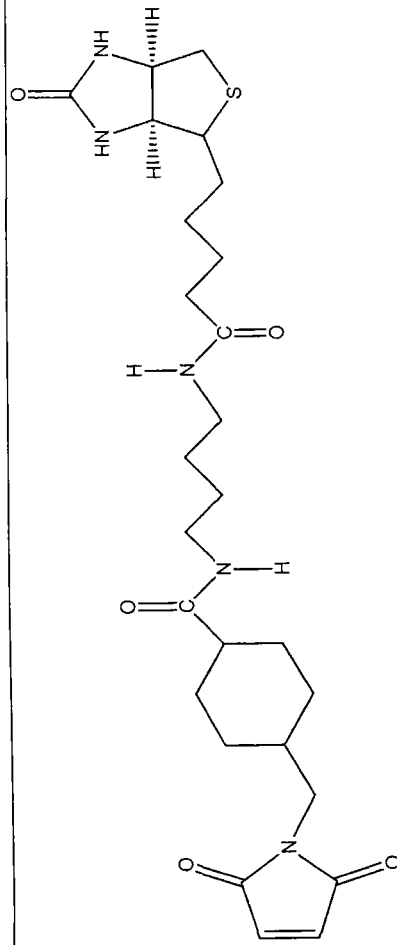
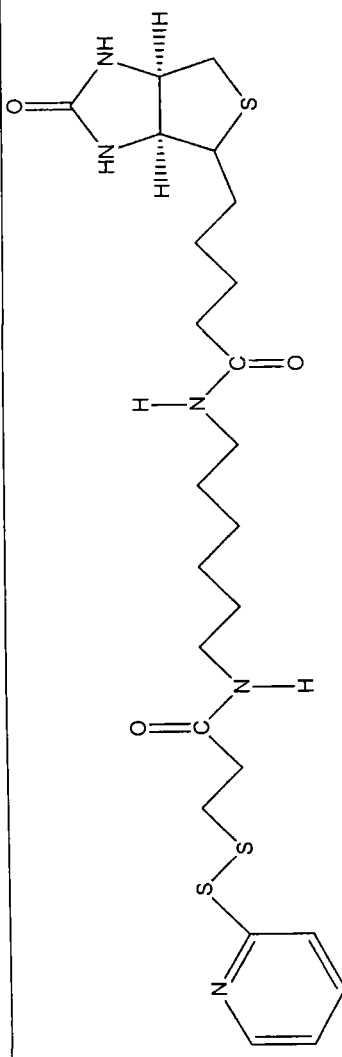
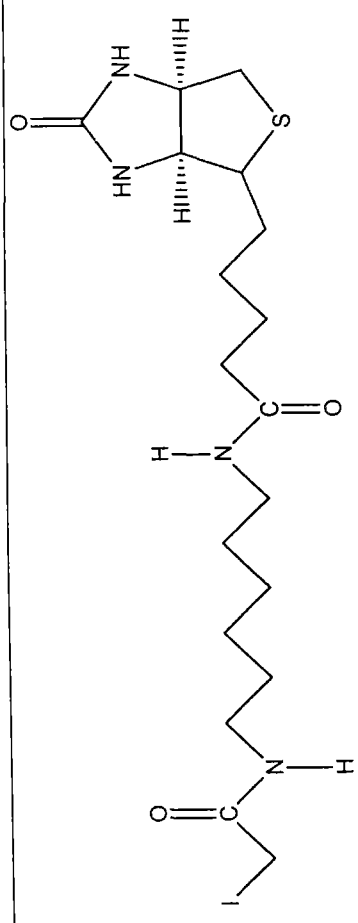
-sn-甘油基-3-磷酸胆碱磷酸酯和磷酸联十六烷酯分子的离子-偶极键合，与脂质相互作用。离子-偶极键合发生于纤维素羟基基团上的 δ^+ 氢和磷脂分子的磷酸酯部分上的带负电的氧原子之间。在离子-偶极相互作用中起最大作用的官能团是磷脂分子的磷酸酯基团上带负电的氧原子、干扰素分子的羟基基团上的氢原子和干扰素分子的酰胺键上的氢原子。带负电官能团形成离子-偶极相互作用的位点，以及与独立羟基和邻苯二甲酸醋酸纤维素上的羧基官能团上的羟基上的 δ^+ 氢原子反应的位点。可在磷酸胆碱官能团上的带正电的季铵类和见于邻苯二甲酸醋酸纤维素和干扰素上的 δ^- 羰基氧之间，形成离子-偶极。在干扰素中，包括支化亲水结构的糖分子可参与氢键合和离子-偶极相互作用。

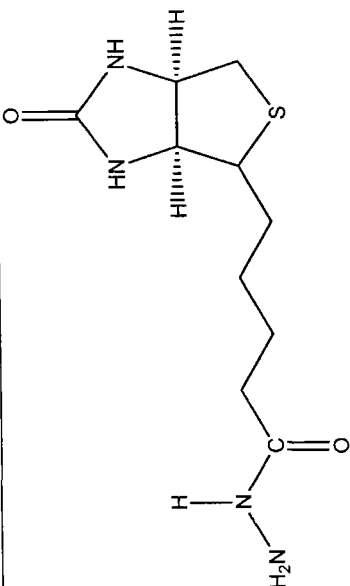
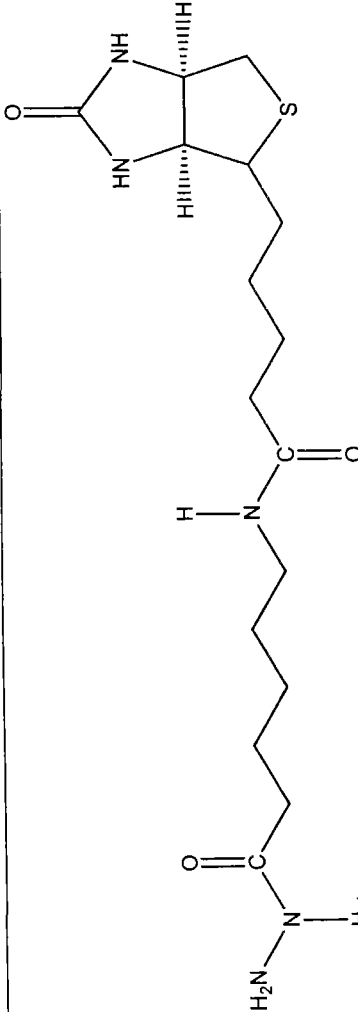
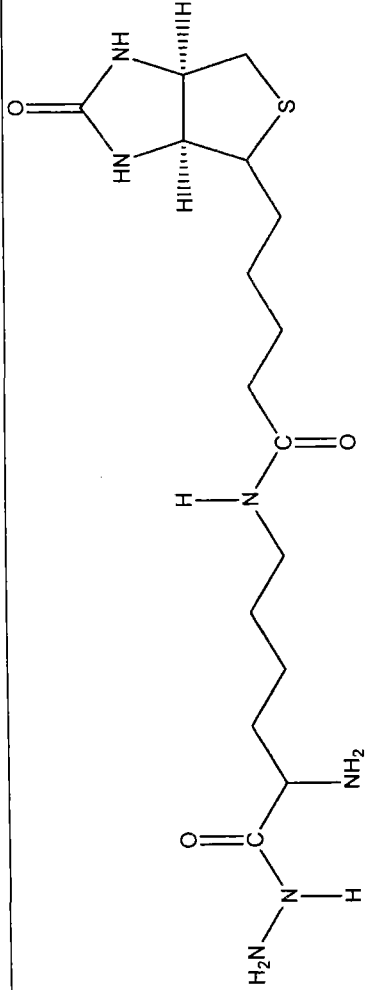
表 3

1	N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)生物素 2,5-二氧吡咯烷-1-基 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯  The structure shows a 5-membered pyrrolidine ring with two carbonyl groups at positions 2 and 5. An oxygen atom at position 3 is linked via an ester bond to a 5-carbon chain. This chain ends in a 2,5-dioxolane ring fused to a 4,5-dihydroimidazole ring. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.
2	磺基-NHS-生物素 钠 2,5-二氧代-3-(三氧化硫代 (trioxidanylthio)) 吡咯烷-1-基 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯  The structure is similar to the first one, but the pyrrolidine ring has a sulfonamide group (-SO₂Na) at position 4. The ester linkage and the 2,5-dioxolane-imidazole moiety are identical to the first structure.

3	N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸酯	
4	磺基-N-羟基琥珀酰亚胺长链生物素 钠 2,5-二氧代-3-(三氧化硫代)吡咯烷-1-基 6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸酯	
5	D-生物素 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸	

6	生物胞素 2-氨基-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代-六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸	
7	磺基-N-羟基琥珀酰亚胺-S-S-生物素 钠 2,5-二氧代-3-(三氧化硫代)吡咯烷-1-基 3-((2-(4-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)丁氨基)乙酰基)二硫烷基)丙酸酯	

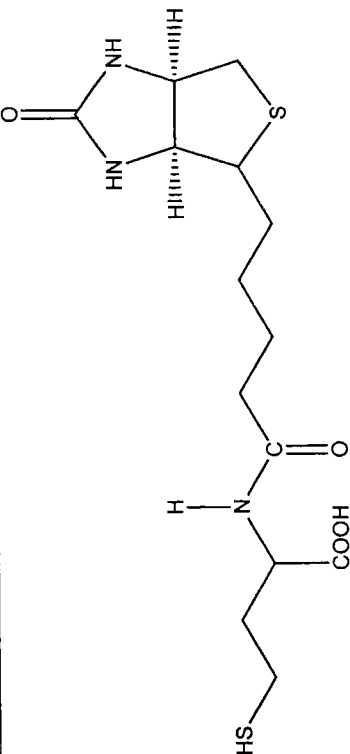
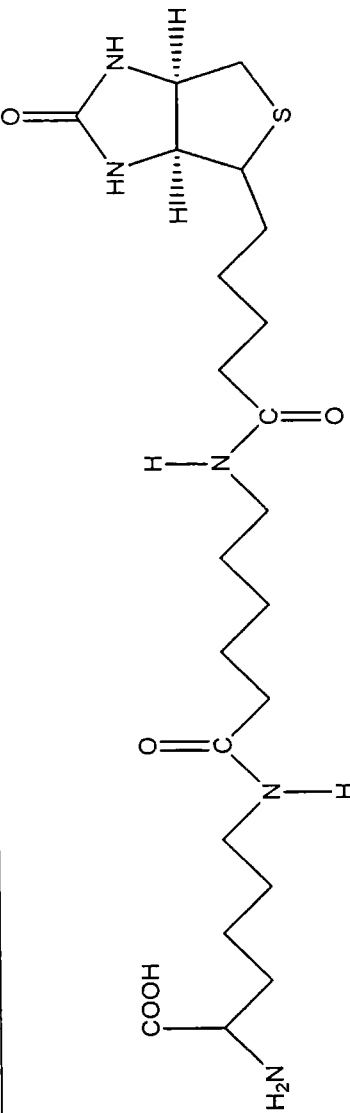
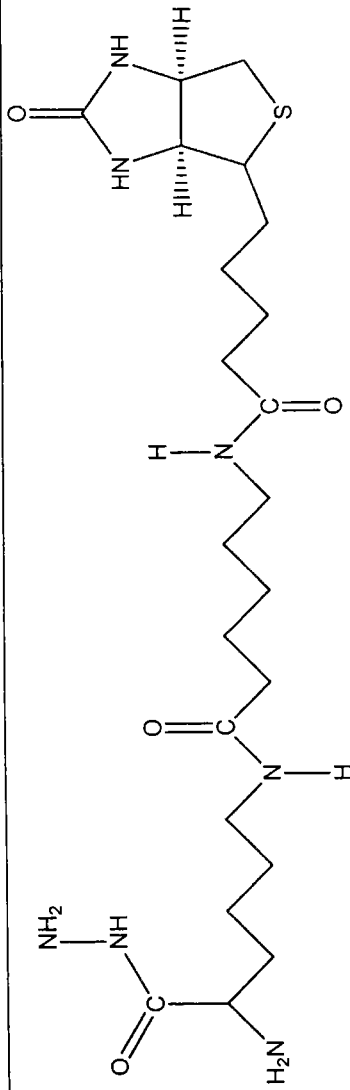
8	生物素-BMCC 4-((2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)甲基)-N-(4-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)环己烷甲酰胺	
9	生物素-HPDP 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)-N-(6-(3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酰氨基)己基)戊酰胺	
10	碘乙酰基-LC-生物素 N-(6-(2-碘乙酰氨基)己基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	

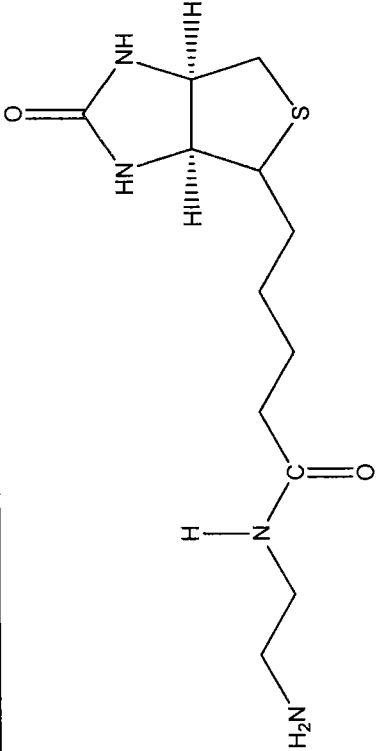
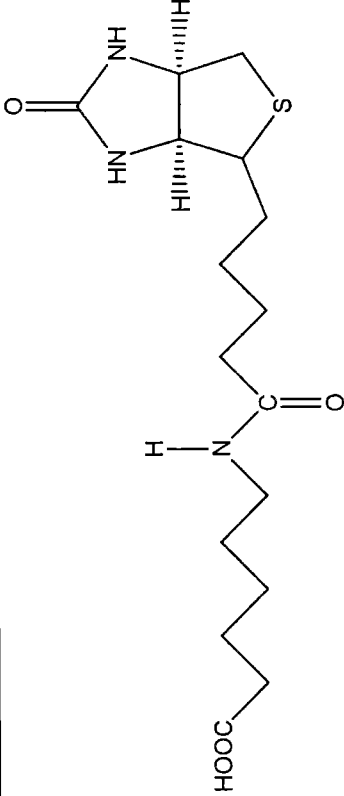
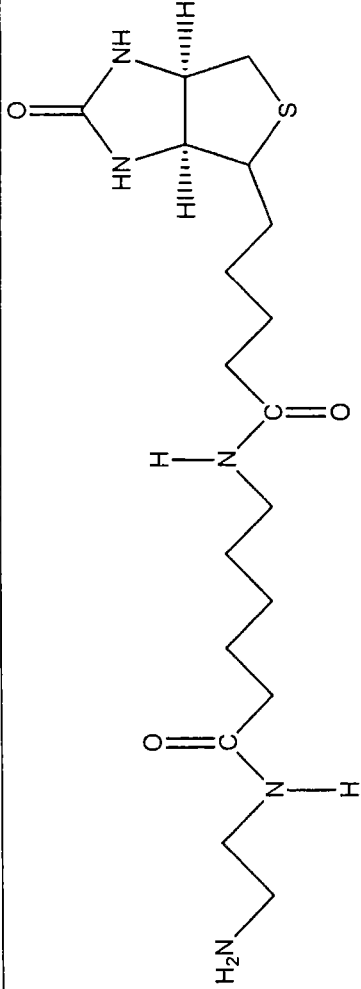
11	生物素-酰肼 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰肼	
12	生物素-LC-酰肼 N-(6-胍基-6-氧代己基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰肼	
13	生物胞素-酰肼 N-(5-氨基-6-胍基-6-氧代己基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰肼	

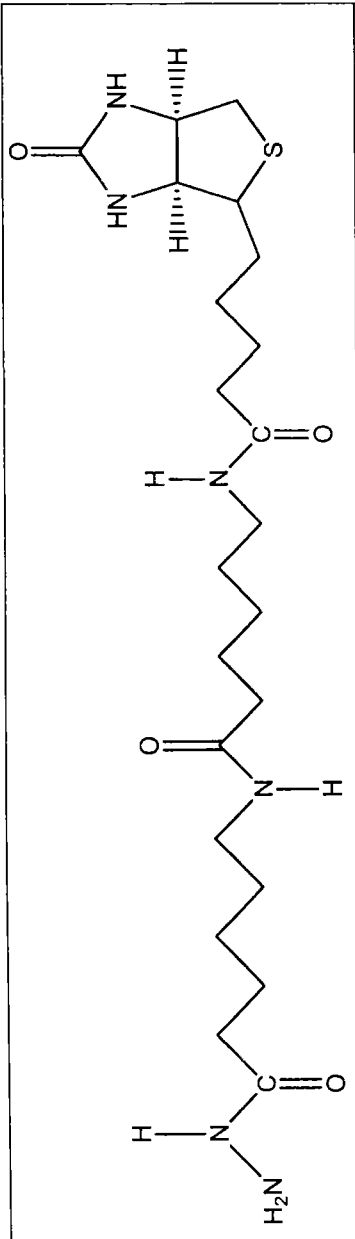
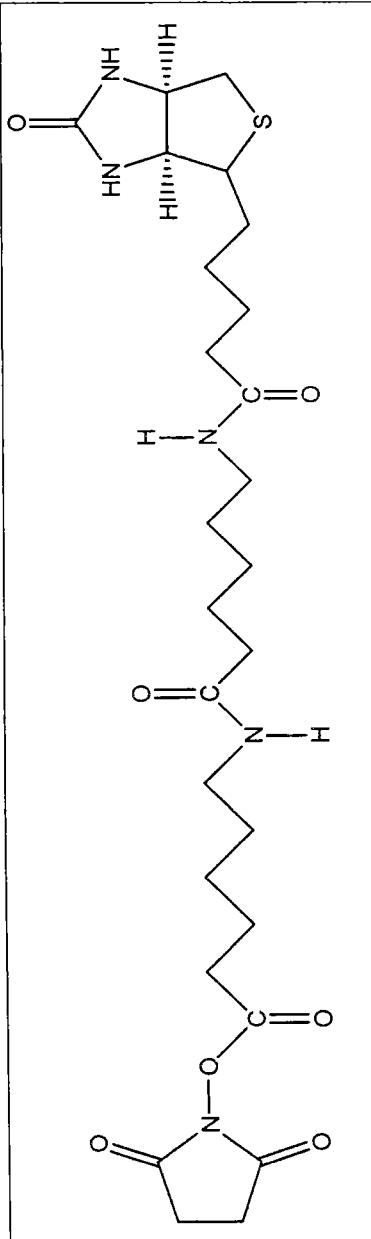
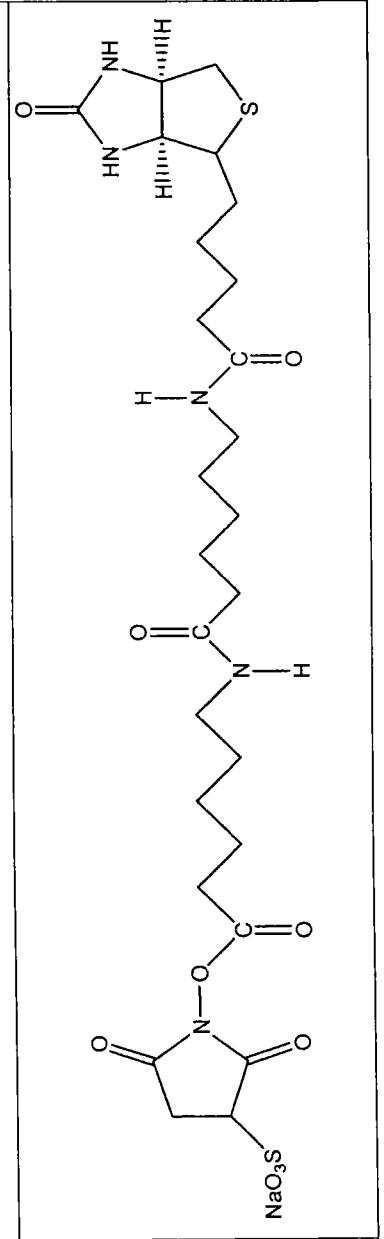
14	生物素尸胺 N-(5-氨基戊基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	
15	羧基生物素 (3aS, 6aR)-4-(4-羧基丁基)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-1-羧酸	
16	光生物素 N-(3-((3-(4-重氮基-2-硝基苯基)丙基)丙基)(甲基)氨基)戊基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	

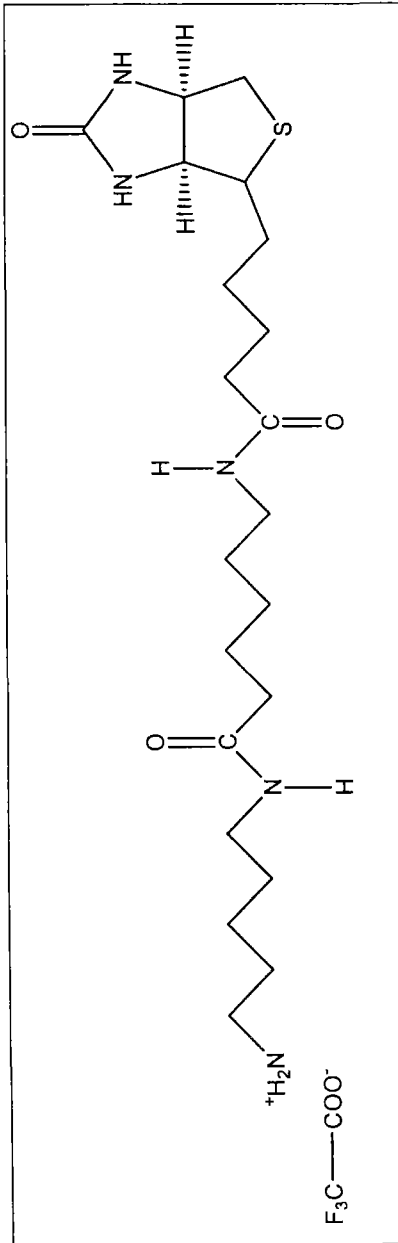
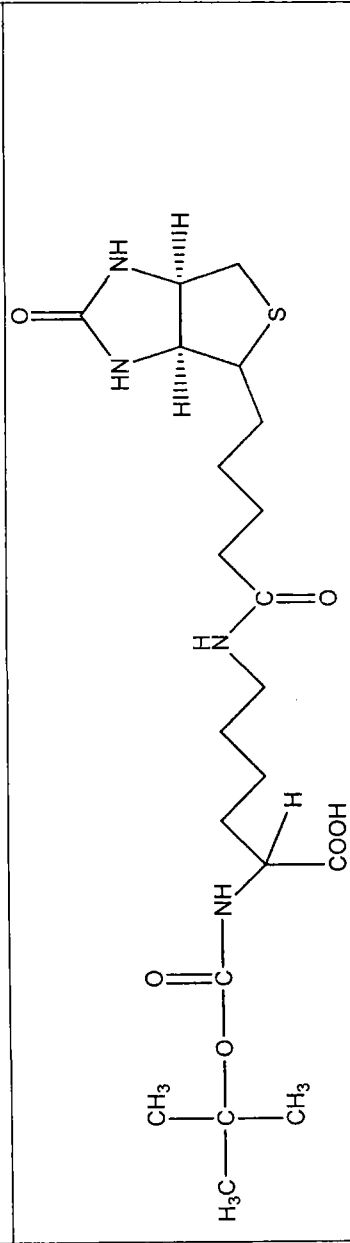
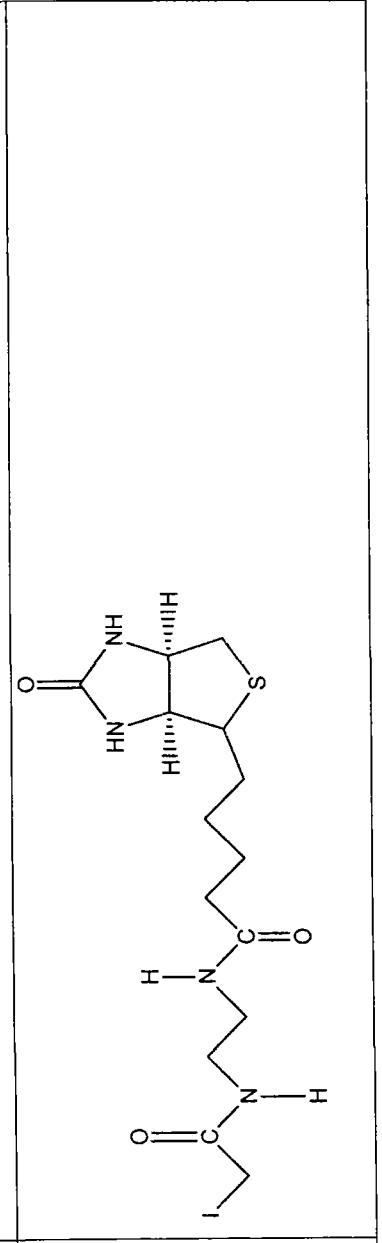
17	对氨基苯甲酰生物胞素三氟乙 酸酯 2-(4-氨基苯甲酰氨基 基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六 氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基) 戊酰氨基)己酸 2,2,2-三氟乙酸 酯	
18	对重氮基苯甲酰生物胞素 4-(1-羧基-5-(5-((3aS, 6aR)-2- 氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪 唑-4-基)戊酰氨基)戊基氨基甲 酰)氯化重氮苯	
19	生物素 DHPE 三乙铵 2,3-二乙氧基丙基 2-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢 -1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊 酰氨基)磷酸乙酯	

20	生物素-X-DHPE 三乙铵 2,3-二乙酰氧基丙基 2-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢 -1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊 酰氨基)己酰氨基)磷酸乙酯	
21	12-((生物素酰)氨基)十二酸 12-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢 -1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊 酰氨基)十二酸	
22	12-((生物素酰)氨基)十二酸琥 珀酰亚胺酯 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 12-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢 -1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊 酰氨基)十二酸酯	

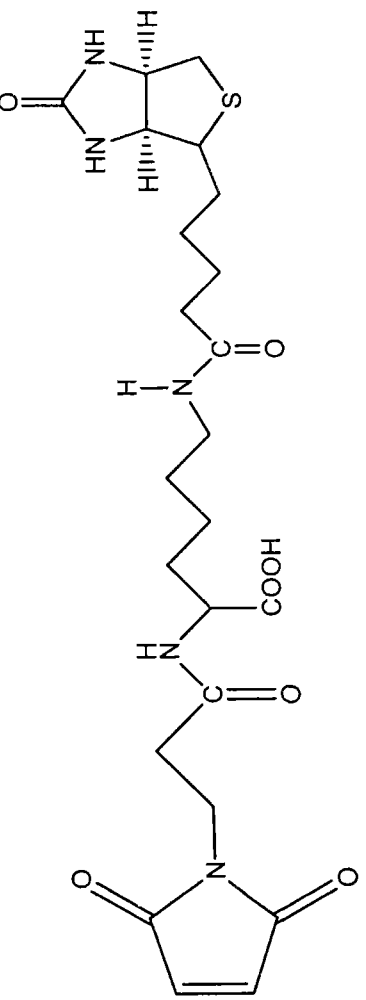
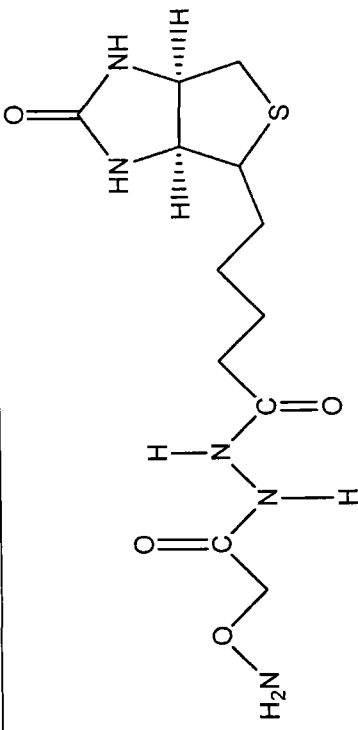
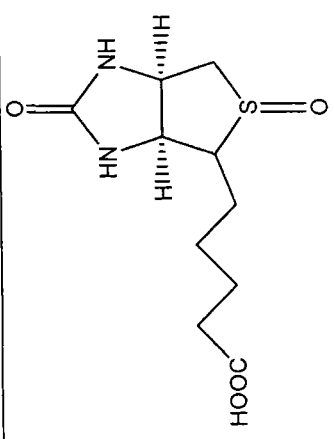
23	S-生物素酰肼高半胱氨酸 4-巯基-2-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁酸	
24	生物素素-X 2-氨基-6-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸	
25	生物素素-X-酰肼 N-(5-氨基-6-肼基-6-氧代己基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰胺	

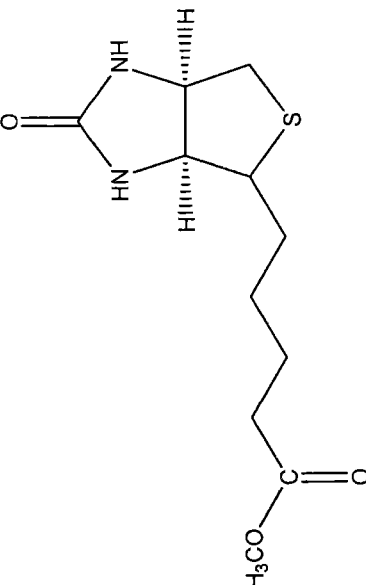
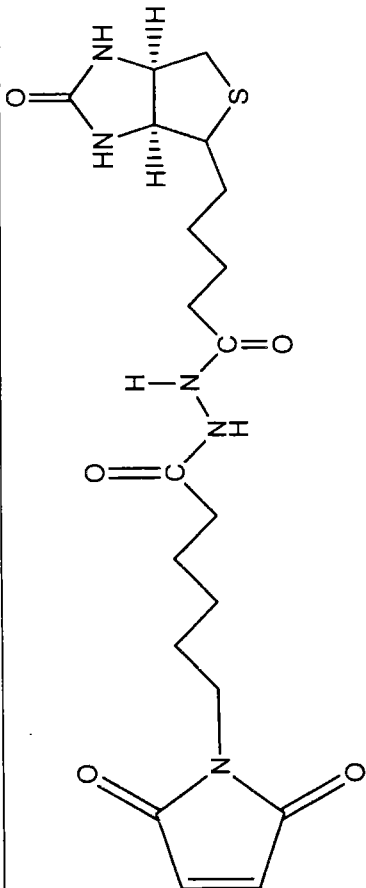
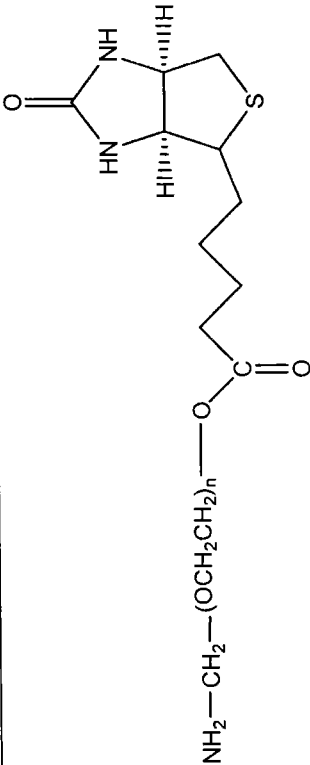
26	生物素乙二胺 N-(2-氨基乙基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并 [3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	
27	生物素-X 6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢 -1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊 酰氨基)己酸	
28	生物素-X-乙二胺 N-(2-氨基乙基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并 [3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己 酰胺	

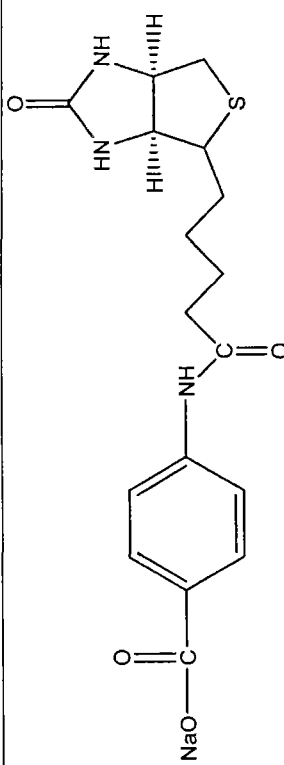
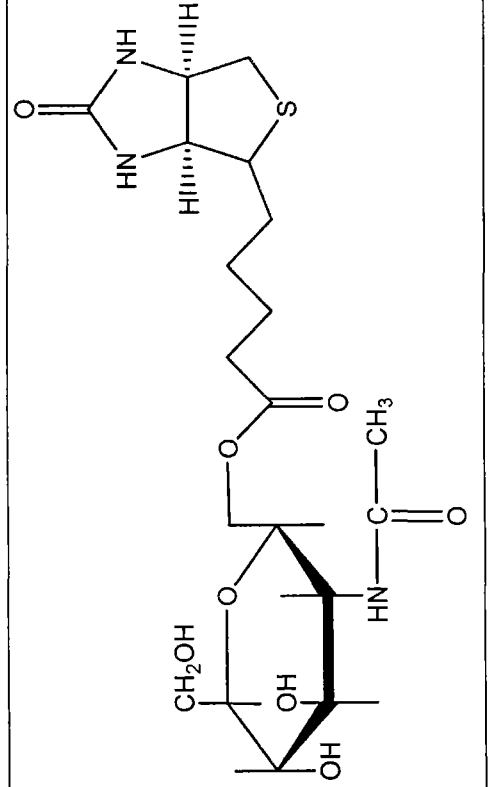
29	生物素-XX-酰肼 N-(6- 肟基 -6- 氧代己基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰胺	
30	生物素-XX-SE 2,5- 二氧吡咯烷-1-基-6-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰氨基)己酸酯	
31	生物素-XX, SSE 2,5- 二氧代-1-(6-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰氨基)己酰氨基)吡咯烷-3-磺酸钠	

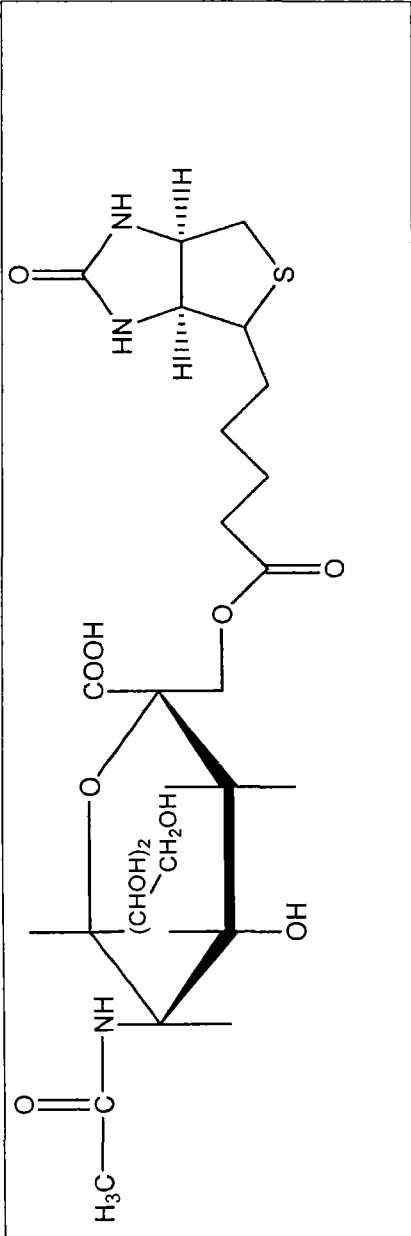
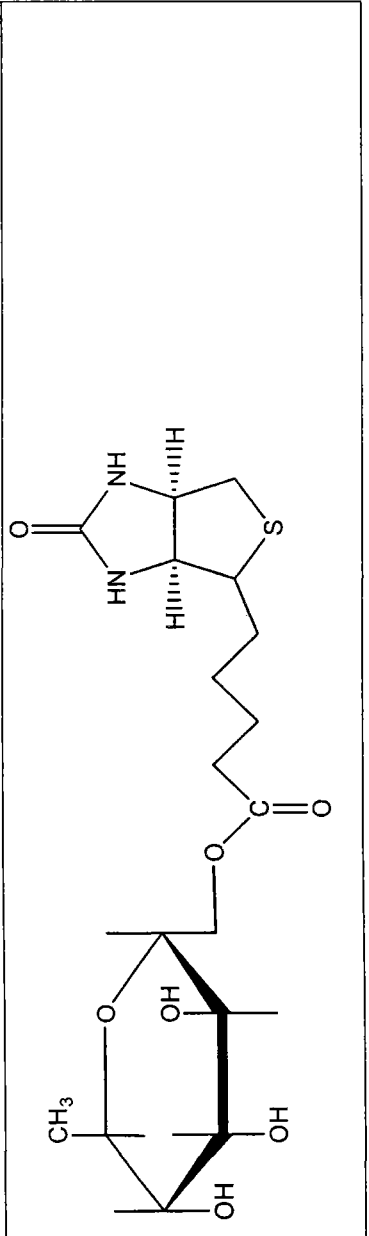
32	生物素-X-尸胺 5-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰氨基)戊-1-铵-2,2,2-三氟乙酸酯	
33	α -(t-BOC)生物胞素 2-(叔丁氧羰基氨基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸	
34	N-(生物素酰)-N'-(碘乙酰)乙二胺 N-(2-(2-碘乙酰氨基)乙基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	

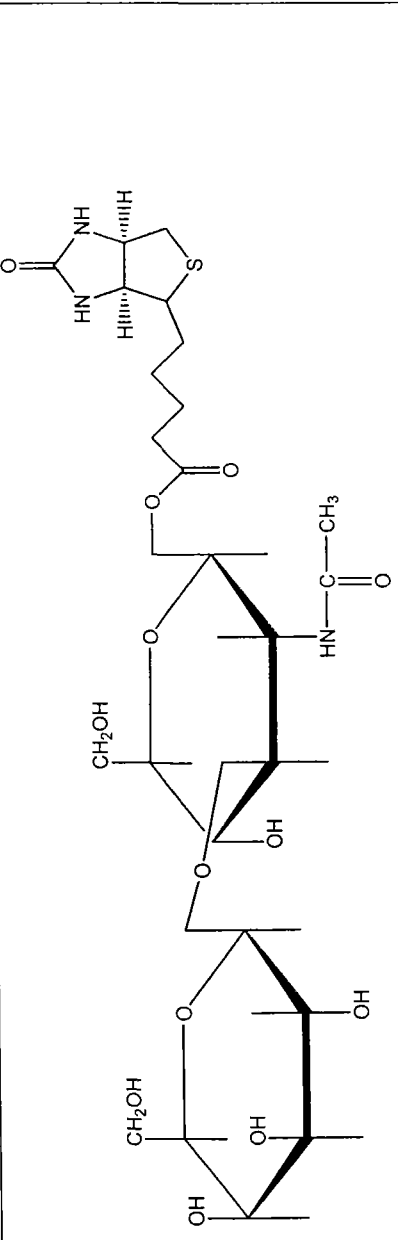
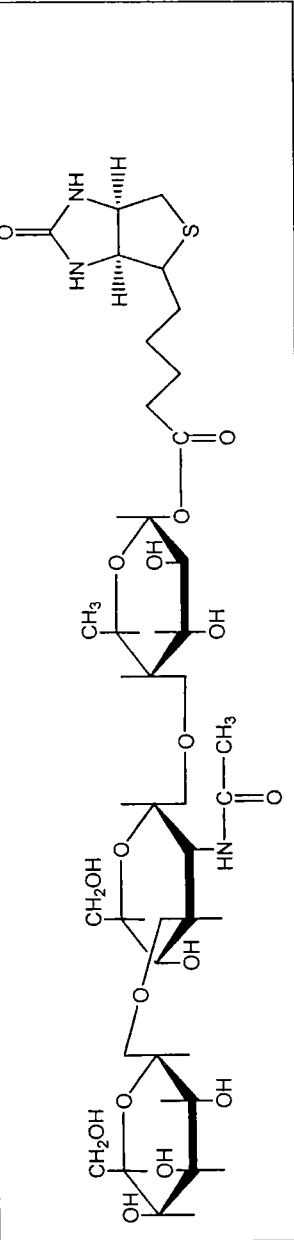
35	DNP-X-生物胞素-X-SE 2,5-二氧代吡咯烷-1-基 2-(6-(6-(2,4-二硝基苯氨基)己 酰氨基)己酰氨基 基)-6-(6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代 六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4- 基)戊酰氨基)己酰氨基)己酸酯	
36	生物素-X-酰肼 N-(6-胍基-6-氧代己基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并 [3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺	
37	降生物素胺氢氯化物 4-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H- 噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)氯化 丁-1-铵	

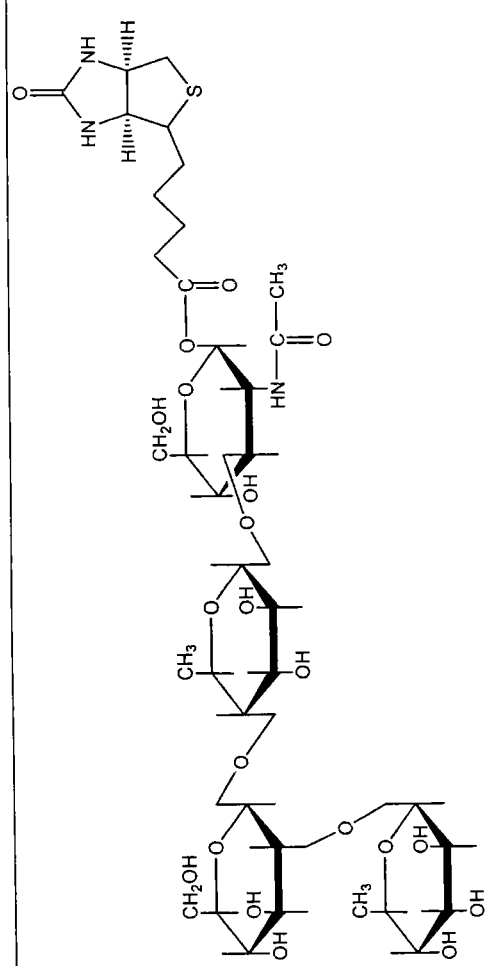
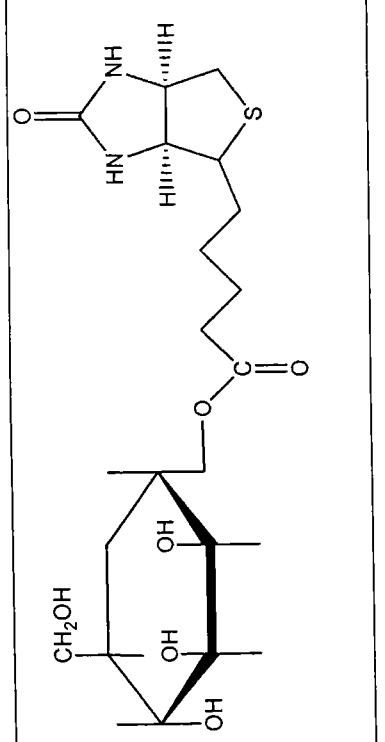
38	3-(N-马来酰亚胺基丙酰)生物胞素 2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰氨基)-6-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酸	
39	ARP; N'-(2-(氨基氧代)乙酰基)-5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰肼	
40	生物素-1-亚砷 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸亚砷	

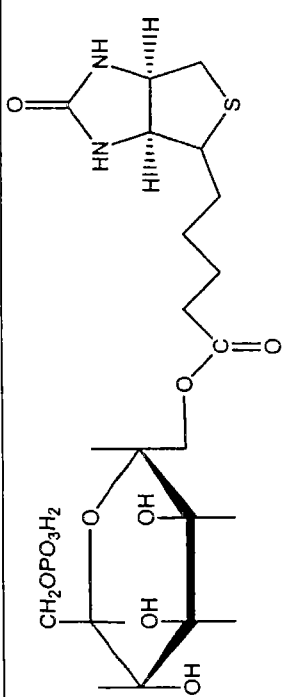
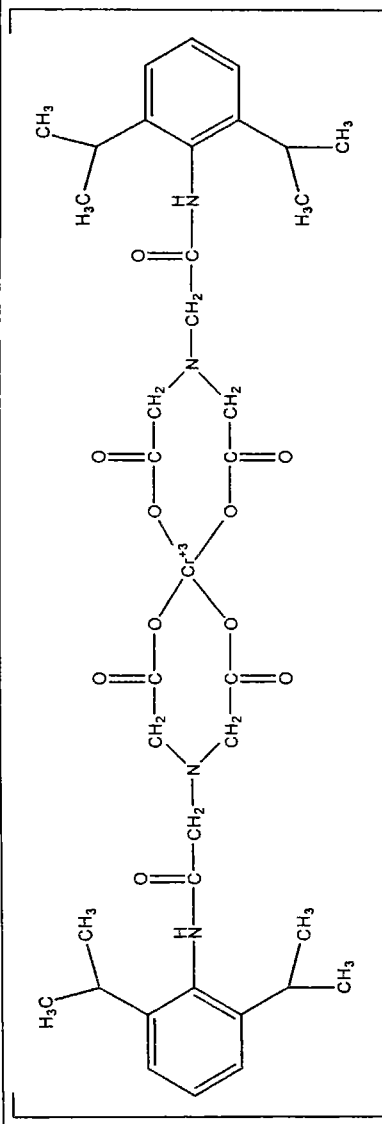
41	生物素甲酯 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸甲酯	
42	生物素-马来酰亚胺 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N'-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰基)己酰肼	
43	生物素-聚(乙二醇)胺 氨基聚烯 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯	

44	(+)-生物素 4-酰氨基苯甲酸钠盐 4-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)苯甲酸钠 
45	生物素 2-N-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷 ((2R,5S)-3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲基 5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯 

46	生物素-α-D-N-乙酰神经氨酸苷 (2S,5R)-5-乙酰氨基-4-羟基-3,3,4,5,6-五甲基-2-((5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰基氧基)甲基)-6-(1,2,3-三羟基丙基)四氢-2H-吡喃-2-羧酸 
47	生物素-α-L-岩藻糖苷 ((2R,5S)-3,4,5-三羟基-2,3,4,5,6,6-六甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯 

48	生物素-乳-N-二糖苷 名称见表后	
49	生物素-路易斯-A 三糖 名称见表后	

50	生物素-路易斯-Y 四糖 名称见表后	
51	生物素-α-D-吡喃甘露糖苷 ((1R,4R)-2,3,4-三羟基-5-(羟甲基)-1,2,3,4,5-五甲基环乙基)甲基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯	

52	生物素 6-O-磷酸- α -D-吡喃甘露糖苷 
53	聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基乙酸 

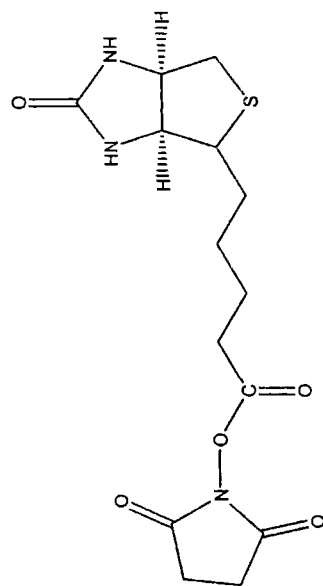
化合物 48-50 的名称

48. ((2R,5S)-3-乙酰氨基-5-羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,6-四甲基-4-(((2S,5R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯((2R,5S)-3-乙酰氨基-5-羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,6-四甲基-4-(((2S,5R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯
49. (2R,3R,5S)-5-(((2S,3S,5S)-3-乙酰氨基-5-羟基-6-(羟甲基)-2,4,6-三甲基-4-(((2S,5R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯

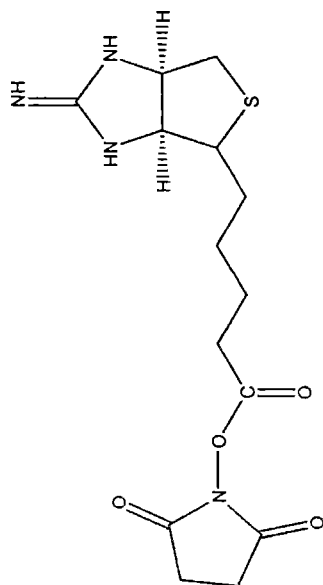
-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)-3,4-二羟基-2,4,5,6,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯

50. (2S,5S)-3-乙酰氨基-4-(((2R,5S)-5-二羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基-3-((((2S,5R)-3,4,5-三羟基-2,3,4,5,6,6-六甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)-3,4-二羟基-2,3,4,5,6,6-六甲基四氢-2H-吡喃-2-基)甲氧基)甲基)-5-羟基-6-(羟甲基)-2,3,4,5,6-五甲基四氢-2H-吡喃-2-基 5-((3aS,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酸酯

亚氨基生物素化合物的结构没有在表 3 中示出。亚氨基生物素结构是生物素结构的类似物，其中生物素基团被亚氨基生物素基团取代。实例在下面用类似物 N-羟基琥珀酰亚胺亚氨基生物素和 N-羟基琥珀酰亚胺亚氨基生物素示出。



N-羟基琥珀酰亚胺生物素



N-羟基琥珀酰亚胺亚氨基生物素

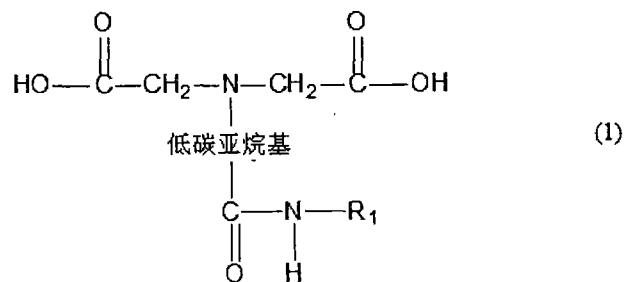
[0135] 分子构型和聚合物的大小(具有大约 15,000 或更高的分子量)能使邻苯二甲酸醋酸纤维素在亲水基的区域中包覆脂构建体的各个磷脂分子。这种包覆保护脂构建体中的干扰素免于胃部酸性环境的攻击。有几种方式可将邻苯二甲酸醋酸纤维素连接到脂构建体内分子的表面。将邻苯二甲酸醋酸纤维素连接到脂构建体表面的优选的方法是将聚合纤维素种类连接到存在从脂构建体表面伸出的糖的干扰素分子的尾部。这保护干扰素蛋白质尾免于酶水解。

[0136] 延伸两亲脂质包括多种用来连接到受体的多配位基结合位点。如本文限定的, 多配位基结合需要干扰素表面和其伴随的糖部分上的多个潜在结合位点, 以及在可与邻苯二甲酸醋酸纤维素聚合物上的羰基、羧基和羟基官能团交接 (interface with carbonyl, carboxyl and hydroxyl functional groups on the cellulose acetate hydrogen phthalate polymer) 的脂构建体上的多个潜在结合位点。这能使邻苯二甲酸醋酸纤维素聚合物结合到多个亲水区——不但在脂构建体上而且在干扰素分子上, 以建立脂构建体的水解防护罩。以这种方式, 在经口施用干扰素剂型后, 干扰素和脂构建体都被保护免于胃部酸性环境的进攻。即使当通过胃时邻苯二甲酸醋酸纤维素覆盖或保护脂构建体内部和脂构建体表面上的各个脂质分子, 但是在构建体移入小肠的碱性区之后, 邻苯二甲酸醋酸纤维素被水解降解。在邻苯二甲酸醋酸纤维素从脂构建体分子的表面除去之后, 脂质锚定肝细胞受体结合分子——例如 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)——被暴露, 然后可结合受体。需要使用邻苯二甲酸醋酸纤维素包覆于干扰素和脂构建体上, 以确保达到更大的干扰素生物利用度。

[0137] 在一实施方式中, 脂构建体包括含有由桥连成分和络合剂络合形成的多个连接的独立单元的靶分子络合物。桥连成分是与络合剂形成水不溶性配位配合物的金属的水溶性盐。适当的金属选自过渡金属和内过渡金属或过渡金属的相邻金属。其中过渡金属和内过渡金属选自: Sc (钪), Y (钇), La (镧), Ac (锕), 锕系; Ti (钛), Zr (锆), Hf (铪), V (钒), Nb (铌), Ta (钽), Cr (铬), Mo (钼), W (钨), Mn (锰), Tc (锝), Re (铼), Fe (铁), Co (钴), Ni (镍), Ru (钌), Rh (铑), Pd (钯), Os (锇), Ir (铱), 和 Pt (铂)。其中过渡金属的相邻金属可选自: Cu (铜), Ag (银), Au (金), Zn (锌), Cd (镉), Hg (汞), Al (铝), Ga (镓), In (铟), Tl (铊), Ge (锗), Sn (锡), Pb (铅), Sb (锑) 和 Bi (铋), 以及 Po (钋)。用作桥连剂的金属化合物的实例包括氯化铬(III)六水合物; 氟化铬(III)四水合物; 溴化铬(III)六水合物; 柠檬酸锆(IV)铵络合物; 氯化锆(IV); 水合氟化锆(IV); 碘化锆(IV); 溴化钼(III); 氯化钼(III); 硫化钼(IV); 氢氧化铁(III); 磷酸铁(III)四水合物, 硫酸铁(III)五水合物, 和类似物。

[0138] 络合剂是可与桥连成分形成水不溶性配位配合物的化合物。有几个适合的络合剂家族。

[0139] 络合剂可选自式(1)的亚氨基二乙酸家族, 其中 R_1 是低碳烷基、芳基、芳基低碳烷基和杂环取代基。



适合的式(1)化合物包括:

N-(2,6-二异丙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2,6-二乙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2,6-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(4-异丙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(4-丁基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2,3-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2,4-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2,5-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(3,4-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(3,5-二甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(3-丁基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2-丁基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(4-叔丁基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(3-丁氧基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(2-己氧基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(4-己氧基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

氨基吡咯亚氨基二乙酸;

N-(3-溴-2,4,6-三甲基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

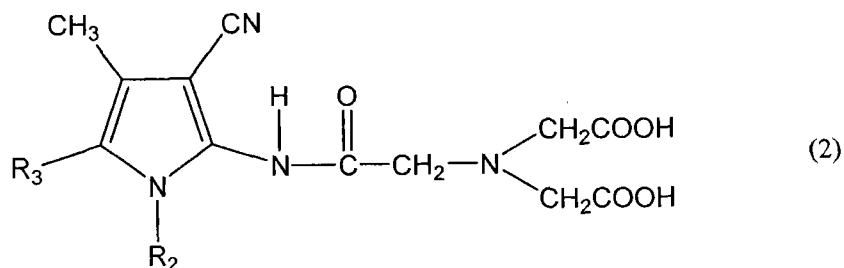
苯并咪唑甲基亚氨基二乙酸;

N-(3-氰基-4,5-二甲基-2-吡咯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸;

N-(3-氰基-4-甲基-5-苄基-2-吡咯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸; 和

N-(3-氰基-4-甲基-2-吡咯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸以及式(2)的

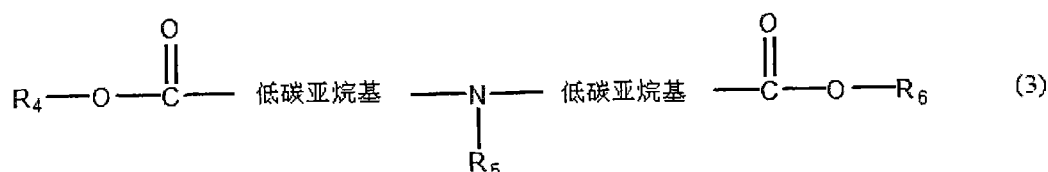
N-(3-氰基-4-甲基-2-吡咯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸的其它衍生物,



其中 R_2 和 R_3 是下述:

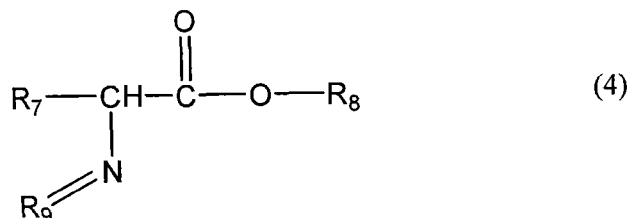
R_2	R_3
H	异-C ₄ H ₉
H	CH ₂ CH ₂ SCH ₃
H	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-OH
CH ₃	CH ₃
CH ₃	异-C ₄ H ₉
CH ₃	CH ₂ CH ₂ SCH ₃
CH ₃	C ₆ H ₅
CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅
CH ₃	CH ₂ C ₆ H ₄ -p-OCH ₃

[0140] 络合剂选自通式(3)的亚氨基二酸衍生物家族, 其中 R_4 、 R_5 和 R_6 彼此独立, 并且可以是氢、低碳烷基、芳基、芳基低碳烷基、烷氧基低碳烷基和杂环。



[0141] 适合的式(3)化合物包括: N'-(2-乙酰萘基)亚氨基二乙酸 (NAIDA); N'-(2-萘甲基)亚氨基二乙酸 (NMIDA); 亚氨基二羧甲基-2-萘甲酮酞氨羧络合剂 (iminodicarboxymethyl-2-naphthylketone phthalein complexone); 3 (3: 7a: 12a: 三羟基-24-降胆烷基-23-亚氨基二乙酸; 苯并咪唑甲基亚氨基二乙酸; 和 N-(5,孕烯-3-对-醇-2-酰氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸。

[0142] 络合剂选自式(4)的氨基酸的家族,



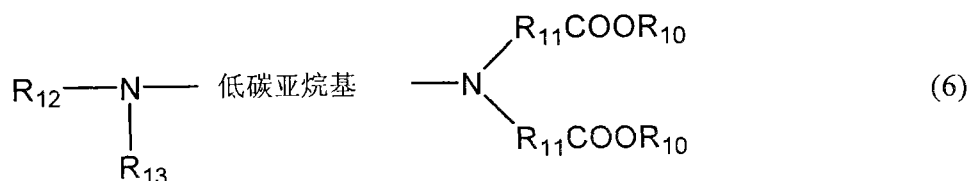
这里, R_7 是氨基酸侧链, R_8 是低碳烷基、芳基、芳基低碳烷基, R_9 是吡哆醛 (pyridoxylidene)。

[0143] 适合的式(4)氨基酸是脂肪族氨基酸, 包括但不限于: 甘氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸; 羟基氨基酸, 包括丝氨酸, 和苏氨酸; 二羧基氨基酸

和它们的酰胺,包括天冬氨酸,天冬酰胺,谷氨酸,谷氨酰胺;具有碱性官能的氨基酸,包括赖氨酸,羟赖氨酸,组氨酸,精氨酸;芳族氨基酸,包括苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸,甲状腺素;和含硫氨基酸,包括胱氨酸,甲硫氨酸。

[0144] 络合剂选自氨基酸衍生物,包括但不必限于(3-丙氨酸- γ -氨基)丁酸,邻重氮乙酰丝氨酸(重氮丝氨酸),高丝氨酸,鸟氨酸,瓜氨酸,青霉胺和吡哆醛类化合物成员,包括但不限于:吡哆谷氨酸;吡哆异亮氨酸;吡哆苯丙氨酸;吡哆色氨酸;吡哆-5-甲基色氨酸;吡哆-5-羟基色氨酸;和吡哆-5-丁基色氨酸。

[0145] 络合剂选自通式(6)的二胺家族,



这里 R_{10} 是氢、低碳烷基、或芳基; R_{11} 是低碳亚烷基或芳基低碳烷基; R_{12} 和 R_{13} 独立为氢、低碳烷基、烷基、芳基、芳基低碳烷基、酰基杂环、甲苯、磺酰或甲苯磺酸盐(酯)。

[0146] 一些适合的式(6)二胺包括但不限于,乙二胺-N,N 双乙酸;乙二胺-N,N-二(-2-羟基-5-溴苯基)乙酸酯; N' -乙酰基乙二胺-N,N 双乙酸; N' -苯甲酰乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(对甲苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(对叔丁基苯甲酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(对氯苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(对乙基苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -酰基和 N' -磺酰乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(对-正-丙基苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; N' -(萘-2-磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸; 和 N' -(2,5-二甲基苯磺酰)乙二胺-N,N 双乙酸。

[0147] 其它合适的络合化合物或络合剂包括但不限于:青霉胺;对-巯基异丁酸;二氢硫辛酸;6-巯基嘌呤;乙氧丁酮醛-二(缩氨基硫脲)(kethoxal-bis(thiosemicarbazone));肝胆胺复合物(Hepatobiliary Amine Complexes);1-胍基酞嗪(胍基酞嗪);磺酰脲;肝胆氨基酸席夫碱复合物(Hepatobiliary Amino Acid Schiff Base Complexes);吡哆谷氨酸;吡哆异亮氨酸;吡哆苯丙氨酸;吡哆色氨酸;吡哆-5-甲基色氨酸;吡哆-5-羟基色氨酸;吡哆-5-丁基色氨酸;四环素;7-羧基-对-羟基喹啉;酚酞;蓝曙红 I;黄曙红 I;verograffin;3-羟基-1-4-甲酰基-吡啶谷氨酸(pyridine glutamic acid);偶氮取代的亚氨基二乙酸;肝胆染料络合物,例如玫瑰红;刚果红;溴磺酚酞;溴酚蓝;甲苯胺蓝;和吲哚菁绿;肝胆造影剂,例如胆影酸;和碘甘卡酸;胆汁盐,例如胆红素;cholgycylidohistamine;和甲状腺素;肝胆硫代复合物,例如青霉胺;对-巯基异丁酸;二氢硫辛酸(dihydrothiocytic acid);6-巯基嘌呤;和乙氧丁酮醛-二(缩氨基硫脲);肝胆胺复合物,例如1-胍基酞嗪(胍基酞嗪);和磺酰脲;肝胆氨基酸席夫碱复合物,包括吡哆-5-羟基色氨酸;和吡哆-5-丁基色氨酸;肝胆蛋白复合物,例如鱼精蛋白;铁蛋白;和脱唾

液酸血清类黏蛋白; 和脱唾液酸复合物, 例如乳糖胺白蛋白; 免疫球蛋白, G, IgG; 和血红蛋白。

[0148] 通过结合桥连剂和络合剂制造三维靶分子络合物被描述于 WO99/59545, 其通过引用引入于本文。在一实施方式中, 桥连剂是金属盐, 例如氯化铬六水合物, 其可与络合剂形成配位配合物, 所述络合剂例如 N-(2,6-二异丙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸。将桥连剂和络合剂结合, 形成以三维排列的多个连接单元组成的络合物。在一优选的实施方式中, 络合物由多个连接在一起的二[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸]铬单元构成的。在一实施方式中, 将铬靶分子络合物物质溶于含有 1,2-二硬脂酰-Sn-甘油基-磷酸胆碱、磷酸联十六烷酯和胆固醇的脂质混合物中。该络合物被并入从先前描述的脂质的组中形成的脂构建体中。

[0149] 在一实施方式, 适当比例的干扰素与抗病毒剂混合, 所述抗病毒剂例如病毒唑(ribivirin)、阿昔洛韦(acyclovir)、双链 DNA、寡核苷酸、蛋白酶抑制剂、反转录酶抑制剂和其它本身无效但在 HDV 中输送时有效的可能的抗病毒物质。

发明描述-制造脂构建体的方法

[0150] 图 11 表示制造含有两亲脂质、延伸两亲脂质和干扰素的脂构建体的方法的概要。

[0151] 组合物的制造包括三个总步骤: 制备两亲脂质和延伸两亲脂质的混合物、从两亲脂质和延伸两亲脂质的混合物制备脂构建体、以及将干扰素结合到脂构建体。

[0152] 通过本文公开的方法和在美国专利第 4,946,787、4,603,044、和 5,104,661 号以及它们引用的参考文献中描述的那些方法, 制造和装载脂质。一般地, 本发明的含水脂构建体制剂按重量计包括水溶液中 0.1%到 10%的活性剂(即 1-10 mg 药物/ml), 和按重量计 0.1%到 4%的脂质, 任选地, 包括盐和缓冲液, 其量使得体积为 100%。优选地为含有 0.1%到 5%活性剂的制剂。最优选地为含有按重量计 0.01%到 5%活性剂和按重量计可达 2%的脂质成分的制剂, 其在量足以(q. s.)得到按体积计 100%的水溶液中。

[0153] 在一实施方式中, 通过下述方法制备脂构建体。在有机溶剂体系中, 将各个脂质组分混合在一起, 这里溶剂已通过分子筛干燥大约两个小时, 以除去任何可能已存在于溶剂中的残留水分。在一实施方式中, 溶剂体系包含体积比 2:1 的氯仿和甲醇的混合物。也可使用可很容易从干燥脂质的混合物中去除的其它有机溶剂。在最初混合步骤中, 使用单步添加脂质成分消除了引入任何另外的偶联反应的需要, 这样将不必使脂构建体的结构复杂化而且不需要另外的分离步骤。将脂质成分和肝细胞受体结合分子在溶剂中溶解, 然后在高真空下除去溶剂, 直到干燥脂质混合物形成。在一实施方式中, 在真空中使用旋转蒸发器或其它本领

域已知的方法，在大约 60°C 下缓慢转动大约 2 小时除去溶剂。该脂质混合物可被储藏以进一步使用或者直接使用。

[0154] 从两亲脂质和延伸两亲脂质的干燥混合物制备脂构建体。将干燥的脂质混合物加入到适当量的水缓冲介质中，然后使混合物旋涡振荡以形成均匀的悬浮液。然后加热脂质混合物，并且在干燥氮气氛中在大约 80°C 下混合大约 30 分钟。立刻，将加热过的均匀悬浮液转移到被预热到大约 70°C 的微流化床装置（micro-fluidizer）中。将悬浮液通过微流化床装置。悬浮液可以需要另外通过微流化床设备以得到均匀脂质微悬浮液。在一实施方式中，使用型号#M-110 EHI 的微流化床装置，这里第一次通过的压力是大约 9,000 psig。可能需要脂质悬浮液第二次通过微流化床装置，以产生展示出均匀脂质微悬浮液的性能的产品。这种产品在结构和形态上被定义为含有肝细胞受体结合分子的三维脂构建体。

[0155] 使用两种方法之一，将干扰素装载入脂构建体：平衡装载和非平衡装载。当将干扰素加入到脂构建体的悬浮液中时，干扰素的平衡装载开始。随时间的过去，干扰素分子移入和移出脂构建体。通过分配平衡控制移动，这里在最初将干扰素引入悬浮液之后，干扰素移入脂构建体。

[0156] 将干扰素非平衡装载入脂构建体使干扰素局限于脂构建体内部。在将游离干扰素平衡装载入脂构建体后，除去含有游离干扰素的体相介质。非平衡装载过程是方向驱动(vector-driven)过程，其在外相介质被除去的时刻开始。当已除去含有干扰素的水相时，干扰素移出脂构建体的梯度势被消除。总过程导致最终脂构建体中更大的干扰素浓度，这是因为消除了从构建体内移出干扰素。干扰素的平衡装载是时间依赖性的现象，而非平衡装载过程实际上是瞬时的。多种方法可起始非平衡装载，其中溶液中的材料被从脂构建体分离。这类方法的实例包括但不限于：过滤、离心超滤(centricon filtration)、离心、分批式(batch style)亲和层析法、链霉抗生物素琼脂糖亲和-凝胶层析法(streptavidin agarose affinity-gel chromatography)或者分批式离子交换层析法。可以使用任何可消除干扰素扩散和渗漏的梯度势并使得干扰素保留在脂构建体内的方法。

[0157] 当使用分批式层析法的时候，亲和或离子交换凝胶与干扰素和构建体的混合物迅速混合。结合到层析介质快速发生，并且通过倾析水相或通过使用经典过滤技术例如使用滤纸和布氏漏斗，从水介质中除去层析介质。

[0158] 脂构建体含有不连续量的装载的干扰素，所述干扰素不但位于脂构建体内部，而且位于脂构建体表面中和表面上。产生的脂构建体是新颖和新型的物质组合物，并且作为非平衡装载的结果，其成为用于输运有效量干扰素的组合物。将干扰素装载入该脂构建体和随后除去体相干扰素，这通过缩短用去除外部相介质的所需时间，导致脂构建体内高浓度的干扰素。使用时间-依赖性方法，例如离子交换法或凝胶过滤层析法，很难达到这种将干扰素装载入构建体的水平，因为这些方法需要持续输入包含高浓度干扰素的缓冲液。例如，使用小型柱层析法

将干扰素装载入构建体，需要大约 20 分钟以从含有干扰素的构建体除去含有干扰素的外部体相介质。在这段时间期间通过从构建体移出干扰素，重建平衡条件。在脂构建体内和脂构建体上保持高浓度的干扰素是使用非平衡装载的一个积极的益处。

[0159] 在非平衡装载方法的扩展中，在将干扰素装载入脂构建体的步骤期间，在干扰素已经经过平衡装载之后，但是在非平衡装载过程开始之前，将邻苯二甲酸醋酸纤维素加入到脂构建体。干扰素分子的性质和结构使其插入脂构建体，其中干扰素被分散到整个脂构建体。干扰素的亲水部分以及支链复合糖和另外的官能团，从脂构建体的表面伸入体相介质。在脂构建体表面，这些延伸的干扰素亲水部分可参与到与邻苯二甲酸醋酸纤维素的羟基、羧基和羰基官能团的氢键合、偶极-偶极和离子-偶极相互作用中，如图 10 所阐述。邻苯二甲酸醋酸纤维素提供与脂构建体分子结合的独特方式，以提供保护脂构建体内容物免受胃消化环境影响的良好防护罩。胃消化过程是由胃蛋白酶水解切割蛋白质底物和酸水解切割产生的。胃的酸性环境降解游离干扰素，并且可水解酯键，所述酯键将酰基链保持在磷脂分子的甘油骨架上。水解切割也可发生在磷酸胆碱中磷酸酯官能团的任意一边上。消化系统从胃的酸性区域变成小肠的碱性区域，在那里发生胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的酶作用。氨基酸裂解酶，例如 α 氨基肽酶，可从 N-末端降解蛋白质例如干扰素。在脂构建体中邻苯二甲酸醋酸纤维素的存在保护干扰素免于水解降解。当小肠的碱性环境水解降解脂构建体的邻苯二甲酸醋酸纤维素罩时，肝细胞受体结合分子可以指引构建体结合到肝细胞结合受体。尽管不希望被任何具体理论所束缚，但是在非平衡装载的终点加入邻苯二甲酸醋酸纤维素之后存在水解保护的协同作用。该保护不仅分配给干扰素和各个脂质分子，而且分配给整个的脂构建体。这种协同作用提供了免于酶和酸水解的整体以及单独的分子保护。

[0160] 在一实施方式中，使用多种方法，将邻苯二甲酸醋酸纤维素共价结合到干扰素或脂构建体。例如，一种方法涉及使用 Mannich 反应，将邻苯二甲酸醋酸纤维素上的羟基与 1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺或干扰素分子中 10 个 L-赖氨酸中的 ϵ 氨基上的胺官能团偶联。

[0161] 在一实施方式中，在将干扰素平衡装载入构建体期间，将邻苯二甲酸醋酸纤维素装载入脂构建体。邻苯二甲酸醋酸纤维素的羟基和羰基官能团与脂构建体中的脂质分子发生氢键合。当干扰素在平衡条件下被装载入脂构建体而在干扰素周围和构建体周围产生罩时，邻苯二甲酸醋酸纤维素和构建物之间的氢键同步形成。

[0162] 通过将 HDV-干扰素结合到链霉抗生物素琼脂糖亚氨基生物素，将其从水介质回收和再利用。共价结合到溴化氰活化的琼脂糖的链霉抗生物素提供了在将干扰素非平衡装载入构建体结束时从水介质中的干扰素分离亚氨基生物素基脂构建体的方法。在一实施方式中，亚氨基生物素衍生物在脂构建体内形成磷脂

部分的肝细胞受体结合部分。脂质锚定分子的水溶性部分从脂质表面延伸大约 30 埃，以促进磷脂部分的肝细胞受体结合部分与肝细胞受体相结合，并且帮助将脂构建体结合到链霉抗生物素。

[0163] 在 9.5 和更大的 pH 值下，链霉抗生物素可逆地结合于亚氨基生物素，其中亚氨基生物素不带电的胍基官能团强烈结合到蛋白质表面以下大约 9 埃位置的链霉抗生物素上的四个结合位点之一。通过将构建体的水混合物的 pH 提高到 pH9.5，从缓冲介质中除去含有亚氨基生物素的脂构建体，这种 pH 的提高是通过加入 20 mM 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液实现的。在这个 pH，体相介质含有游离干扰素，使用多种方法，包括但不限于过滤、离心或层析法，将该游离干扰素回收并且与脂构建体分离。

[0164] 然后，在 pH 9.5 下该混合物与链霉抗生物素琼脂糖交联珠混合，其中构建体被吸附到链霉抗生物素上。这些珠直径大约 120 微米，被通过过滤从溶液中分离。通过加入 pH 4.5 的 20 mM 乙酸钠-乙酸缓冲液将 pH 从 pH 9.5 降低到 pH 4.5，脂构建体从链霉抗生物素琼脂糖亲和凝胶被释放。在 pH 4.5 时，亚氨基生物素的胍基质子化，并且带有正电，如图 10 所示。通过过滤从链霉抗生物素琼脂糖珠释放和分离脂构建体。回收链霉抗生物素琼脂糖珠以另外使用。因此，游离干扰素和链霉抗生物素琼脂糖都被保存，并且可再次使用。

[0165] 在一实施方式中，当应用链霉抗生物素琼脂糖珠，用 α 干扰素装载亚氨基生物素或亚氨基生物素脂构建体时，产生了提供干扰素延长释放的组合物。当前述构建体的 pH 被从 pH 9.5 调节到 pH 4.5 时，在大约 pH 5.9 下， α 干扰素将在脂构建体内沉淀。 α 干扰素的等电点是 pH 5.9，并且其表示 α 干扰素具有最低水溶解度的 pH。在从 pH 5.9 到 pH 6.7 的范围内， α 干扰素保持基本上不溶，并且 α 干扰素表现出通常被归因于粒状物质的性能。脂构建体中不溶解的 α 干扰素产生新型的 α 干扰素制剂，其当通过皮下注射或通过口服给药施用，提供 α 干扰素分子的缓慢释放。当脂构建体的 pH 接近 pH 7.4 时， α 干扰素开始溶解。

[0166] 在给药以前，脂构建体是冻干的或保存在非水环境中。在水剂型 α 干扰素中，将 α 干扰素溶液的 pH 保持在大约 pH 6.5，以便保持 α 干扰素的不可溶形式。当 α 干扰素在体内被暴露于外部 pH 梯度时， α 干扰素被溶解并且从脂构建体中移出，因而将 α 干扰素提供给其它含有病毒的组织。保持在脂构建体中的干扰素保持被指引到肝脏中肝细胞上肝细胞结合受体的能力。因此，从该特定脂构建体，产生了两种形式的 α 干扰素。在体内环境中，游离 α 干扰素和脂质连接的 α 干扰素以时间依赖性的方式产生。预期，脂质连接的 α 干扰素的溶解，如先前所描述，可被制造以在指定的缓慢释放时期释放干扰素。对于病毒感染的患者，这可导致更低频率的给药方案。

[0167] 在一优选的实施方式中，干扰素分子移入脂构建体并且被隔离在装载的脂构建体的脂质结构域中。在干扰素装载过程的最后阶段期间，当化学平衡被

破坏时,使用方向驱动的过程以在一个方向移动干扰素分子。在干扰素装载过程的最后阶段期间,缓冲液或水介质被快速除去,以便与脂构建体连接的干扰素分子丧失了其移入的外部介质。除去外部介质有效地结束了与脂构建体连接的干扰素和溶解在外部介质中的干扰素之间的平衡。这个过程被称为非平衡装载,如本文其它地方所描述。

[0168] 在一实施方式中,应用平衡方法,使用干扰素装载脂构建体,选择每微克蛋白 273,000 单位干扰素的干扰素浓度,开始装载过程。继续平衡装载,直到脂构建体对干扰素饱和。

[0169] 将干扰素非平衡装载入脂构建体的最后步骤需要使用从含有游离干扰素的缓冲介质中分离固体脂构建体的步骤。在一实施方式中,使用非常细的微孔合成膜的过滤过程被用来从外部介质中分离脂构建体。在另一实施方式中,装备具有 100,000 截留分子量的膜的适当滤器例如 NanoSep 滤器的过滤离心设备,例如离心超滤(centricon)设备,被用来从含有游离干扰素的缓冲介质中除去脂构建体。脂构建体中干扰素的浓度被保持,因为连接的干扰素不再与位于体相介质的游离干扰素平衡,该体相介质已从构建体除去。在溶液中的游离干扰素可被装载到其它脂构建体。因此,在脂构建体中浓缩干扰素的方向驱动过程以基本时间不依赖的步骤一步实现。

[0170] 在脂构建体从体相介质中分离以后,其直径大小可从大约 0.0200 微米到 0.4000 微米范围内变化。脂构建体包括不同的粒径,所述粒径通常符合高斯分布。达到目的药理学功效所需的适当大小的脂构建体可通过肝细胞结合受体从含有高斯分布粒径的脂构建体中选择。

[0171] 使用微流化过程制备含有干扰素、两亲脂质和延伸两亲脂质的脂构建体,所述微流化过程提供将较大的脂构建体降解为较小的构建体的高剪切力。脂构建体的两亲脂质成分是 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐)、三乙铵 2,3-二乙酰氧基丙基 2-(5-((3aS, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)磷酸乙酯以及它们适当的衍生物,其代表结构被描述于表 3。

[0172] 在一实施方式中,构建体含有靶分子络合物,其含有通过将桥连成分与络合剂络合所形成的多个连接的独立单元。典型地,通过将选定的金属化合物例如氯化铬(III)六水合物与络合剂的水缓冲溶液相组合,形成靶分子络合物。在一实施方式中,通过将络合剂例如 N-(2,6-二异丙基苯基氨基甲酰甲基)亚氨基二乙酸溶解在水缓冲溶液例如最终 pH 为 3.2-3.3 的 10mM 乙酸钠缓冲液,制造络合剂的水缓冲溶液。将金属化合物过量加入——以足够与络合剂的可分离部分(isolateable portion)络合的量,并且在 20°C 到 33°C 的温度下进行反应 24 到 96 小时,或者

直到所形成的络合物沉淀出水缓冲溶液。然后，分离表现聚合性能的沉淀的络合剂，以将来使用。在制备脂构建体之前，将该络合物加入到两亲脂质分子和延伸两亲脂质的混合物中。

发明描述-使用方法

[0173] 将有效量的肝细胞靶向组合物施用给肝炎患者，所述肝细胞靶向组合物含有游离干扰素和与水不溶性靶分子络合物连接的干扰素的混合物。在一实施方式，适当比例的干扰素与抗病毒剂混合，所述抗病毒剂例如病毒唑、阿昔洛韦、双链 DNA、寡核苷酸、蛋白酶抑制剂、反转录酶抑制剂和其它本身可是无效但在 HDV 中输送时有效的可能的抗病毒物质。在一实施方式，可通过皮下或经口施用该组合物。

[0174] 在通过皮下注射将组合物施用给患者之后，在注射区域的原位生理 pH 环境产生 pH 增加，这影响游离干扰素和与水不溶性靶分子络合物连接的干扰素的形态和化学结构。随着干扰素周围环境的 pH 增加，干扰素变为在脂构建体内部或连接到脂构建体的可溶形式，其中干扰素可通过循环系统移动到肝脏。

[0175] 经口施用含有与靶分子络合物连接的干扰素的药物组合物，然后通过肠吸收与靶分子络合物相连的干扰素，进入身体的循环系统，在那里干扰素也暴露于血液的生理 pH。将脂构建体靶向输运到肝脏。在一实施方式中，构建体中邻苯二甲酸醋酸纤维素的存在保护脂构建体。在经口施用的过程下，被保护的脂构建体横穿口腔，穿过胃部，并且移入小肠，在那里小肠的碱性 pH 降解邻苯二甲酸醋酸纤维素保护罩。去掉保护的脂构建体被吸收入循环系统。这样能使脂构建体输送到肝脏的窦状隙。受体结合分子例如 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)或其它前述的肝细胞特异性分子，提供将脂构建体结合到受体的手段，然后肝细胞将其内吞或胞饮(engulfe or endocytose)。然后从脂构建体释放干扰素，其中在进入细胞内环境后，其施行其指定的功能——作为药剂对抗病毒的感染，所述病毒例如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、己型肝炎病毒和庚型肝炎病毒以及其它病毒。

[0176] 本发明的脂构建体结构提供了用于将干扰素施用给宿主的药物应用的可用药剂。因此，本发明的结构可用作与药物可接受载体联合的药物组合物。施用本文描述的结构可通过施用期望被施用的干扰素的任何可接受的方式。这些方法包括经口、肠胃外、鼻和其它系统或气溶胶形式。

[0177] 施用的干扰素的量将取决于被治疗的对象、病痛的类型和严重性、给药方式和处方医生的判断。尽管对于具体目标生物活性物质的有效剂量的范围取决于多种因素，并且通常对本领域普通技术人员是已知的，但仍一般性地规定了一些剂量指导。对于大多的给药方式，将脂质成分悬浮于水溶液中，并且通常不超过总制剂的 4.0%(w/v)。制剂的药物成分最可能在药剂的 20%(w/v)以下，并且通

常在 0.01% (w/v) 以上。

[0178] 可以制备剂型或组合物，该剂型或组合物含有 0.005% 到 5% 范围内的活性成分，余量由非毒性载体组成。

[0179] 这些制剂的精确组成可依赖于正被讨论的药物的具体特性广泛变化。然而，它们通常包含 0.01% 到 5% 活性成分，优选地，对于高效能药物包含 0.05% 到 1% 的活性成分，以及对于中等活性药物包含 2% 到 4% 的活性成分。

[0180] 包含在这类肠胃外组合物中的活性化合物的百分比高度依赖于其具体性能以及该化合物的活性和对象的需要。然而，溶液中 0.01% 到 5% 的活性成分百分比是可以使用的，如果组合物是随后将被稀释到上述百分比的固体，活性成分的百分比更高。优选地，组合物将包括溶液中的 0.2%-2.0% 的活性成分。

[0181] 可通过任何在药理学领域已知的方法或今后发展的方法，制备本文描述的药物组合物制剂。通常而言，这类制备方法包括使活性成分与载体或一种或多种其它成分相关联的步骤，然后，如果需要或期望，将产品成形或包装成期望的单剂量或多剂量单元。

[0182] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合凭处方施用给人的药物组合物，但是技术人员理解，这类组合物通常适合于施用给各种动物。修饰适合施用给人的药物组合物以便使该组合物适合施用给各种动物是很好理解的，普通有技术的兽医药理学家可以用仅仅普通的实验——如果有的话，设计和实施这类修饰。考虑来向其施用本发明的药物组合物的对象，包括但不限于人和其它灵长类动物、哺乳动物，所述哺乳动物包括商业相关的哺乳动物例如牛、猪、马、羊、猫和狗。

[0183] 适用于本发明的方法的药物组合物可以以适合于经口、肠胃外、肺部、鼻内、颊部或其它给药途径的剂型被制备、包装或出售。

[0184] 本发明的药物组合物可以以大批或单一单位剂量或多个单一单位剂量的形式被制备、包装或出售。如本文使用的，“单位剂量 (unit dose)” 是不连续量的药物组合物，其包括预先确定量的活性成分。活性成分的量通常等于将被施用给对象的活性成分的剂量或者这样的剂量的实用小部分 (convenient fraction)，例如该剂量的一半或三分之一。然而，输送本发明描述的活性剂，可以低至正常施用剂量的 1/10、1/100 或 1/1000 或者在正常施用剂量以下，这是因为干扰素治疗剂的靶向性能。

[0185] 本发明的药物组合物的活性成分、药学上可接受载体和任意另外成分的相对量依赖于被治疗对象的特征、大小（或身材）和症状，并且进一步依赖于施用组合物的途径而变化。作为实例，组合物可包括 0.1% 和 100% (w/w) 之间的活性成分。

[0186] 适用于经口施用的本发明的药物组合物的制剂可以以不连续固体剂量单元的形式制备、包装或出售，所述固体剂量单元包括但不限于片剂、硬或软胶

囊、扁囊剂、含片或锭剂，每一个含有预先确定量的活性成分。其它适用于经口施用的制剂包括但不限于粉末或颗粒制剂、水性或油状悬浮液、水性或油状溶液或者乳浊液。

[0187] 如本文使用的，“油状”液是包括含碳液体分子的液体，并且表现比水极性更低的特性。

[0188] 例如，可通过将活性成分压片或模压制备包括活性成分的片剂，任选的带有一种或多种另外的成分。在适当的设备上，通过以自由流动形式例如粉末或颗粒制剂将活性成分——其任选与一种或多种粘合剂、润滑剂、赋形剂、表面活性剂和分散剂相混合——压片，制备压制片剂。在适当的设备上，通过模压活性成分、药学可接受载体和至少足够润湿该混合物的液体的混合物，制备模压片剂。用于制造片剂的药学可接受赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、粒化和崩解剂、粘合剂和润滑剂。已知的分散剂包括但不限于马铃薯淀粉和羟基乙酸淀粉钠。已知的表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠。已知的稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙和磷酸钠。已知的粒化和崩解剂包括但不限于玉米淀粉和褐藻酸。已知的粘合剂包括但不限于明胶、阿拉伯树胶、预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、硅石和滑石。

[0189] 片剂可以是非包衣的，或者可以使用已知的方法对片剂包衣，以达到在对象胃肠道中的延迟崩解，从而提供活性成分的持续释放和吸收。作为实例，可使用材料例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯来包衣片剂。进一步作为实例，可以使用在美国专利号 4,256,108、4,160,452 和 4,265,874 中描述的方法包衣片剂，以形成渗透控制的释放片剂。片剂可进一步包括增甜剂、调味剂、着色剂、防腐剂或它们的一些的组合，以便提供药学上精致和美味的制剂。

[0190] 使用生理可降解的组合物例如明胶，可制备含有活性成分的硬胶囊。这类硬胶囊含有活性成分，并且可进一步含有另外的成分，所述成分包括例如惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或邻苯二甲酸醋酸纤维素。

[0191] 使用生理可降解的组合物例如明胶，可制备含有活性成分的软胶囊。这类软胶囊含有活性成分，其可与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油相混合。

[0192] 适用于经口施用的本发明的药物组合物的液体制剂可以以液体形式或者拟在使用前与水或其它适合的载体重构的干产品的形式进行制备、包装和出售。

[0193] 使用传统的方法可制备液体悬浮液，以获得活性成分在水性或油状载体中的悬浮液。水性载体包括，例如水和等渗盐。油状载体包括，例如杏仁油、油酯、乙醇、植物油如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油、分馏的植物油、以及矿物油如液体石蜡。液体悬浮液可进一步包括一种或多种另外的成分，其包括但不限于悬浮剂、分散剂或润湿剂、乳化剂、润药、防腐剂、缓冲液、盐、调味剂、

着色剂和增甜剂。油状悬浮液可进一步包括增稠剂。已知的悬浮剂包括但不限于山梨醇糖浆、氢化可食用脂肪、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、龙须胶、阿拉伯树胶和纤维素衍生物如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素。已知的分散剂或润湿剂包括但不限于天然发生的磷脂如卵磷脂、烯化氧与脂肪酸、长链脂肪醇、从脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯或者从脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩聚产物(例如分别为聚氧乙烯硬脂酸酯、十七烯氧基十六醇(heptadecaethyleneoxycetanol)、聚氧乙烯山梨醇单油酸酯和聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)。已知的乳化剂包括但不限于卵磷脂和阿拉伯树胶。已知的防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯、抗坏血酸和山梨酸。已知的增甜剂的实例包括甘油、丙二醇、山梨醇、蔗糖和糖精。已知的油状悬浮液的增稠剂包括,例如蜂蜡、硬石蜡和十六醇。

[0194] 可用与液体悬浮液基本相同的方式制备水性或油状溶剂中的活性成分的液体溶液,主要的差异是溶解活性成分而不是将其悬浮于溶剂中。本发明的药物组合物的液体溶液可包含对应于液体悬浮液描述的每一成分,可以理解,将不需要悬浮剂帮助活性成分溶解于溶剂中。水性溶剂包括例如水和等渗盐。油状溶剂包括,例如杏仁油、油酯、乙醇、植物油如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油、分馏的植物油和矿物油如液体石蜡。

[0195] 使用已知的方法,可制备本发明药物制剂的粉末和颗粒制剂。这类制剂可直接施用给对象,例如用来形成片剂、填充胶囊或通过向其中加入水性或油状载体制备水性或油状悬浮液或溶液。每一个这些制剂可进一步包括分散剂或润湿剂、悬浮剂和防腐剂中的一种或多种。另外的赋形剂例如填料和增甜剂、调味剂或着色剂也可被包括在这些制剂中。

[0196] 本发明的药物组合物也可以以水包油乳液或油包水乳液的形式进行制备、包装或出售。油相可以是植物油如橄榄油或花生油、矿物油如液体石蜡或者这些的组合。这些组合物可进一步包括一种或多种乳化剂,例如天然发生的树胶如阿拉伯树胶或龙须胶、天然发生的磷脂如大豆磷脂或卵磷脂、从脂肪酸和己糖醇酐的组合衍生的酯或偏酯如山梨聚糖单油酸酯以及这些偏酯和氧乙烯的缩聚产物如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯。这些乳液也可包括另外的成分,其包括例如增甜剂或调味剂。

[0197] 如本文使用的,药物组合物的“肠胃外施用”包括以物理破裂对象组织并通过组织中的裂口施用药物组合物为特征的任何施用途径。因此,肠胃外施用包括但不限于通过注射组合物施用药物组合物、通过外科切口应用组合物、通过组织穿透性非外科创伤应用组合物和类似方法。具体而言,被考虑的肠胃外施用包括但不限于皮下注射、腹膜内注射、肌肉注射、胸骨内注射和肾透析灌流技术。

[0198] 适用于肠胃外施用的药物组合物制剂包括与药学上可接受载体如无菌

水或无菌等渗盐组合的活性成分。这类制剂可以以适合快速施用或连续施用的形式进行制备、包装或出售。可以以单位剂量形式例如在安瓿中或在含有防腐剂的多剂量容器中，制备、包装或出售可注射制剂。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于油状或水性载体中的悬浮液、溶液、乳状液，糊剂和可植入持续释放或可生物降解的制剂。这类制剂可进一步包括一种或多种另外的成分，其包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在肠胃外施用制剂的一个实施方式中，提供了干燥形式(即粉末或颗粒)的活性成分，其与适当载体(例如无菌无致热原的水)重构，然后肠胃外施用该重构的组合物。

[0199] 可以以无菌可注射的水性或油状悬浮液或溶液的形式制备、包装或出售药物组合物。可以根据已知技术配制悬浮液或溶液，并且除了所述活性成分之外，该悬浮液或溶液可包含另外的成分，如本文描述的分散剂、润湿剂、或悬浮剂。例如，可使用非毒性肠胃外可接受稀释液或溶剂如水或 1,3-丁二醇，制备这类无菌可注射制剂。其它可接受稀释液和溶剂包括但不限于林格溶液、等渗氯化钠溶液和固定油类例如合成的甘油一酯或甘油二酯。其它可用的可肠胃外施用的制剂包括包含微晶型的、在脂构建体制剂中的、或作为可生物降解的聚合物体系成分的活性成分的那些制剂。用于持续释放或植入的组合物可包括药学上可接受聚合或疏水材料例如乳剂、离子交换树脂、微溶聚合物或者微溶盐。

[0200] 本发明的药物组合物可以以适合通过口腔 (buccal cavity) 进行肺部施用的制剂制备、包装或出售。这类制剂可包括干燥颗粒，所述干燥颗粒包含活性成分并且其具有大约 0.5 到大约 7 微米范围内的直径，优选具有大约 1 到大约 6 微米的直径。方便地，使用包含干粉储存器的装置施用这类干粉形式的组合物，其中推进剂流可被指引以将粉末分散到所述储存器，或者使用自推进溶剂/粉末-分配容器，施用这类干粉形式的组合物，所述自推进溶剂/粉末-分配容器例如在密封容器中含有溶解或悬浮于低沸点推进剂的活性成分的装置。优选地，这类粉末含有颗粒，其中按重量计至少 98% 的颗粒具有 0.5 微米以上的直径，按数量计至少 95% 的颗粒具有 7 微米以下的直径。更优选地，按重量计至少 95% 的颗粒具有 1 纳米以上的直径，按数量计至少 90% 的颗粒具有 6 微米以下的直径。干粉组合物优选包括固体细粉末稀释剂例如糖，并且被以单位剂量形式方便地提供。

[0201] 低沸点推进剂一般包括大气压下具有 65°F 以下沸点的液体推进剂。一般而言，推进剂可构成组合物的 50 到 99.9% (w/w)，并且活性成分可构成组合物的 0.1 到 20% (w/w)。推进剂可进一步包括另外的成分例如液体非离子或固体阴离子表面活性剂或固体稀释剂(优选地，与含有活性成分的颗粒具有相同级的粒径)。

[0202] 配制用于肺部输送的本发明的药物组合物也可提供溶液或悬浮液的滴状形式的活性成分。这类制剂可作为含有活性成分的含水或稀释醇溶液或悬浮液——其任选地无菌，加以制备、包装或出售，并且使用任意雾化或喷雾仪器，可方便地施用这类制剂。这类制剂进一步包括一种或多种另外的成分，其包括但不限于

限于调味剂如糖精钠、挥发油、缓冲剂、表面活性剂或防腐剂如羟基苯甲酸甲酯。这种施用途提供的小滴优选具有大约 0.1 到大约 200 微米范围的平均直径。

[0203] 本文描述成可用于肺部输送的制剂也可用于本发明药物组合物的鼻内输送。

[0204] 适用于鼻内施用的另一种制剂是包括活性成分和具有大约 0.2 到 500 微米平均粒径的粗粉。施用这类制剂以服用嗅剂的方式进行，即从放置在鼻孔附近的粉末容器中通过鼻道快速吸入。

[0205] 适用于鼻内施用的制剂例如可包括从少至大约 0.1% (w/w) 到多至 75% (w/w) 的活性成分，并且可进一步包括一种或多种本文描述的另外的成分。

[0206] 可以以适用于口腔施用的剂型，制备、包装或出售本发明的药物组合物。这种剂型例如可以是例如使用传统方法制造的片剂或锭剂，并且例如可以包含 0.1 到 20% (w/w) 的活性成分，余量包含经口可溶或可降解的组合物，并且任选地含有一种或多种本文描述的另外的组分。可选地，适用于口腔施用的剂型可包括含有活性成分的粉末或烟雾化的或雾化的溶液或悬浮液。这些粉末的、烟雾化的或雾化的制剂当分散时，优选具有在大约 0.1 到大约 200 微米的平均粒径或小滴大小，并且可进一步包括一种或多种本文描述的另外的成分。

[0207] 可以以适合于眼部施用的剂型制备、包装或出售本发明的药物组合物。这类制剂例如可以是滴眼剂形式，其包括例如水性或油状液载体中活性成分 0.1%-1.0% (w/w) 的溶液或悬浮液。此类滴眼剂可进一步包括缓冲剂、盐或一种或多种本文描述的另外的成分。其它可用的可眼部施用的制剂包括含有微晶形式的或在脂构建体制剂中的活性成分的那些制剂。

[0208] 如本文使用的“另外的成分”包括但不限于一种或多种下述成分：赋形剂；表面活性剂；分散剂；惰性稀释剂；粒化和崩解剂；粘合剂；润滑剂；增甜剂；调味剂；着色剂；防腐剂；生理上可降解组合物，例如明胶；水性载体和溶剂；油状载体和溶剂；悬浮剂；分散或润湿剂；乳化剂、润药；缓冲液；盐；增稠剂；填料；乳化剂；抗氧化剂；抗生素；抗真菌剂；稳定剂；和药学上可接受的聚合材料或疏水材料。其它可包含在本发明的药物组合物的“另外的成分”是本领域已知的，并描述在例如 Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 其通过引用并入本文。

[0209] 可施用给动物——优选人——的本发明组合物的典型剂量在 1 微克到大约 100 克/千克动物体重的范围内。然而，施用的精确剂量将根据多种因素变化，所述因素包括但不限于动物类型和被治疗的疾病状态的类型、动物的年龄和施用途。优选地，组合物的剂量从大约 1 毫克/千克动物体重到大约 10 克/千克动物体重变化。更优选地，剂量从大约 10 毫克/千克动物体重到大约 1 克/千克动物体重变化。

[0210] 将组合物施用给动物可以以每天几次的频率，或者可以以更低的频率

施用，例如一天一次、一周一次、每两周一次、一月一次或者甚至更低的频率如每隔几个月一次或甚至一年一次或更低。给药的频率对熟练的医师是十分明显的，并且取决于许多因素，所述因素例如但不限于被治疗疾病的类型和严重性、动物的类型和年龄等。

[0211] 本发明也包括含有本发明组合物和描述将组合物施用给哺乳动物组织的说明性材料的试剂盒。在另一实施方式中，该试剂盒包括在将本发明组合物施用给哺乳动物之前适用于溶解或悬浮该组合物的(优选无菌的)溶剂。

[0212] 如本文使用的，“说明性材料”包括出版物、记录媒介、图表、或可用于传达试剂盒中本发明的蛋白质实现减轻本文描述的各种疾病或紊乱的有用性的任何其它表达媒介。任选地或可选地，说明性材料可以描述一种或多种缓解哺乳动物细胞或组织中疾病或紊乱的方法。本发明试剂盒的说明性材料可以，例如，附于含有本发明的成分的容器中，或者与含有本发明成分的容器一起运输。可选地，说明性材料可以与容器分开运输，目的是接受者协同使用说明性材料和化合物。

[0213] 可将用于实践本发明的药物组合物施用，以输送与干扰素的标准剂量相等的剂量。

[0214] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合凭处方施用给人的药物组合物，但是技术人员理解，这类组合物通常适合于施用给各种动物。修饰适合施用给人的药物组合物以便使该组合物适合施用给各种动物是很好理解的，普通熟练的兽医药理学家可以仅仅普通的实验——如果有的话，设计和实施这类修饰。考虑来对其施用本发明的药物组合物的对象，包括但不限于人和其它灵长类动物、伴侣动物和其它哺乳动物。

[0215] 适用于本发明的方法的药物组合物可以以适合于经口或可注射施用途径的剂型被制备、包装或出售。

[0216] 本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受载体和任意另外成分的相对量将依赖于被治疗对象的特征、大小（或身材）和症状，并且进一步依赖于施用组合物的途径而变化。

实验实施例

[0217] 现在，本发明参考下述实施例进行描述。这些实施例仅以阐明的目的被提供，本发明绝不应该理解为限制于这些实施例，而应该理解为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0218] 下面描述出现在实验实施例的实验中使用的材料和方法。

实验实施例 1：药物组合物 1

[0219] 脂构建体包括脂质 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸

联十六烷酯、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐), 延伸两亲脂质 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)和干扰素的混合物。

实验实施例 2: 药物组合物 2

[0220] 脂构建体包括脂质 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱、胆固醇、磷酸联十六烷酯、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐), α 干扰素, 延伸两亲脂质 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰), 和/或聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基]双乙酸]的混合物。延伸两亲脂质 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)和聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基]双乙酸]分别以按重量计 $1.68\% \pm 0.5\%$ 和按重量计 $1.2\% \pm 0.5\%$ 的水平加入到脂构建体。

实验实施例 3: 药物组合物 3

[0221] 脂构建体含有两亲脂质 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(12.09g)、胆固醇(1.60g)、磷酸联十六烷酯(3.10g)、聚铬-聚(二)-[N-(2,6-(二异丙基苯基)氨基甲酰甲基)亚氨基]双乙酸](0.20 g)和 α 干扰素的混合物。将该混合物加入到含水介质中, 总质量为 1200g。

实验实施例 4: 制备含有 α 干扰素的脂构建体

[0222] 通过制备两亲脂质分子和延伸两亲脂质的混合物、从两亲脂质分子和延伸两亲脂质的混合物制备脂构建体、以及将 α 干扰素结合入脂构建体, 形成脂构建体。

[0223] 使用下列步骤, 制造两亲脂质分子和延伸两亲脂质的混合物。通过组合等分部分的 1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(5.6881g)、胆固醇晶体(0.7980g)、磷酸联十六烷酯(1.5444g)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(Cap 生物素酰)(0.1436g)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(0.1144g)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-(琥珀酰)(0.1245g)和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油基-3-[磷酸-rac-(1-甘油)](钠盐)(0.1186g), 制备脂构建体的脂质成分的混合物(总质量 8.5316g)。

[0224] 100ml 氯仿:甲醇(2:1 v:v)的溶液在 5.0g 分子筛上脱水。将脂构建体的脂质成分的混合物置于 3 升烧瓶中, 并且将 45ml 该氯仿/甲醇溶液加入该脂质混合物。将溶液放置于带有 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ 水浴的旋转蒸发器上的烧瓶中并缓慢转动。在真空中, 在旋转蒸发器上使用吸气器大约 45 分钟除去氯仿/甲醇溶液, 然后用真空泵大约 2 小时以除去残留溶剂, 形成脂质的固体混合物。可将干燥的脂质混合物于大约

-20°C-0°C 的冷藏箱中不定期储存。

[0225] 使用下列步骤, 从两亲脂质分子和延伸两亲脂质的混合物制备脂构建体。脂质混合物与 pH7.0 的大约 600ml 28.4mM 的磷酸钠(一价-二价的)缓冲液混合。使脂质混合物旋涡振荡, 然后放置于 $80^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ 的加热的水浴中 30 分钟, 同时缓慢转动以水合脂质。

[0226] 使用 pH 在 6.5 - 7.5 之间的 SWI, 将 M-110 EHI 微流化床设备预热到 $70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 。将水合靶复合物的悬浮液转移到微流化床设备并且在大约 9000 psig 下, 通过水合靶分子络合物的悬浮液单程通过流化床, 微流化该悬浮液。在通过微流化床设备后, 收集流化过的悬浮液的未过滤样品(2.0 - 5.0 ml), 以使用来自 Coulter N-4 plus 粒径分析仪的单峰分布数据进行粒径分析。在所有的粒径确定之前, 用 0.2 微米过滤的、pH 已被调节为 6.5 - 7.5 的 SWI 稀释该样品。粒径要求在 0.020 - 0.40 微米的范围内。如果粒径不在此范围内, 那么悬浮液在大约 9000 psig 下再次通过微流化床设备, 并再次分析粒径, 直到达到粒径的要求。在无菌容器中, 收集微流化的靶分子络合物。

[0227] 将微流化的靶分子络合物保持在 $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 同时用连接到 5.0ml 注射器的无菌 0.8 微米+0.2 微米的组合滤器过滤两次。分析等分部分的过滤悬浮液, 以确定悬浮液中颗粒的粒径范围。最终 0.2 微米过滤的样品的粒径范围应该在 0.0200 - 0.2000 微米的范围内, 如通过粒径分析仪的单峰分布打印输出所确定的。

[0228] 使用美国 5,104,661 描述的方法通过反向装载(reverse loading)构建体, 将干扰素装载入构建体, 所述文件通过引用并入本文。

实验实施例 5: 使用方法

[0229] 在具有应答于干扰素肝效应的遗传标记的小鼠模型中, 评估 HDV-干扰素 α 的功效。从 Jackson Laboratory 得到 C57B16 小鼠, 并且在 Cleveland MetroHealth Center, Cleveland, Ohio 建立繁殖集群 (breeding colony)。从繁殖集群得到小鼠。治疗两组小鼠, 一个实验组, 一个对照组。实验组接受干扰素+HDV, 而对照组仅接受干扰素。HDV-干扰素含有 100 mcg HDV 和 10 mcg α 干扰素。HDV 由 Hepasome Pharmaceuticals 供应, 而 Roferon 是 α 干扰素的来源。在注射入小鼠之前, 使 HDV 和 α 干扰素平衡 12 小时。两组鼠都用 100,000U/kg 体重给药。为了检测对 IFN 应答的时限, 将 Roferon 皮下注射入小鼠。给药后 6 小时杀死小鼠。得到杀死的鼠的肝脏和脾脏, 用于分析。

[0230] 双链 RNA 依赖性蛋白激酶(PKR)基因诱导的干扰素刺激应答被用作干扰素肝组织输送的标记。使用实时定量 PCR(聚合酶链反应)测定来分析 PKR 信使核糖核酸(mRNA)水平。使用 Oligo V6 软件, 设计相应于间隔内含子的小鼠 PKR mRNA 外显子序列的寡核苷酸引物, 并且经过在 NCBI 针对基因组和 mRNA 小鼠序列进行 Blast 检索, 该序列被证明是唯一的。设计 30 个以上的引物对, 但是仅

仅选择两对进行实验。使用连续的温度和镁梯度，优化所选择的对的条件。从动物的肝脏和脾脏提取 RNA，然后使用我们所有的随机六聚体和寡-dT 和 M-MLV RT 的混合给量将 RNA 反转录。所产生的 cDNA 经过半定量 PCR，选择 6 小时时间点进行 HDV 实验。用盐水中 HDV-IFN 或者盐水中仅仅 IFN 注射两组小鼠(每组 3 只)。在 6 小时后杀死小鼠，从肝脏和脾脏提取 RNA，并且进行 RT 反应。使用 cybr green 技术在所产生的 cDNA 上，施行实时定量 PCR。在 HDV-IFN 治疗和 IFN 治疗的小鼠的肝脏和脾脏之间进行 PKR 表达水平的对比。

[0231] PKR 结果在图 12 中示出。图 12a 表示 α 干扰素给药小鼠的肝脏和脾脏的相对表达水平。脾脏被选为评估系统输送的替代物。在脾脏中的相对表达水平被比较于肝脏中的相对表达水平。在脾脏中的相对表达水平大约为肝脏中相对表达水平的两倍。图 12b 表示 α 干扰素和 HDV 给药小鼠的肝脏和脾脏的相对表达水平。在肝脏中的相对表达水平大约为脾脏中相对表达水平的两倍。用 HDV-干扰素治疗的小鼠的肝脏中的相对表达水平大约为仅用干扰素治疗的小鼠的肝脏中相对表达水平的两倍。

[0232] 在小鼠模型中，HDV 靶向对通过 α 干扰素的肝 PKR 激活的影响在图 13 中示出。相对于基线，单独干扰素提供大约 5 倍的 PKR 激活增加。相对于基线，HDV-干扰素提供大约 15 倍的 PKR 激活增加，并且相对于单独干扰素，提供大约 3 倍的 PKR 激活增加。通过用 HDV 输送干扰素，肝组织中干扰素活性显著增强。

[0233] 尽管参考具体实施方式公开了本发明，明显地，本发明的其它实施方式和改变可被本领域其他技术人员所设计，而没有背离本发明的真实精神和范围。附加的权利要求拟被解释为包括所有这些实施方式和等同的变化。

图1

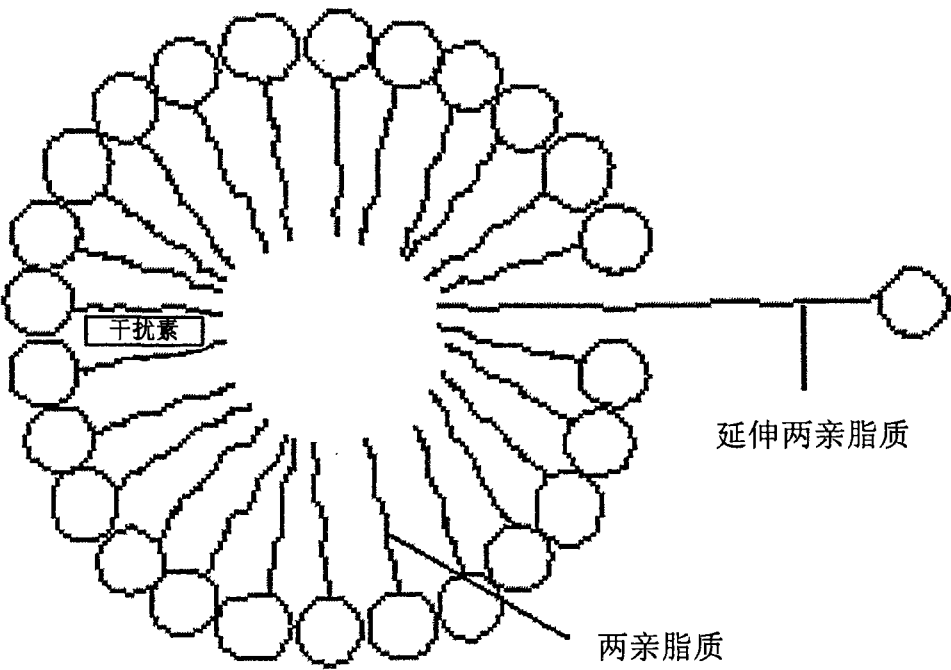


图2

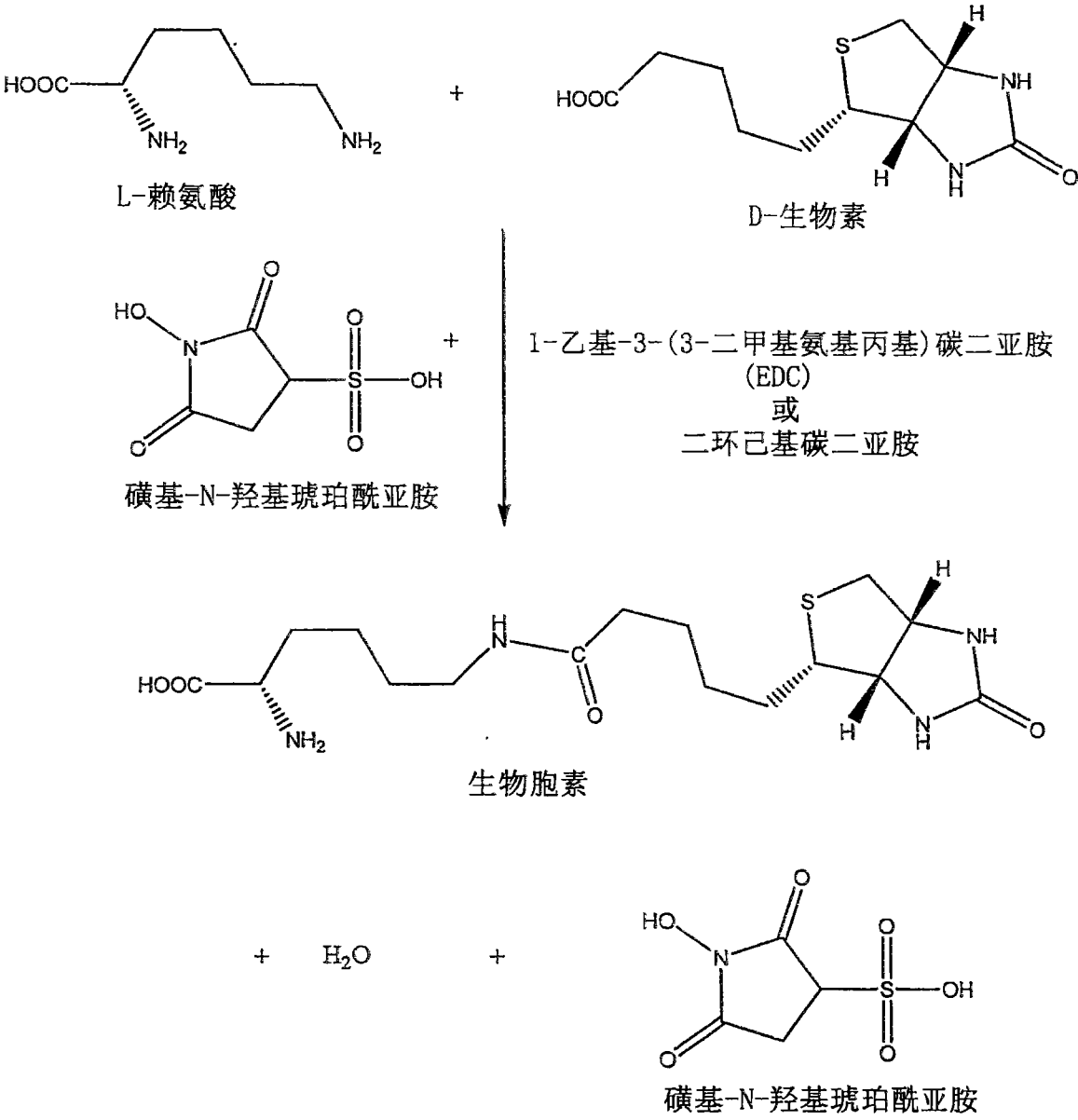


图3

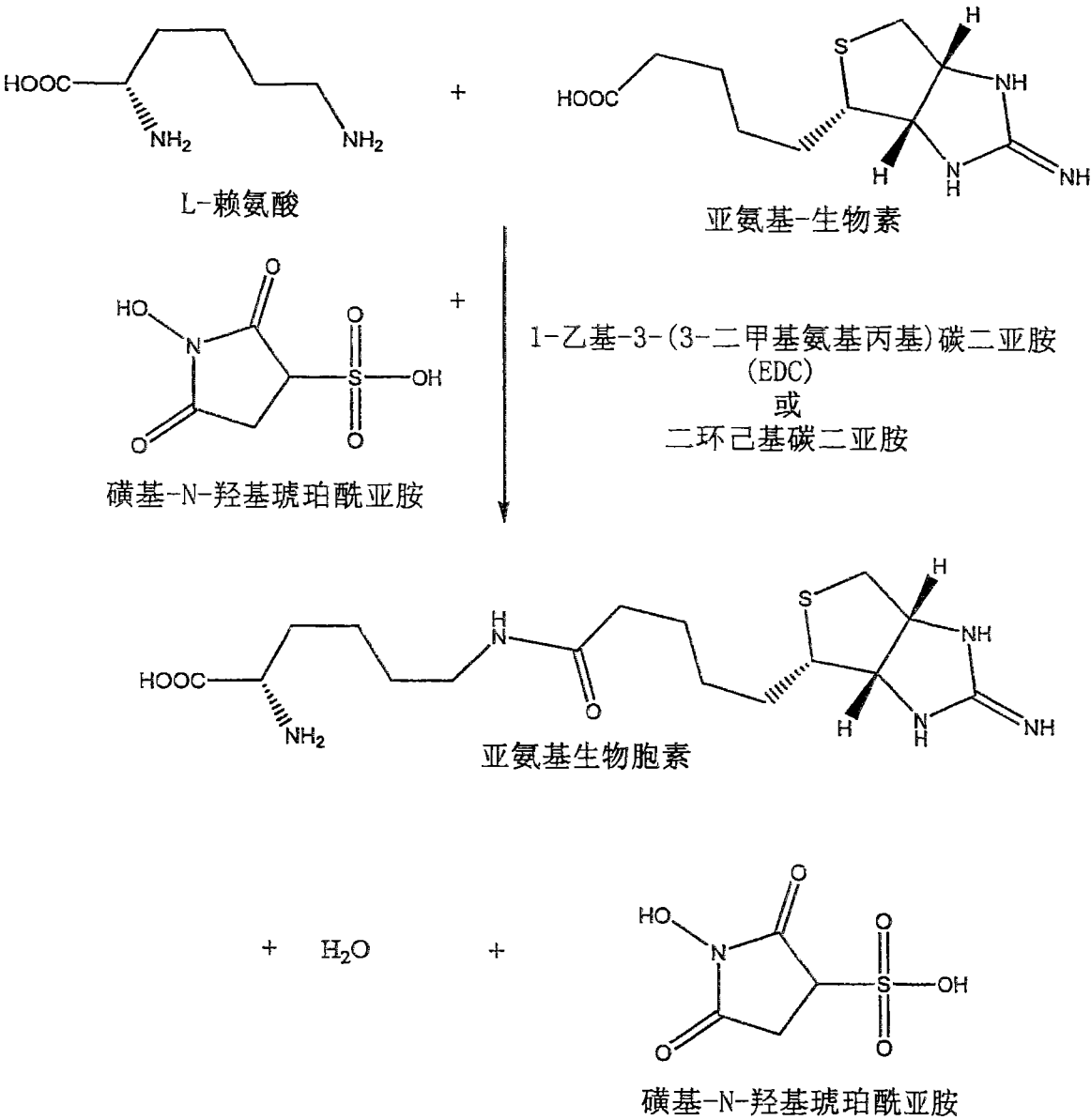


图4

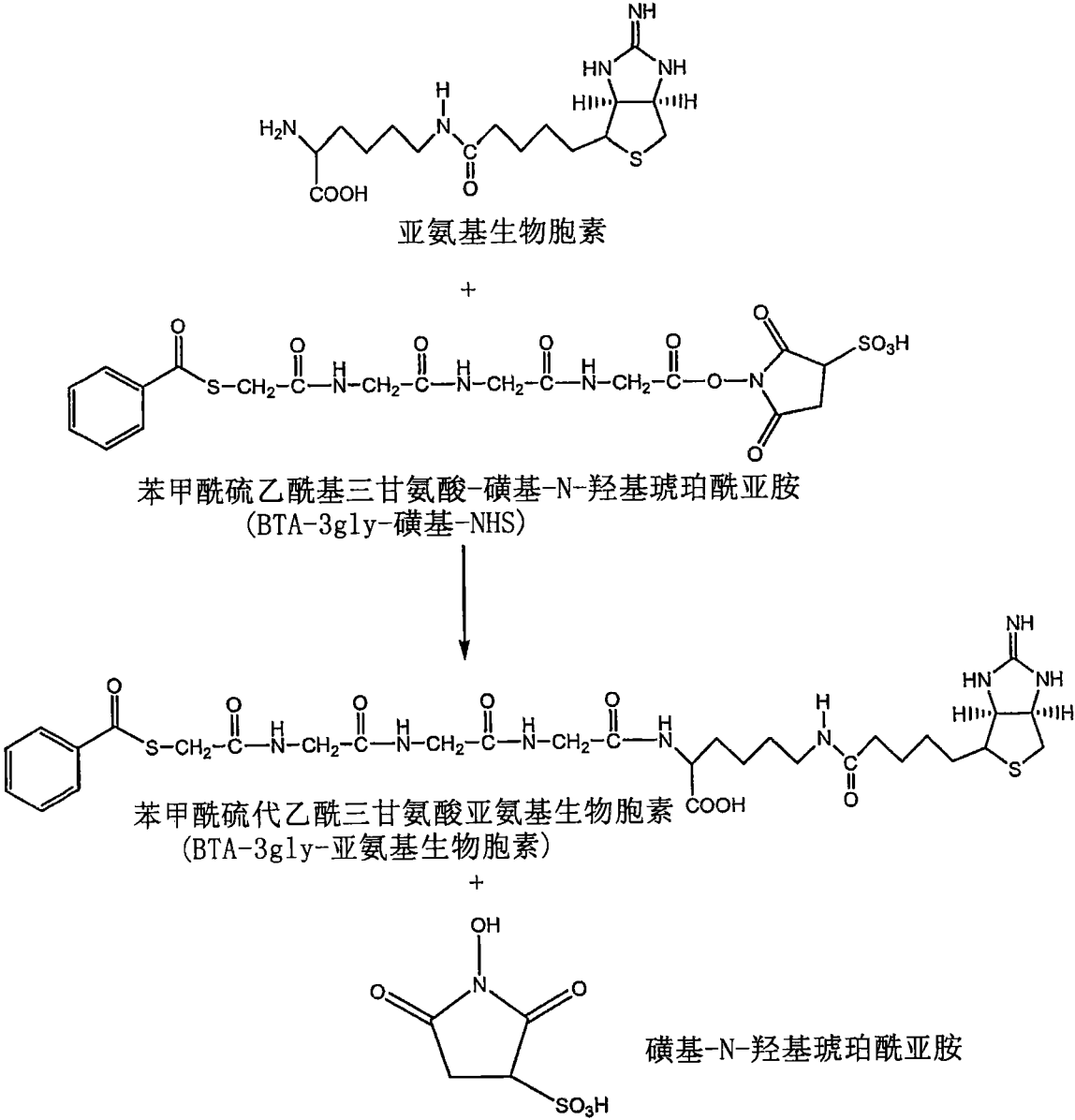


图5

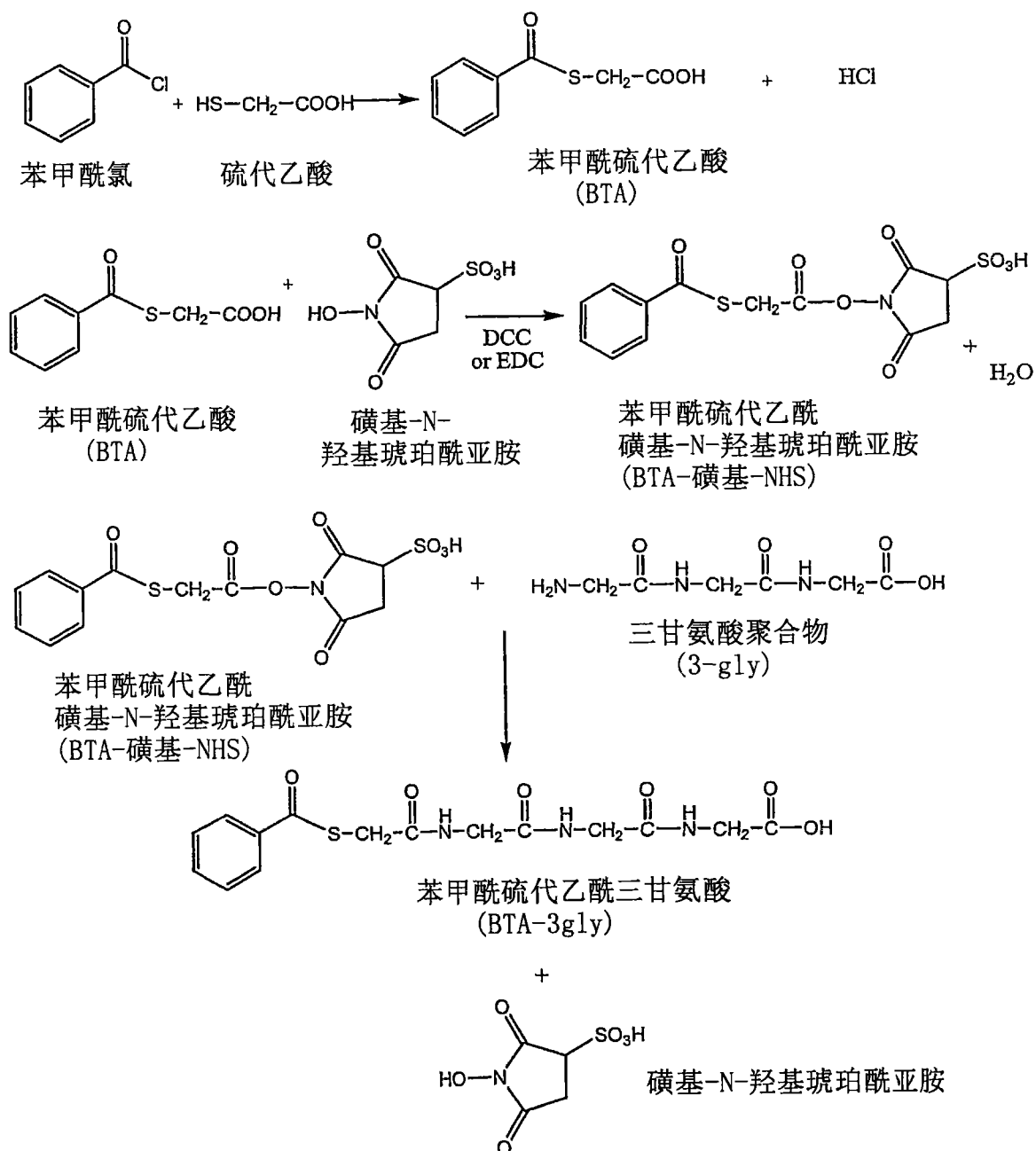


图6

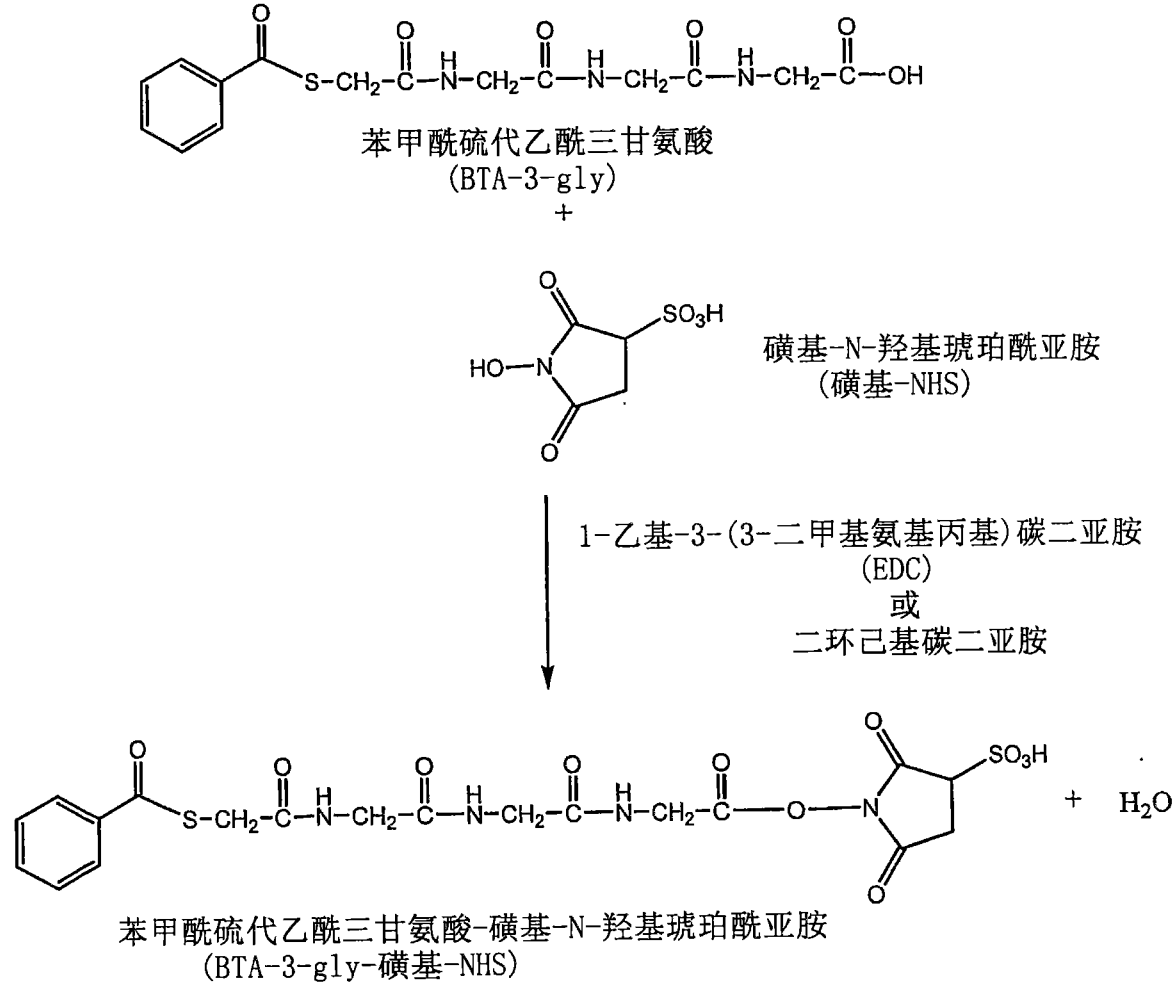


图7

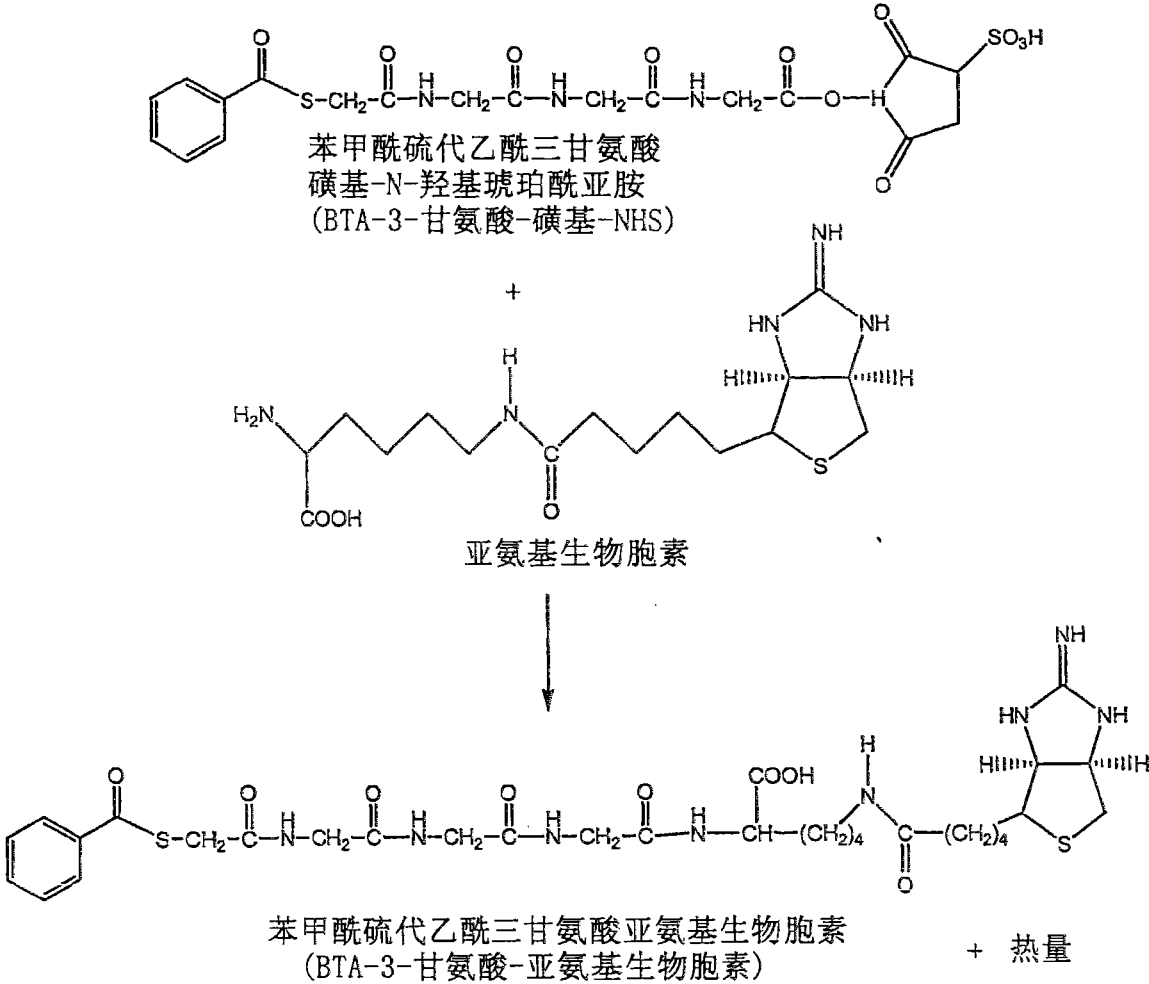
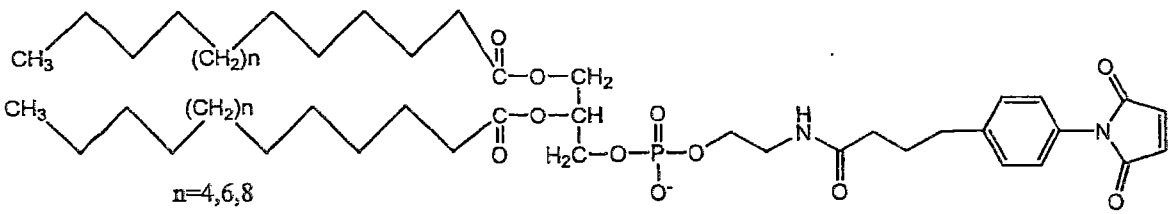
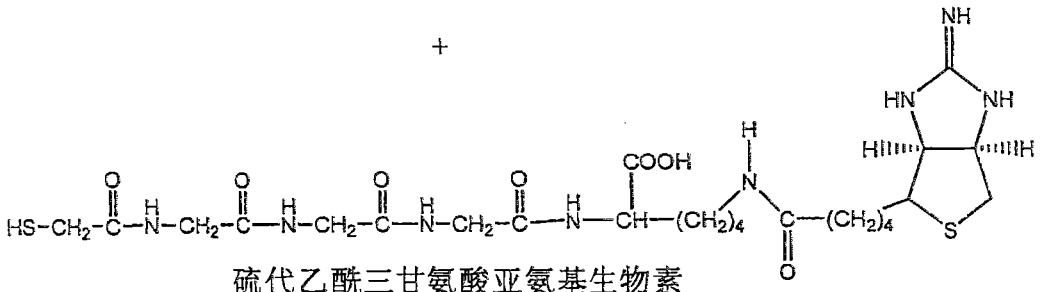


图8



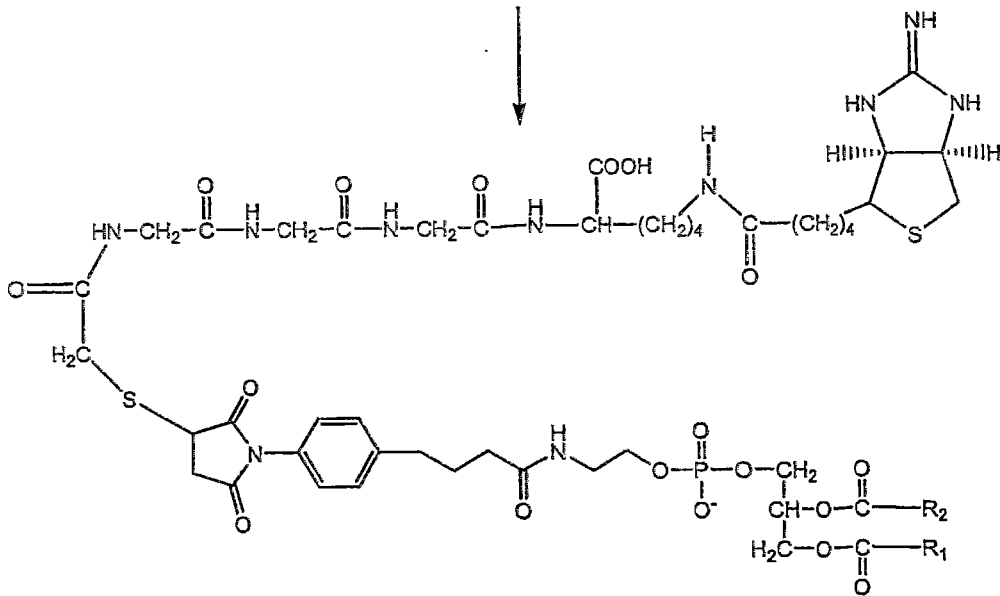
N-对马来酰亚胺基苯基丁酸酯磷脂酰乙醇胺

+



硫代乙酰三甘氨酸亚氨基生物素
(TA-3-gly-亚氨基生物素)

↓



脂质锚定和肝细胞受体结合分子
LA-HRBM

图9

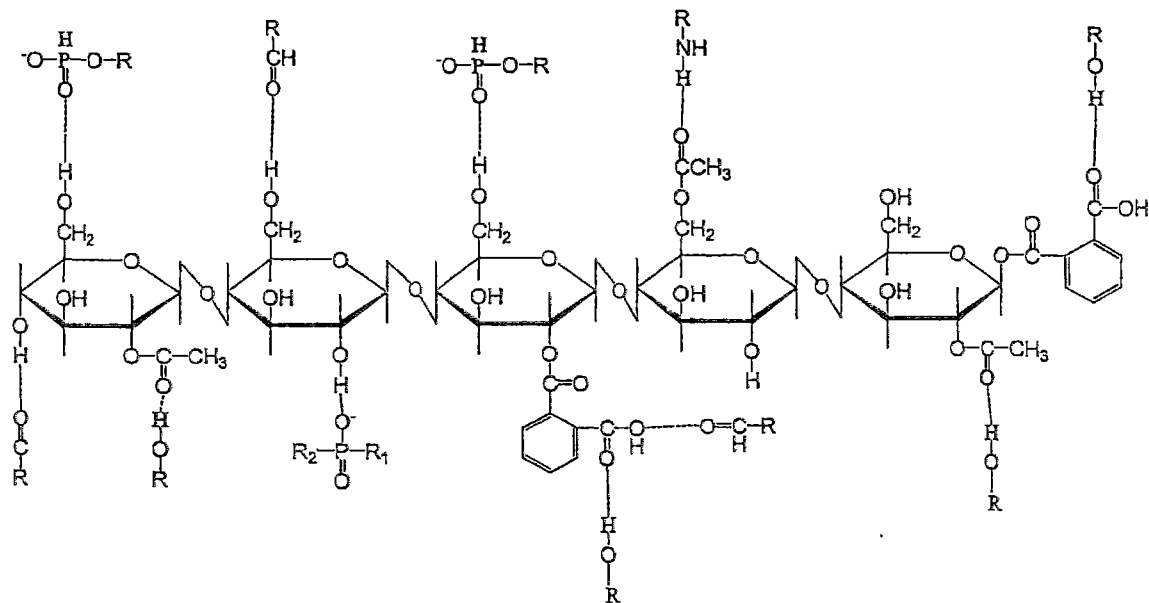


图10

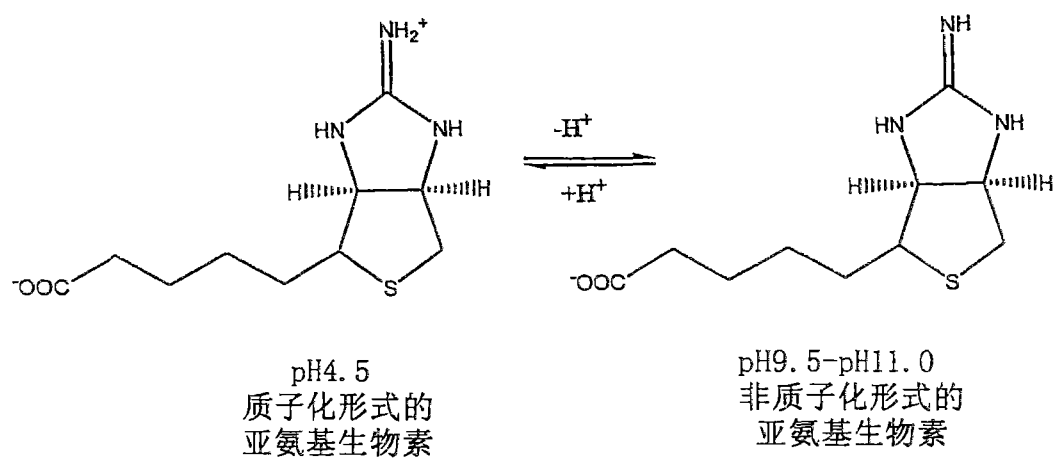
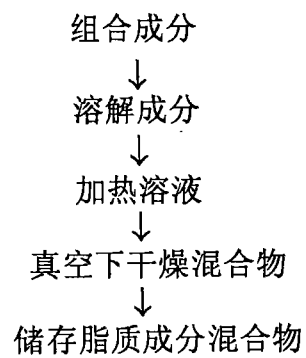
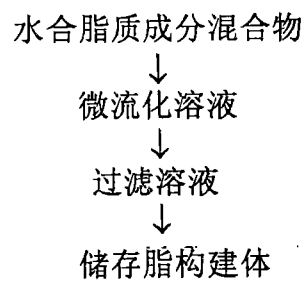


图11

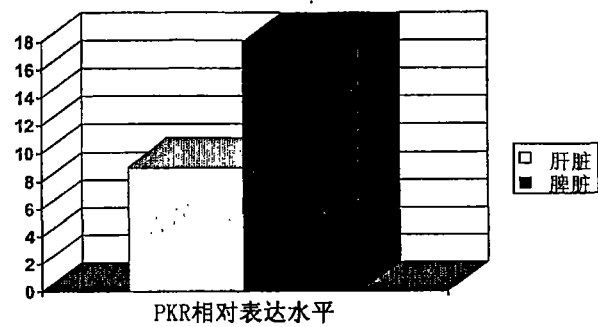
制备脂质成分的混合物从脂质成分形成脂构建体制备含有干扰素的脂构建体

将干扰素加入脂构建体

图12

a)

天然IFN



b)

HDV-IFN

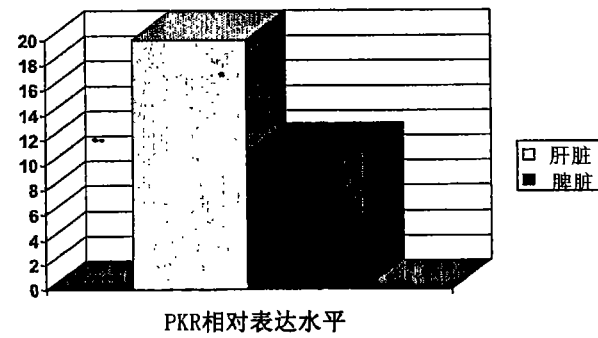


图13

