(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117500510 A
(43)申请公布日 2024.02.02

(21)申请号 202280043337.3
(22)申请日 2022.06.15
(30)优先权数据
63/212468 2021.06.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/033654 2022.06.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/266237 EN 2022.12.22
(71)申请人 周格尼克斯公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D·迪皮特罗
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 童春媛 彭昶
(51)Int.Cl.
A61K 31/7068(2006.01)

权利要求书6页 说明书27页 附图14页

(54)发明名称

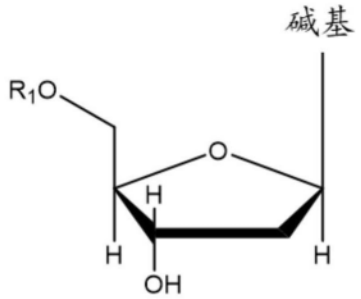
用于治疗由失衡的核苷酸池引起的线粒体疾病的脱氧核苷的前药

(57)摘要

本文提供了脱氧核苷酸前药及其用于治疗以失衡的核苷酸池为特征的疾病如MPV17和脱氧鸟苷激酶缺乏症的方法。

CN 117500510 A

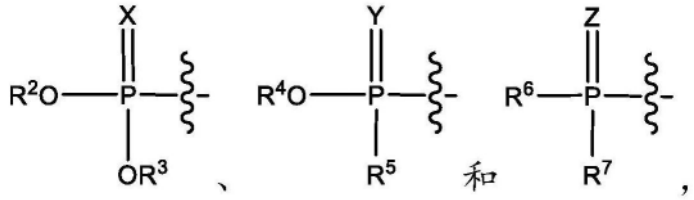
1.一种用于治疗有需要的受试者中选自MPV17和dGK缺乏症的线粒体耗竭疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种式I的前药:



式I

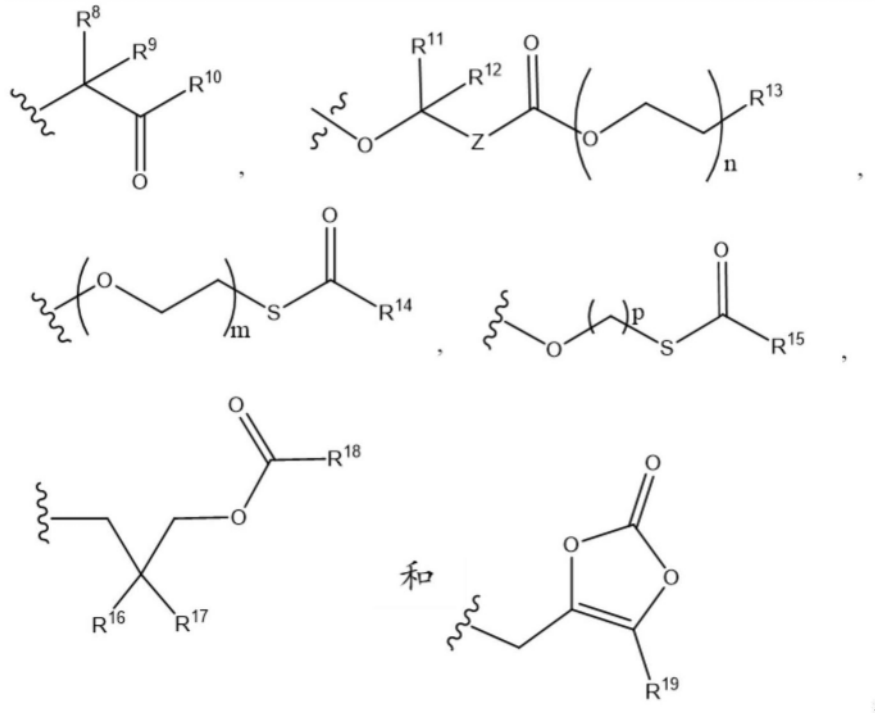
其中碱基是指鸟嘌呤或具有受保护的氨基的鸟嘌呤;

R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、



X、Y和Z各自独立地选自O和S;

R^2、R^3和R^4各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳基(C_{1-6})烷基,



或者R^2和R^3可以一起形成环状部分;

R^5、R^6和R^7各自独立地选自任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、$NR^{20}R^{21}$、任选取代的N-连接的氨基酸、

任选取代的N-连接的氨基酸酯;

R^8、R^9、R^{11}和R^{12}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基;

R^{10}和R^{13}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基、任选取代的-O-C1-24烷基、任选取代的-O-芳基、任选取代的-O-杂芳基、任选取代的-O-单环杂环基;

R^{14}、R^{15}和R^{19}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基和任选取代的芳基;

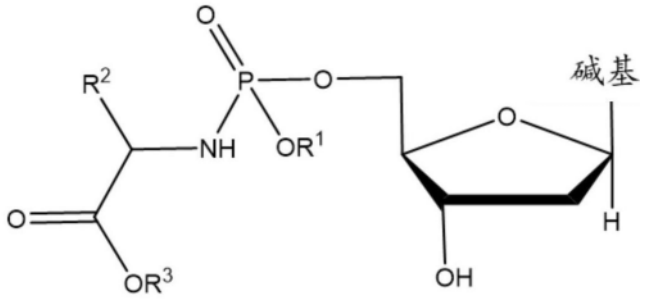
R^{16}和R^{17}各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8}有机基羰基、C_{2-8}烷氧基羰基和C_{2-8}有机基氨基羰基;

R^{18}选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基;

R^{20}和R^{21}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基;并且

n、m和p各自独立地选自0、1、2或3。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述前药是式Ia的化合物:

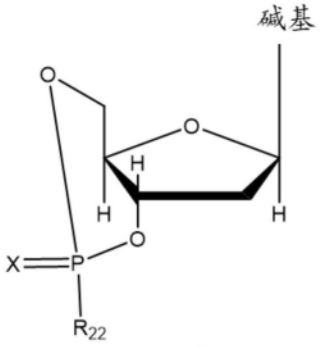


式Ia

其中R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳基(C_{1-6})烷基。

3.根据权利要求2所述的方法,其中R^1是芳基,R^2是C_{1-24}烷基,并且R^3是C_{1-24}烷基。

4.一种用于治疗有需要的受试者中选自MPV17和dGK缺乏症的线粒体耗竭疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种式II的前药:

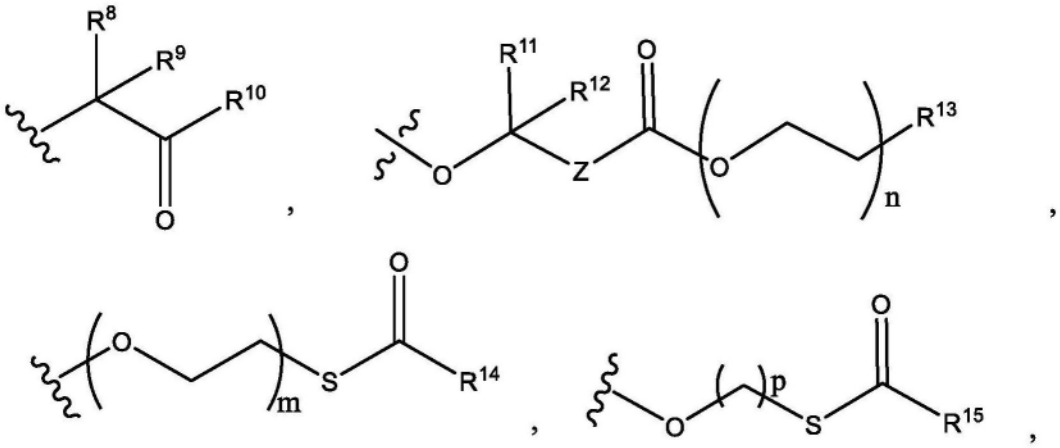


式II

其中碱基是指鸟嘌呤或具有受保护的氨基的鸟嘌呤;

X选自S和O;并且

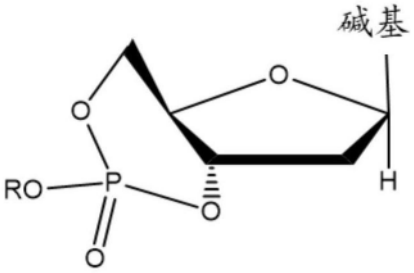
R^{22}选自$-O^-$、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6}烷氧基、



任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯;

其中R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、n、m和p如上所定义。

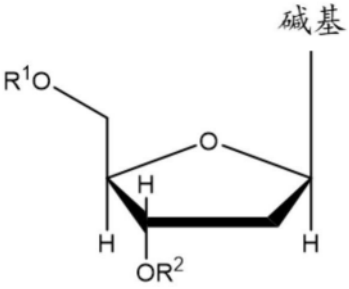
5.根据权利要求4所述的方法,其中所述前药是式IIa的化合物:



式IIa

其中R是C_{1-4}烷基。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述前药是式III的化合物:

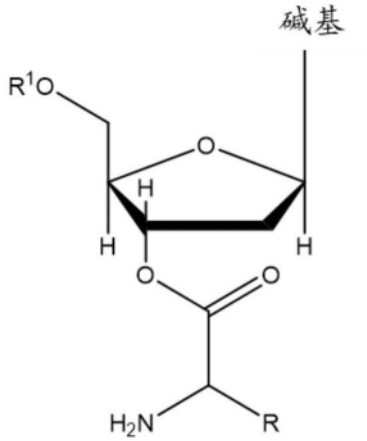


式III

其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基;

R^1和R^2独立地选自氢、磷酸酯(包括单、二或三磷酸酯和式I的改性的磷酸酯);直链、支链或环状的烷基;酰基;CO-烷基、CO-烷氧基烷基;CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酸酯;烷基磺酰基;芳基磺酰基;芳烷基磺酰基;脂质;磷脂;氨基酸;碳水化合物;肽和胆固醇。

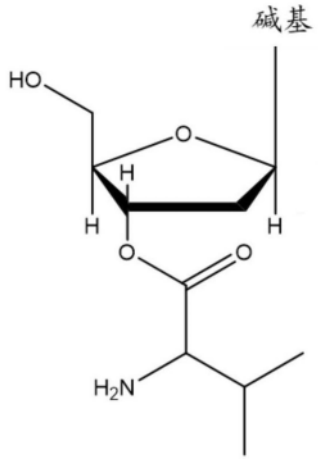
7.根据权利要求6所述的方法,其中所述前药是式IIIa的化合物:



式IIIa

其中R是氨基酸的侧链。

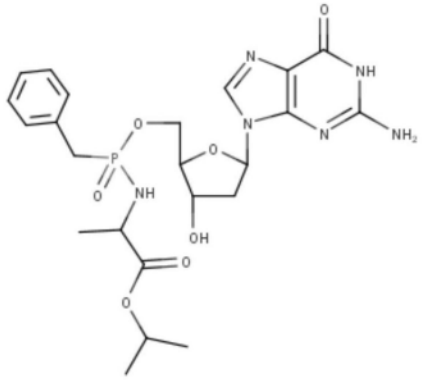
8.根据权利要求6所述的方法,其中所述前药是式IIIb的化合物:



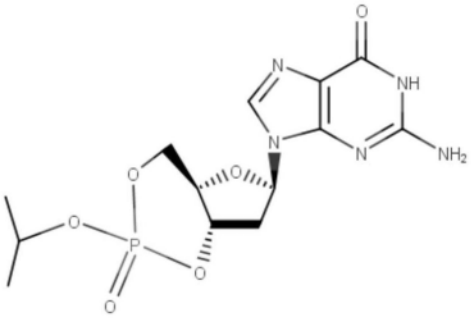
式IIIb

其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基。

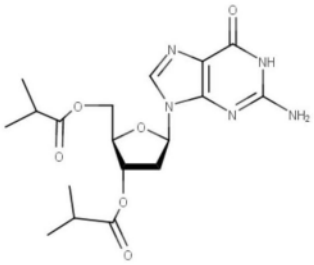
9.根据权利要求1、4或6所述的方法,其中所述至少一种前药选自以下:



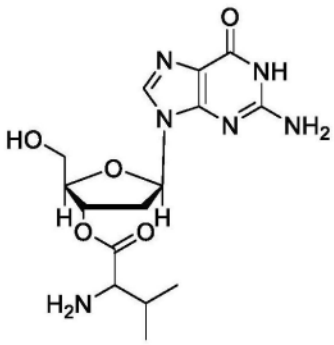
1 (MT103G)



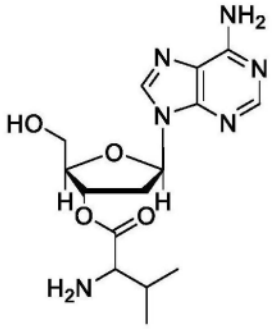
2 (MT102G)



3 (MT105G)

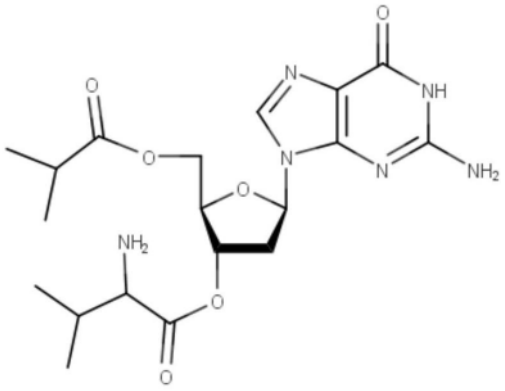


7



8

4 (MT101G)



5 (MT104G))

10.根据权利要求9所述的方法,其中施用第二前药,并且其中所述第二前药的碱基是胞嘧啶。

11.根据权利要求10或11中任一项所述的方法,其中所述dG前药与所述第二前药的重量比是95/5、90/10、85/15、80/20、75/25、70/30、65/35、60/40、55/45或50/50。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述前药以药物组合物的形式施用。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述施用方法是口服。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述施用剂量是约200mg/kg/天至约1,000mg/kg/天。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中施用前药或包含其的组合物每天至

少一次。

16.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中碱基是指鸟嘌呤。

17.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中碱基是指具有受保护的氨基的鸟嘌呤。

用于治疗由失衡的核苷酸池引起的线粒体疾病的脱氧核苷的前药

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年6月18日提交的美国临时申请号63/212,468的优先权,将其通过引用以其整体结合到本文中。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及用于递送单一核苷或其前药的前药,以及所述前药任选地与其他核苷及其前药组合以平衡核苷酸复制池在治疗线粒体DNA耗竭综合征疾病如MPV17和dGK缺乏病症中的用途。

背景技术

[0004] 线粒体携带其自身的DNA(mtDNA),所述DNA编码许多用于线粒体呼吸复合物(OXPHOS复合物)的装配和活性的关键蛋白质。mtDNA被许多蛋白质包裹以形成均匀分布在线粒体基质内的类核,其对线粒体功能是必需的。线粒体DNA(mtDNA)的维持取决于许多核基因编码的蛋白质,包括形成合成mtDNA所需的复制体的一系列酶。这些酶需要以平衡的量存在以恰当地发挥功能。另外,mtDNA合成需要核苷酸的平衡供应,这是通过核苷酸在线粒体内部的再循环和从胞质溶胶的输入来实现的。线粒体DNA维持缺陷是一组由参与mtDNA维持的核基因中的致病性变异引起的疾病,这些致病性变异导致mtDNA合成受损,导致mtDNA方面的定量(mtDNA耗竭)和定性(多个mtDNA缺失)缺陷。由于mtDNA编码的蛋白质合成不足,缺陷型mtDNA导致器官功能障碍,导致能量产生不足以满足受影响器官的需要。MDS作为常染色体隐性或显性性状遗传,并且与范围从轻度成人发作的眼肌麻痹到重度婴儿致命性肝衰竭的广泛表型谱相关。线粒体疾病是临床异质性疾病,其原因在于在通常具有密集能量需求的不同器官中发生的线粒体呼吸链(RC)和氧化磷酸化的缺陷,并且线粒体疾病干扰将电子中的能量转化成三磷酸腺苷(ATP)的生物化学途径。

[0005] 呼吸链由四个多亚基酶(复合物I-IV)构成,这些多亚基酶转移电子以产生跨线粒体内膜的质子梯度,并且通过复合物V实现的质子流驱动ATP合成(DiMauro和Schon 2003;DiMauro和Hirano 2005)。辅酶Q_{10}(Co Q_{10})是将电子从复合物I和II穿梭到复合物III的必需分子。由于受两个基因组:线粒体DNA(mtDNA)和核DNA(nDNA)的控制,呼吸链在真核细胞(例如,哺乳动物)中是独特的。因此,任一基因组中的突变都可能引起线粒体疾病。大多数线粒体疾病影响多个身体器官,并且在早发形式中通常是致命的。对于线粒体疾病,尚无证明有效的治疗,仅有支持性疗法,如施用Co Q_{10}及其类似物以增强呼吸链活性并使作为功能障碍呼吸链酶的毒性副产物的活性氧(ROS)解毒。脱氧胞苷和脱氧胸苷的组合目前正在几个国家针对治疗TK2缺乏症进行临床试验研究。(ClinicalTrials.gov标识符:NCT03845712)嘌呤核苷的有限口服生物利用度限制了直接脱氧鸟苷和/或脱氧腺苷补充用于其他MDS的有用性。

[0006] 线粒体DNA耗竭综合症(MDS),作为线粒体疾病的亚组,是重度儿童脑肌病、肝脑病

或肝特异性疾病的常见原因,其分子特征在于线粒体DNA(mtDNA)拷贝数减少或mtDNA耗竭在组织中积累以及线粒体RC复合物合成不足(Hirano等人2001)。已经鉴定出若干核基因中的突变是婴儿MDS的原因,包括:TK2、DGUOK(或dGK,如本文在一些情况下所用,其与指定二酰基甘油激酶的DGK区分开)、POLG、POLG2、SCLA25A4、MPV17、RRM2B、SUCLA2、SUCLG1、TYMP、OPA1和C10orf1(PEO1)(Bourdon等人2007;Copeland 2008;Elpeleg等人2005;Mandel等人2001;Naviaux和Nguyen 2004;Ostergaard等人2007;Saada等人2003;Sarzi等人2007;Spinazzola等人,2006)。另外,这些核基因中的突变也可以引起mtDNA的多重缺失,而具有或不具有mtDNA耗竭(Behin等人2012;Garone等人2012;Longley等人2006;Nishino等人1999;Paradas等人2012;Ronchi等人2012;Spelbrink等人2001;Tyynismaa等人2009;Tyynismaa等人2012;Van Goethem等人2001)。

[0007] 脱氧鸟苷激酶(dGK:dG(脱氧鸟苷)激酶)是线粒体嘌呤核苷酸补救途径中的必需限速组分,由编码脱氧鸟苷激酶的核基因(DGUOK)编码。DGUOK的突变通常在肝脏和大脑中导致mtDNA耗竭,引起肝脑表型,并且它是参与用于mtDNA复制的前体合成的两种线粒体脱氧核苷补救途径酶之一。使用核苷三磷酸作为磷酸供体,dGK负责嘌呤脱氧核苷的初始限速磷酸化。DGOUK基因中的突变与MDS(mtDNA耗竭综合征)疾病的肝特异性和肝脑形式相关。脱氧单磷酸又转化为二磷酸和三磷酸,以并入mtDNA中。先前表明,在培养的细胞中,向培养液中单独添加50μm脱氧鸟苷作为补充足以增加来自具有DGUOK突变的患者的成纤维细胞中的mtDNA拷贝数(Camara等人2014)。最近,产生了斑马鱼突变体dGK模型,并且这些纯合突变体展现出mtDNA量的特征性减少,但不具有可见的表型。对此的一种可能的解释可以是被细胞质酶脱氧胞苷激酶(dCK)补偿。与在成纤维细胞培养物中进行的实验类似,通过单独添加脱氧鸟苷来增加dGK突变鱼中的mtDNA水平的尝试导致模型中的mtDNA水平降低。这表明仅一种底物核苷的浓度就可能引入dNTP池中的失衡,从而干扰mtDNA复制,并且结果降低mtDNA拷贝数。然而,在向dGK突变鱼补充两种嘌呤核苷的进一步实验中,检测到肝脏mtDNA拷贝数显著增加(Munro等人2019)。

[0008] dGK临床表现:

[0009] 疾病发作主要是在新生儿阶段、婴儿期或儿童期。它是一种导致线粒体耗竭的常染色体隐性遗传病。该疾病表现为肝病和脑病的症状。患者通常最初表现为低血糖和乳酸酸中毒。另外,在受影响新生儿的新生儿筛查中,酪氨酸或苯丙氨酸的血清浓度升高是明显的,并且肝脏转氨酶、γ谷氨酰转移酶(GGT)和高结合胆红素血症通常升高。患者具有可变的神经肌肉表型,但症状可以包括发育退步、张力减退、重度肌病、旋转性眼球震颤和斜视性眼阵挛。

[0010] 通过在三个肝脑MDS家族中的疾病分离突变鉴定出Mpv17,并且证明MPV17是线粒体内膜蛋白,并且其缺乏或功能障碍不仅在受影响个体中而且在Mpv17-/-小鼠中引起氧化磷酸化(OXPHOS)失败和mtDNA耗竭。(Spinazzola等人2006)。最近的报道已经表明MPV17是参与将脱氧核苷酸输入到线粒体中的蛋白质,并且其功能障碍以婴儿发作形式和更罕见地成人发作形式二者引起疾病。婴儿发作形式的特征在于重度肝-脑MDS,并且成人发作形式的特征在于具有缺失的神经肌肉或多系统表型。(El-Hattab等人2018)。

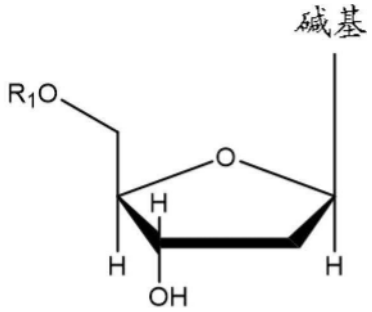
[0011] 需要治疗许多形式的MDS和其他以失衡的核苷酸池为特征的疾病,例如在US10471087中已经描述的。例如,具有mtDNA耗竭或多重缺失或两者的几种孟德尔病的特征

在于失衡的脱氧核苷三磷酸池,其导致mtDNA复制的缺陷。其他破坏线粒体dNTP池的核基因包括TK2、TYMP、RRM2B、SUCLA2、SUCLG1和POLG。恢复dNTP池平衡的疗法对于治疗这些病症也是有用的,尤其是施用单一前药药剂将提供给药和患者依从性的优点。

发明内容

[0012] 本发明总体上涉及脱氧鸟苷的前药,其用于将脱氧核苷或脱氧核苷酸递送至dGK或MPV17缺乏病症影响的组织,任选地包括旨在平衡核苷酸池的其他核苷/核苷酸的一种或多种前药。已经出人意料地发现,单独用(dG)脱氧鸟苷、或单独用作为根据本发明的前药施用的dG进行治疗足以增加dGK或MPV17缺乏病症中的mtDNA拷贝数。

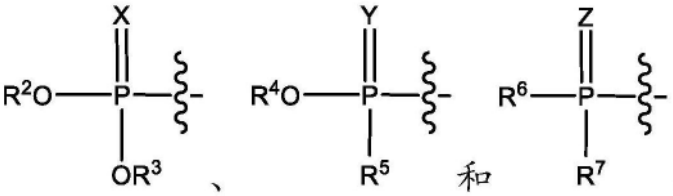
[0013] 一方面,本发明提供了用于核苷补充治疗线粒体耗竭综合征的式I化合物:

[0014] 

式I

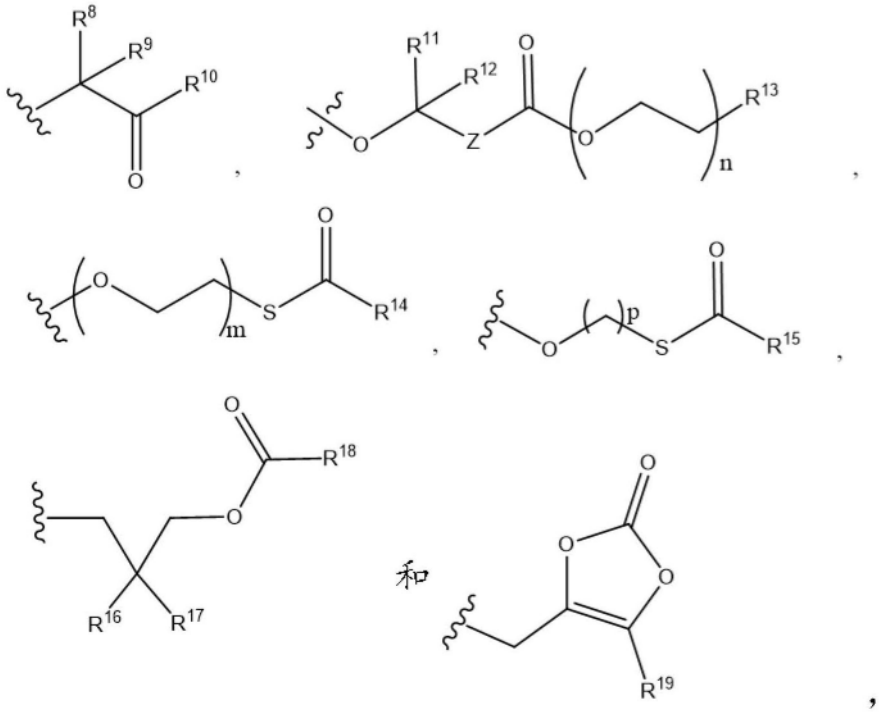
[0015] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基;

[0016] R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、



、 和 , X、Y和Z各自独立地选自O和S;

[0017] R^2、R^3和R^4各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳基(C_{1-6})烷基,

[0018] 

[0019] 或者R^2和R^3可以一起形成环状部分；

[0020] R^5、R^6和R^7各自独立地选自任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、$NR^{20}R^{21}$、任选取代的N-连接的氨基酸、任选取代的N-连接的氨基酸酯；

[0021] R^8、R^9、R^{11}和R^{12}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基；

[0022] R^{10}和R^{13}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基、任选取代的-O-C1-24烷基、任选取代的-O-芳基、任选取代的-O-杂芳基、任选取代的-O-单环杂环基；

[0023] R^{14}、R^{15}和R^{19}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基和任选取代的芳基；

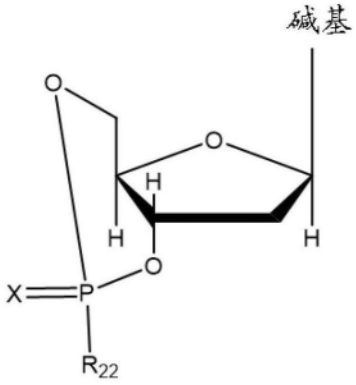
[0024] R^{16}和R^{17}各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8}有机基羰基、C_{2-8}烷氧基羰基和C_{2-8}有机基氨基羰基；

[0025] R^{18}选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基；

[0026] R^{20}和R^{21}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基；并且

[0027] n、m和p各自独立地选自0、1、2或3。

[0028] 在另一方面，前药是式II的核苷/单核苷酸化合物：

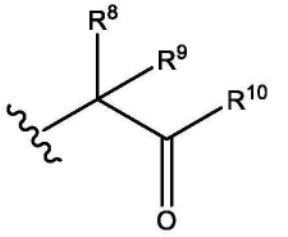
[0029] 

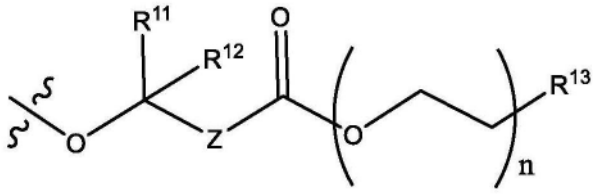
式II

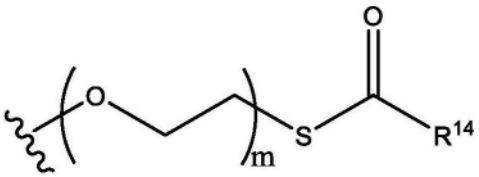
[0030] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基；

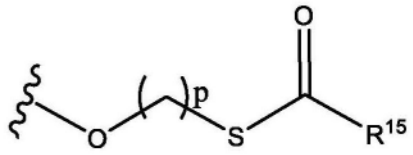
[0031] X选自S和O；并且

[0032] R^{22}选自-O^-、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6}烷氧基、

[0033] 

，

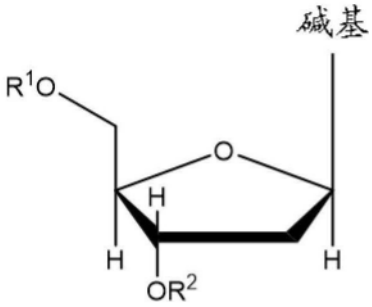


，

，任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯；

[0034] 其中R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、n、m和p如上所定义。

[0035] 在仍另一个方面，前药是式III的化合物：

[0036] 

式III

[0037] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基；

[0038] R^1和R^2独立地选自氢、磷酸酯(包括单、二或三磷酸酯和式I的改性的磷酸酯)；直链、支链或环状的烷基；酰基；CO-烷基、CO-烷氧基烷基；CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酸酯；烷基磺酰基；芳基磺酰基；芳烷基磺酰基；脂质；磷脂；氨基酸；碳水化合物；肽和胆固醇。

[0039] 在一个实施方案中,式I、II和III中的每一个中的碱基是指鸟嘌呤。

[0040] 在一个实施方案中,式I、II和III中的每一个中的碱基是指具有胺保护基团的鸟嘌呤。氨基保护基团的实例包括而不限于氨基甲酸酯-保护基团,如2-三甲基甲硅烷基乙氧羰基(Teoc)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙氧羰基(Bpoc)、叔丁氧羰基(BOC)、烯丙氧基羰基(Alloc)、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)和苄氧羰基(Cbz);酰胺-保护基团,如甲酰基、乙酰基、三卤代乙酰基、苯甲酰基和硝基苯基乙酰基;磺酰胺-保护基团,如2-硝基苯磺酰基;和亚胺-和环状酰亚胺-保护基团,如邻苯二甲酰亚氨基和二硫代琥珀酰亚氨基(dithiasuccinoyl)。

[0041] 在又另一个方面,本发明还总体上涉及治疗有需要的受试者中以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种本发明的前药。前药可以以其本身(即单独地)或以药物组合物的形式施用。

[0042] 合适的疾病或病症包括但不限于MPV17缺乏症和dGK突变。

[0043] 施用可以经由任何途径进行,所述途径包括但不限于口服、胃饲管、鞘内、肠胃外、粘膜和经皮施用。

[0044] 至少一种前药或包含其的组合物的施用量可以是约15mg/kg/天至约500mg/kg/天。

附图说明

[0045] 图1A、图1B和图1C分别比较MPV17敲除小鼠和正常对照在肝脏、肾脏和脑中的核苷水平。图1A显示肝脏线粒体中dTTP和dGTP的显著耗竭。结果进一步表明MPV $17^{-/-}$小鼠中的肝脏线粒体(图1A)揭示dGTP和dTTP脱氧核苷酸的缺乏,而肾脏线粒体(图1B)或脑线粒体(图1C)并非如此。

[0046] 图2显示在MPV17缺乏人成纤维细胞中用核苷补充进行的早期研究的结果。图2示出了添加到细胞培养液中的核苷的各种组合。缩写GdR对应于dG,TdR对应于dT,并且A/CdR对应于dA和dC的混合物,等等。

[0047] 图3呈现了3'Val-dG(MT101G)的合成方案,并且在以下实施例中进一步描述。

[0048] 图4呈现了3'Val-dA(MT101A)的合成方案,并且在以下实施例中进一步描述。

[0049] 图5呈现了3'Val,5'异丁酰基dG(MT104G)的合成方案,并且在以下实施例中进一步描述。

[0050] 图6A呈现了3',5'二异丁酰基dG(MT104G)的起始材料、产率和结构。图6B呈现了3',5'二异丁酰基dA(MT104A)的起始材料、产率和结构。这两者在以下实施例中进一步描述。

[0051] 图7呈现了治疗组和未治疗组中肝脏MPV$17^{-/-}$小鼠中mtDNA拷贝数的qPCR测量结果的条形图。所述图表示每个实验组的平均值±SEM。所有治疗都代表75mg/kg dC或75mg/kg dG的摩尔当量。

[0052] 图8A、图8B和图8C呈现了对前药治疗MPV$17^{-/-}$小鼠的效果的进一步研究结果。图8A、图8B和图8C示出在实验组和未治疗组之间的体重增加类似。图8A呈现了敲除(KO)同窝仔群组和给药方案的组合。图8B和图8C示出在治疗组和未治疗组中幼仔体重增加的曲线图。

[0053] 图8D呈现了每给药组MPV17$^{-/-}$小鼠的肝脏中mtDNA拷贝数的qPCR测量结果的条形图,比较了野生型、未治疗的MPV17$^{-/-}$小鼠和用包含dG和dC的组合的MT101和MT104治疗的治疗的MPV17$^{-/-}$小鼠。所述图表示各实验组的平均值±SD。将每个实验组的值与在未治疗的MPV17$^{-/-}$动物中获得的值用Kruskal-Wallis检验、随后用Dunn's非参数检验进行比较。P值为*p<0.05和***p>0.001。20%和50%分别代表相当于75至200mg/kg dG的摩尔当量。

[0054] 图8E、图8F和图8G呈现了几种OXPHOS(氧化磷酸化)组分蛋白水平的条形图,比较了野生型、未治疗的MPV17$^{-/-}$敲除小鼠和用包含dG和dC组合的本发明的MT101和MT104治疗的治疗的MPV17$^{-/-}$小鼠。如图8D所示,对于每种给药方案确定复合物I(Ndufb8)、复合物III(Core2)和复合物V(Atp5a)的OXPHOS组分。

[0055] 图9呈现了肝脏MPV17$^{-/-}$小鼠中mtDNA拷贝数的qPCR测量结果的条形图。图9比较了野生型、未治疗的MPV17$^{-/-}$小鼠和用单一核苷前药和未衍生的dG和dC治疗的MPV17$^{-/-}$小鼠。所述图表示每个实验组的平均值±SEM。所有治疗都代表75mg/kg dC和/或75mg/kg dG的摩尔当量。

具体实施方式

[0056] I.定义

[0057] 如本文所用,"受试者"是指哺乳动物。哺乳动物包括犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、牛科动物、马科动物、猪科动物(porcine)、羊科动物(ovine)和灵长类动物。因此,本发明可以用于兽医学中,例如以治疗伴侣动物、农场动物、动物园中的实验动物和野生动物。本发明对于人类医学应用是特别合意的。

[0058] 如本文所用,"患者"是指人受试者。在本发明的一些实施方案中,"患者"已知或疑似患有以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症、线粒体疾病、线粒体DNA耗竭综合征或dGK或MPV17缺乏疾病。

[0059] 如本文所用,"治疗有效量"是指足以引起受试者中临床显著病症的改进,或延迟或最小化或减轻与疾病或病症相关的一种或多种症状,或导致受试者中所需的生理有益变化的量。

[0060] 如本文所用,"治疗(treat)"、"治疗(treatment)"等是指减慢、缓解、改善或减轻疾病或病症的症状中的至少一种,或在疾病或病症发作之后逆转疾病或病症的手段。

[0061] 如本文所用,"预防(prevent)"、"预防(prevention)"等是指在明显的疾病或病症发作前起作用,以防止疾病或病症发展或使疾病或病症的程度最小化,或减慢其发展过程。

[0062] 如本文所用,"有需要"是指已知或怀疑患有或有风险患上以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症、线粒体疾病、线粒体DNA耗竭综合征如MPV17缺乏或dGK缺乏疾病的受试者。

[0063] 如本文所用,"前药"是指在使用条件下如在体内经历转化以释放脱氧核苷的脱氧核苷衍生物。前药通常但不一定是药理学上无活性的,直到转化为活性形式。前药可以通过将前体部分(通常经由官能团)与药物结合而获得。

[0064] 如本文所用,"前体部分"是指经由在指定使用条件下可裂解的键与脱氧核苷(通常官能团)键合的基团。药物和前体部分之间的键可以通过酶促或非酶促手段裂解。在使用条件下,例如在施用于患者后,药物和前体部分之间的键可以裂解以释放母体药物。前体部

分的裂解可以自发地进行,如经由水解反应进行,或者其可以通过另一种试剂,如通过酶、通过光、通过酸催化或诱导,或通过改变或暴露于物理或环境参数,如改变温度、pH等进行。所述试剂可以是使用条件内源性的,如存在于施用前药的患者的体循环中的酶或胃的酸性条件,或者所述试剂可以是外源性供应的。

[0065] 如本文所用,“不良作用”是由药物施用引起的不希望的反应。在大多数情况下,脱氧核苷的施用不引起不良作用。最意料之中的不良作用将是轻微的胃肠道不耐受。

[0066] 如本文所用,“约”或“大约”意指在如由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,所述可接受误差范围将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的限制,即对于特定目的如药物制剂所需的精确度。例如,根据本领域的实践,“约”可以意指在1个或超过1个标准差内。可替代地,“约”可以意指给定值的至多20%、优选至多10%、更优选至多5%、并且还更优选至多1%的范围。可替代地,特别是对于生物系统或过程,所述术语可以意指在值的一个数量级内,优选在5倍内,并且更优选在2倍内。在本申请和权利要求中描述特定值的情况下,除非另有说明,否则应当认为术语“约”意指在所述特定值的可接受误差范围内。

[0067] 当基团被描述为“任选取代的”时,所述基团可以是未取代的或被所指示的取代基中的一个或多个取代。同样,当基团被描述为“未取代的或取代的”时,如果是取代的,则取代基可以选自一个或多个所指示的取代基。如果没有指示出取代基,则意味着所指示的“任选取代的”或“取代的”基团可以被一个或多个单独地且独立地选自下述的基团取代:烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、杂环基(烷基)、羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤素、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异硫氰酸基、叠氮基、硝基、甲硅烷基、氧硫基、亚磺酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲磺酰基、三卤代甲磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基以及其受保护的衍生物。

[0068] 如本文所用的术语“保护基团”或“受保护的衍生物”是指本领域已知的不稳定化学部分,其保护包括而不限于羟基、氨基和硫醇基的反应性基团使其通常在合成程序期间中免于不期望的反应。保护基团通常选择性地和/或正交地用于在其他反应位点的反应期间保护位点,然后可以被去除以留下未保护的基团,所述未保护的基团保持原样或可用于进一步的反应。本领域已知的保护基团一般描述于Greene’sProtective Groups in Organic Synthesis,第4版,John Wiley&Sons,New York,2007中。

[0069] 基团可以选择性地结合到如本文中作为前体而提供的化合物中。例如,氨基可以作为叠氮基置于如本文提供的化合物中,所述叠氮基可以在合成中的所需点化学转化为氨基。通常,基团被保护或作为前体存在,它们对于修饰母体分子的其他区域的反应是惰性的,以便在适当的时间转化成其最终基团。其他代表性保护基团或前体基团在Agrawal等人,Protocols for Oligonucleotide Conjugates,Humana Press;New Jersey,1994,26,1-72中论述。可替代地,保护基团可以作为最终产物的成分而保留。

[0070] 氨基保护基团的实例包括而不限于氨基甲酸酯-保护基团,如2-三甲基甲硅烷基乙氧羰基(Teoc)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙氧羰基(Bpoc)、叔丁氧羰基(BOC)、烯丙氧基羰基(Alloc)、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)和苄氧羰基(Cbz);酰胺-保护基团,如甲酰基、乙酰基、三

卤代乙酰基、苯甲酰基和硝基苯基乙酰基;磺酰胺-保护基团,如2-硝基苯磺酰基;和亚胺-和环状酰亚胺-保护基团,如邻苯二甲酰亚氨基和二硫代琥珀酰亚氨基。

[0071] 羟基保护基团的实例包括而不限于乙酰基、叔丁基、叔丁氧基甲基、甲氧基甲基、四氢吡喃基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、对氯苯基、2,4-二硝基苯基、苄基、2,6-二氯苄基、二苯基甲基、对硝基苄基、双(2-乙酰氧基乙氧基)甲基(ACE)、2-三甲基甲硅烷基乙基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三苯基甲硅烷基、[(三异丙基甲硅烷基)氧基]甲基(TOM)、苯甲酰基甲酸酯、氯乙酰基、三氯乙酰基、三氟乙酰基、新戊酰基、苯甲酰基、对苯基苯甲酰基、9-芴基甲基碳酸酯、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、三苯基甲基(三苯甲基)、单甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基(DMT)、三甲氧基三苯甲基、1(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基(FPMP)、9-苯基黄嘌呤-9-基(Pixyl)和9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。其中更常用的羟基保护基团包括而不限于苄基、2,6-二氯苄基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、苯甲酰基、甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、二甲氧基三苯甲基(DMT)、9-苯基黄嘌呤-9-基(Pixyl)和9-(对甲氧基苯基)黄嘌呤-9-基(MOX)。

[0072] 通常用于保护磷酸酯和磷羟基的保护基团的实例包括而不限于甲基、乙基、苄基(Bn)、苯基、异丙基、叔丁基、烯丙基、环己基(cHex)、4-甲氧基苄基、4-氯苄基、4-硝基苄基、4-酰氧基苄基、2-甲基苯基、2,6-二甲基苯基、2-氯苯基、二苯基甲基、4-甲硫基-1-丁基、2-(S-乙酰硫基)乙基(SATE)、2-氰基乙基、2-氰基-1,1-二甲基乙基(CDM)、4-氰基-2-丁烯基、2-(三甲基甲硅烷基)乙基(TSE)、2-(苯硫基)乙基、2-(三苯基甲硅烷基)乙基、2-(苄基磺酰基)乙基、2,2,2-三氯乙基、2,2,2-三溴乙基、2,3-二溴丙基、2,2,2-三氟乙基、苯硫基、2-氯-4-三苯甲基苯基、2-溴苯基、2-[N-异丙基-N-(4-甲氧基苯甲酰基)氨基]乙基、4-(N-三氟乙酰基氨基)丁基、4-氧代戊基、4-三苯甲基氨基苯基、4-苄基氨基苯基和吗啉代。其中更常用的磷酸酯和磷保护基团包括而不限于甲基、乙基、苄基(Bn)、苯基、异丙基、叔丁基、4-甲氧基苄基、4-氯苄基、2-氯苯基和2-氰基乙基。

[0073] 如本文所用,“Ca至Cb”(其中“a”和“b”是整数)是指烷基、烯基或炔基中的碳原子数,或环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环基的环中的碳原子数。即,烷基、烯基、炔基、环烷基的环、环烯基的环、芳基的环、杂芳基的环或杂环基的环可以含有“a”至“b”个碳原子,包括端值。因此,例如,“C1至C4烷基”是指具有1至4个碳的所有烷基,即CH_3-、CH_3CH_2-、$CH_3CH_2CH_2$-、$(CH_3)_2CH$-、$CH_3CH_2CH_2CH_2$-、$CH_3CH_2CH(CH_3)$-和$(CH_3)_3C$-。如果关于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环基没有指定“a”和“b”,则应认为是在这些定义中描述的最宽范围。

[0074] 如本文所用,“烷基”是指包含完全饱和的(没有双键或三键)烃基的直链或支链烃链。烷基可以具有1至20个碳原子(每当其出现在本文中时,数值范围如“1至20”是指给定范围内的每个整数;例如,“1至20个碳原子”意指烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成,直至并包括20个碳原子,然而本定义还涵盖了其中没有指定数值范围的术语“烷基”的出现)。烷基也可以是具有1至10个碳原子的中等大小的烷基。烷基也可以是具有1至6个碳原子的低级烷基。化合物的烷基可以被指定为“C1-C4烷基”或类似的指定。仅举例来说,“C1-C4烷基”指示烷基链中有一至四个碳原子,即烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但决不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁

基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。烷基可以是取代的或未取代的。

[0075] 如本文所用，“烯基”是指在直链或支链烃链中含有一个或多个双键的烷基。烯基的实例包括烯丙基(alleny1)、乙烯基甲基和乙烯基。烯基可以是未取代的或取代的。

[0076] 如本文所用，“炔基”是指在直链或支链烃链中含有一个或多个三键的烷基。炔基的实例包括乙炔基和丙炔基。炔基可以是未取代的或取代的。

[0077] 如本文所用，“环烷基”是指完全饱和的(没有双键或三键)单环或多环烃环系。当由两个或更多个环构成时，这些环可以以稠合方式接合在一起。环烷基可以在环中含有3至10个原子或在环中含有3至8个原子。环烷基可以是未取代的或取代的。典型的环烷基包括但决不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0078] 如本文所用，“环烯基”是指在至少一个环中含有一个或多个双键的单环或多环烃环系；尽管如果存在多于一个双键，这些双键不能在所有环中形成完全离域的π电子体系(否则所述基团将是如本文所定义的“芳基”)。当由两个或更多个环构成时，所述环可以以稠合方式连接在一起。环烯基可以在环中含有3至10个原子或在环中含有3至8个原子。环烯基可以是未取代的或取代的。

[0079] 如本文所用，“芳基”是指在所有环中具有完全离域的π电子体系的碳环(全碳)单环或多环芳族环系(包括其中两个碳环共享化学键的稠环系)。芳基中的碳原子数可以变化。例如，芳基可以是C6-C14芳基、C6-C10芳基或C6芳基。芳基的实例包括但不限于苯、萘和蒽。芳基可以是取代的或未取代的。

[0080] 如本文所用，“杂芳基”是指含有一个或多个杂原子(例如，1至5个杂原子)的单环、双环和三环芳族环系(具有完全离域的π电子体系的环系)，所述杂原子即除碳以外的元素，包括但不限于氮、氧和硫。杂芳基的环中的原子数目可以变化。例如，杂芳基可以在环中含有4至14个原子，在环中含有5至10个原子或在环中含有5至6个原子。此外，术语“杂芳基”包括稠合环系，其中两个环(如至少一个芳环和至少一个杂芳环或至少两个杂芳环)共享至少一个化学键。杂芳环的实例包括但不限于呋喃、呋咱、噻吩、苯并噻吩、酞嗪、吡咯、噁唑、苯并噁唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、噻唑、1,2,3-噻二唑、1,2,4-噻二唑、苯并噻唑、咪唑、苯并咪唑、吲哚、吲唑、吡唑、苯并吡唑、异噁唑、苯并异噁唑、异噻唑、三唑、苯并三唑、噻二唑、四唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、嘌呤、蝶啶、喹啉、异喹啉、喹唑啉、喹喔啉、噌啉和三嗪。杂芳基可以是取代的或未取代的。

[0081] 如本文所用，“杂环基”或“杂脂环基(heteroalicyclyl)”是指三-、四-、五-、六-、七-、八-、九-、十-、至多18元单环、双环和三环环系，其中碳原子与1至5个杂原子一起构成所述环系。杂环可以任选地含有一个或多个不饱和键，然而，所述不饱和键的位置使得在所有环中都不出现完全离域的π电子体系。杂原子是除碳以外的元素，包括但不限于氧、硫和氮。杂环可以进一步含有一个或多个羰基或硫代羰基官能团，以便使定义包括氧代-体系和硫代-体系，如内酰胺、内酯、环状酰亚胺、环状硫代酰亚胺和环状氨基甲酸酯。当由两个或更多个环构成时，这些环可以以稠合方式接合在一起。另外，杂脂环族中的任何氮都可以被季铵化。杂环基或杂脂环基可以是未取代的或取代的。这类“杂环基”或“杂脂环基”基团的实例包括但不限于1,3-二噁英、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、1,2-二氧杂环戊烷、1,3-二氧杂环戊烷、1,4-二氧杂环戊烷、1,3-氧杂硫杂环己烷、1,4-氧杂硫杂环己二烯、1,3-氧杂硫杂环戊烷、1,3-二硫杂环戊二烯、1,3-二硫杂环戊烷、1,4-氧杂硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、

2H-1,2-噁嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二氧代哌嗪、乙内酰脲、二氢尿嘧啶、三噁烷、六氢-1,3,5-三嗪、咪唑啉、咪唑烷、异噁唑啉、异噁唑烷、噁唑啉、噁唑烷、噁唑烷酮、噻唑啉、噻唑烷、吗啉、环氧乙烷、哌啶N-氧化物、哌啶、哌嗪、吡咯烷、吡咯烷酮、吡咯烷二酮(pyrrolidione)、4-哌啶酮、吡唑啉、吡唑烷、2-氧代吡咯烷、四氢吡喃、4H-吡喃、四氢噻喃、硫吗啉、硫吗啉亚砜、硫吗啉砜及其苯并稠合类似物(例如,苯并咪唑烷酮、四氢喹啉和3,4-亚甲基二氧苯基)。

[0082] 如本文所用,“芳烷基”和“芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的芳基。芳基(烷基)的低级亚烷基和芳基可以是取代的或未取代的。实例包括但不限于苄基、2-苯基(烷基)、3-苯基(烷基)和萘基(烷基)。

[0083] 如本文所用,“杂芳烷基”和“杂芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的杂芳基。杂芳基(烷基)的低级亚烷基和杂芳基可以是取代的或未取代的。实例包括但不限于2-噻吩基(烷基)、3-噻吩基(烷基)、呋喃基(烷基)、噻吩基(烷基)、吡咯基(烷基)、吡啶基(烷基)、异噁唑基(烷基)、咪唑基(烷基)及其苯并稠合类似物。

[0084] 如本文所用,“烷氧基”是指式-OR,其中R是本文定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。烷氧基的非限制性列表是甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、苯氧基和苄氧基。烷氧基可以是取代的或未取代的。

[0085] 如本文所用,“酰基”是指作为取代基经由羰基连接的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。实例包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基。酰基可以是取代的或未取代的。

[0086] 如本文所用,术语“杂环碱基”是指可以连接至任选取代的戊糖部分或改性的戊糖部分上的任选取代的含氮杂环基。在一些实施方案中,杂环碱基可以选自任选取代的嘌呤-碱基、任选取代的嘧啶-碱基和任选取代的三唑-碱基(例如,1,2,4-三唑)。术语“嘌呤-碱基”在本文中以其如本领域技术人员所理解的一般意义来使用,并且包括其互变异构体。类似地,术语“嘧啶-碱基”在本文中以其如本领域技术人员所理解的一般意义来使用,并且包括其互变异构体。任选取代的嘌呤-碱基的非限制性列表包括嘌呤、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、别黄嘌呤、7-烷基鸟嘌呤(例如7-甲基鸟嘌呤)、可可碱、咖啡因、尿酸和异鸟嘌呤。优选的嘌呤碱基是腺嘌呤和鸟嘌呤(包括胺和/或烯醇保护的腺嘌呤和鸟嘌呤)碱基。嘧啶-碱基的实例包括但不限于胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶和5-烷基胞嘧啶(例如,5-甲基胞嘧啶)。优选的嘧啶碱基是胞嘧啶和胸苷(包括胺或烯醇保护的胞嘧啶和胸苷)碱基。任选取代的三唑-碱基的实例是1,2,4-三唑-3-甲酰胺。杂环碱基的其他非限制性实例包括二氨基嘌呤、8-氧代-N^6-烷基腺嘌呤(例如,8-氧代-N^6-甲基腺嘌呤)、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、N^4,N^4-桥亚乙基胞嘧啶、N^6,N^6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-卤代尿嘧啶(例如,5-氟尿嘧啶和5-溴尿嘧啶)、假异胞嘧啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤和描述于美国专利号5,432,272和7,125,855中的其他杂环碱基,出于公开另外杂环碱基的有限目的,通过引用将其并入本文。在一些实施方案中,杂环碱基可以任选地被胺或烯醇保护基团取代。

[0087] 如本文所用,“-N-连接的氨基酸”是指经由主链氨基或单取代的氨基连接至所指示部分的氨基酸。当氨基酸以-N-连接的氨基酸连接时,不存在作为主链氨基或单取代氨基

的一部分的氢之一,并且氨基酸经由氮连接。N-连接的氨基酸可以是取代的或未取代的。

[0088] 如本文所用,“-N-连接的氨基酸酯”是指其中主链羧酸基团已被转化成酯基团的氨基酸。在一些实施方案中,酯基团具有选自烷基-O-C(=O)-、环烷基-O-C(=O)-、芳基-O-C(=O)-和芳基(烷基)-O-C(=O)-的式。酯基团的非限制性列表包括以下的取代和未取代形式:甲基-O-C(=O)-、乙基-O-C(=O)-、正丙基-O-C(=O)-、异丙基-O-C(=O)-、正丁基-O-C(=O)-、异丁基-O-C(=O)-、叔丁基-O-C(=O)-、新戊基-O-C(=O)-、环丙基-O-C(=O)-、环丁基-O-C(=O)-、环戊基-O-C(=O)-、环己基-O-C(=O)-、苯基-O-C(=O)-、苄基-O-C(=O)-和萘基-O-C(=O)-。N-连接的氨基酸酯衍生物可以是取代的或未取代的。

[0089] 如本文所用,“-O-连接的氨基酸”是指经由来自其主链羧酸基团的羟基连接至所指示部分的氨基酸。当氨基酸以-O-连接的氨基酸连接时,不存在作为来自其主链羧酸基团的羟基的一部分的氢,并且氨基酸经由氧连接。O-连接的氨基酸可以是取代的或未取代的。

[0090] 如本文所用,术语“氨基酸”是指任何氨基酸(标准氨基酸和非标准氨基酸两者),包括但不限于α-氨基酸、β-氨基酸、γ-氨基酸和δ-氨基酸。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸。合适的氨基酸的另外实例包括但不限于鸟氨酸、羧腐胺赖氨酸(hypusine)、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、γ-氨基丁酸、瓜氨酸、β-丙氨酸、α-乙基-甘氨酸、α-丙基-甘氨酸和正亮氨酸。

[0091] 术语“氨基酸”包括天然存在的和合成的β、γ或δ氨基酸。所述氨基酸可以呈D-或L-构型。氨基酸可以是以下项的衍生物:丙氨酰基、缬氨酰基、亮氨酰基、异亮氨酰基、脯氨酰基、苯丙氨酰基、色氨酰基、甲硫氨酰基、甘氨酰基、丝氨酰基、苏氨酰基、半胱氨酰基、酪氨酰基、天冬酰胺酰基、谷氨酰胺酰基、天冬氨酰基、戊二酰基、赖氨酰基、精氨酰基、组氨酰基、β-丙氨酰基、β-缬氨酰基、β-亮氨酰基、β-异亮氨酰基、β-脯氨酰基、β-苯丙氨酰基、β-色氨酰基、β-甲硫氨酰基、β-甘氨酰基、β-丝氨酰基、β-苏氨酰基、β-半胱氨酰基、β-酪氨酰基、β-天冬酰胺酰基、β-谷氨酰胺酰基、β-天冬氨酰基、β-戊二酰基、β-赖氨酰基、β-精氨酰基或β-组氨酰基。

[0092] 如本文所用,术语“脱氧核苷”是指含有脱氧糖的任何核苷,即,通过用氢原子替代羟基在形式上衍生自糖的任何化合物,例如脱氧核糖。

[0093] 如本文所用,术语“脱氧核苷前药”或“前药脱氧核苷”是指脱氧核苷的前药衍生物,并且包括将磷酸基团或其衍生物结合到其结构中的前药。

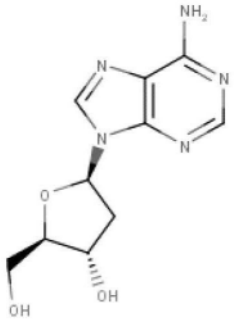
[0094] 如本文所用,术语“dNTP”是指脱氧核糖核苷酸三磷酸。每个dNTP由磷酸基团、脱氧核糖和含氮碱基组成。有四种不同的dNTP,并且可以被分成两组:嘌呤类和嘧啶类。dATP(脱氧腺苷5’-三磷酸)和dGTP(脱氧鸟苷5’-三磷酸)组成嘌呤类,而dTTP(脱氧胸苷5’-三磷酸)和dCTP(脱氧胞苷5’-三磷酸)组成嘧啶类。腺嘌呤和鸟嘌呤(特征在于嘌呤的碱基)均具有双环结构,而胸腺嘧啶和胞嘧啶(特征在于嘌呤的碱基)均具有单环结构。

[0095] 如本文所用,术语“线粒体DNA耗竭综合征”是指一类表型多样的疾病和病症,其特征在于受影响的组织和器官(例如,肌肉、肝脏、脑和/或胃肠道)中线粒体DNA(mtDNA)含量严重降低。所述减少或耗竭可以由可用于mtDNA复制的线粒体核苷酸池中的任何失衡以及线粒体复制中的异常引起。基于发作年龄,区分出两种亚型:先天(或早发)和小儿(或迟

发)。尽管以较晚发作形式存活时间更长,但是所述综合征对于几乎所有患者都是致命的,并且目前尚没有有效的治疗。

[0096] II.前药

[0097] 本发明提供了用于治疗MDS的脱氧核苷前药。“脱氧核苷”是指2'-脱氧核苷,例如2'-脱氧鸟苷(dG或脱氧鸟苷,如下所示)、2'-脱氧胸苷(dT或胸苷)、2'-脱氧腺苷(dA或脱氧腺苷)和2'-脱氧胞苷(dC或脱氧胞苷)。各自的全长名称和通用缩写可以互换地使用:

[0098] 

[0099] 2'-脱氧鸟苷或dG

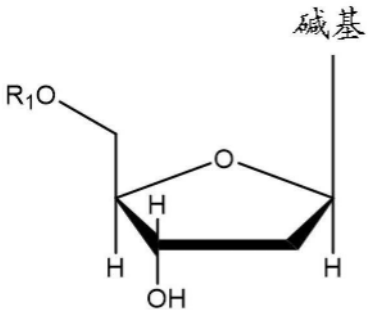
[0100] 在特定的实施方案中,碱基选自胞嘧啶、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和腺嘌呤。

[0101] 因此,本文所述的前药是脱氧胞苷前药(dC前药)、脱氧胸苷前药(dT前药)、脱氧鸟苷前药(dG前药)和脱氧腺苷前药(dA前药)。

[0102] 所述前药优选呈碱基和脱氧核糖部分的天然存在的β-D-构型,并且嘧啶和嘌呤环与式I的连接点根据标准编号惯例优选是嘧啶碱基的天然存在的1位和嘌呤碱基的天然存在的9位。

[0103] 在一个实施方案中,前药策略包括掩蔽反应性基团,例如体内带电荷的-OH和磷酸基团,以允许其穿过细胞膜。

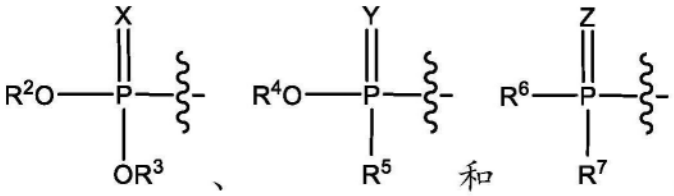
[0104] 在一个实施方案中,本发明提供式I的前药:

[0105] 

式I

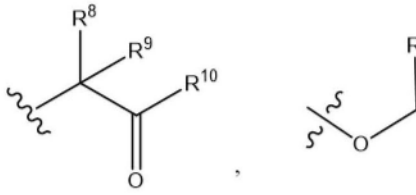
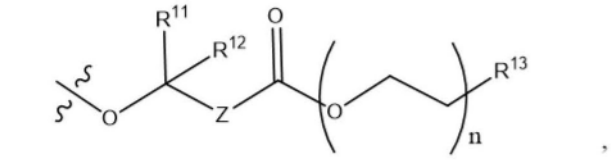
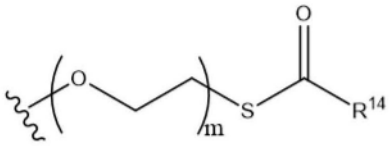
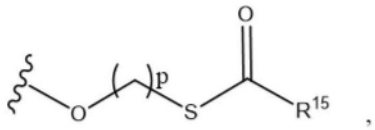
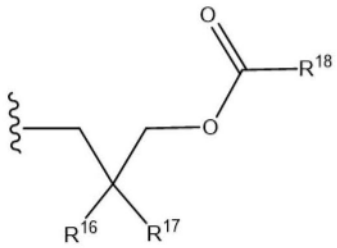
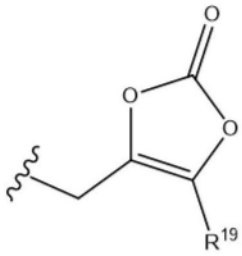
[0106] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基;

[0107] R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、



[0108] X、Y和Z各自独立地选自O和S;

[0109] R^2、R^3和R^4各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳基(C_{1-6})烷基，

[0110] 




和

，

[0111] 或者R^2和R^3可以一起形成环状部分；

[0112] R^5、R^6和R^7各自独立地选自任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、$NR^{20}R^{21}$、任选取代的N-连接的氨基酸、任选取代的N-连接的氨基酸酯；

[0113] R^8、R^9、R^{11}和R^{12}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基；

[0114] R^{10}和R^{13}各自独立地选自氢、任选取代的C1-24烷基和任选取代的芳基、任选取代的-O-C1-24烷基、任选取代的-O-芳基、任选取代的-O-杂芳基、任选取代的-O-单环杂环基；

[0115] R^{14}、R^{15}和R^{19}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基和任选取代的芳基；

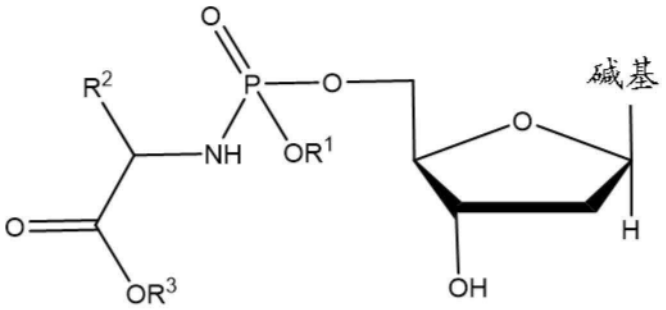
[0116] R^{16}和R^{17}各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8}有机基羰基、C_{2-8}烷氧基羰基和C_{2-8}有机基氨基羰基；

[0117] R^{18}选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基；

[0118] R^{20}和R^{21}各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基和任选取代的C_{3-6}环烯基；并且

[0119] n、m和p各自独立地选自0、1、2或3。

[0120] 在特定的实施方案中，前药是式Ia的化合物：

[0121] 

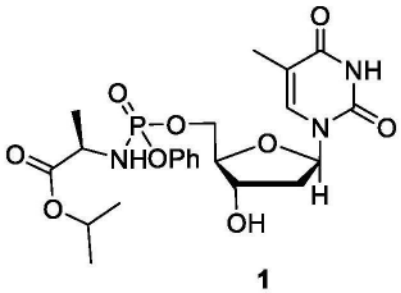
式Ia

[0122] 其中R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢、任选取代的C_{1-24}烷基、任选取代的C_{2-24}烯基、任选取代的C_{2-24}炔基、任选取代的C_{3-6}环烷基、任选取代的C_{3-6}环烯基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳基(C_{1-6})烷基。

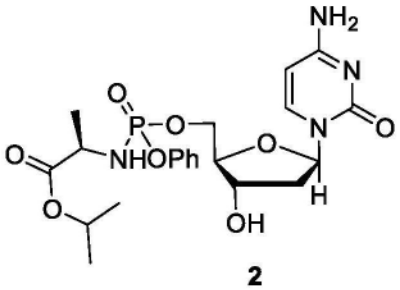
[0123] 在特定的实施方案中,R^1是芳基,R^2是C_{1-24}烷基,并且R^3是C_{1-24}烷基。

[0124] 在另一个特定的实施方案中,R^2是氨基酸侧链。

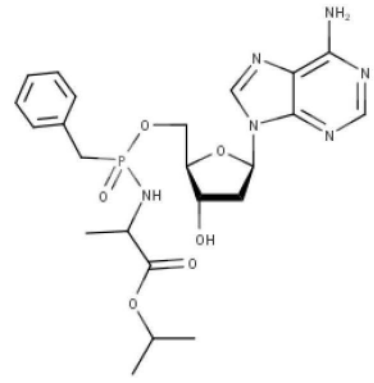
[0125] 在另外特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:



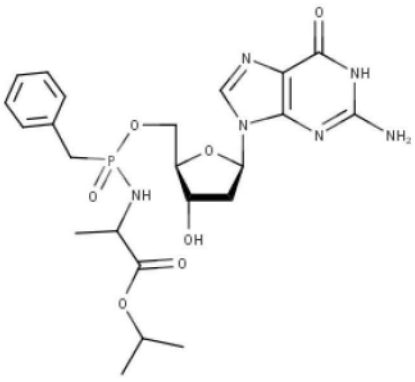
1



2

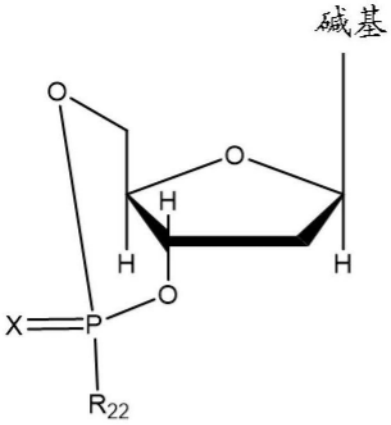
[0126] 

3



4。

[0127] 在另一个实施方案中,本发明提供式II的前药:

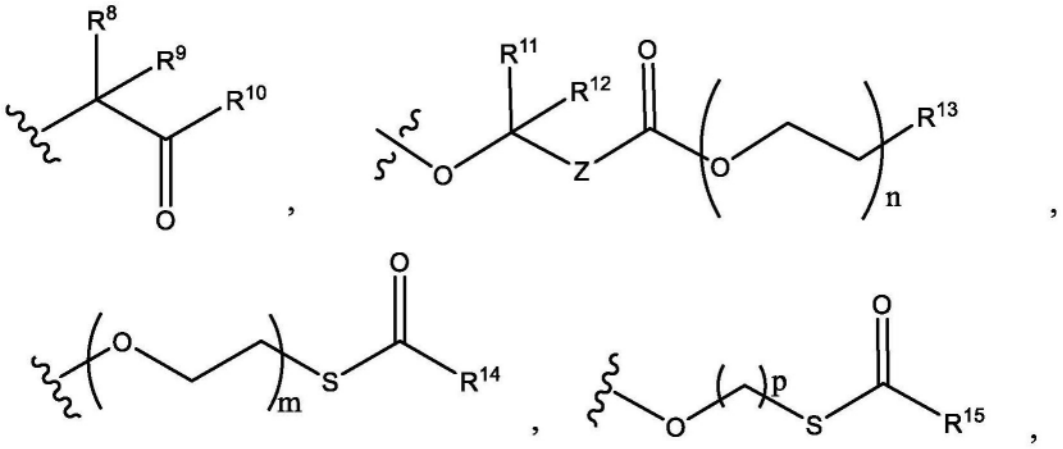
[0128] 

式II

[0129] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基;

[0130] X选自S和O;并且

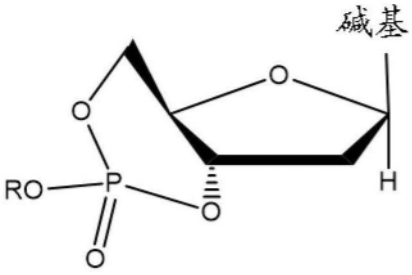
[0131] R^{22}选自-O^-、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6}烷氧基、

[0132] 

[0133] 任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯;

[0134] 其中R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、n、m和p如上所定义。

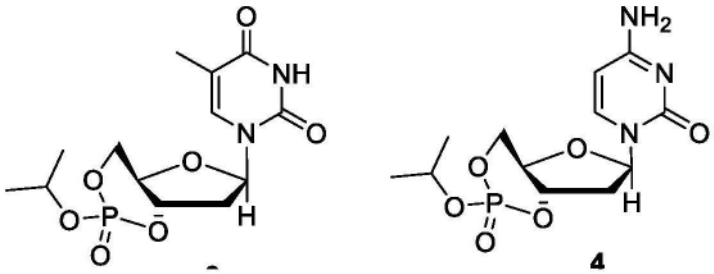
[0135] 在特定的实施方案中,前药是式IIa的化合物:

[0136] 

式IIa

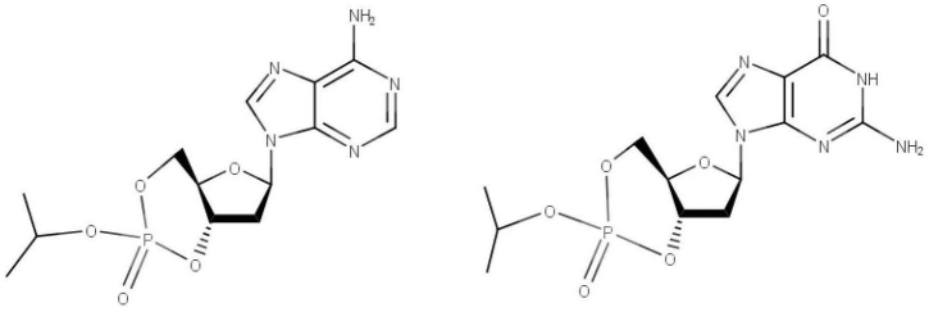
[0137] 其中R是C_{1-4}烷基。

[0138] 在还另外特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:

[0139] 

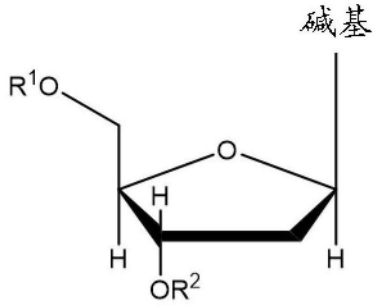
5 6。

[0140] 在还另外特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:

[0141] 

7 8。

[0142] 在还另一个实施方案中,本发明提供式III的前药:

[0143] 

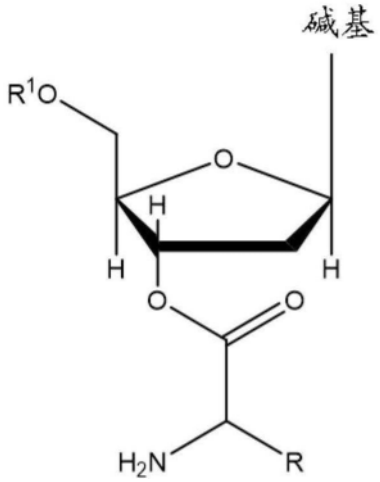
式III

[0144] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基。

[0145] R^1和R^2独立地选自氢、磷酸酯(包括单、二或三磷酸酯和式I的改性的磷酸酯);直链、支链或环状的烷基;任选取代的酰基;CO-烷基、CO-烷氧基烷基;CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酸酯;烷基磺酰基;芳基磺酰基;芳烷基磺酰基;脂质;磷脂;氨基酸;碳水化合物;肽和胆固醇。

[0146] 合适的碱基可以是未保护的或包括受保护的氨基。可以添加以形成受保护的氨基的保护基团的实例包括而不限于氨基甲酸酯-保护基团,如2-三甲基甲硅烷基乙氧羰基(Teoc)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙氧羰基(Bpoc)、叔丁氧羰基(BOC)、烯丙氧基羰基(Alloc)、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)和苄氧羰基(Cbz);酰胺-保护基团,如甲酰基、乙酰基、三卤代乙酰基、苯甲酰基和硝基苯基乙酰基;磺酰胺-保护基团,如2-硝基苯磺酰基;和亚胺-和环状酰亚胺-保护基团,如邻苯二甲酰亚氨基和二硫代琥珀酰亚氨基。

[0147] 在一个实施方案中,R^2是氨基酸,即式III的化合物是3'-氨基酸酯,例如式IIIa的化合物:

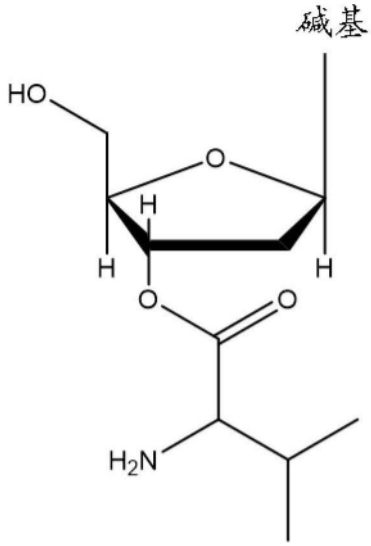
[0148] 

式IIIa

[0149] 其中R是氨基酸的侧链。

[0150] 在特定的实施方案中,氨基酸是缬氨酸(即R是$CH(CH_3)_2$)。

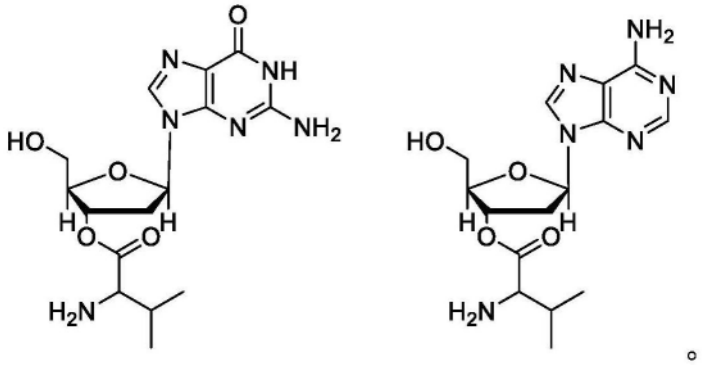
[0151] 在更特定的实施方案中,前药是式IIIb的化合物:

[0152] 

式IIIb

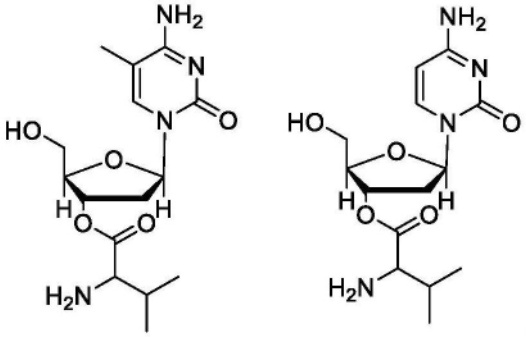
[0153] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基。

[0154] 在还更特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:

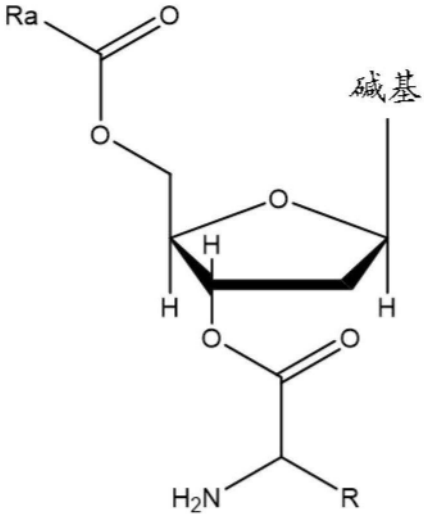
[0155] 

。

[0156] 在还另外特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:

[0157] 

[0158] 在还另外的实施方案中,前药是式IIIc的化合物:

[0159] 

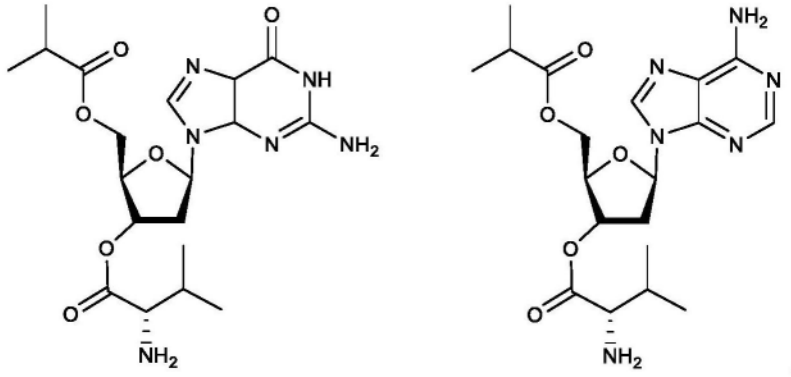
式IIIc

[0160] 其中碱基是指任选取代的杂环碱基或具有受保护的氨基的任选取代的杂环碱基;

[0161] Ra是直链、支链或环状的烷基,并且R是氨基酸的侧链。

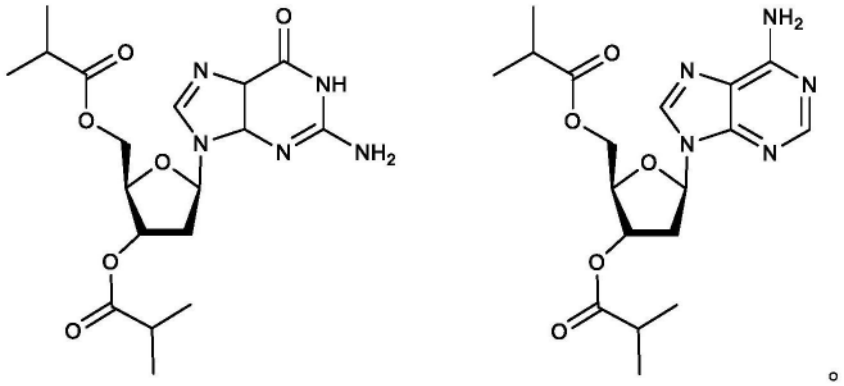
[0162] 在特定的实施方案中,Ra选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基,并且R是$CH(CH_3)_2$。

[0163] 在还另外特定的实施方案中,前药选自以下化合物之一:

[0164] 

[0165] 在还另一个实施方案中,本发明提供式III的前药,其中R^1和R^2两者都是取代的酰基,其中酰基取代可以是C1-C6烷基。

[0166] 在特定的实施方案中,R^1和R^2两者都是异丙基,并且前药是下列化合物之一:

[0167] 

[0168] III.使用方法

[0169] 本发明提供了一种治疗有需要的受试者中以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种本文所述的前药。

[0170] 在一个实施方案中,上述前药可以用于本发明方法中。

[0171] 前药可以以其本身(即单独地)或以药物组合物的形式施用。用于施用的包含一种或多种前药的药物组合物可以包含治疗有效量的前药和药学上可接受的载体。短语"药学上可接受的"是指这样的分子实体和组合物,当施用于人类时,其是生理上可耐受的并且通常不产生变态反应或类似的不适反应如胃不适、眩晕等,并且经联邦或州政府的监管机构批准或列在用于动物且更特别用于人类的《美国药典》或其他普遍认可的《药典》中。"载体"是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这类药物载体可以是无菌液体,如水中的盐水溶液和油,所述油包括石油、动物、植物或合成起源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,盐水溶液是优选的载体。盐水溶液以及水性右旋糖和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0172] 在特定的实施方案中,所公开的方法可以用于治疗线粒体DNA(mtDNA)耗竭综合征(MDS)。每个有核细胞都含有数百个线粒体,它们是处于双重基因组控制之下的独特细胞器。线粒体含有它们自己的DNA、mtDNA,但大多数线粒体蛋白是由核基因编码的,包括mtDNA的复制、转录和修复所需要的所有蛋白。

[0173] mtDNA的维持需要对于mtDNA合成、线粒体核苷酸池的维持和介导线粒体融合所必需的蛋白质。合成mtDNA的酶需要线粒体内核苷酸的平衡供应。这些是通过线粒体核苷酸补救途径和经由特异性转运蛋白从细胞溶质中导入核苷酸来供应的。为了在mtDNA合成中恰当地发挥作用,这些酶的量需要适当地平衡。已知mtDNA合成所需要的蛋白质是由核基因编码的。当致病性变体破坏由这些基因编码的蛋白质中的任一种的功能时,mtDNA合成就会受损,导致mtDNA的定量缺陷(mtDNA耗竭)或mtDNA的定性缺陷(多重mtDNA缺失)。迄今为止,已知超过20种核基因中的致病性变体与mtDNA维持缺陷相关。mtDNA缺失的一个原因是失衡的核苷酸池,其可以导致复制错误。尽管DNA聚合酶区分核糖核苷酸和脱氧核苷酸,但该系统并不完美,并且聚合酶会错误地结合核糖核苷酸,尤其是在存在池失衡的情况下。

[0174] 在一个实施方案中,mtDNA耗竭综合征是基于核DNA的mtDNA耗竭综合征。在特定的实施方案中,核DNA编码参与核苷酸代谢的蛋白质,其中游离核苷酸浓度的失衡导致mtDNA

复制紊乱和mtDNA拷贝数减少。

[0175] 在特定的实施方案中,本发明的方法可用于治疗由脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)池失衡引起的疾病或病症。dTNP是DNA聚合酶用于在动物细胞中复制和修复核和线粒体DNA的前体。dNTP的浓度取决于合成、消耗和降解之间的平衡。

[0176] 准确的DNA合成需要足够量的每种dNTP和适当平衡的dNTP池。在S期期间,总细胞池大小在10-100皮摩尔每种dNTP/百万细胞的范围内,线粒体池占总数的最多10%。在静止或分化的细胞中,池在细胞溶质和线粒体两者中降低为约1/10。与基于DNA中4种氮碱基的大致等摩尔丰度可以意料的相反,四种dNTP以不同的比率存在于池中,嘧啶类通常超过嘌呤类。即使单个细胞系衍生自相同的动物物种,它们也可能展现出不同的池组成。一种dNTP浓度的增加通常导致另一种dNTP的耗竭。

[0177] mtDNA耗竭综合征可能涉及特定的组织或器官,例如肌肉、肝脏、脑和/或胃肠道。在特定的实施方案中,mtDNA耗竭综合征是肌病性或肝脑综合征。

[0178] 以失衡的核苷酸池为特征的病症包括但不限于破坏线粒体dNTP池的核基因,如MPV17和脱氧鸟苷激酶(dGK),这种缺陷与TK2缺乏症平行,由于DGUOK中的常染色体隐性突变,导致dGMP和dAMP缺乏,其中mtDNA耗竭综合征通常表现为儿童期早发型肝脑病(Mandel等人2001)。与这些基因有关的病症可以用本文的方法治疗。例如,对于dGK缺乏的患者,dG和/或dA的前药的施用在逻辑上将是可行的。在本发明方法的特定实施方案中,dG或dG的前药可以单独地用于治疗MPV17或dGK缺乏症。任选地,dG或dG的前药可以补充有少量的dA、dC或dT及其盐和前药,旨在平衡核苷池,可用于治疗患有MPV17或dGK缺乏症的患者。

[0179] 可以使用一组已知导致mtDNA耗竭综合征的基因进行分子遗传测试(Chanprasert等人,2012),并且所述分子遗传测试可以用于识别患有以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症的患者。这种测试可以包括对与MDS诊断有关的基因的整个编码区和外显子/内含子接合区进行序列分析,以找到序列变异和缺失/重复。如果在序列分析中识别出复合杂合或纯合有害突变,则可以证实缺乏症的诊断,并且因此受试者将受益于脱氧核苷疗法。如果序列分析没有识别出两个复合杂合或纯合有害突变,则应考虑缺失/重复分析,以确定和/或证实缺乏症诊断。

[0180] 施用可以经由任何途径进行,所述途径包括但不限于口服、鞘内、肠胃外、粘膜和经皮。

[0181] 在一个实施方案中,施用是口服的。示例性口服剂型包括但不限于胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂、溶液、糖浆、混悬剂(在非水性或水性液体中)或乳剂。片剂或硬明胶胶囊可以包含乳糖、淀粉或其衍生物、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁、硬脂酸或其盐。软明胶胶囊可以包含植物油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇。溶液和糖浆可以包含水、多元醇和糖。可以将本文所述的前药添加到患者将消耗的任何形式的液体中,包括但不限于奶、牛和人二者的乳汁、婴儿配方食品和水。前药可以包衣有或混合有延迟在胃肠道中崩解和/或吸收的材料。因此,可以实现经许多小时的持续释放。

[0182] 在另一个实施方案中,施用是鞘内的。鞘内施用涉及将药物注射到椎管中,更具体地是蛛网膜下腔,使得其到达脑脊髓液。该方法通常用于脊椎麻醉、化学疗法和止痛药。鞘内施用可以通过腰椎穿刺(推注)或通过药盒导管系统(推注或输注)来进行。最通常将导管插入腰椎椎板之间,并且尖端向上穿过鞘隙至所需水平(通常L3-L4)。鞘内制剂最常使用水

和盐水作为赋形剂,但也使用过EDTA和脂质。

[0183] 在又另一个实施方案中,施用是肠胃外的,包括静脉内的。适合肠胃外施用的药物组合物包括水性和非水性无菌可注射溶液或混悬剂,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使组合物与受试者的血液基本上等渗的溶质。可以存在于这类组合物中的其他组分包括水、醇、多元醇、甘油和植物油。适合肠胃外施用的组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,如密封的安瓿和小瓶,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在紧临使用前添加无菌载体。即用注射溶液和混悬剂可以由无菌粉剂、颗粒剂和片剂来制备。可以用于提供本发明的肠胃外剂型的合适媒介物是本领域技术人员熟知的。实例包括:注射用水USP;水性媒介物,如氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液和乳酸化林格氏注射液;水混溶性媒介物,如乙醇、聚乙二醇和聚丙二醇;和非水性媒介物,如玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。另外,由于一些患者可能在治疗开始时就接受肠内营养,因此可以通过膳食饲管(gastronomy feeding tube)或其他肠内营养手段来施用前药。

[0184] 适合经鼻和经肺施用的药物组合物可以包含固体载体,如粉剂,其可以通过快速吸入通过鼻施用。经鼻施用的组合物可以包含液体载体,如喷雾剂或滴剂。可替代地,可以通过深度吸入或通过吹口安装实现直接吸入到肺中。这些组合物可以包含活性成分的水溶液或油溶液。吸入用组合物可以供应在特别适合的装置中,包括但不限于加压喷雾器、雾化器或吹入器,其可以被构造成提供预定剂量的活性成分。

[0185] 适合直肠施用的药物组合物可以以栓剂或灌肠剂的形式提供。适合阴道施用的药物组合物可以以子宫托、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂的形式提供。

[0186] 适合经皮施用的药物组合物可以作为分离的贴剂来提供,旨在与接受者的表皮经长时间保持紧密接触。

[0187] 所述至少一种前药或包含其的组合物的施用量可以是约15mg/kg/天至约500mg/kg/天。进一步优选的剂量范围是约50mg/kg/天至约400mg/kg/天。进一步优选的剂量范围是约100mg/kg/天至约350mg/kg/天,如例如约150mg/kg/天至约300mg/kg/天,约200mg/kg/天至约350mg/kg/天或约250mg/kg/天至约350mg/kg/天。

[0188] 在一个实施方案中,所述剂量是典型核苷(dT、dC、dG、dA)的约20%等摩尔至约100%等摩尔,例如约20%至约80%、约20%至约50%、约50%至约80%或约50%至约100%。在特定的实施方案中,所述剂量是典型核苷的约20%等摩尔。在另一个特定的实施方案中,所述剂量是典型核苷的约50%等摩尔。在还另一个实施方案中,所述剂量是典型核苷的约100%等摩尔。

[0189] 所述至少一种前药或包含其的组合物的施用可以是一天一次、一天两次、一天三次、一天四次、一天五次、直至一天六次,优选以规律的间隔。如果静脉内或鞘内施用,也可以降低剂量。这样的施用的优选剂量范围是约5mg/kg/天至约200mg/kg/天。

[0190] 在其中组合物包含多于一种前药的实施方案中,前药的比率可以变化。例如,如果要施用dG前药和第二脱氧核苷(dN),dG/dN的比率可以是95/5、90/10、85/15、80/20、75/25、70/30、65/35、60/40、55/45或50/50。

[0191] 在一个实施方案中,所述方法还包括在增加剂量之前监测受试者的状况的改进。可以通过观察受试者的肌肉力量和控制和行动能力以及身高和体重的变化来监测受试者

对治疗性施用的响应。如果在施用之后这些参数中的一个或多个增加,则可以继续治疗。如果这些参数中的一个或多个保持不变或降低,则可以增加剂量。

[0192] 在另一个实施方案中,所述方法还包括在降低剂量前监测受试者的不良反应。示例性的不良反应包括但不限于腹泻、腹胀和其他胃肠道表现。

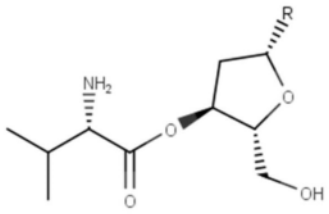
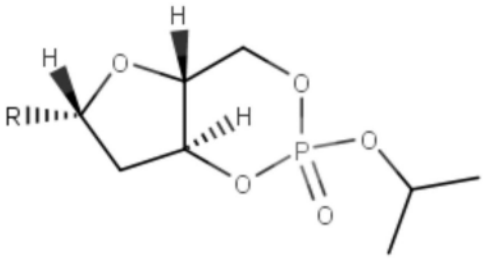
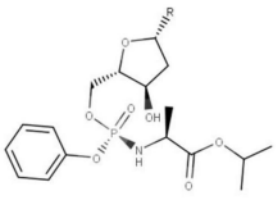
[0193] 本发明的前药也可以与其他药剂共同施用。这类药剂将包括用于治疗MDS的特定形式的症状的治疗剂。特别地,对于MPV17或dGK缺乏症,其他药剂包括普遍存在的核苷分解代谢酶的抑制剂,包括但不限于酶抑制剂,如四氢尿苷(胞苷脱氨酶的抑制剂)和免疫霉素H(immucillin H)(嘌呤核苷磷酸化酶的抑制剂)和替比嘧啶(tipiracil)(胸苷磷酸化酶的抑制剂)。这类抑制剂是已知的并且用于治疗一些癌症。

[0194] 实施例

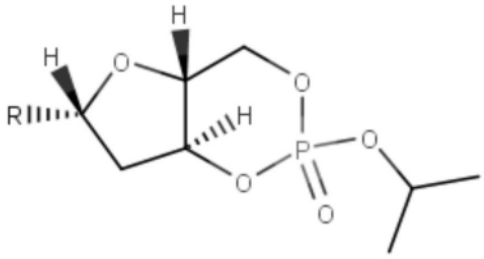
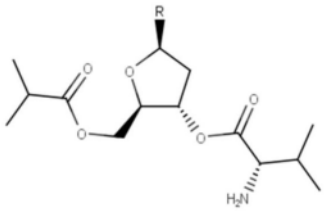
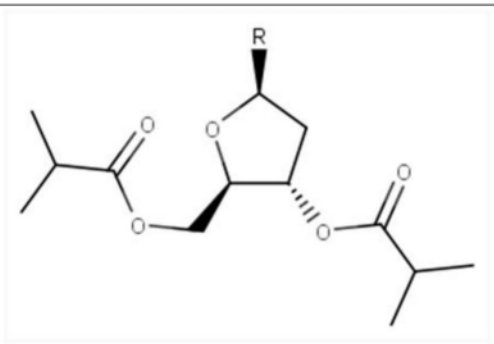
[0195] 实施例1:

[0196] 测试标识号的前药

[0197]

结构 代码#	简短描述	结构 R 选自胞嘧啶、胸腺嘧啶、鸟嘌呤或腺嘌呤 - 具有与天然存在的脱氧核苷相同的连接点和立体化学
MT101C	3' Val dC	
MT101T	3' Val dT	
MT101G	3' Val dG	
MT101A	3' Val dA	
MT102C	dC 的环状磷酸酯前药	
MT102T	dT 的环状磷酸酯前药	
MT102G	dG 的环状磷酸酯前药	
MT102A	dA 的环状磷酸酯前药	
MT103C	dC 的氨基磷酸酯前药	
MT103T	dT 的氨基磷酸酯前药	

[0198]

MT103G	dG 的氨基磷酸酯前药	
MT103A	dA 的氨基磷酸酯前药	
MT102C	dC 的环状磷酸酯前药	
MT102T	dT 的环状磷酸酯前药	
MT102G	dG 的环状磷酸酯前药	
MT102A	dA 的环状磷酸酯前药	
MT104C	3'Val, 5'异丁酰基 dC	
MT104T	3'Val, 5'异丁酰基 dT	
MT104G	3'Val, 5'异丁酰基 dG	
MT104A	3'Val, 5'异丁酰基 dA	
MT105C	3'5'-二异丁酰基 dC	
MT105T	3'5'-二异丁酰基 dT	
MT105G	3'5'-二异丁酰基 dG	
MT105A	3'5'-二异丁酰基 dA	

[0199] 使用本领域已知的核苷和核苷衍生物的保护/脱保护策略完成前药的合成。合成是用可商购的化学级核苷起始材料进行的,这类起始原料可从许多供应商,如例如中国上海的Hongene Biotech公司得到。实施例1A至1D中化合物的合成的一般方案描绘于图3、图4、图5、图6A和图6B中。

[0200] 1A.MT101-G的合成描述

[0201] 步骤1:从脱氧鸟苷开始,在室温(rt)下,在叔丁基二苯基甲硅烷基氯化物(TBDPSCl)/二甲基氨基吡啶(DMAP)在二甲基甲酰胺(DMF)中的反应条件下,通过添加TBDPS

(叔丁基二苯基甲硅烷基),选择性地保护脱氧鸟苷的5'-羟基。

[0202] 步骤2:用(羰基苄氧基)Cbz-L-缬氨酸和二环已基碳二亚胺(DCC)在CH_2Cl_2(DCM)中完成3'羟基的酯化,得到受保护的中间体T545-3-2,将其通过硅胶柱色谱法纯化,总收率为49%。

[0203] 步骤3:然后,在室温下使用在四氢呋喃(THF)中的n-Bu_4NF(TBAF),去除TBDPS基团,在柱纯化之后得到T545-3-3,收率为75%。

[0204] 步骤4:在L-酒石酸的存在下,使用溶液中的氢气与钯上碳催化剂进行氢化,得到作为L-酒石酸盐的MT101-G。

[0205] 1B.MT101-A的合成描述

[0206] 步骤1:从脱氧腺苷开始,在0-10℃下,用4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTr)在吡啶中对5'-羟基进行选择性保护,得到T545-4-1,柱纯化之后收率为60%。

[0207] 步骤2:如实施例1A中那样,在室温下通过在DCM中的Cbz-L-缬氨酸和DCC完成3'-羟基的酯化,得到T545-4-2,将其通过硅胶柱色谱法纯化,提供84%的总收率。

[0208] 步骤3:在室温下,用80% AcOH水溶液实现DMTr基团的去除。产物通过硅胶柱色谱法纯化,收率为74%。

[0209] 步骤4:采用H_3PO_4/DCM的条件进行脱Boc保护,然后装入L-酒石酸,得到呈L-酒石酸盐的MT101-A,通过结晶实现收率为76%。

[0210] 1C.MT105-G的合成描述

[0211] 通过用异丁酸酐直接处理dG获得3'5'-异丁酰基dG,并且在柱纯化之后以66%的收率获得。

[0212] 1D.MT105-A的合成描述

[0213] 通过用异丁酸酐直接处理dA获得3'5'-异丁酰基dA,并且在柱纯化之后以50%的收率获得。

[0214] 实施例2.在$MPV17^{-/-}$小鼠中的脱氧核苷补充研究

[0215] 2A.在研究中使用2窝来自$MPV17^{-/-}$小鼠(KO x KO)育种对的同窝仔。实验组如下建立:

[0216] 1.---未治疗的KO(n=1)

[0217] 2.---用109.35mg/kg MT102C+104.2mg/kg MT102G治疗的KO(n=3)

[0218] 3.---用163.87mg/kg MT103C+150.56mg/kg MT103G治疗的KO(n=3)

[0219] 4.---用75mg/kg dC和75mg/kg dG(购自Sigma)治疗的KO(n=3)

[0220] 5.---用144.9mg/kg MT101G治疗的KO(n=2)

[0221] 治疗在第7天开始并在第30天终止。在整个研究中通过递送到口腔中进行治疗。在任何实验组中都没有观察到健康或死亡率的改变。在第30天,牺牲动物并收集组织。将肝脏、肌肉、肾脏、肠道、心脏和脑在液氮中闪冻。通过心脏穿刺收集血液,并且将血浆级分在-80℃下储存。

[0222] 治疗小鼠和未治疗小鼠的肝组织中mtDNA拷贝数的qPCR测量结果示于图7。

[0223] 2B.为了比较结果,来自先前实验的WT(n=5)、未治疗的KO(n=4)和用20% MT101治疗的KO(n=4)和用20% MT104治疗的KO(n=4)也包括在分析中。

[0224] 2C.在核苷前药补充的进一步研究中使用来自KO x KO育种对的另外三窝同窝仔:

[0225] 1.-同窝仔2(L2):20年2月9日出生

[0226] 2.-同窝仔3(L3):20年5月9日出生

[0227] 3.-同窝仔4(L4):20年8月9日出生

[0228] 实验组如图8A所示建立,其显示出来自上述不同同窝仔的测试动物的给药量和重复以及性别。

[0229] 治疗在第7天开始并在第30天终止。在整个研究中通过递送到口腔中进行治疗。没有发现痛苦;相反,几天之后,动物变得习惯于本技术。

[0230] 每天监测每只动物的体重以调节剂量并检测化合物的任何可能的有害作用。在任何实验组中都没有观察到健康或死亡率的改变,并且经治疗的幼仔的体重增加与未治疗的幼仔类似,如分别在图8B和图8C中对于前药MT101和MT104所示。

[0231] 在第30天,牺牲动物并收集组织。将肝脏、肌肉、肾脏、肠道、心脏和脑在液氮中闪冻。通过心脏穿刺收集血液,并且将血浆级分在-80℃下储存。

[0232] 分析在第6天表现出显著mtDNA耗竭的肝脏和肌肉。对肝脏mtDNA拷贝数的影响示于图8D中。核苷补充对线粒体OXPHOS蛋白的影响示于图8E、图8F和图8G中。

[0233] 使用与实施例2A相同的程序,建立实验组以如下接受补充的不同组合:

[0234] 1.未治疗的KO(n=1)

[0235] 2.用20% MT101G治疗的KO(n=2)

[0236] 3.用20% MT101C治疗的KO(n=4)

[0237] 4.用20% MT105G治疗的KO(n=4)

[0238] 5.用75mg/kg dG(Sigma,D7145)治疗的KO(n=4)

[0239] 6.用75mg/kg dC(Sigma,D3897)治疗的KO(n=2)

[0240] 20%代表75mg/kg dC或75mg/kg dG的摩尔当量。

[0241] 肝脏中的mtDNA拷贝数通过RT-qPCR分析。为了比较结果,来自先前实验的WT(n=5)、未治疗的KO(n=4)和用20% MT101G治疗的KO(n=2)也包括在分析中。

[0242] 实施例3:dGK缺乏患者来源的成纤维细胞

[0243] 在dGK缺乏患者来源的成纤维细胞中测试前药,以确定它们对mtDNA拷贝数的影响。用dGK缺乏的成纤维细胞工作的优点是,它们在诱导静止之后自发地经历mtDNA耗竭而不添加DNA损伤剂。先前已经证明,用dGuo(50μM)补充细胞培养基足以防止这种耗竭。细胞生长直至汇合。通过将培养基中的FBS减少至0.1%来诱导静止。三天后(第0天),我们向细胞培养基中补充50μM的dGuo(脱氧鸟苷)或本发明的前体药物。将细胞在相同条件下维持直至18天,定期添加新鲜培养基。在整个实验的不同时间点(第4天、第9天和第18天)评价mtDNA拷贝数。结果表示为实验重复的平均值+SD,并且以mtDNA/nDNA比率相对于平行培养的三只未治疗的健康对照获得的平均值作图。

[0244] 在类似的条件下平行测试等摩尔浓度的dGuo和其他可用的dG前药(50μM)。结果表明,50μM的7和8的50/50混合物防止mtDNA耗竭

[0245] 前面仅说明了本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设想出各种安排,这些安排虽然未在本文中明确描述或示出,但体现了本发明的原理并且包括在其精神和范围内。此外,本文所列举的所有实施例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和诸位发明人为推进本领域所贡献的概念,并且应被解释为不限于此类具体列举的实施例和

条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实施例的所有陈述旨在涵盖其结构等同物和功能等同物两者。另外,此类等同物旨在包括当前已知的等同物和将来开发的等同物两者,即,所开发的执行相同功能的任何元件,而不管结构如何。因此,本发明的范围不旨在受限于本文示出并描述的示例性实施方案。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。

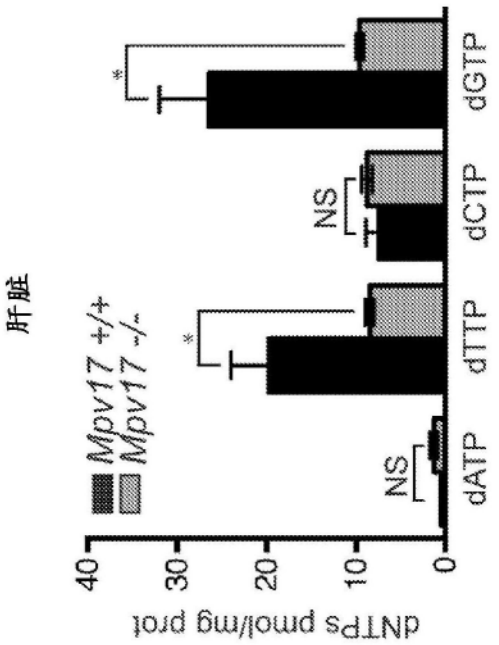

肝脏
Mpv17 +/+
Mpv17 -/-
dNTPs pmol/mg prot
0
10
20
30
40
NS
*
dATP
dTTP
dCTP
dGTP

图1A

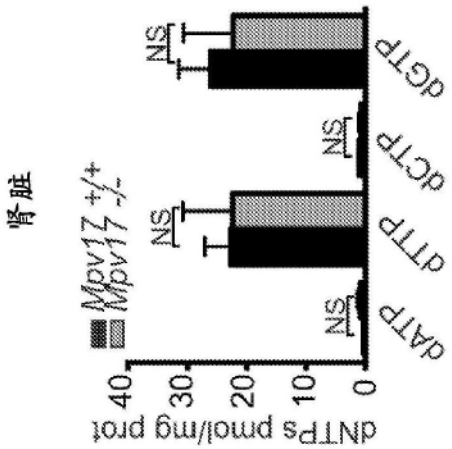

肾脏
Mpv17 +/+
Mpv17 -/-
dNTPs pmol/mg prot
0
10
20
30
40
NS
dATP
dTTP
dCTP
dGTP

图1B

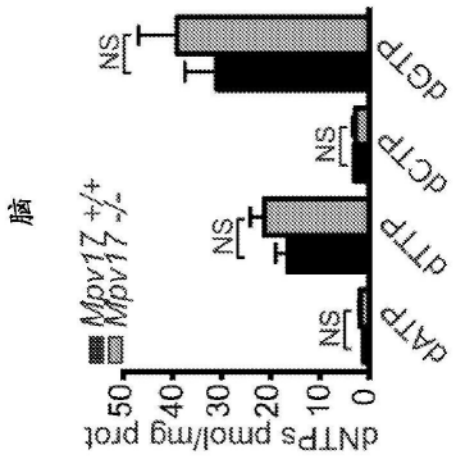

脑
Mpv17 +/+
Mpv17 -/-
dNTPs pmol/mg prot
0
10
20
30
40
50
dATP
dTTP
dCTP
dGTP
NS
NS
NS
NS

图1C

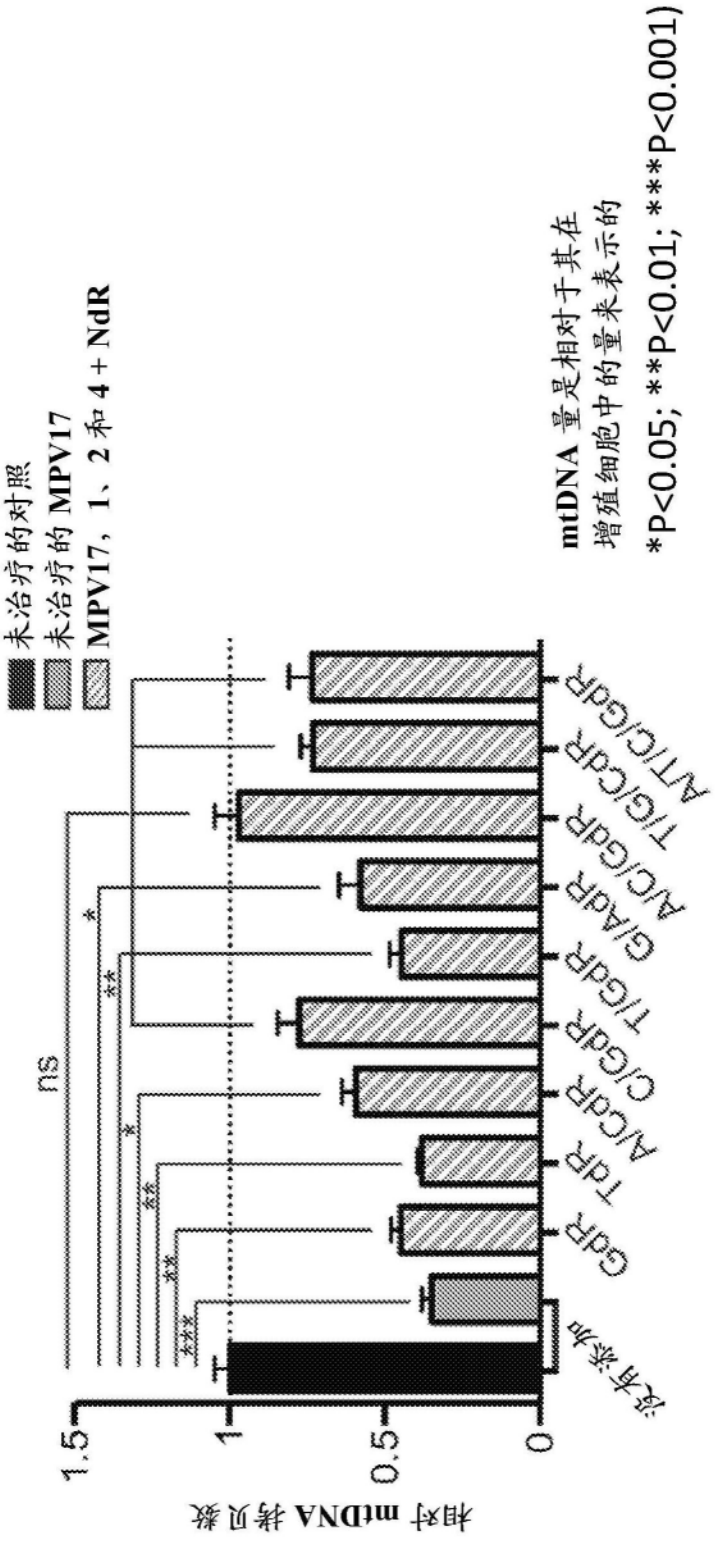

未治疗的对照
未治疗的 MPV17
MPV17，1、2 和 4 + NdR
mtDNA 量是相对于其在
增殖细胞中的量来表示的
*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)
相对 mtDNA 拷贝数
1.5
1
0.5
0
ns
*
**
***
载体对照
GdR
TdR
A/CdR
C/GdR
T/GdR
G/AdR
A/C/GdR
T/G/CdR
A/T/C/GdR

图2

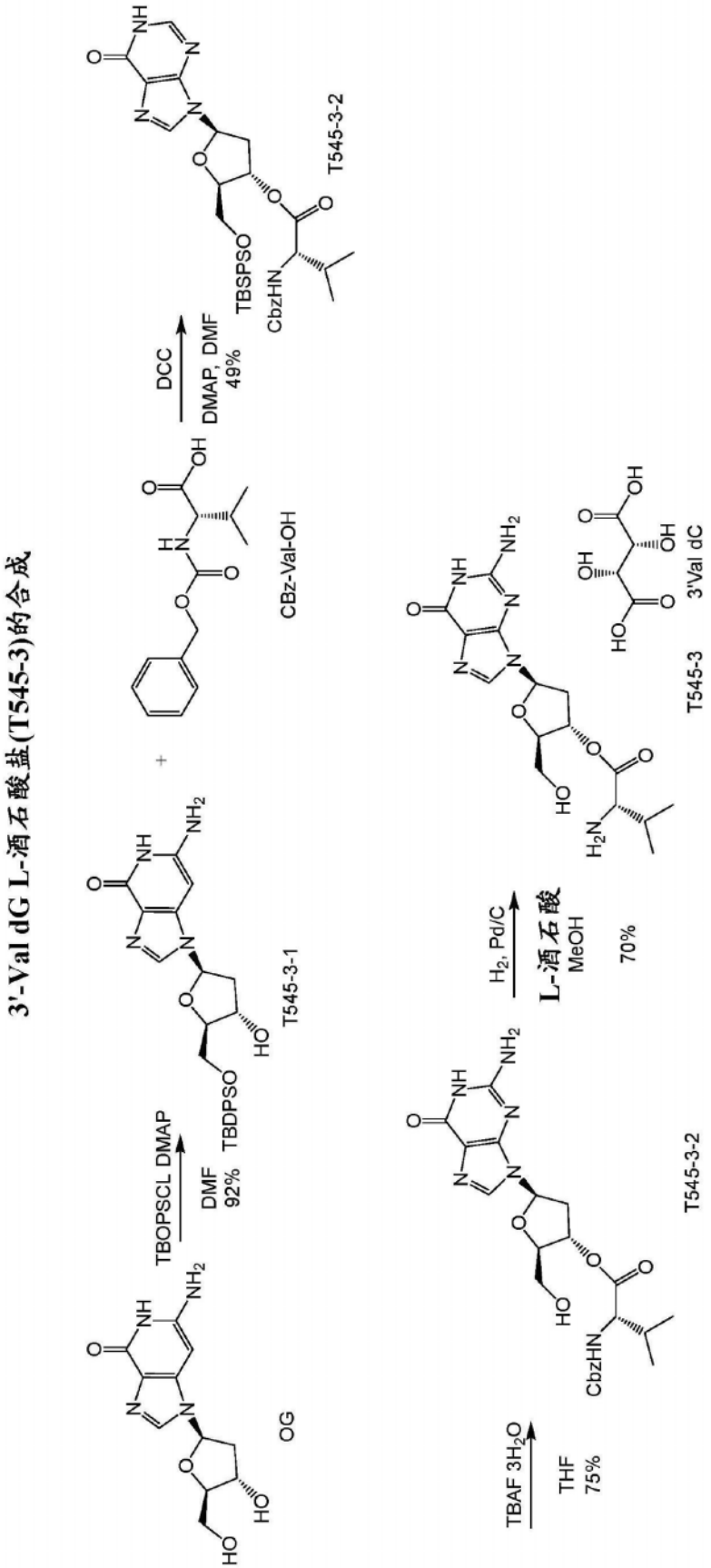

3'-Val dG L-酒石酸盐(T545-3)的合成
OG
TBOPSCL DMAP
DMF
92%
TBDPSO
T545-3-1
CBz-Val-OH
DCC
DMAP, DMF
49%
TBSPSO
CbzHN
T545-3-2
TBAF 3H2O
THF
75%
H2, Pd/C
L-酒石酸
MeOH
70%
T545-3
3'Val dC

图3

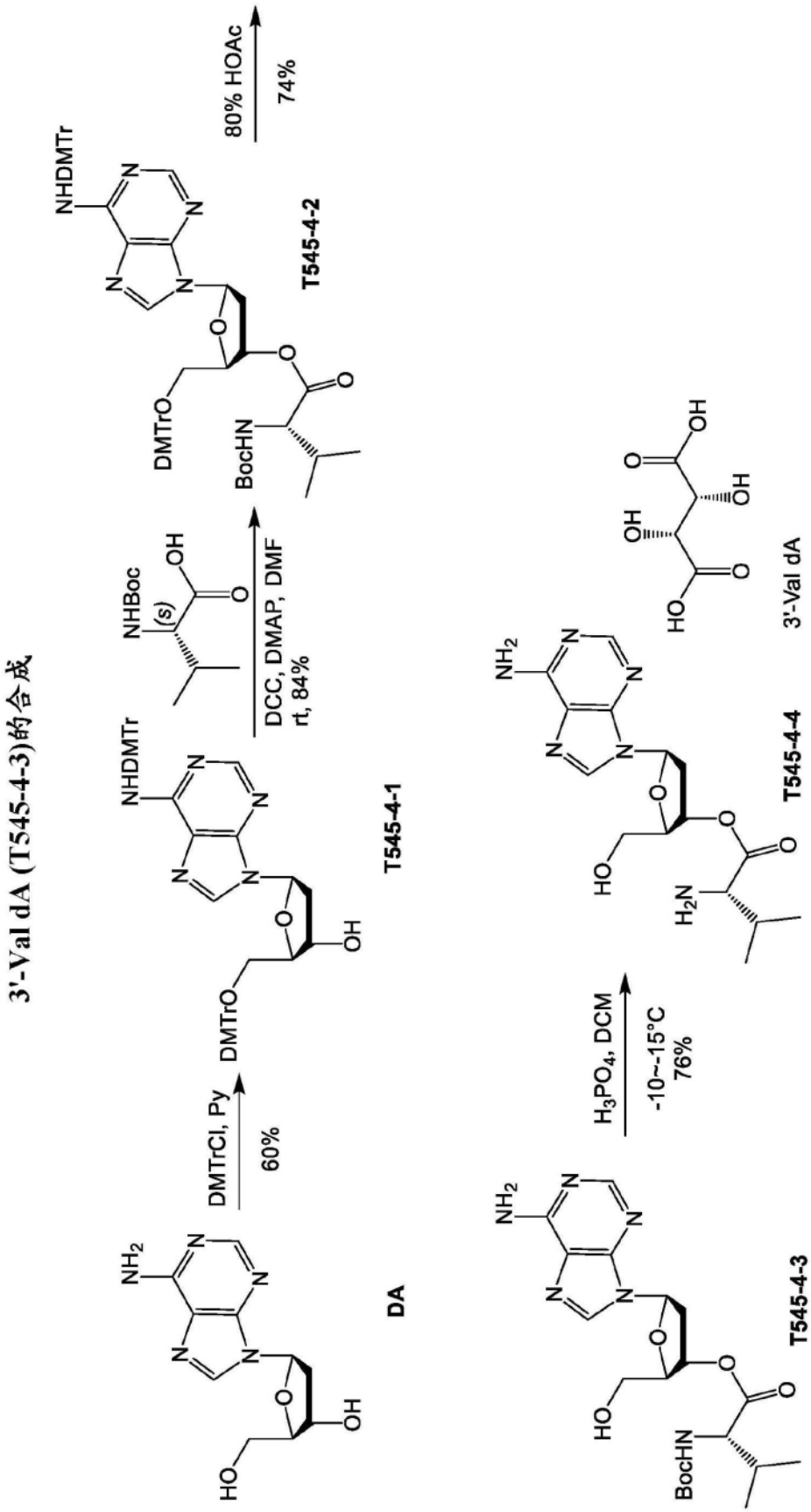

3'-Val dA (T545-4-3)的合成
DA
DMTrCl, Py
60%
T545-4-1
DCC, DMAP, DMF
rt, 84%
T545-4-2
80% HOAc
74%
H3PO4, DCM
-10~-15°C
76%
T545-4-3
T545-4-4
3'-Val dA

图4

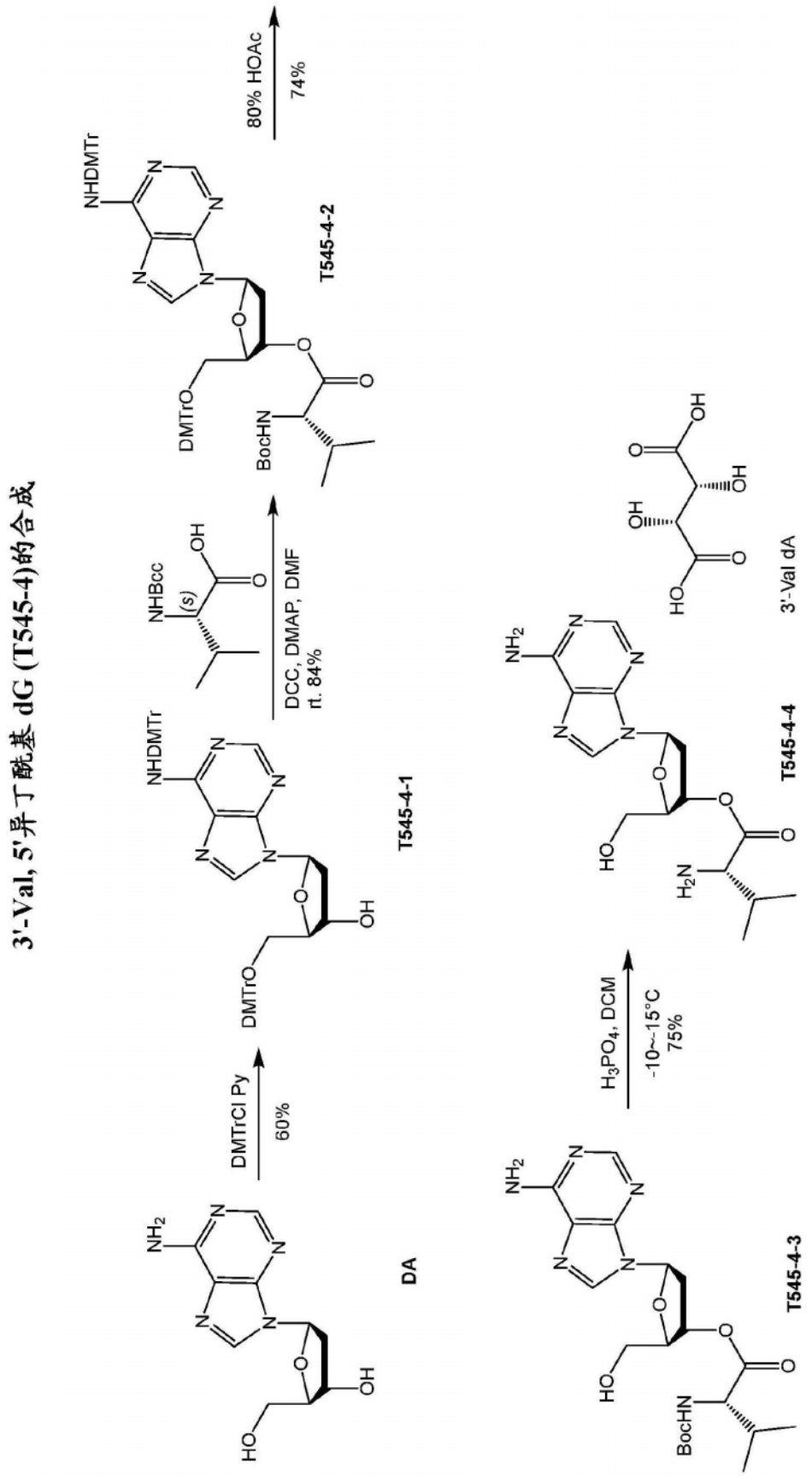

3'-Val, 5'异丁酰基 dG (T545-4)的合成
DA
DMTrCl Py
60%
T545-4-1
DCC, DMAP, DMF
rt. 84%
T545-4-2
80% HOAc
74%
T545-4-3
H3PO4, DCM
-10~-15°C
75%
T545-4-4
3'-Val dA

图5

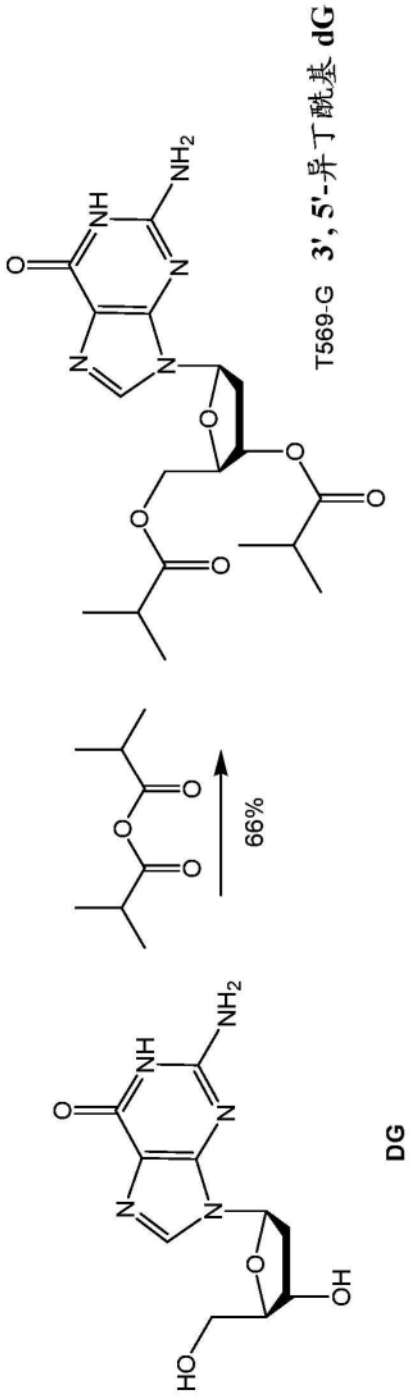


图6A

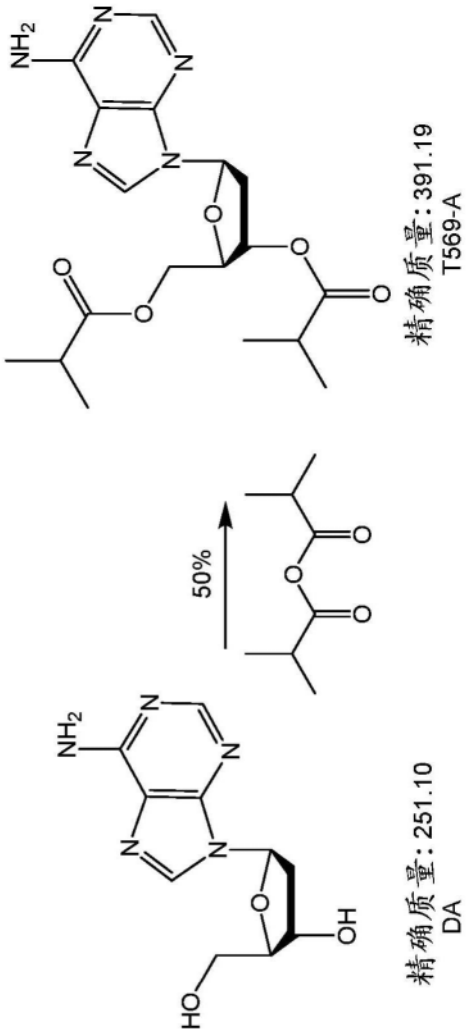

NH2
N
N
N
N
O
O
O
O
O
精确质量:391.19
T569-A
50%
O
O
O
NH2
N
N
N
N
O
OH
HO
精确质量:251.10
DA

图6B

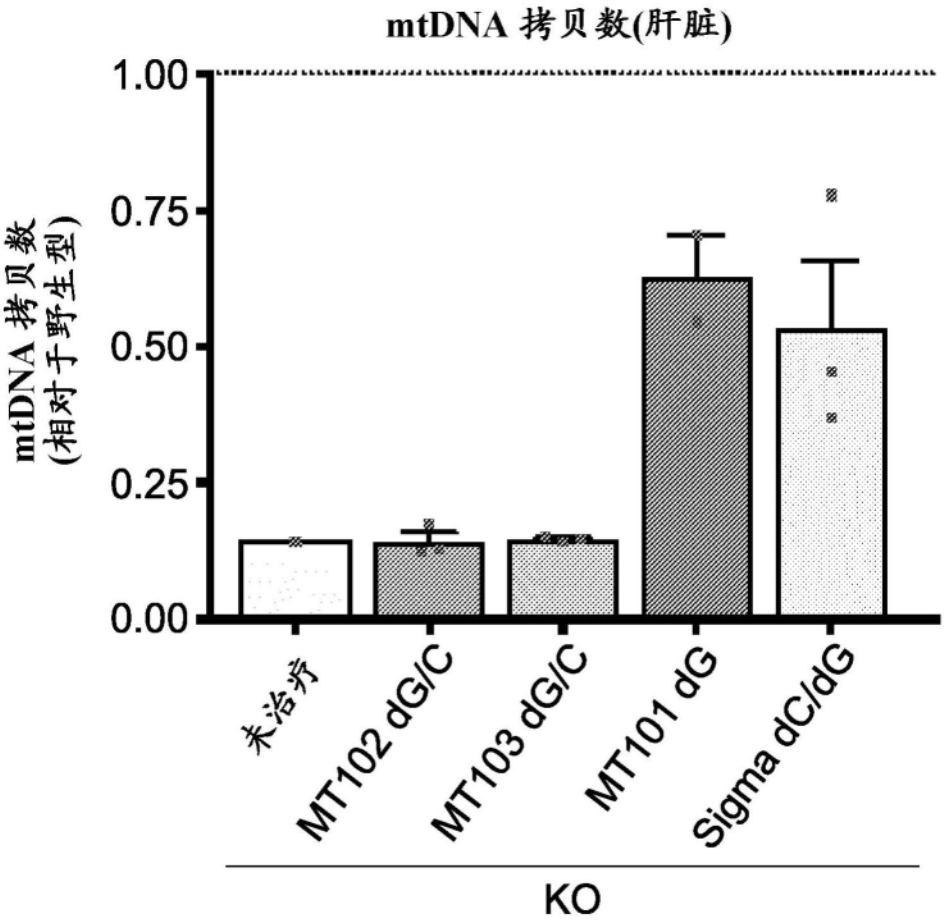
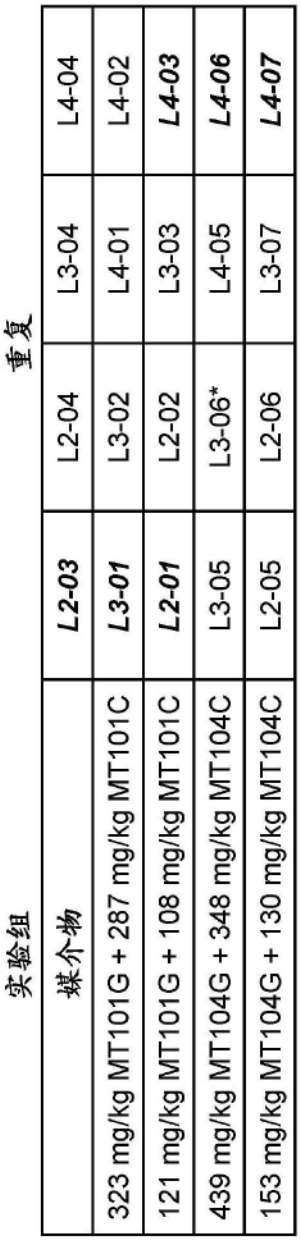

mtDNA 拷贝数(肝脏)
mtDNA 拷贝数
(相对于野生型)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
未治疗
MT102 dG/C
MT103 dG/C
MT101 dG
Sigma dC/dG
KO

图7



实验组	重复			
培养基	***L2-03***	L2-04	L3-04	L4-04
323 mg/kg MT101G + 287 mg/kg MT101C	***L3-01***	L3-02	L4-01	L4-02
121 mg/kg MT101G + 108 mg/kg MT101C	***L2-01***	L2-02	L3-03	***L4-03***
439 mg/kg MT104G + 348 mg/kg MT104C	L3-05	L3-06*	L4-05	***L4-06***
153 mg/kg MT104G + 130 mg/kg MT104C	L2-05	L2-06	L3-07	***L4-07***

雄性/雌性

图8A

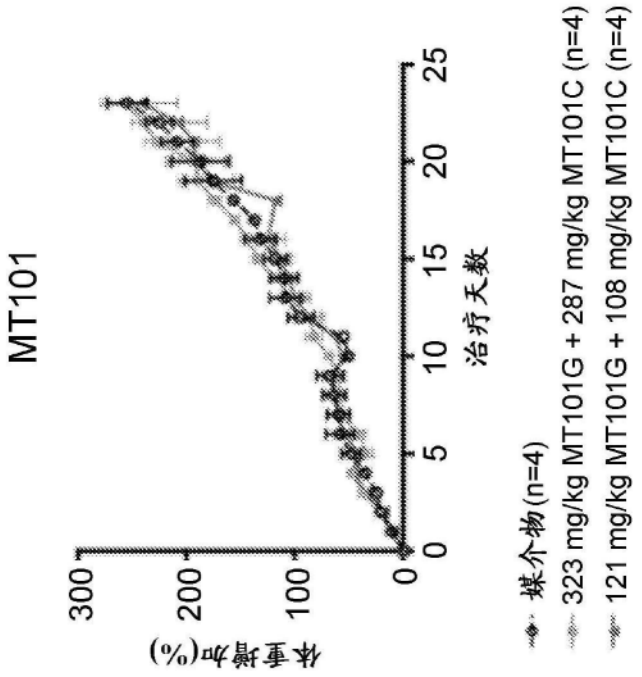

MT101
体重增加(%)
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
治疗天数
媒介物(n=4)
323 mg/kg MT101G + 287 mg/kg MT101C (n=4)
121 mg/kg MT101G + 108 mg/kg MT101C (n=4)

图8B

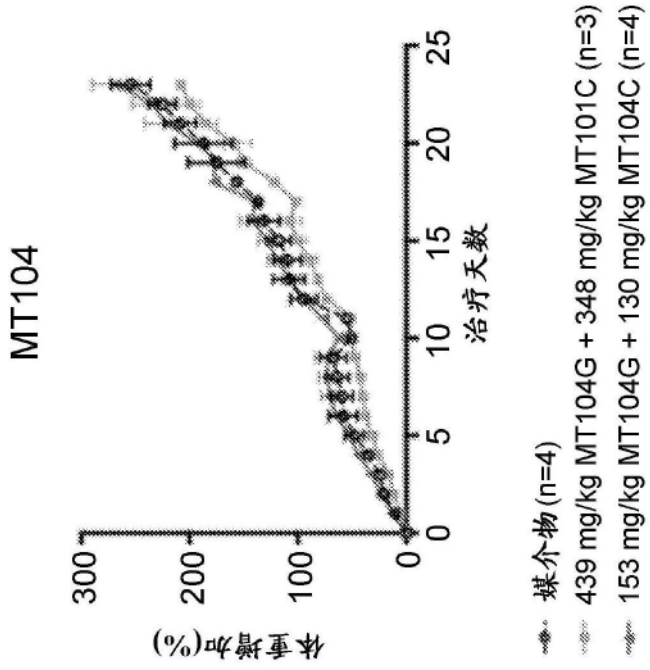

MT104
体重增加(%)
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
治疗天数
媒介物(n=4)
439 mg/kg MT104G + 348 mg/kg MT101C (n=3)
153 mg/kg MT104G + 130 mg/kg MT104C (n=4)

图8C

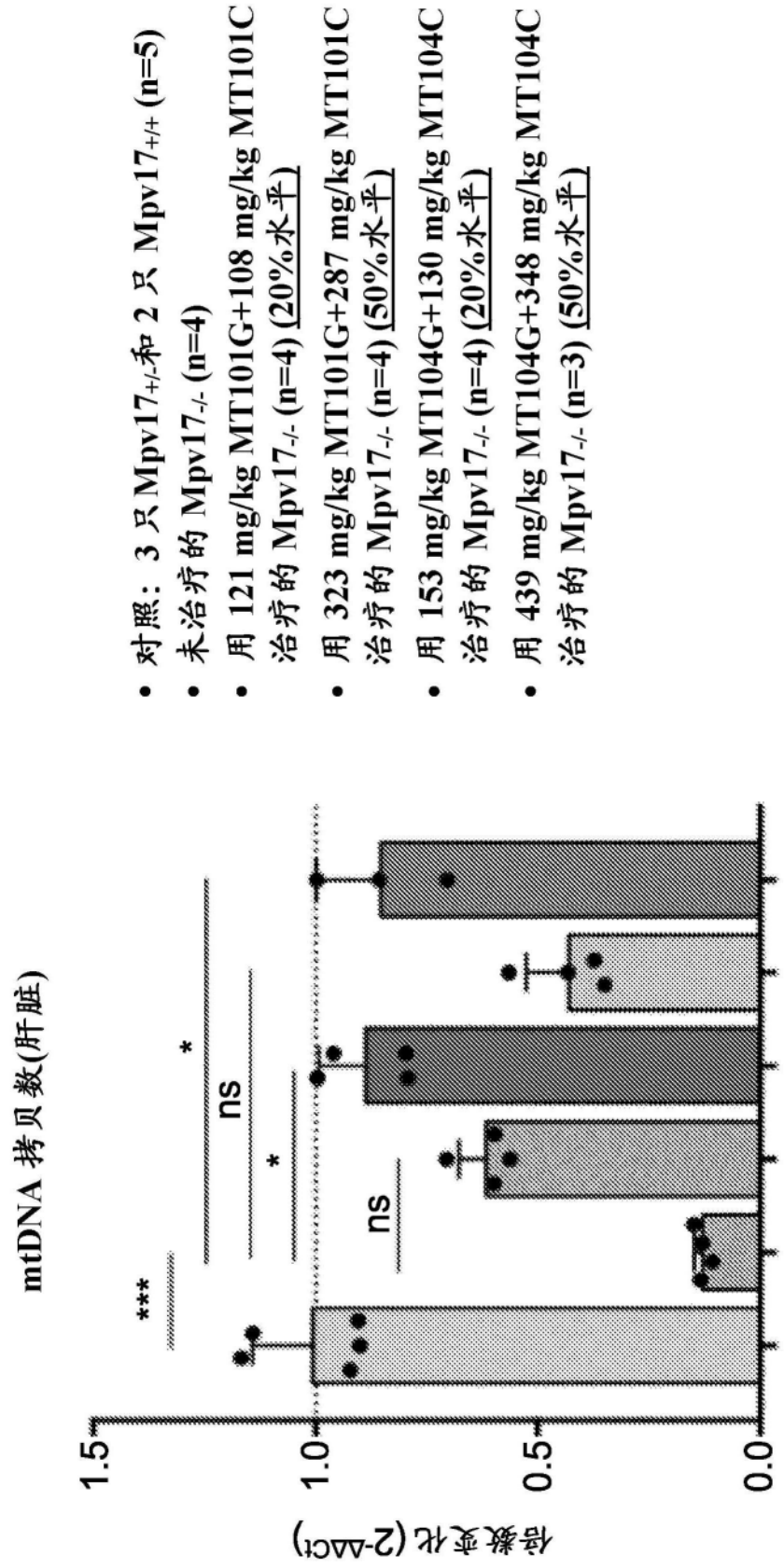

mtDNA 拷贝数(肝脏)
倍数变化 (2-ΔΔCt)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
ns
*
ns
• 对照：3 只 Mpv17+/-和 2 只 Mpv17+/+ (n=5)
• 未治疗的 Mpv17-/- (n=4)
• 用 121 mg/kg MT101G+108 mg/kg MT101C 治疗的 Mpv17-/- (n=4) (20%水平)
• 用 323 mg/kg MT101G+287 mg/kg MT101C 治疗的 Mpv17-/- (n=4) (50%水平)
• 用 153 mg/kg MT104G+130 mg/kg MT104C 治疗的 Mpv17-/- (n=4) (20%水平)
• 用 439 mg/kg MT104G+348 mg/kg MT104C 治疗的 Mpv17-/- (n=3) (50%水平)

图8D

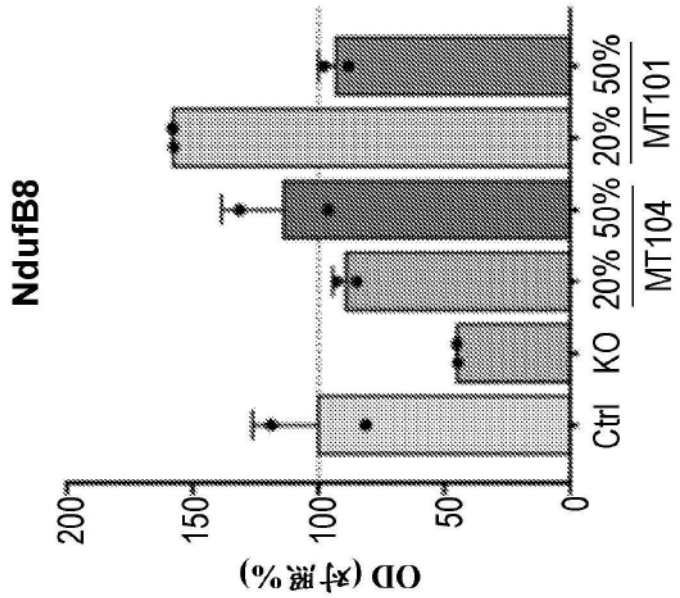

NdufB8
OD (对照%)
200
150
100
50
0
Ctrl
KO
20%
50%
MT104
20%
50%
MT101

图8E

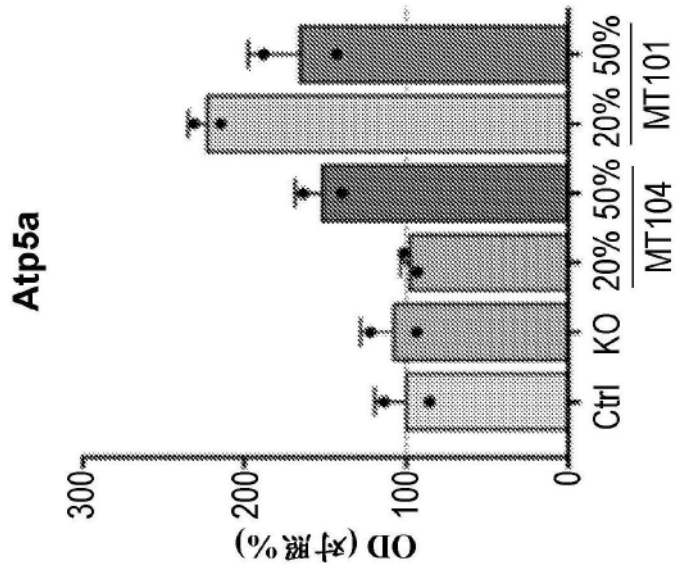

Atp5a
OD (对照%)
300
200
100
0
Ctrl
KO
20%
50%
MT104
20%
50%
MT101

图8F

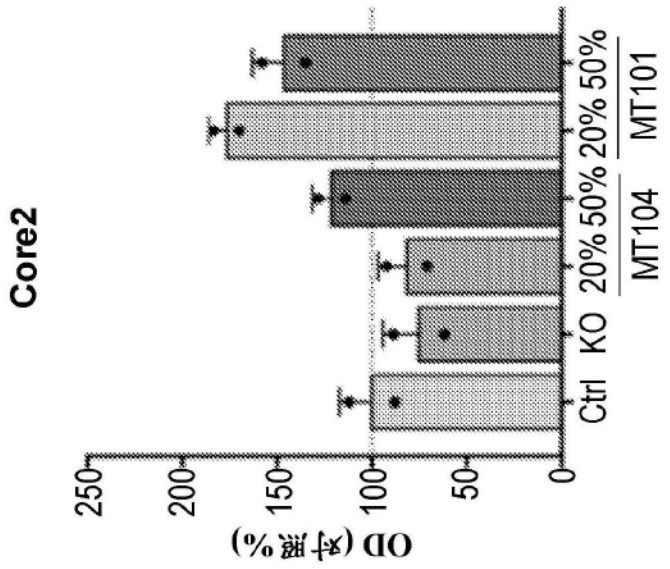

Core2
OD (对照%)
250
200
150
100
50
0
Ctrl
KO
20%
50%
20%
50%
MT104
MT101

图8G

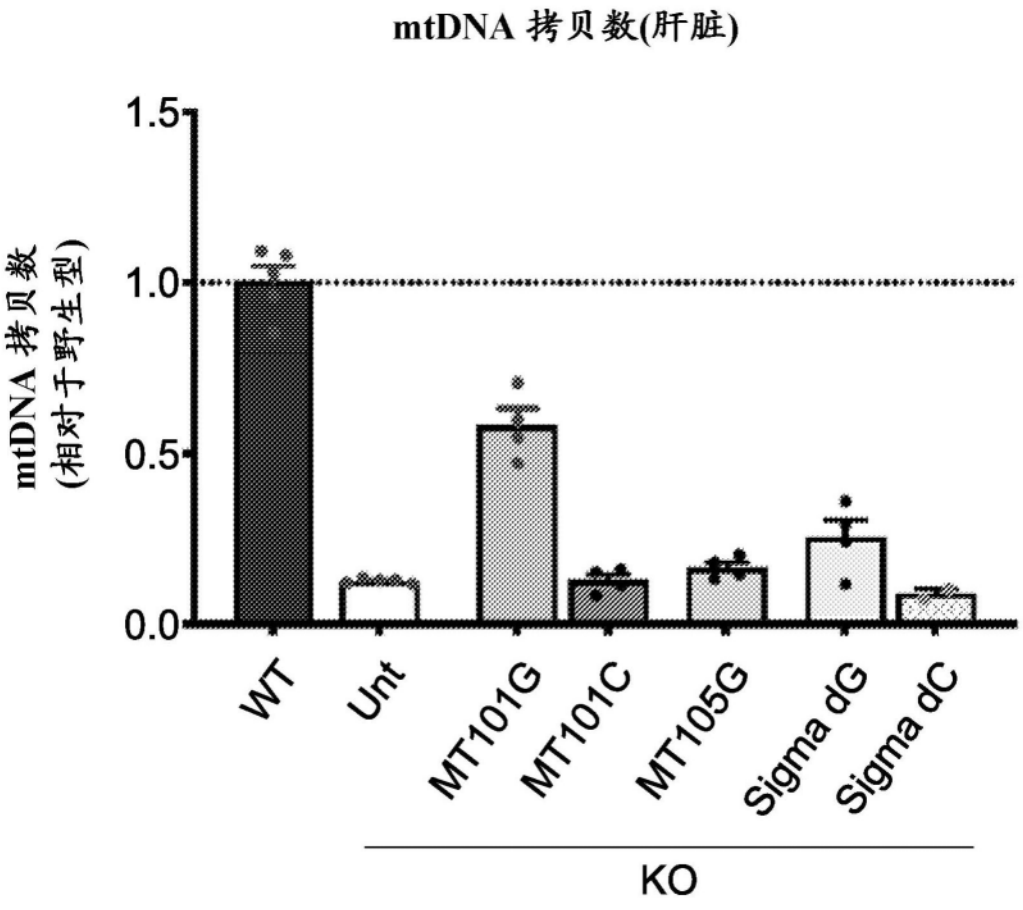

mtDNA 拷贝数(肝脏)
mtDNA 拷贝数
(相对于野生型)
1.5
1.0
0.5
0.0
WT
Unt
MT101G
MT101C
MT105G
Sigma dG
Sigma dC
KO

图9