



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105992587 A

(43)申请公布日 2016.10.05

(21)申请号 201480009224.7

(22)申请日 2014.02.18

(30)优先权数据

61/766,011 2013.02.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.08.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/016996 2014.02.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/127378 EN 2014.08.21

(71)申请人 春堤制药公司

地址 美国马萨诸塞

(72)发明人 R·P·艾依尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 孙式洪

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 31/7084(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

权利要求书5页 说明书32页 附图21页

(54)发明名称

作为疫苗佐剂和治疗试剂的短寡核苷酸的设计

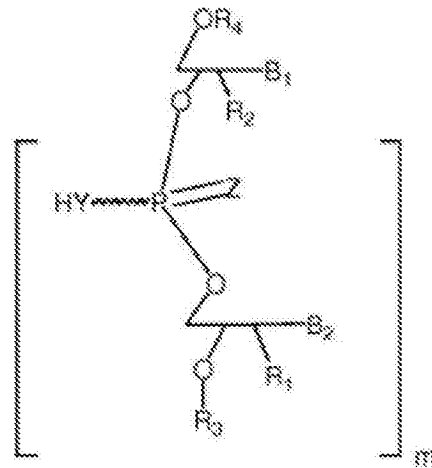
(57)摘要

本发明提供了通过施用有效量的核苷、短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体,来治疗受试者中的微生物感染的方法和改善受试者中针对疾病、状况、感染或病毒的免疫系统应答的方法。另外,本发明提供了用于治疗或预防受试者(例如人)中的病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染的方法。本发明的化合物包括例如如本文提供的二和三核苷酸化合物。本发明的化合物可用于不同治疗应用,包括例如预防剂和治疗剂。本发明还提供了化合物的设计和合成,所述化合物可用于如本文提及的多种治疗应用。

1. 一种通过给鉴定为有此需要的受试者施用有效量的预防试剂, 来治疗微生物感染的方法, 其中所述预防试剂是短寡核苷酸化合物或其类似物, 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

2. 一种改善受试者中针对疾病、状况、感染或病毒的免疫系统应答的方法, 所述方法包括给所述受试者施用有效量的疫苗佐剂, 其中所述疫苗佐剂是短寡核苷酸化合物或其类似物, 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

3. 权利要求1或2的方法, 其中所述短寡核苷酸化合物或其类似物是式(I)的化合物:



其中:

R₁和R₂各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环;

R₃选自氢、烷基、取代烷基、C(0)-烷基、C(0)O-烷基、C(0)-芳基、C(0)O-芳基、C(0)NH-烷基和C(0)NH-芳基;

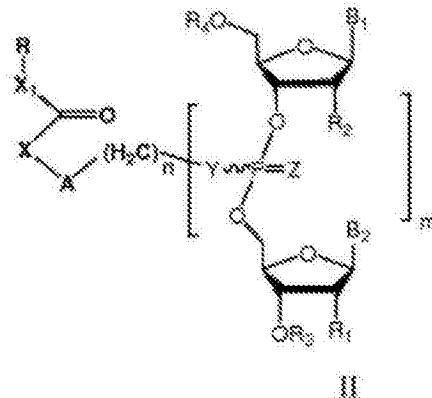
Y和Z各自独立地是O或S;

B₁和B₂各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷;

m=1-6;

R₄独立地是H、烷基、取代烷基、C(0)-烷基、C(0)O-烷基、C(0)-芳基、C(0)O-芳基、C(0)NH-烷基和C(0)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

4. 权利要求1或2的方法, 其中所述短寡核苷酸化合物或其类似物是式(II)的化合物:



其中

X=不存在、O、NH、NR或S；

X₁=不存在、O或NH；

A=不存在、芳基或芳烷基；

n=0、1、2、3、4或5；

R=烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-烷基、O-杂芳基或甾体；

R₁和R₂各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环；

R₃选自氢、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基；

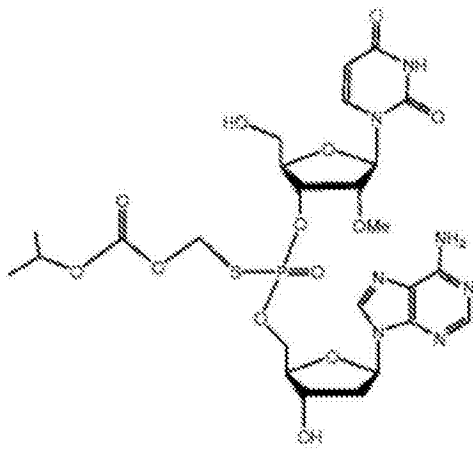
Y和Z各自独立地是O或S；

B₁和B₂各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷；

m=1-6；

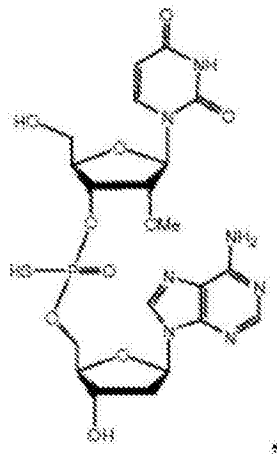
R₄独立地是H、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

5. 权利要求1或2的方法，其中所述短寡核苷酸化合物或其类似物是下述结构的化合物：



或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

6. 权利要求1或2的方法，其中所述短寡核苷酸化合物或其类似物是下述结构的化合物：



或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

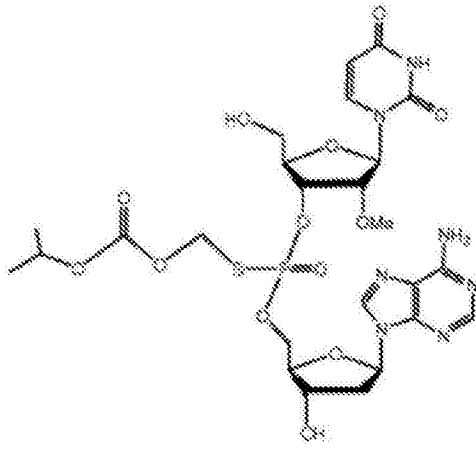
7. 权利要求1或2的方法,其中所述方法包括施用疫苗。

8. 权利要求7的方法,其中所述疫苗是BCG疫苗。

9. 权利要求8的方法,其中所述预防试剂或疫苗佐剂是式(I)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

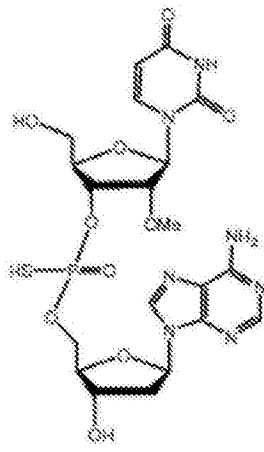
10. 权利要求8的方法,其中所述预防试剂或疫苗佐剂是式(II)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

11. 权利要求8的方法,其中所述预防试剂或疫苗佐剂是下述结构的化合物:



或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

12. 权利要求8的方法,其中所述预防试剂或疫苗佐剂是下述结构的化合物:



或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

13. 权利要求2的方法,其中所述疫苗佐剂与用于治疗或预防微生物感染的疫苗一起施用。

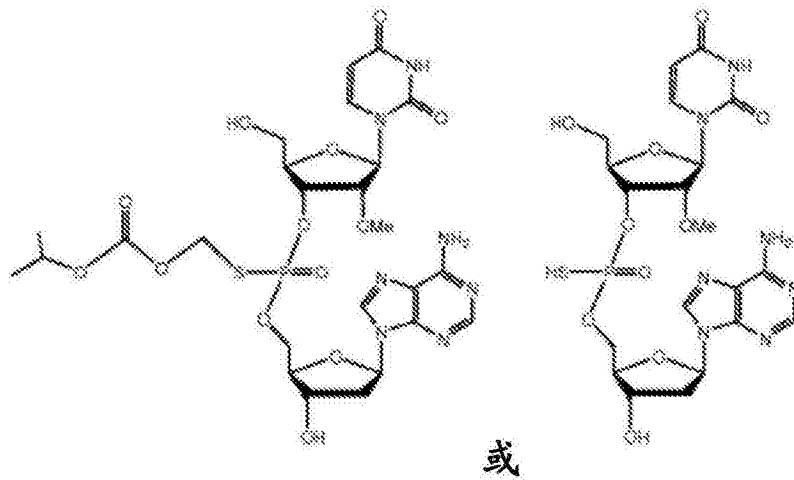
14. 权利要求7的方法,其中所述方法用于改善所述受试者中针对病毒的免疫系统应答。

15. 权利要求7的方法,其中所述方法用于改善针对癌症的免疫系统应答。

16. 一种用于预防和治疗受试者中的病毒感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的化合物,其中所述化合物是式(I)或(II)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

17. 权利要求16的方法,其中所述方法包括与所述化合物组合或顺次施用疫苗或者一种或多种另外试剂。

18. 权利要求16的方法,其中所述化合物是

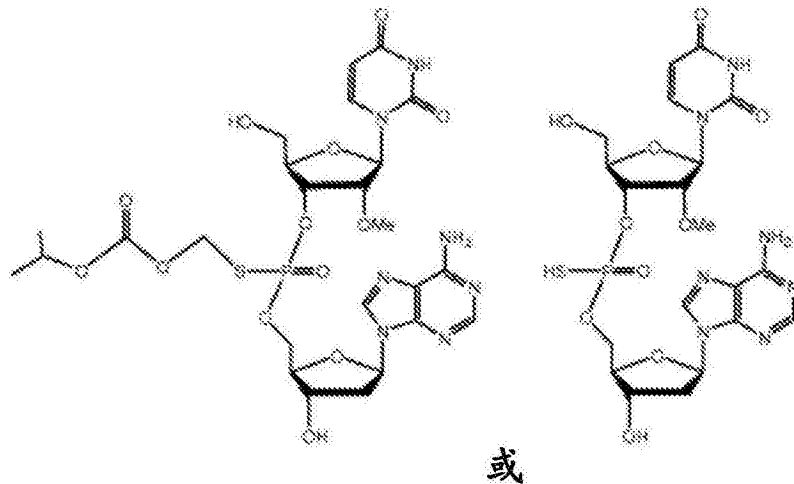


或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

19. 一种用于预防和治疗受试者中的细菌感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的化合物,其中所述化合物是式(I)或(II)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

20. 权利要求19的方法,其中所述方法包括与所述化合物组合或顺次施用疫苗或者一种或多种另外试剂。

21. 权利要求19的方法,其中所述化合物是

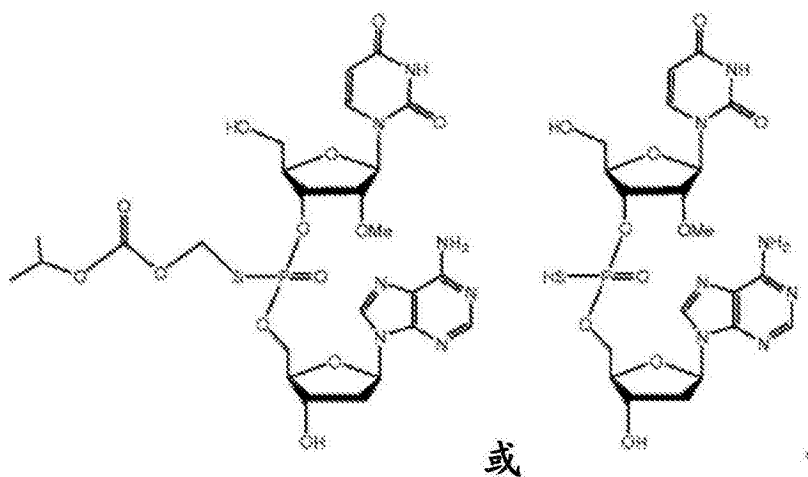


或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

22. 一种用于预防和治疗受试者中的真菌感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的化合物,其中所述化合物是式(I)或(II)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

23. 权利要求22的方法,其中所述方法包括与所述化合物组合或顺次施用疫苗或者一种或多种另外试剂。

24. 权利要求22的方法,其中所述化合物是

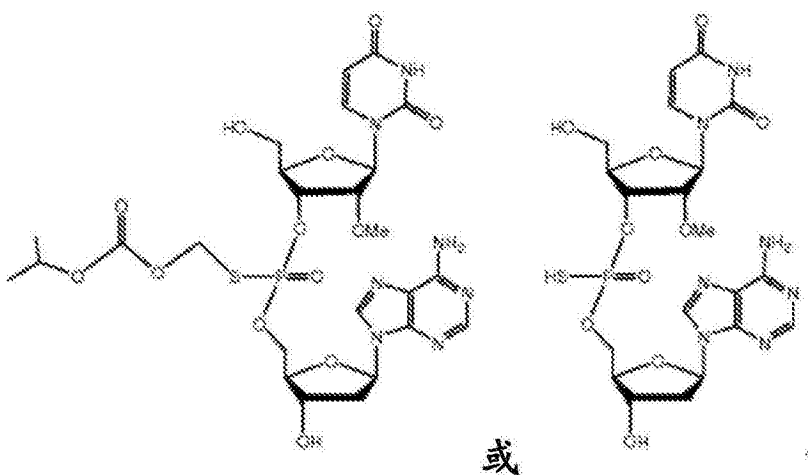


或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

25. 一种用于预防和治疗受试者中的寄生虫感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的化合物,其中所述化合物是式(I)或(II)的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

26. 权利要求25的方法,其中所述方法包括与所述化合物组合或顺次施用疫苗或者一种或多种另外试剂。

27. 权利要求25的方法,其中所述化合物是



或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

作为疫苗佐剂和治疗试剂的短寡核苷酸的设计

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本发明要求于2013年2月18日提交的美国临时专利申请系列号61/766,011的优先权利益,所述美国临时专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 先天性免疫在机体针对原核生物和真核生物病原体例如病毒、细菌、真菌、寄生虫等的防御中起关键作用。事实上,通过病毒引起的急性和慢性感染构成主要的全世界的公共卫生危机,具有明显未满足的医学需要(1,2)。除传染病之外,病毒引起全世界所有癌症的15-20%,包括肝癌、宫颈癌和胰腺癌,各自导致显著的死亡率和发病率。

[0005] 除人类痛苦之外,病毒性疾病导致压倒性的卫生保健费用和生产力丧失。例如,全世界500,000,000至600,000,000人由HBV和HCV慢性感染,并且由于病毒诱导的肝硬化和肝癌,每年发生1,000,000至2,000,000例死亡。全世界数以万计的患者迫切需要肝移植。人乳头状瘤病毒感染导致宫颈癌,并且与HIV感染相关的卡波济肉瘤的发生率均有据可查。大流行性感冒的特征在于在人中高水平的发病率和死亡率,并且与由于缺乏针对其新型抗原亚型的预存免疫而增加水平的感染和发病机制相关。抗病毒剂不仅潜在减慢大流行性感冒的传播,还可能最终是解决方案。当今,由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (Mtb)引起的肺结核杀死比任何其他细菌感染更多的人。在超过90个国家,接近三分之一的人群被Mtb感染,并且2,000,000人每年死于该疾病。

[0006] 尽管疫苗可作为针对有限数目的病毒的预防药获得,但它们对于已经感染的那些人没有实际的治疗利益。此外,由于在新人类菌株已鉴定后生成足够剂量的针对其的合适疫苗所需的时间,针对某些病毒的疫苗(例如流感疫苗)不太可能对大范围流行中的死亡率造成显著影响。佐剂的使用可以增大疫苗的效力,且提供针对广泛范围的病毒的保护。

[0007] 因此,我们的抗病毒防御几乎专一地依赖抗病毒药物的使用。不幸的是,许多医学上重要的病毒,特别是RNA病毒是危险的,不能在模型系统中进行测试,或不能繁殖用于测试潜在的候选药物。

[0008] 目前的抗病毒药物中的许多已作为病毒聚合酶、蛋白酶、整合酶和进入抑制剂开发。然而,设计为抑制病毒生长的药物也可以不利地影响宿主细胞,因为病毒生命周期衔接正常宿主细胞功能。顺应抗病毒干预的有限的病毒靶进一步阻碍抗病毒药物开发。因此,尽管近50年的抗病毒研究,我们的抗病毒药物库仍少到危险的程度,在国际市场上仅具有约34种抗病毒药物,大部分针对HIV和疱疹病毒。

[0009] 进一步地,几种慢性病毒性疾病包括HCV和HBV的目前治疗选项仍是非常有限且有挑战性的。事实上,在疗法停止后的病毒反弹、药物造成的毒性和在抗病毒药物的选择压力下的抗性株出现仍是目前抗病毒疗法中的严重问题。病毒的彻底根除很少达到,并且充其量在极小的患者队列中,因为目前的抗病毒疗法产生不足够和不可持续的抗病毒应答。靶向宿主编码功能的药物的开发提供了抗微生物开发的替代策略。

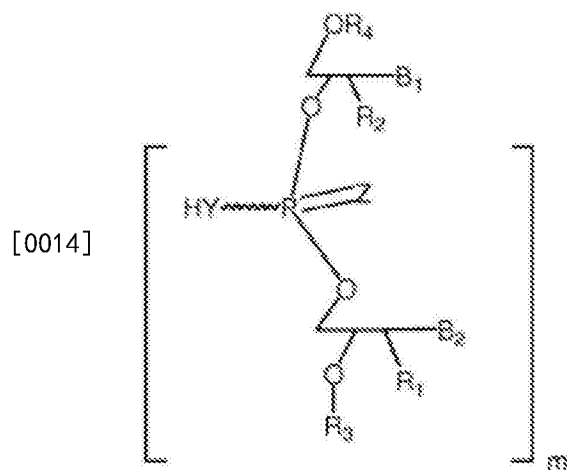
[0010] 病毒也已继续进化出更聪明的逃避宿主免疫应答的策略,并且通过多种机制发展针对药物的抗性。细胞经由细胞传感器使自身免于微生物感染,所述细胞传感器包括维甲

酸诱导基因(RIG-I)及其他RIG样蛋白质(RLR)、MDA5、核苷酸寡聚结构域蛋白质-2(NOD2及其他Nod样蛋白质(NLR)。经由病原体识别受体与微生物核酸或肽的相互作用活化这些蛋白质引起干扰素信号传导途径,导致使细胞免于感染的IFN产生。事实上,认识到DNA和RNA病毒两者均抑制I型干扰素(IFN)产生,从而提示控制IFN应答是广泛范围的病毒存活必需的(3,4)。因此,有效的抗病毒疗法的开发必须涉及新药物类别的组合的使用,所述新药物类别各自具有新型多重作用机制,包括刺激宿主免疫应答用于根除病毒的那些机制。类似地,细菌已进化出导致对抗菌剂抗性的独特机制。因此,有效的抗菌疗法的开发必须涉及新药物类别的组合的使用,所述新药物类别各自具有新型多重作用机制,包括刺激宿主免疫应答用于根除细菌的那些机制。许多不同类型的癌症已进化出发展针对抗癌剂的抗性的不同机制。因此,有效的抗癌疗法的开发必须涉及新药物类别的组合的使用,所述新药物类别各自具有新型多重作用机制,包括刺激宿主免疫应答用于根除癌症的那些机制。

[0011] 发明概述

[0012] 在一个方面,本发明提供了用作预防试剂的核苷、短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体(下文被称为“本发明的化合物”)。在另一个方面,本发明提供了用作疫苗佐剂的核苷、短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0013] 本发明的化合物包括例如式(I)的化合物:



[0015] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体,

[0016] 其中:

[0017] R_1 和 R_2 各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环;

[0018] R_3 选自氢、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基;

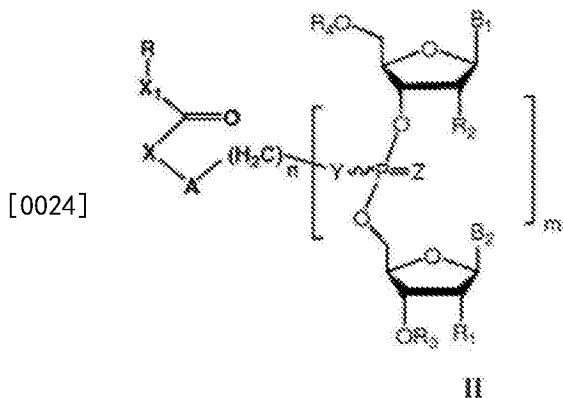
[0019] Y和Z各自独立地是O或S;

[0020] B_1 和 B_2 各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷;

[0021] $m=1-6$ 。

[0022] R_4 独立地是H、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

[0023] 在一个实施方案中,本发明的化合物是式(II)的化合物:



[0025] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体,

[0026] 其中:

[0027] X=不存在、O、NH、NR或S;

[0028] X₁=不存在、O或NH;

[0029] A=不存在、芳基或芳烷基;

[0030] n=0、1、2、3、4或5;

[0031] R=烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-烷基、O-杂芳基或甾体;

[0032] R₁和R₂各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环;

[0033] R₃选自氢、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基;

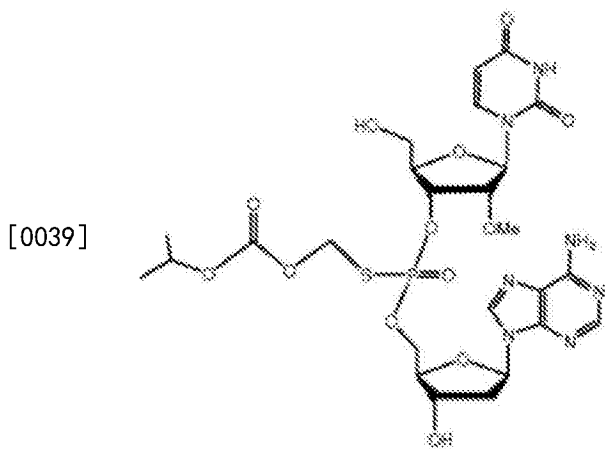
[0034] Y和Z各自独立地是O或S;

[0035] B₁和B₂各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷;

[0036] m=1-6;

[0037] R₄独立地是H、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

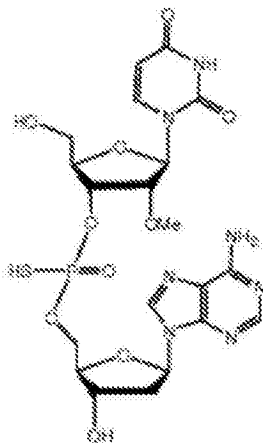
[0038] 在一个实施方案中,本发明的化合物是具有下述结构的化合物:



[0040] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是具有下述结构的化合物:

[0042]



[0043] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0044] 本发明还提供了通过给鉴定为有此需要的受试者(或宿主)施用有效量的本发明的化合物,来治疗受试者(或宿主)中的微生物感染的方法。

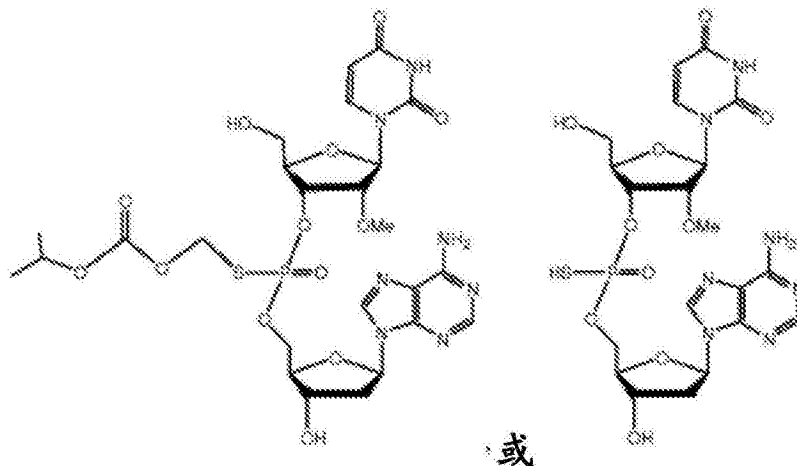
[0045] 在另一个方面,本发明提供了改善受试者(或宿主)中针对疾病、状况、感染或病毒的免疫系统应答的方法。该方法包括给受试者施用有效量的作为疫苗佐剂的本发明的化合物。

[0046] 在该方法的某些实施方案中,本发明的化合物是式(I)的短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0047] 在其他实施方案中,本发明的化合物是式(II)的短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0048] 在一个实施方案中,本发明的化合物是

[0049]



[0050] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0051] 本发明还提供了用于预防和治疗宿主(或受试者)包括人中的病毒感染的方法。该方法包括施用有效量的本发明的化合物。

[0052] 在另外一个方面,本发明提供了用于预防和治疗宿主(或受试者)包括人中的细菌感染的方法,其包括施用有效量的本发明的化合物。

[0053] 进一步地,本发明提供了用于预防和治疗宿主(或受试者)包括人中的寄生虫感染的方法,其中所述方法包括施用有效量的本发明的化合物。

[0054] 再进一步地,本发明提供了通过给宿主施用有效量的本发明的化合物,用于预防和治疗宿主(或受试者)包括人中的真菌感染的方法。

[0055] 根据本发明的方法,本发明的化合物可以连同疫苗(例如BCG疫苗)或者一种或多种另外试剂一起施用。即,根据本发明的方法,本发明的化合物可以单独或者与疫苗或另外一种或多种试剂组合或顺次施用。

[0056] 在一个实施方案中,本发明的化合物和疫苗施用用于治疗或预防微生物感染。

[0057] 在另一个实施方案中,本发明的化合物与其他抗微生物剂组合施用,用于治疗或预防微生物感染。

[0058] 在另一个实施方案中,本发明的方法和化合物针对病毒使用。

[0059] 在进一步的实施方案中,方法和化合物用于治疗或预防癌症。

[0060] 本发明进一步提供了用于治疗或预防本文描述的状况、疾病、感染或病毒的药物组合物和试剂盒。药物组合物包括治疗有效量的本发明的化合物,和药学可接受的赋形剂。本发明的试剂盒包括治疗有效量的本发明的化合物,和关于施用化合物用于治疗或预防本文描述的状况、疾病、感染或病毒的书面说明书。本发明还提供了用于治疗或预防本文的状况、疾病、感染或病毒的包装药剂和物品。

[0061] 此外,本发明还提供了可用于如本文提及的多种治疗应用的化合物的设计和合成。本发明的其他特征和优点根据详述和权利要求将是显而易见的。

[0062] 附图简述

[0063] 根据本发明的优选实施方案的下述更具体描述,本发明的前述及其他目的、特点和优点将是显而易见的,如附图中举例说明的,其中在不同视图自始至终,相似的参考符号指相同部分。附图不一定按比例绘制,相反重点放在举例说明本发明的原理上。

[0064] 图1显示了在未经处理的(UT)和SMNH化合物处理的人肺上皮细胞(HLE A549细胞)中,干扰素调节因子-3(IRF3)-萤光素酶报道基因的活化。

[0065] 图2证实了通过SMNH化合物(SB 40和SB 1B[SB 44-1])的IRF3活化经由NOD2活化而介导。

[0066] 图3显示了在HLE细胞中通过SB 44活化RIG-I后的IRF3诱导。

[0067] 图4证实了在通过SB 44活化RIG-I和NOD2后,转录因子NF-KB的诱导。

[0068] 图5显示了IRF3的诱导导致磷酸化的IRF3的形成,所述磷酸化的IRF3是IFN信号传导级联中的关键中间产物。

[0069] 图6显示了通过SB 1B的IRF3诱导经由NOD2活化而介导;SB 40是SB 44的活性代谢产物。

[0070] 图7显示了SMNH化合物(SB 44和SB 302,a,草酸盐形式)诱导来自人肺上皮A549细胞的干扰素- β (IFN- β)生产。

[0071] 图8显示了SB 1B(显示为“SB-44-1-D”)处理导致来自人肺上皮A549细胞的IFN- β 生产。

[0072] 图9显示了通过SB 1B(显示为“SB-44-1-D”)的应答者基因RIG-I和NOD2诱导;SB 50不活化NOD2且用作阴性对照。

[0073] 图10(a-d)显示了SMNH化合物增强在巨噬细胞中的肽抗原-85B的体外呈现,这与增加的MHC-II表达关联(SB 44显示为SB 1A)。

[0074] 图11(a-e):a)显示了在小鼠中的疫苗实验模型;b-e)是显示作为增强BCG疫苗针对小鼠中的肺结核的功效的佐剂,NOD2活化化合物SB 1A(也显示为SB 44)和SB 1B比胞壁酰二肽(MDP)更佳的图表。

[0075] 图12显示了通过巨噬细胞中的半胱天冬酶依赖性机制,NOD2活化化合物SB 1A(也显示为SB 44)和SB 1B(SB 44的Rp异构体)仅与MDP或完整BCG杆菌组合而诱导IL-1 β 。

[0076] 图13(a-b)显示了与BCG疫苗组合的NOD2活化SB 1A(也显示为SB 44)和SB 1B(SB 44的Rp异构体)在小鼠中诱导针对肺结核的再攻击的保护,提示长期保护。

[0077] 图14显示了开发为验证SB 1A(也显示为SB 44)和SB 1B(SB 44的Rp异构体)诱导的MPEC,可以通过在小鼠中再生为强效应T细胞致使长期保护的模型。

[0078] 图15(a-b)显示了具有BCG疫苗的SB 1A(也显示为SB 44)或SB 1B(SB 44的Rp异构体)组合保留产生针对用肺结核的再攻击的更佳回忆应答的能力。

[0079] 图16显示了在肺结核再攻击的小鼠的肺中,与BCG疫苗组合的NOD2活化SB 1A(也显示为SB 44)和SB 1B(SB 44的Rp异构体)化合物诱导抗原特异性CD8T细胞的强劲扩增。

[0080] 图17显示了当与本发明的化合物组合时,用BCG处理的PBMC中的干扰素诱导。

[0081] 发明详述

[0082] 在一个方面,本发明特征在于本文描述的化合物和使用此类化合物用于治疗受试者中的微生物感染的方法。在另一个方面,本发明涉及用于改善受试者中针对疾病、状况、感染或病毒的免疫系统应答的化合物、组合物和方法。

[0083] 本发明还提供了通过给宿主(或受试者)施用有效量的本发明的化合物,来预防和治疗宿主(或受试者)包括人中的病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染的方法。

[0084] 多药抗性Mtb(MDR-Mtb)对目前的抗TB药物中的许多是有抗性的,所述抗TB药物包括异烟肼、利福平、卡那霉素等。WHO估计全世界高达50,000,000人可能被MDR-Mtb感染。由于药物治疗/抗性中的困难,预防或限制肺结核的疫苗接种变得越来越重要。目前,BCG疫苗是针对儿童期TB的唯一可变保护,并且不提供针对成人疾病的保护。因此,需要更有效的BCG疫苗。加强BCG效力的一种方法是将其与佐剂组合。佐剂是可以促进、调节且改善疫苗免疫原性的化合物。佐剂还可以降低所需靶抗原剂量且以定量方式调节抗原特异性免疫应答,例如Th1和Th2应答。先天性免疫中的近期进展已显示TLR、RIG-I和NLR,特别是NOD2识别多种核酸配体,其刺激先天性免疫应答且促进佐剂样活性。

[0085] 脊椎动物系统不断地处于被侵入微生物的攻击下,并且已进化出免疫介导的用于消除病原体的防御。哺乳动物免疫系统包含先天性和获得性免疫的组分。先天性免疫系统经由有限数目的种系编码的病原体识别受体(PRR)来识别微生物(3,4)。吞噬细胞例如巨噬细胞和树突状细胞介导先天性免疫应答。获得性免疫应答的特征在于涉及淋巴细胞的特异性,所述淋巴细胞携带通过诸如基因重排的机制生成的抗原特异性受体。先天性免疫在调节肝损伤、纤维化和再生中起重要作用。例如,通过干扰素活化天然杀伤细胞(NK细胞)可以是治疗肝纤维化的新型策略。这是因为NK细胞的活化可以杀死特别活化的肝星状细胞(HSC),从而改善肝纤维化和肝肿瘤形成。因此,本发明中公开的寡核苷酸类似物可以在抑制肝纤维化和肝癌进展中具有效用。

[0086] 微生物也已进化出更聪明的逃避免疫应答的策略,所述免疫应答使宿主细胞免于感染。事实上,DNA和RNA病毒两者均抑制细胞IFN产生(I型、IFN- α 、IFN- β)。细胞内IFN是有

力的抗病毒细胞因子,其表达/产生通过未感染细胞的细胞质中存在的转录因子IRF3(IFN调节因子3)介导。一旦细胞被感染,并且病毒组分(也称为病原体相关分子模式(PAMPs,例如病毒基因组、病毒蛋白质等)由专门的病毒传感器或模式识别受体(PRR)识别,IRF3就被活化。活化的IRF3易位至核,以反式活化IFN基因表达。IFN产生通过多种机制诱导保护性抗病毒效应(经由旁分泌和自分泌活性),所述机制例如(i)先天性和适应性免疫应答的活化,(ii)通过抗病毒和有利的促炎因子的产生,在细胞中诱导抗病毒状态,和(iii)病毒感染细胞的受控细胞凋亡。PRR因此是IFN应答的必需组分。最近以来,NOD2,核苷酸寡聚结构域(NOD)蛋白质的家族成员,已发现是检测单链RNA(ssRNA)病毒包括RSV和A型流感的PRR。有趣的是,如同病毒传感器RIG-I,NOD2的活化还导致触发IFN产生和NF- κ B诱导的信号转导级联,其促进受控的促炎应答,以加强IFN的抗病毒作用。因为,NOD2是检测广泛范围的ssRNA病毒例如RSV和A型流感的病毒传感器,其呈现用于抗病毒开发和对抗抗病毒抗性的独特宿主靶。

[0087] 类似于NOD2,RIG-I是将双链病毒RNA识别为PAMP的宿主细胞溶质蛋白质,其活化I型干扰素免疫防御,从而抑制病毒复制以及压制对于病毒感染的细胞允许性(6-15)。RIG-I是检测广泛范围的RNA病毒的病毒传感器,所述RNA病毒例如黄病毒包括丙型肝炎病毒、仙台病毒、流感病毒、以及水疱性口炎病毒、狂犬病毒和日本脑炎病毒,它呈现关于广谱抗病毒活性的独特宿主靶。值得注意的是尽管HBV是DNA病毒,但它使用前基因组RNA模板用于起始DNA合成,且潜在地因此RIG-I可以是HBV pgRNA的受体。

[0088] 已发现某些二核苷酸组合物具有通过RIG-I途径的活化,用于刺激先天性免疫和诱导干扰素产生的潜力。此类化合物还可以是针对病毒感染预防上有用的,并且用作疫苗中的佐剂。

[0089] 病毒传感器RIG-I是由下述组成的多聚细胞溶质蛋白质:C末端调节结构域(RD)、两个末端半胱天冬酶(caspase)活化和招募结构域(CARDS)以及中央ATP酶结构域。病毒双链RNA(dsRNA)和5'-三磷酸是两个PAMP,其允许RIG-I区别病原体RNA(含和不含三磷酸的dsRNA)与宿主RNA(其通常在末端处具有“帽”修饰)(6-14)。此外,RIG-I具有通过易位现象感测病毒RNA的能力(Myong等人,Science 323,1070.2009)。在病毒基因组的dsRNA上的RIG-I易位和反复改组是RIG-I的触发物,以经历构象变化,活化其ATP酶且暴露CARDS用于遍在蛋白化。在下一步中,CARDS与线粒体抗病毒信号传导(MAVS)[也称为干扰素 β 刺激物[(IPS-1)或VISA]]相互作用,以引发导致I型IFN表达(IFN- α 、 β)的下游信号传导。

[0090] NOD2和RIG-I是多聚蛋白质,其在结构和组构上非常相似。因此,如同RIG-I,NOD2含有CARD结构域。另外,RIG-I和NOD2均具有位于NBD(核苷酸结合结构域)(对于NOD2)和解旋酶(对于RIG-I)结构域中的核苷酸结合袋。分子建模研究显示某些二核苷酸组合物与核苷三磷酸(NTP)结构具有结构相似性,所述NTP结构与NBD结合。我们假设短寡核苷酸充当NTP模拟物,其与NOD2(和RIG-I)的NBD结合,且因此其活化用于下游抗病毒作用。

[0091] 本发明人发现本发明的核苷、短寡核苷酸化合物或其类似物可以调节免疫途径,所述免疫途径涉及Toll样受体(TLR)、非TLR受体例如维甲酸诱导基因-1(RIG-I)和核苷酸寡聚蛋白质(NOD),统称为TLR、RLR和NLR。这些途径通过其各自配体的活化可以诱导多种细胞因子和趋化因子的产生,例如白细胞介素、干扰素、NF- κ B、TNF- α 等,并且还引起具有抗微生物活性的某些细胞蛋白质的诱导,从而提供抗微生物免疫。相反,本发明人设计了用于引

起炎症途径抑制的化合物,导致在自身免疫疾病中的有利效应。

[0092] 本发明人出乎意料地发现本发明的核苷、短寡核苷酸化合物及其类似物可以用作疫苗的佐剂。本发明的化合物具有针对由细菌和病毒因子引起的多种传染病的治疗效用。本发明的化合物还可用于治疗或预防自身免疫疾病,例如过敏、哮喘、炎症病症、以及其他疾病例如癌症。

[0093] 因此,本发明提供了用于治疗或预防本文描述的多种状况、疾病、感染或病毒的方法。

[0094] 定义

[0095] 为了使本发明可以更容易得到理解,为了方便起见,某些术语首先在此处进行定义和收集。

[0096] 本发明的化合物包含来自“天然”核酸(即天然核苷间键,或核碱基G、C、T、U、A等)的一种或多种修饰。修饰包括例如核苷酸间键、碱基、或糖部分的修饰。

[0097] 核苷单位由国际公认的线图约定表示。在下文例子中,2'-取代的核糖核苷以常规结构和相应的线图形式两者表示。



[0099] 附着至产生 α 或 β N或C核苷的 B_1 和 B_2 的糖单位包括但不限于呋喃糖、脱氧呋喃核糖、核糖和阿拉伯糖。

[0100] 术语“施用(administration)”或“施用(administering)”包括将一种或多种化合物引入受试者以执行其预期功能的途径。可以使用的施用途径的例子包括注射(皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内)、经口、吸入、直肠和经皮。药物制剂当然通过适合于每种施用途径的形式给予。例如,这些制剂以片剂或胶囊形式、通过注射、吸入、通过洗剂或软膏局部施用;以及通过栓剂直肠施用。经口施用是优选的。注射可以是推注,或可以是连续输注。取决于施用途径,化合物可以以所选材料包被或在所选材料中沉积,以使其免于可能有害地影响其执行其预期功能的能力的天然条件。

[0101] 化合物可以单独或与如上所述的另一种试剂(例如疫苗)或药学可接受的载体或两者结合施用。化合物可以在另一种试剂施用前,与试剂同时,或在试剂施用后进行施用。此外,化合物还可以以前体形式施用,所述前体形式在体内转换成其活性代谢产物、或更活性的代谢产物。

[0102] 如本文使用的,术语“芳基”指具有一个或两个芳环的单环或多环碳环系统,包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基(idenyl)等。

[0103] 如本文使用的,术语“杂芳基”指具有五至十个环原子的单环或多环(例如二环或三环或更多环)芳香族原子团或环,其中一个或多个环原子选自例如S、O和N;零个、一个或两个环原子是独立地选自例如S、O和N的另外杂原子;并且剩余环原子是碳,其中环内含有的任何N或S可以任选是氧化的。杂芳基包括但不限于吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑、噁二唑基、苯硫基、呋喃基、噻啉基、异噻啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹啉基等。

[0104] 依照本发明,本文描述的芳基、取代芳基、杂芳基和取代杂芳基中的任何均可作为任

何芳香族基团。芳香族基团可以是取代或未取代的。

[0105] 如本文使用的,术语“烷基”指分别含有一至六个、或一至十二个碳原子的饱和、直链或支链烃原子团。C1-C6烷基原子团的例子包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、新戊基和正己基原子团;并且C1-C12烷基原子团的例子包括但不限于乙基、丙基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二基原子团。

[0106] 术语“芳烷基(arylalkyl)”或“芳烷基(arylalkyl)”包含芳基取代的烷基原子团例如苄基、二苯甲基、三苯甲基、苯乙基、和二苯乙基。

[0107] 如本文使用的,术语“杂环”指非芳香族5、6或7元环或者二环或三环基团稠合系统,其中(i)每个环含有独立地选自氧、硫和氮的一至三个杂原子,(ii)每个5元环具有0至1个双键,并且每个6元环具有0至2个双键,(iii)氮和硫杂原子可以任选是氧化的,(iv)氮杂原子可以任选是季铵化的,(iv)上述环中的任何均可与苯环稠合,和(v)剩余环原子是碳原子,其可以任选是氧基取代的。代表性杂环烷基包括但不限于[1,3]二氧戊环、吡咯烷基、吡唑啉基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、噁唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、噻唑烷基、异噻唑烷基、喹啉基、哒嗪基(pyridazinonyl)和四氢呋喃基。此类杂环基团可以是进一步取代的。

[0108] 如本文使用的,术语“环烷基”指示通过去除单个氢原子,衍生自单环或多环饱和碳环化合物的单价基团。例子包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、二环[2.2.1]庚基和二环[2.2.2]辛基。

[0109] 如本文使用的,术语“取代芳基”、“取代烷基”、“环烷基”指在其上的一个、两个或三个或更多个氢原子由取代基取代的先前定义的芳基、烷基和环烷基,所述取代基包括但不限于-F、-Cl、-Br、-I、-OH、受保护的羟基、-NO₂、-CN、-NH₂、受保护的氨基、-NH-C1-C12-烷基、-NH-C2-C12-烯基、-NH-C2-C12-炔基、-NH-C3-C12-环烷基、-NH-芳基、-NH-杂芳基、-NH-杂环烷基、-二烷基氨基、-二芳基氨基、-二杂芳基氨基、-O-C1-C12-烷基、-O-C2-C12-烯基、-O-C2-C12-炔基、-O-C3-C12-环烷基、-O-芳基、-O-杂芳基、-O-杂环烷基、-C(O)-C1-C12-烷基、-C(O)-C2-C12-烯基、-C(O)-C2-C12-炔基、-C(O)-C3-C12-环烷基、-C(O)-芳基、-C(O)-杂芳基、-C(O)-杂环烷基、-CONH₂、-CONH-C1-C12-烷基、-CONH-C2-C12-烯基、-CONH-C2-C12-炔基、-CONH-C3-C12-环烷基、-CONH-芳基、-CONH-杂芳基、-CONH-杂环烷基、-OC(O)-C1-C12-烷基、-OC(O)-C2-C12-烯基、-OC(O)-C2-C12-炔基、-OC(O)-C3-C12-环烷基、-OC(O)-芳基、-OC(O)-杂芳基、-OC(O)-杂环烷基、-OCONH₂、-OCONH-C1-C12-烷基、-OCONH-C2-C12-烯基、-OCONH-C2-C12-炔基、-OCONH-C3-C12-环烷基、-OCONH-芳基、-OCONH-杂芳基、-OCONH-杂环烷基、-NHC(O)-C1-C12-烷基、-NHC(O)-C2-C12-烯基、-NHC(O)-C2-C12-炔基、-NHC(O)-C3-C12-环烷基、-NHC(O)-芳基、-NHC(O)-杂芳基、-NHC(O)-杂环烷基、-NHC(O)-C1-C12-烷基、-NHC(O)-C2-C12-烯基、-NHC(O)-C2-C12-炔基、-NHC(O)-C3-C12-环烷基、-NHC(O)-芳基、-NHC(O)-杂芳基、-NHC(O)-杂环烷基、-NHC(O)NH₂、-NHC(O)NH-C1-C12-烷基、-NHC(O)NH-C2-C12-烯基、-NHC(O)NH-C2-C12-炔基、-NHC(O)NH-C3-C12-环烷基、-NHC(O)NH-芳基、-NHC(O)NH-杂芳基、-NHC(O)NH-杂环烷基、NHC(S)NH₂、-NHC(S)NH-C1-C12-烷基、-NHC(S)NH-C2-C12-烯基、-NHC(S)NH-C2-C12-炔基、-NHC(S)NH-C3-C12-环烷基、-NHC(S)NH-芳基、-NHC(S)NH-杂芳基、-NHC(S)NH-杂环烷基、-NHC(NH)NH₂、-NHC(NH)NH-C1-C12-烷基、-NHC(NH)NH-C2-C12-烯基、-NHC(NH)NH-C2-C12-炔基、-NHC(NH)NH-C3-C12-环烷基、-NHC(NH)NH-芳基、-

NHC(NH)NH-杂芳基、-NHC(NH)NH-杂环烷基、-NHC(NH)-C1-C12-烷基、-NHC(NH)-C2-C12-烯基、-NHC(NH)-C2-C12-炔基、-NHC(NH)-C3-C12-环烷基、-NHC(NH)-芳基、-NHC(NH)-杂芳基、-NHC(NH)-杂环烷基、-C(NH)NH-C1-C12-烷基、-C(NH)NH-C2-C12-烯基、-C(NH)NH-C2-C12-炔基、-C(NH)NH-C3-C12-环烷基、-C(NH)NH-芳基、-C(NH)NH-杂芳基、-C(NH)NH-杂环烷基、-S(O)-C1-C12-烷基、-S(O)-C2-C12-烯基、-S(O)-C2-C12-炔基、-S(O)-C3-C12-环烷基、-S(O)-芳基、-S(O)-杂芳基、-S(O)-杂环烷基-SO₂NH₂、-SO₂NH-C1-C12-烷基、-SO₂NH-C2-C12-烯基、-SO₂NH-C2-C12-炔基、-SO₂NH-C3-C12-环烷基、-SO₂NH-芳基、-SO₂NH-杂芳基、-SO₂NH-杂环烷基、-NHSO₂-C1-C12-烷基、-NHSO₂-C2-C12-烯基、-NHSO₂-C2-C12-炔基、-NHSO₂-C3-C12-环烷基、-NHSO₂-芳基、-NHSO₂-杂芳基、-NHSO₂-杂环烷基、-CH₂NH₂、-CH₂SO₂CH₃、-芳基、-芳基烷基、-杂芳基、-杂芳基烷基、-杂环烷基、-C3-C12-环烷基、聚烷氧基烷基、聚烷氧基、-甲氧基甲氧基、-甲氧基乙氧基、-SH、-S-C1-C12-烷基、-S-C2-C12-烯基、-S-C2-C12-炔基、-S-C3-C12-环烷基、-S-芳基、-S-杂芳基、-S-杂环烷基、或甲硫基甲基。应当理解芳基、杂芳基、烷基等可以是进一步取代的。

[0110] 如本文使用的,术语“甾体”指具有众多天然存在的或合成脂溶性有机化合物中的任一种,其具有在四个环中排列的17个碳原子作为基础,并且包括甾醇和胆汁酸,肾上腺和性激素,某些天然药物例如洋地黄化合物,以及某些维生素的前体。甾体结构的例子包括但不限于胆固醇、胆甾烷醇、3 α -环5- α -胆甾烷-6- β -醇、胆酸、胆甾醇甲酸酯、胆甾烯甲酸酯。

[0111] 如本文使用的,术语“经修饰的核苷”指包括经修饰的杂环碱基、经修饰的糖部分或其组合的任何核苷。在一些实施方案中,经修饰的核苷是非天然嘧啶或嘌呤核苷,如本文描述的。经修饰的核苷的例子包括但不限于2'-取代的核糖核苷、阿糖苷(arabinonucleoside)或2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖苷、脱氮腺嘌呤、脱氮鸟嘌呤。

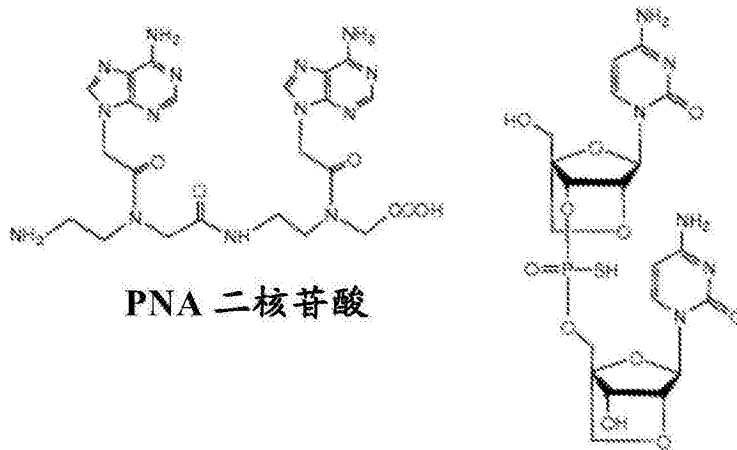
[0112] 为了本发明的目的,术语“一种或多种短寡核苷酸”指由1至约6个连接的核苷单位形成的单、二或多核苷。此类短核苷酸可以得自现有核酸来源,包括基因组或cDNA,但优选通过合成方法产生。核苷残基可以通过众多已知的核苷间键中的任一种彼此偶联。此类核苷间键可以是经修饰的或未经修饰的,并且包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、烷基磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、烷氧羰基、乙酰胺酯(acetamidate)、氨基甲酸酯、吗啉代、硼(borano)、硫醚、桥接氨基磷酸酯、桥接亚甲基磷酸酯、桥接硫代磷酸酯和砷核苷间键。术语“短核苷酸”还涵盖具有一个或多个立体特异性核苷间键(例如(RP)-或(SP)-硫代磷酸酯、烷基磷酸酯或磷酸三酯键)的多核苷。本发明的短核苷酸包括任何此类核苷间键,无论该键是否包含磷酸基。在某些优选实施方案中,这些核苷间键可以是经修饰的或未经修饰的,并且包括但不限于磷酸二酯、硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键或其组合。

[0113] 术语“一种或多种短核苷酸”还涵盖另外的取代基,包括但不限于蛋白质基团、亲脂基团、嵌入剂、二胺、叶酸、胆固醇和金刚烷。

[0114] 术语“一种或多种短核苷酸”还涵盖任何其他含核碱基聚合物,包括但不限于肽核酸(PNA)、具有磷酸基的肽核酸(PHONA)、锁核酸(LNA)。

[0115] PNA和LNA的例子显示于下文:

[0116]



PNA 二核苷酸

LNA 二核苷酸

[0117] “核苷酸”指核酸亚单位(无论是DNA还是RNA或其类似物,例如肽核酸(PNA)和锁核酸(LNA)),其包括核苷酸间键、糖基团和杂环碱基,以及此类亚单位的类似物。“核苷”指包括糖基团和杂环核碱基的核酸亚单位。应当理解,如本文使用的,术语“核苷”和“核苷酸”包括这样的部分,其不仅含有天然存在的核苷酸间键(就“核苷酸”而言),例如磷酸二酯核苷酸间键;天然存在的糖部分例如核糖和脱氧核糖部分;以及天然存在的核碱基例如嘌呤和嘧啶碱基,例如腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或尿嘧啶(U),还含有经修饰的核苷酸间键、经修饰的糖部分以及经修饰的嘌呤和嘧啶碱基或其类似物,或者经修饰的和未经修饰的核苷酸间键、糖部分以及嘌呤和嘧啶碱基的任何组合。经修饰的核苷的其他例子包括无环核苷,其由开环形式的核糖和脱氧核糖部分组成。相应地,此类开环核苷可以用于形成经修饰的核苷酸。经修饰的核苷的其他例子包括C-核苷例如假异胞嘧啶,以及核苷模拟物包括核苷电子等排物,例如肽核酸单体和锁核酸单体。

[0118] 核碱基包括天然存在的嘌呤和嘧啶核碱基以及经修饰的核碱基,其包括但不限于甲基化嘌呤或嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶等,或保护基团例如乙酰基、二氟乙酰基、三氟乙酰基、异丁酰基、苯甲酰基等的添加。嘌呤或嘧啶碱基还可以是前述的类似物;合适的类似物将是本领域技术人员已知的,并且在有关课本和文献中描述。常见类似物包括但不限于1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-异戊基腺嘌呤、2-甲基硫代-N6-异戊基腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、2-硫代胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、4-乙酰基胞嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、2,2-二甲基鸟嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-甲氧基鸟嘌呤、8-甲氧基腺嘌呤、8-氯鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫代鸟嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-(甲基氨基甲基)尿嘧啶、5-(羧基甲基氨基甲基)-尿嘧啶、2-硫代尿嘧啶、5-甲基-2-硫代尿嘧啶、5-(2-溴乙烯基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、肌苷、1-甲基肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、2-氨基嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、6-硫代嘌呤、2,6-二氨基嘌呤-5-三氟甲基胸腺嘧啶、6-氯-腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤。其他例子包括但不限于5-氟-尿嘧啶、5-三氟甲基胸腺嘧啶、6-氯-腺嘌呤、2-环戊氧基腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤。

[0119] 在某些实施方案中,碱基B可以是非天然核碱基,包括通用核碱基。碱基B的此类例

子包括但不限于二氟甲基、硝基吡咯基和硝基咪唑基等等。

[0120] 还应当理解“经修饰的碱基”还被称为“经修饰的核碱基”，包括含氮化合物，其可以是或不是杂环。此类优选的含氮化合物包括但不限于-NHR₁₈，其中R₁₈是氢、丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基、烯丙基、取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、或者杂环。

[0121] 术语“经修饰的核碱基”进一步意欲包括杂环化合物，其在最通常的含义上不是核苷碱基，但可以充当核苷碱基。此类化合物包括如本领域已知的“通用碱基”。通用碱基可以包括芳环部分，其可以含有或不含氮原子。在一些实施方案中，通用碱基可以共价附着至核苷的戊糖的C-1'碳。通用碱基的例子包括3-甲基丙烯基喹诺酮(PIM)、3-甲基异喹诺酮(MICS)、和5-甲基异喹诺酮部分。另外的例子包括肌苷衍生物、吡咯甲酰胺类似物、硝基吡咯和硝基咪唑。

[0122] 经修饰的核苷酸和核苷糖部分的例子包括但不限于：海藻糖、阿拉伯糖、2'-脱氧-2'-取代的戊糖部分、2'-O-取代的戊糖部分、核糖、来苏糖和木糖、或己糖基团。为了本发明的目的，命名糖基团中的任何的术语“2'-取代的”例如“2'-取代的核糖核苷”或“2'-取代的阿拉伯糖苷”包括核糖核苷或阿糖苷，其中在戊糖部分的2'-位置上的羟基被取代，以产生2'-取代或2'-O-取代的核糖核苷或阿糖苷。优选地，此类取代使用含有1-6个饱和或不饱和的碳原子的低级烷基，或使用具有6-10碳原子的芳基，其中此类烷基或芳基可以是未取代的，或可以是例如用卤素、羟基、三氟甲基、氰基、硝基、酰基、酰氧基、烷氧基、羧基、烷氧羰基或氨基取代的。2'-O-取代的核糖核苷或2'-O-取代的阿拉伯糖苷的例子包括但不限于2'-O-甲基核糖核苷(本文也指示为2'-OMe)或2'-O-甲基阿拉伯糖苷和2'-O-甲氧基乙基核糖核苷或2'-O-甲氧基乙基阿拉伯糖苷。术语“2'-取代的核糖核苷”或“2'-取代的阿拉伯糖苷”还包括核糖核苷或阿糖苷，其中2'-羟基替换为含有1-6个饱和或不饱和的碳原子的低级烷基，或者氨基或卤素基团。此类2'-取代的核糖核苷或2'-取代的阿拉伯糖苷的例子包括但不限于2'-氨基、2'-氟、2'-烯丙基和2'-炔丙基核糖核苷或阿拉伯糖苷。

[0123] 经修饰的核苷酸间键的例子包括但不限于：取代的和未取代的硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、烷基膦酸酯、烷基硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、硅氧烷、碳酸酯、烷氧羰基、乙酰胺酯、氨基甲酸酯、吗啉代、硼、硫醚、桥接氨基磷酸酯、桥接亚甲基膦酸酯、桥接硫代磷酸酯和砷核苷间键。

[0124] 本发明的化合物含有一个或多个不对称中心，并且因此可以作为外消旋物和外消旋混合物、单一对映体，非对映体混合物和个别非对映体出现。本发明意欲包括对于五元呋喃糖环具有 β -D立体化学构型的短核苷酸化合物，即其中在五元呋喃糖环的C-1和C-4处的取代基具有 β -立体化学构型(“向上”取向，其通常由本文描述的一些化学式中的粗线指示)。

[0125] 术语“前体药物”包括具有可以在体内代谢的部分的化合物。一般地，前体药物在体内通过酯酶或通过其他机制代谢为活性药物。前体药物的例子及其用途是本领域众所周知的(参见例如Berge等人(1977)“Pharmaceutical Salts”, J.Pharm.Sci.66:1-19)。前体药物可以在化合物的最终分离和纯化期间原位制备，或通过使其游离酸形式的纯化化合物或羟基与合适的酯化剂分开反应进行制备。羟基可以经由用羧酸处理转换成酯。前体药物部分的例子包括取代的和未取代的、支链或非分支低级烷基酯部分(例如丙酸酯)、低级

烯基酯、二低级烷基-氨基低级烷基酯(例如二甲基氨基乙酯)、酰基氨基低级烷基酯(例如乙酰氧基甲酯)、酰氧基低级烷基酯(例如、新戊酰氧基甲酯)、芳基酯(苯酯)、芳基-低级烷基酯(例如苄酯)、取代的(例如具有甲基、卤素或甲氧基取代基)芳基和芳基-低级烷基酯、酰胺、低级烷基酰胺、二低级烷基酰胺、和羟基酰胺。某些前体药物部分是例如丙酸酯和酰基酯。还包括在体内通过其他机制转换为活性形式的前体药物。

[0126] 缩写

[0127] 可以用于下文方案和实施例的描述中的缩写是:

[0128] AcOH用于乙酸;

[0129] Boc₂O用于二叔丁基二碳酸酯;

[0130] Boc用于叔丁氧羰基;

[0131] Bpoc用于1-甲基-1-(4-联苯基)乙基羰基;

[0132] Bz用于苯甲酰基;

[0133] Bn用于苄基;

[0134] BocNH₂用于叔丁基N-羟基氨基甲酸酯;

[0135] t-BuOK用于叔丁醇钾;

[0136] Bu₃SnH用于三丁基氢化锡;

[0137] CDI用于羰基二咪唑;

[0138] CH₂Cl₂用于二氯甲烷;

[0139] CH₃用于甲基;

[0140] CH₃CN用于乙腈;

[0141] DMSO用于二甲亚砜;

[0142] EtOAc用于乙酸乙酯;

[0143] EtOH用于乙醇;

[0144] Et₂O用于二乙醚;

[0145] HCl用于氯化氢;

[0146] MeOH用于甲醇;

[0147] MOM用于甲氧基甲基;

[0148] Ms用于甲磺酰基或-SO₂-CH₃;

[0149] Ms₂O用于甲磺酸酐或甲磺酰基酸酐;

[0150] NaCl用于氯化钠;

[0151] NaH用于氢化钠;

[0152] NaHCO₃用于碳酸氢钠(sodium bicarbonate)或碳酸氢钠(sodium hydrogen carbonate);

[0153] Na₂CO₃碳酸钠;

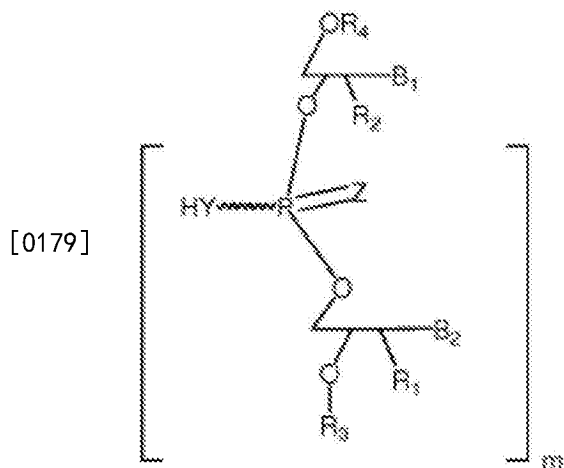
[0154] NaOH用于氢氧化钠;

[0155] Na₂SO₄用于硫酸钠;

[0156] NaHSO₃用于亚硫酸氢钠(sodium bisulfite)或亚硫酸氢钠(sodium hydrogen sulfite);

[0157] Na₂S₂O₃用于硫代硫酸钠;

- [0158] NH_2NH_2 用于肼；
- [0159] NH_4HCO_3 用于碳酸氢铵；
- [0160] NH_4Cl 用于氯化铵；
- [0161] OH用于羟基；
- [0162] OMe用于甲氧基；
- [0163] OEt用于乙氧基；
- [0164] TEA或 Et_3N 用于三乙胺；
- [0165] TFA三氟乙酸；
- [0166] THF用于四氢呋喃；
- [0167] TPP或 PPh_3 用于三苯基膦；
- [0168] Ts用于甲苯磺酰基或 $-\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ ；
- [0169] Ts_2O 用于甲苯磺酐或甲苯磺酰基酸酐；
- [0170] TsOH用于对甲苯磺酸；
- [0171] Ph用于苯基；
- [0172] TBS用于叔丁基二甲基硅烷基；
- [0173] TMS用于三甲基硅烷基；
- [0174] TMSCl 用于三甲基氯硅烷。
- [0175] 本发明的化合物
- [0176] 本发明提供了核苷、短寡核苷酸化合物或其类似物，或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。本发明还包括以其前体药物和代谢产物形式的化合物。
- [0177] 在某些实施方案中，本发明提供了二和三核苷酸，包括但不限于 $3\text{-dApsU}_2\text{'-OMe}$ 、 $3'\text{-dApsA}$ _{7-脱氧腺}和 $3'\text{-dApsTpsC}$ 及其类似物，其中“ps”指硫代磷酸酯核苷酸间键。
- [0178] 本发明的化合物包括例如式(I)的化合物：



- [0180] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体，
- [0181] 其中：
- [0182] R_1 和 R_2 各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环；
- [0183] R_3 选自氢、烷基、取代烷基、 $\text{C}(\text{O})$ -烷基、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ -烷基、 $\text{C}(\text{O})$ -芳基、 $\text{C}(\text{O})\text{O}$ -芳基、 $\text{C}(\text{O})$

NH-烷基和C(O)NH-芳基；

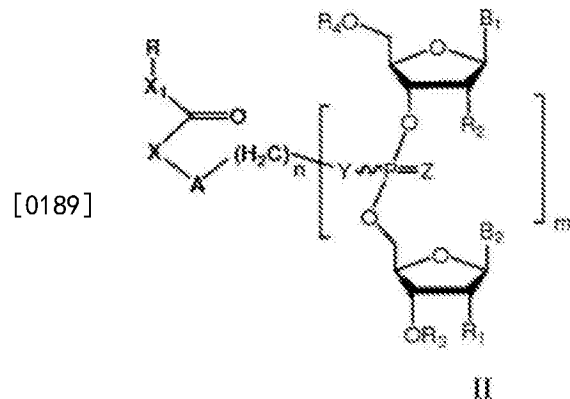
[0184] Y和Z各自独立地是O或S；

[0185] B₁和B₂各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷；

[0186] m=1-6。

[0187] R₄独立地是H、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

[0188] 在一个实施方案中，本发明的化合物包括式(II)的化合物：



[0190] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体，

[0191] 其中：

[0192] X=不存在、O、NH、NR或S；

[0193] X₁=不存在、O或NH；

[0194] A=不存在、芳基或芳烷基；

[0195] n=0、1、2、3、4或5；

[0196] R=烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-烷基、O-杂芳基或甾体；

[0197] R₁和R₂各自独立地是H、OH、O-烷基、烷基、取代烷基、环烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、杂环、O-芳基、O-杂芳基芳基或杂环；

[0198] R₃选自氢、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基；

[0199] Y和Z各自独立地是O或S；

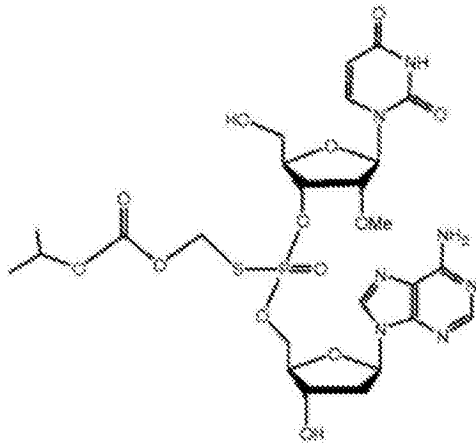
[0200] B₁和B₂各自独立地是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶或经修饰的核苷；

[0201] m=1-6；

[0202] R₄独立地是H、烷基、取代烷基、C(O)-烷基、C(O)O-烷基、C(O)-芳基、C(O)O-芳基、C(O)NH-烷基和C(O)NH-芳基、单磷酸、二磷酸或三磷酸基。

[0203] 在一个实施方案中，本发明的化合物是具有下述结构的化合物：

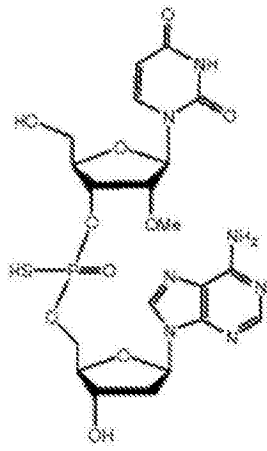
[0204]



[0205] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0206] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是具有下述结构的化合物:

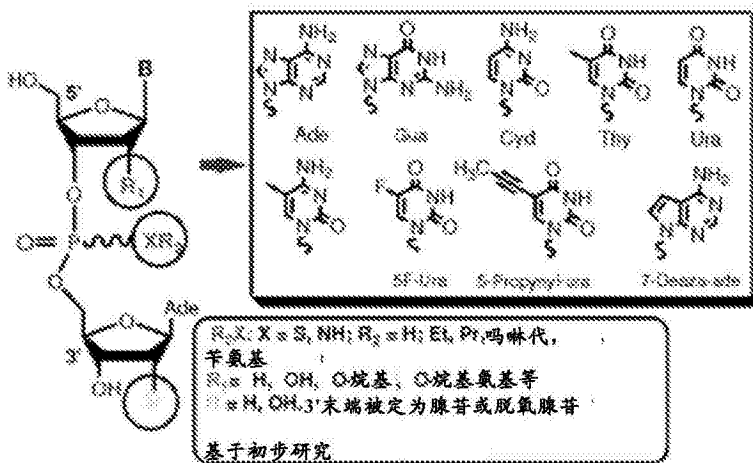
[0207]



[0208] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0209] 本发明的其他实施方案提供了下述化合物或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体:

[0210]



SS 43: R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = Ura; XR_2 = $COCH_2-O-COO-iso$
 SS 49: XR_2 = NH; R_1 = OH; R_3 = Ura

所有化合物均使用类似于初步研究的标准亚磷酸胺或 H-磷酸酯化学进行合成

[0211] 进一步地,本发明的化合物可以包含来自“天然”核酸的一种或多种修饰,即天然核苷间键,或核碱基G、C、T、U、A等。修饰包括例如核苷酸间键、碱基、或糖部分的修饰。

[0212] 本发明还提供了本文描述的化合物的互变异构体、立体异构体、光学异构体、N-氧化物、水合物、溶剂合物、多晶型物、药学上可接受的酯、酰胺、盐、前体药物、和同位素衍生物。

[0213] 本发明的化合物中的一些的结构包括不对称碳原子。相应地，产生于此类不对称的异构体(例如所有对映体和非对映体)均包括在本发明的范围内，除非另有说明。可以通过常规分离技术和/或通过立体化学控制的合成，以基本上纯的形式获得此类异构体。

[0214] 天然存在的或合成异构体可以以本领域已知的几种方式进行分离。用于分离两种对映体的外消旋混合物的方法包括使用手性固定相的色谱法(参见例如“Chiral Liquid Chromatography,” W. J. Lough, Ed. Chapman和Hall, New York(1989))。对映体还可以通过常规分辨技术进行分离。

[0215] 获得本发明的化合物的方法包括购买、合成或以其他方式获得化合物。合成本发明的化合物在本领域普通技术人员的化学方法内；用于制备本发明的化合物的示例性方法在本文中描述。用于优化反应条件的方法，需要时使竞争副产物降到最低的方法，是本领域已知的。方法还可以另外包括在本文具体描述的步骤之前或之后的步骤，以添加或删除合适的保护基团，以便最终允许合成本文的化合物。另外，多个合成步骤可以以交替顺序或次序执行，以获得所需化合物。

[0216] 方法和用途

[0217] 本发明的化合物可用于广泛范围的治疗领域中，所述治疗领域涉及宿主免疫组分，包括但不限于：过敏、炎症、自身免疫性疾病、COPD、哮喘等等。由于这些化合物可以通过许多机制来充当免疫应答调节剂的事实，它们具有在自身免疫疾病中的治疗用途。例如，因为化合物具有刺激先天性免疫应答的潜力，所以它们可以单独或与其他试剂组合用于治疗多种癌症，包括但不限于黑色素瘤、骨髓瘤、癌、成胶质细胞瘤和肉瘤。例如，因为某些寡核苷酸组合物具有抑制免疫应答的潜力，所以它们可以单独或与其他试剂组合用于治疗多种自身免疫疾病，包括但不限于过敏、哮喘、COPD和多发性硬化。

[0218] 因为许多干扰素相关基因产物能够诱导细胞凋亡，所以化合物可以诱导癌细胞的选择性细胞死亡。因此，本发明的组合物可以单独或者与疫苗或另一种或多种其他试剂组合或顺次使用。

[0219] 本发明因此提供了通过给鉴定为有此需要的受试者(或宿主)施用有效量的本发明的化合物，来治疗受试者(或宿主)中的微生物感染的方法。

[0220] 在另一个方面，本发明提供了改善受试者中针对疾病、状况、感染或病毒的免疫系统应答的方法。该方法包括给受试者施用有效量的作为疫苗佐剂的本发明的化合物。

[0221] 本发明还提供了通过施用有效量的本发明的化合物，来预防和治疗宿主(或受试者)中的病毒感染的方法。本发明的化合物可以单独或者与疫苗或其他试剂组合或顺次施用。

[0222] 在另外一个方面，本发明提供了通过施用有效量的本发明的化合物，来预防和治疗宿主(或受试者)中的细菌感染的方法。本发明的化合物可以单独或者与疫苗或其他试剂组合或顺次施用。

[0223] 进一步地，本发明提供了通过施用有效量的本发明的化合物，来预防和治疗宿主(或受试者)中的寄生虫感染的方法。本发明的化合物可以单独或者与疫苗或其他试剂组合

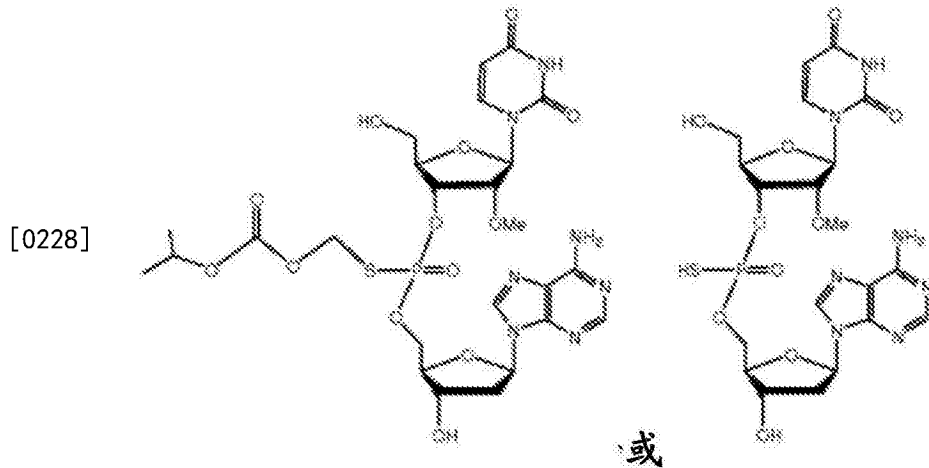
或顺次施用。

[0224] 还公开了用于预防和治疗宿主(或受试者)中的真菌感染的方法。该方法包括施用有效量的本发明的化合物,其可以单独或者与疫苗或另一种或多种其他试剂组合或顺次施用。

[0225] 在该方法的某些实施方案中,本发明的化合物是式(I)的短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

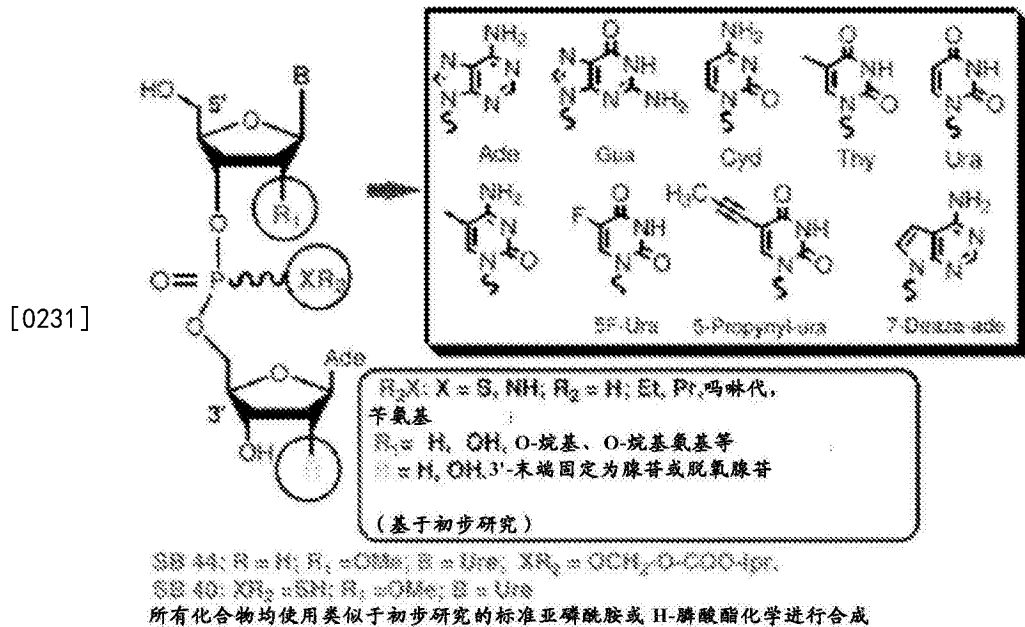
[0226] 在其他实施方案中,本发明的化合物是式(II)的短寡核苷酸化合物或其类似物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0227] 在一个实施方案中,本发明的化合物是



[0229] 或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体。

[0230] 进一步地,本发明提供了在下述图表中提供的化合物,或者其药学可接受的盐、外消旋物、对映体、非对映体、几何异构体或互变异构体的用途:



[0232] 根据本发明的方法,本发明的化合物可以单独或者连同疫苗(例如BCG疫苗)或一种或多种另外试剂一起施用。

[0233] 在一个实施方案中,本发明的化合物和疫苗施用用于治疗或预防微生物感染。

[0234] 在另一个实施方案中,本发明的方法针对病毒使用。

[0235] 在进一步的实施方案中,该方法用于治疗或预防癌症。

[0236] 本发明的方法包括给受试者施用治疗有效量或抑制量的本发明的化合物,其量和时间为达到所需结果必需的。本发明的另外方法是用抑制量的本发明的组合物的化合物处理生物样品,其量和时间为达到所需结果必需的。

[0237] 本发明的另一个方面包括在治疗中使用与用于治疗疾病的一种或多种试剂组合的本发明的化合物。例如,针对病毒活性的此类试剂包括拉米夫定(3TC)、阿德福韦、替诺福韦、更昔洛韦、阿昔洛韦、干扰素、利巴韦林、替比夫定;针对COPD、哮喘、过敏、过敏性鼻炎的其他试剂包括但不限于茶碱、Alvesco(环索奈德)、Patanase(盐酸奥洛他定)、Litairis(Ambresentan)(Gilead)、Xyzal(盐酸左旋西替利嗪)、Brovana(酒石酸阿福特罗)、思力华(噻托溴铵)、Clarinox、丙酸倍氯米松、Remodunil(treprostenil)、Xopenex、Duoneb(沙丁胺醇和噻托溴铵)、富马酸福莫特罗、全可利(波生坦)、曲安奈德、布地奈德、顺尔宁、施立稳、尼多米钠(吸入器和雾化器)、Zyflo、安可来、先力腾、仙特明、赫赛汀。在抗癌剂中有例如但不限于泰素、紫杉醇、顺铂、赫赛汀、格列卫、干扰素等等。

[0238] 依照本发明的该方法,组合的个别组分可以在治疗过程期间的不同时间分开施用,或者以分份或单一组合形式同时施用。本发明因此应理解为包含所有此类同时或交替治疗方案,并且术语“施用”将相应地被加以解释。应当理解本发明的化合物与其他试剂的组合的范围原则上包括与用于治疗病毒、细菌、寄生虫、真菌感染等等的任何药物组合物的任何组合。当本发明的化合物或其药学可接受的盐与第二种治疗试剂组合使用时,每种化合物的剂量可以与化合物单独施用时的剂量相同或不同。

[0239] 应当理解本发明的化合物与其他试剂的组合的范围原则上包括与用于治疗COPD、哮喘、过敏性鼻炎、癌症等等的任何药物组合物的任何组合。当本发明的化合物或其药学可接受的盐与第二种治疗试剂组合使用时,每种化合物的剂量可以与化合物单独施用时的剂量相同或不同。

[0240] 为了本发明的目的,抗微生物剂意欲指示针对病毒、细菌、真菌和寄生虫感染有效的化合物。

[0241] 如本文使用的,术语本发明的化合物的“治疗有效量”意指化合物的足够量,以便在生物样品或受试者中产生有利的生物应答。如医学领域充分理解的,本发明的化合物的治疗有效量将处于可应用于任何医学治疗的合理利益/风险比。

[0242] 本发明的化合物的抑制量或剂量范围可以为约0.1mg/Kg-约500mg/Kg,备选地约1-约50mg/Kg。抑制量或剂量还取决于施用途径以及与其他试剂共同使用的可能性而改变。

[0243] 如本文使用的,术语“一种或多种生物样品”意指预期用于施用于受试者的生物来源的物质。生物样品的例子包括但不限于血液及其组分例如血浆、血小板、血细胞亚群等;器官例如肾、肝、心脏、肺、脑等;精子和卵子;骨髓及其组分;或干细胞。因此、本发明的另一个实施方案是通过使所述生物样品与抑制量的本发明的化合物或药物组合物接触,来处理生物样品的方法。

[0244] 在受试者的状况改善后,需要时,可以施用维持剂量的本发明的化合物、组合物或组合。随后,根据症状,施用剂量和频率或两者可以降低至在其下保持改善状况的水平,当症状已减轻至所需水平时,治疗应停止。然而,在疾病症状的任何复发后,受试者可能需要

在长期基础上的间歇治疗。然而,应当理解本发明的化合物和组合物的每日总使用将由主治医师在合理医学判断的范围内来决定。关于任何特定患者的具体抑制剂量将取决于多种因素,包括待治疗的病症和病症的严重性;采用的具体化合物的活性;采用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;施用时间、施用途径和所采用的具体化合物的排泄速率的时间;治疗的持续时间;与采用的具体化合物在组合中或同时使用的药物;和医学领域中众所周知的类似因素。

[0245] 药物组合物

[0246] 本发明提供了包含与药学可接受的载体结合的,本发明的化合物及其衍生物的药物组合物。本发明的另一个例子是通过将上述化合物中的任一种和药学可接受的载体组合制备的药物组合物。

[0247] 本发明的药物组合物包含至少一种本发明的化合物或其药学可接受的盐作为活性成分,并且还可以含有药学可接受的载体和赋形剂和任选的其他治疗成分。“药学可接受的”意指载体、稀释剂或赋形剂必须与制剂的其他成分相容,并且对其接受者无害。组合物包括适合于经口、直肠、局部、肠胃外(包括皮下、肌肉和静脉内)、眼部(眼)、肺(鼻或颊吸入)、或鼻施用的组合物,尽管在任何给定情况下的最合适途径取决于待治疗的状况的性质和严重性以及活性成分的性质。它们可以方便地以单位剂型呈现,且通过药学领域众所周知的方法中的任一种进行制备。

[0248] 在实际使用中,根据常规药学配制技术,本发明的化合物可以作为活性成分与药学载体在紧密混合物中组合。载体可以采取广泛多样的形式,取决于施用所需的制剂形式,例如经口或肠胃外(包括静脉内)。在制备用于经口剂型的化合物中,可以采用通常的药学介质中的任一种,在经口液体制剂例如悬浮液、酞剂和溶液的情况下,例如水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等;或在经口固体制剂例如粉末、硬和软胶囊以及片剂的情况下,载体例如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等,其中固体经口制剂优选超过液体制剂。

[0249] 由于其容易施用,片剂和胶囊代表最有利的经口剂量单位形式,在所述情况下,明显采用固体药学载体。需要时,片剂可以通过标准水性或非水性技术进行包被。此类组合物和制剂应含有至少0.1百分比的活性化合物。在这些组合物中的活性化合物的百分比当然可以改变,并且可以方便地为约2百分比至约60百分比的单位重量。此类治疗上有用的组合物中的活性化合物的量是这样的,使得将获得有效剂量。活性化合物还可以作为例如液体滴剂或喷雾剂鼻内施用。

[0250] 片剂、丸剂、胶囊等还可以含有粘合剂例如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂例如磷酸二钙;崩解剂例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸;润滑剂例如硬脂酸镁;和甜味剂例如蔗糖、乳糖或糖精。

[0251] 当剂量单位形式是胶囊时,除上述类型的材料之外,它还可以含有液体载体例如脂肪油。多种其他材料可以作为包衣存在,或修饰剂量单位的物理形式。例如,片剂可以用紫草茸、糖或两者进行包被。除活性成分之外,糖浆剂或酞剂还可以含有蔗糖作为甜味剂,对羟基苯甲酸甲酯和丙酯作为防腐剂,染料和调味料例如樱桃或橙香料。可以添加多种稳定剂,其将针对降解稳定活性药学成分,例如氨基酸或多胺。其他赋形剂可以包括但不限于PEG 400、甘氨酸、维生素E衍生物、脱水山梨醇单油酸酯、壳聚糖、柠檬酸胆碱、脱水山梨醇

单硬脂酸酯、Tween 80、Igepal CA 630、Brij 35、NP-40及其类似的衍生物。

[0252] 本发明的化合物还可以肠胃外施用。这些活性化合物的溶液或悬浮液可以在水中与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当地混合进行制备。分散体还可以在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中进行制备。在普通贮存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以阻止微生物的生长。适合于可注射使用的药学形式包括无菌水溶液或分散体,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,形式优选为无菌的并且优选流动至存在容易可注射性的程度。它在制造和贮存条件下必须是稳定的,并且必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用进行防腐。载体可以是溶剂或分散体介质,含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适的混合物、和植物油。

[0253] 任何合适的施用途径均可用于为哺乳动物尤其是人提供治疗有效剂量的本发明的化合物。术语化合物的“施用”和“施用”化合物应理解为意欲给有需要的个体提供本发明的化合物。施用途径包括例如但不限于经口、舌下、经粘膜、静脉内、皮下、鼻内、局部、阴道等。

[0254] 与所选的施用途径无关,通过本领域技术人员已知的常规方法,可以将以合适的水合形式使用的一种或多种化合物和/或本发明的药物组合物,配制成药学可接受的剂型。

[0255] 本发明的药物组合物中的活性成分施用的实际剂量水平和时间过程可以这样改变,以便获得这样的活性分量,其对于特定患者、组合物和施用模式有效达到所需治疗应答,而对患者无毒。示例性剂量范围为约0.1 μ g至20毫克/千克体重/天(mg/kg/天)(例如0.1 μ g/kg至2mg/kg、0.3-3 μ g/kg、0.18-0.54mg/kg)。在其他实施方案中,该量从约0.1mg/kg/天到约100mg/kg/天不等。在另外其他实施方案中,该量从约0.001 μ g到约100 μ g/kg(例如体重)不等。对于上述值中间的范围也预期为本发明的一部分。

[0256] 在单一、多重或分份剂量中施用于受试者的本发明的化合物的每日总抑制剂量可以为例如0.01-50mg/kg体重的量,或更通常为0.1-25mg/kg体重的量。

[0257] 单一剂量组合物可以含有此类量或其约数,以构成日剂量。多重剂量可以为在不同时间间隔服用的单一剂量。一般地,根据本发明的治疗方案包含以单一或多重剂量,每天给需要此类治疗的患者施用约10mg至约1000mg的本发明的一种或多种化合物。

[0258] 进一步地,本发明的化合物可以通过多重递送途径例如经口、静脉内、舌下、鼻内、局部等等进行施用。

[0259] 试剂盒

[0260] 本发明还提供了用于治疗或预防本文描述的疾病、状况或病症的试剂盒。在一个实施方案中,该试剂盒包括以单位剂型的含有有效量的本发明的化合物的治疗或预防组合物。在一些实施方案中,本发明的化合物与疫苗或常规治疗试剂组合提供。在其他实施方案中,该试剂盒包含无菌容器,其含有治疗或预防组合物;此类容器可以为盒、安瓿、瓶、小瓶、管、袋、小袋、泡罩包装或本领域已知的其他合适的容器形式。此类容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或适合于容纳药剂的其他材料制成。

[0261] 需要时,本发明的化合物连同给受试者施用化合物的说明书一起提供,所述受试者具有本文描述的具体疾病、状况或病症,或者处于本文描述的具体疾病、状况或病症的危险中。说明书一般包括关于使用组合物用于治疗或预防疾病、状况、病症、感染或病毒的信息。在其他实施方案中,说明书包括下述中的至少一种:治疗试剂的说明;用于治疗或预防

缺血或其症状的剂量计划表和施用;注意事项;警告;适应症;禁忌症;超剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考。说明书可以直接印刷在容器(当存在时)上,或作为应用于容器的标签,或作为在容器中或与容器一起供应的单独的传单、小册子、卡或文件夹。

实施例

[0262] 提出下述实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备且使用本发明的测定法、筛选和治疗方法的完整公开和说明,并且不预期限制本发明人视为其发明的范围。

[0263] 化合物的合成

[0264] 在本发明中作为举例说明性实施例描述的核苷酸类似物的集中文库如以前合成(17-22)。固相合成和液相策略两者以补充形式使用,以制备如举例说明的集中文库。该方法可以用于合成在糖、核碱基和核苷酸间键处具有修饰的文库。我们的实验室中的几种技术革新促进核苷酸文库的合成:a)我们先前已开发了使用固相亚磷酰胺和H-磷酸酯技术,用于合成二核苷酸文库的策略(17-22)。来自我们实验室的近期技术革新也用于二核苷酸化合物和类似物的固相合成(17-22)。(i)使用微波辅助方法的氨基和羧基官能化固体支持物的超快速制备,(ii)用于将核苷装载到固体支持物上的新型方法。开发了用于核苷装载支持物的大规模制备的改良过程,其涉及使用二甲基甲酰胺(DMF)作为溶剂。获得80-300微摩尔/g支持物的高核苷装载,(iii)用于装载固体支持物和固相合成的称为**LOTUS®**的新型反应器,其促进二核苷酸的大规模合成。**LOTUS®**是配备用于反应物的控制递送的气动阀的多用途反应器(20-22)。

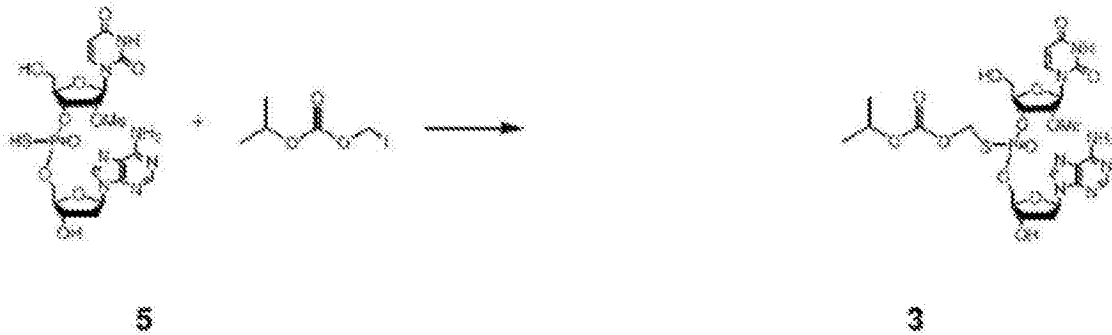
[0265] 实施例1

[0266] 使用与专门构造的**LOTUS**反应器[®](Padmanabhan, S.; Coughlin, J.E.; Iyer, R.P. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 343; Iyer, R.P.; Coughlin, J.E.; Padmanabhan, S. *Org. Prep. Proc. Intl.* 2005, 37, 205)结合的固相亚磷酰胺化学(Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. *Tetrahedron* 1993, 49, 1925),大规模(1毫摩尔核苷装载的可控孔度玻璃(CPG)支持物)合成硫代磷酸酯类似物3-dApsU2'-OMe(1)的Rp, Sp混合物。使用我们近期开发的用于固相支持物的超快速官能化和装载过程,制备dA连接的CPG支持物。对于核苷酸间二核苷亚磷酸酯偶联的产物的硫化,采用3H-1,2-苯并噻吩-3-酮-1,1,-二氧化物(在干CH₃CN中0.4M)(Iyer, R.P.; Regan, J.B.; Egan, W.; Beaucage, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 1253)。

[0267] 在加工、色谱纯化和冻干后,获得>96%纯的Rp, Sp 5(~60:40混合物)钠盐,其通过³¹P和¹H NMR进行表征。因此,容易地执行二核苷酸化合物和类似物的集中文库的固相合成。在补充策略中,液相合成也用于1的合成。这些方法允许合成具有多种化学修饰的化合物。

[0268] 实施例2:化合物3的合成

[0269]



[0270] 靶化合物3在两步中进行制备。

[0271] 步骤1. 碘甲基异丙基碳酸酯的制备: 向无水碘化钠(6g, 40mmol)的无水乙腈(20mL)溶液中, 经过20分钟逐滴加入氯甲基异丙基碳酸酯(2.9g, 19mmol)的无水乙腈(10mL)溶液。由铝箔(避光)覆盖的反应混合物在室温下搅拌过夜。将制备的固体过滤, 用乙腈洗涤且将滤液在减压下浓缩。将残渣溶解于水(10mL)中, 并且在醚(25mL)中提取有机物。将醚提取物用亚硫酸氢钠(5%, 10mL), 随后为盐水(10mL)进行洗涤。将有机层在无水硫酸钠上干燥, 过滤, 浓缩且在高干燥真空下进行干燥。得率2.72g(58%); $^1\text{H-NMR}$ δ 1.3(d, 6H), 4.95(m, 1H), 5.95(s, 2H)。

[0272] 步骤2. 化合物5的烷基化: 在搅拌下, 向二核苷酸1(60mg, 0.098mmol)的水(HPLC, 400mL)溶液中, 加入碘甲基异丙基碳酸酯(80mg, 0.0166mmol, 3.33当量)的丙酮(1mL)溶液。加入另外的丙酮(1mL), 以获得澄清溶液, 以避免烷基化试剂的油性小球的任何分离。将以铝箔覆盖的反应混合物搅拌3小时, 在旋转蒸发条件下浓缩, 并且以后在高真空中浓缩, 以获得作为白色固体的反应混合物。这通过二氧化硅柱色谱法进行纯化, 最初使用氯仿且缓慢地使用含有2%至最终8%甲醇的氯仿。将含有主要组分的级分合并, 浓缩且在高真空中干燥过夜。所需纯产物3以几乎定量得率(68mg)分离; $^{31}\text{P-NMR}$ (MeOH- d_4) δ 27.7, 28.6。

[0273] 实施例3: SB 40、SB 44和SB 1B作为NOD2/RIG-I配体的发现和活性

[0274] 用于NOD2活化的SMNH化合物的评估通过一级、二级和三级测定法进行。在一级测定法中, SMNH化合物就HLE A549细胞中的IRF3表达诱导进行测试, 所述HLE A549细胞已知内源表达NOD2。如图1-2中所示, 二核苷酸类似物SB 40、SB 43、SB 44和SB 1B, 而不是相关类似物例如二核苷酸SB 50、SB 110和SB 60, 诱导IRF3活化。SB 44, 两种异构体Rp和Sp的混合物, 是SB 40的前体药物。SB 1B-SB 44的Rp异构体, 在图1-2中显示为SB 44-1。

[0275] IRF3荧光素酶转染的细胞与仅DMSO(UT)或SMNH化合物(μM)一起温育。在12小时温育后, 根据制造商的方案, 使用Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)测量荧光素酶活性。通过测量海肾荧光素酶的表达来标准化转染效率。通过标准方法测量荧光素酶单位(即, 诱导倍数)(平均值 \pm 标准差; 3次独立实验)。结果在图1中描述。

[0276] HEK 293细胞用NOD2、pcDNA和IRF3荧光素酶进行转染。细胞随后与ssRNA(0.5mg/ml)或SMNH化合物($1\mu\text{M}$)一起温育。在12小时温育后, 如先前描述的测量荧光素酶活性。荧光素酶测定法结果呈现为来自三次独立实验的平均值 \pm S.D.(在这些测定法中采用的详细材料和方法, 参见: 参考文献(28)。结果在图2中描述。

[0277] 图3显示了通过SB 44的RIG-I活化。HEK 293细胞用RIG-I、pcDNA和IRF3-荧光素酶进行转染。细胞随后与SB 44(100或500nM)一起温育。在8小时或16小时温育后, 如先前描述

和DC呈递抗原以活化T细胞的能力的作用是未知的。同样地,T细胞功能是否可以进行调节用于长期功效也是不明确的。BCG是全世界今天用于预防肺结核的最广泛使用的疫苗。它使儿童免于肺结核,但针对成人TB具有有限功效,可能是由于缺乏长期功效。在这部分中,当由BCG疫苗感染时,我们证实SB 1A和SB 1B增强M Φ 功能,并且它们作为初次疫苗给予小鼠时加强BCG的活性,并且作为加强疫苗具有使免于肺结核的再感染的潜力。

[0289] C57B1/6小鼠骨髓衍生的巨噬细胞(M Φ)用10 μ g/孔的SMNH化合物1-4和LPS阳性对照(1 μ g/mL)处理4小时,随后用牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)卡介苗(BCG)细菌感染4小时。覆盖对于抗原85B表位特异性的BB7T细胞,并且使用夹心ELISA就IL-2测试在18小时后收集的上清液(p值,t检验)。

[0290] 图10(a-d)显示:a)最活性的SB化合物的初始筛选,评估SB 1(NOD2激动剂)以及SB 3和SB 44(与SB 1相关的二核苷酸)连同LPS,已知的TLR4激动剂。a)SB 1和2增强抗原呈递;b)SB 1A(SB 44)和SB 1B(SB 1B,SB 44的Rp异构体)与SB 2和LPS相比较。SB 44的Rp异构体(SB 1B)保留完全活性;c)M Φ 用各5 μ M的信号传导分子抑制剂(AP-1、CREB和MAPK(p38、ERK1/2和JNK)处理2小时,随后用SB化合物活化2小时且用BCG感染2小时。将M Φ 固定且使用流式细胞术分析表面MHC-II。SB 1A增强MHC-II的表面表达,其通过阻断MAPK或AP-1/CREB进行抑制(与含BCG的SB 1A组合相比较,>0.5log₁₀转变)。SB 1B具有相似活性(未示出);d)MAPK或AP1/CREB的抑制剂单独对MHC-II没有作用。

[0291] 实施例6:NOD2-RIG-I活化SB 1A和1B化合物增强BCG疫苗针对实验性气溶胶诱导的肺结核的功效

[0292] 在小鼠中的疫苗实验设计:C57B1/6小鼠用单独的BCG或者与SB 1A、SB 1B和MDP混合的BCG进行疫苗接种;这随后为4周后通过用结核分枝杆菌的气溶胶攻击。小鼠在4周后处死用于评估保护(Mtb的CFU计数降低)。使用流式细胞术测量脾或肺的T细胞的表型和功能。图11(a)

[0293] 图11(b)显示了SB 1A和SB 1B是比BCG或MDP+BCG更佳的降低肺的Mtb计数的有力佐剂(通过双因子ANOVA的p值)。条上方的数目指示log₁₀细菌负荷(MDP相对于SB 1A/SB 1B+BCG;p<0.02)。SB 1A和SB 1B在降低脾的Mtb计数中也比BCG疫苗更佳。与BCG疫苗相比较,SB 1B增强多功能T细胞的数目,但SB 1A和SB 1B两者均诱导可比较水平的四聚体特异性CD8T细胞(图11(c-d))。

[0294] SB 1A诱导比BCG疫苗更佳的记忆前体T细胞(MPEC)(图11e)。下文举例说明的直方图显示在脾中表达记忆标记的T细胞群体的流式细胞术分析。

[0295] C57B1/6小鼠骨髓衍生的原代巨噬细胞用单独的SB 1A或SB 1B、单独的MDP或所示组合处理4小时。BCG用于感染4小时,并且使用ELISA就成熟IL1 β 滴定18小时后收集的上清液。巨噬细胞首先由用于半胱天冬酶阻断的ZVAD-fmk(2小时)进行处理,随后为用SB1A和SB 1B(4小时)的活化以及BCG感染(4小时)。18小时后测量细胞因子。结果呈现于图12中,显示通过巨噬细胞中的半胱天冬酶依赖性机制,NOD2活化化合物SB 1A和SB 1B仅与MDP或完整BCG杆菌组合而诱导IL-1 β 。

[0296] 具有BCG疫苗的NOD2活化SB 1A/1B组合在小鼠中诱导针对肺结核的再攻击的保护,提示长期保护。BCG疫苗是唯一批准用于预防TB的疫苗,尽管它在小鼠中针对气溶胶诱导的TB是弱保护的,并且诱导弱中央记忆(29)。这被认为是由于BCG不能诱导MPEC。发现SB

化合物诱导升高的MPEC(参见图11(e))。然而,产生中央记忆的MPEC在小鼠中以低数目存在,并且其功能仅能通过其强回忆扩增成效应CD8T细胞进行确定。

[0297] 因此,开发了新模型,以验证SB 1A和SB 1B诱导的MPEC可以通过在小鼠中再生为强效应T细胞致使长期保护。该模型显示于图14中,其中在初次疫苗接种和攻击后,Mtb以及疫苗通过药物治疗清除,允许MPEC静止。随后,小鼠用剧毒Mtb再攻击,用于评估保护。

[0298] 使C57B1/6小鼠接种疫苗且攻击,并且使用异烟肼和利福平3周来清除疫苗和Mtb生物体,随后为休息和用气溶胶剂量的剧毒Mtb的再攻击。四周后,通过来自3只分开小鼠/组的肺和脾的CFU计数以及T细胞分析来评估保护。最重要的是,在初次和二次再攻击后,具有BCG的SB 1B(SB 1B)组合均比BCG两倍好地保护(通过双因子ANOVA的p值;5只小鼠/组/时间点)。

[0299] 图15(a-b)显示了具有BCG疫苗的SB 1A或SB 1B组合保留产生针对用肺结核的再攻击的更佳回忆应答的能力。

[0300] 在再攻击(第16周)后,使用流式细胞术就CD8T细胞分析图11中所示的小鼠的肺。直方图例子显示对于CD8T细胞的四聚体染色。四聚体+IFN γ 染剂用于测量功能T细胞,并且四聚体+CD44染剂用于测量针对肺中的肺结核的记忆CD8T细胞。(图16a-b)

[0301] 数据显示接种疫苗的小鼠的肺含有可比较数目的CD62L+CD44+中央记忆T细胞和表达穿孔素+颗粒酶的功能CD8T细胞。(图16c-d)然而,肺含有升高水平的四聚体+IFN γ CD8T细胞,其也表达记忆标记CD62L和CD44。这提示SB 1A和SB 1B加强抗原特异性记忆T细胞的量级,其对于肺结核的长期遏制是关键。

[0302] 总之,对于小鼠的这些分开研究已经显示具有BCG疫苗的SMNH组合增强针对用肺结核的初次攻击和二次攻击两者的保护。

[0303] 实施例7:SB 44的临床前研究

[0304] 许多临床前研究已使用SB 44和SB 40进行,并且这些研究举例说明关于先导化合物佐剂候选物SB 1B的结果。

[0305] 如通过使用BCG的研究举例说明的,SB 44和SB 40的作用机制涉及在“外源”核酸的存在下,RIG-I和NOD2的诱导和活化。大多数外源核酸在其结构中具有标志模式(PAMP,病原体相关分子模式),其构成这些核酸被RIG-I和NOD2选择性识别为“外源”的基础。为了举例说明在作用机制中的这种独特选择性,进行几个体外研究且概括于下文:1). 通过对于28种细胞因子进行多路测定法,SB 40和SB 44就其在外周血单核细胞(PBMC)中诱导细胞因子的能力进行评估:IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1a、IL-1b、IL-1RA、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-17A、TNF α 、TNF β 、G-CSF、GM-CSF、IL-8、MCP-1、Eotaxin、MIP-1 α 、MIP-1 β 和RANTES。化合物直到50 μ M在人PBMC培养物中不引起细胞因子诱导。

[0306] 2). 为了评估在细菌核酸的存在下,SB 40和SB 44是否可以加强细胞中的IFN产生,PBMC用单独的BCG以及使用具有以25 μ M的SB 44或SB 40的BCG进行测量。BCG用作细菌核酸的来源。PBMC与单独或在BCG存在下的化合物一起温育24小时,并且收获上清液。使用ELISA测定IFN水平。在BCG存在下,化合物引起IFN产生中的适度加强。(根据相同实验,BCG不诱导其他细胞因子例如IL-1、6、8、10和TNF- α)。

[0307] 3). 使用ISG56荧光素酶报道分子进行实验,以测定外源RIG-I和NOD2表达是否可

以在受体缺陷细胞中进行诱导。为此,聚I-聚C用作阳性对照。由于RIG-I和NOD2的活化,SB 40和SB 44在这些细胞中的添加引起ISG-56表达超过由聚I-聚C诱导的那种的适度2倍增强。

[0308] 结果证实通过SB 40和SB 44的IFN诱导(通过NOD2/RIG-I信号传导级联介导)可以在外源核酸的存在下发生。因此对于这些化合物引起免疫途径的非特异性刺激存在更少的潜力,所述免疫途径的非特异性刺激产生“细胞因子风暴”和相关全身毒性。这些作用机制观察与SB 44对BCG的佐剂活性一致,且同样应适用于ITS ISOMERS。

[0309] 实施例8:在来自人肝的S9级分中的SB 44的代谢

[0310] SB 44(10 μ M)与混合物一起温育,所述混合物含有S9级分(由人合并)(1mg/ml)、NADPH(1.3mM)、UDPGA(5mM)、在1ml 1X PBS缓冲液中的阿拉霉素(10 μ g/ml)、S-(5'-腺苷)-L-甲硫氨酸碘化物(0.1mM)、腺苷3'-磷酸5'-磷酸硫酸锂盐合物(0.1mM)和乙酰CoA(1mM)。代谢产物样品通过HPLC和LC/MS分析进行评估。

[0311] 前体药物R_p,S_p-SB 44对肝微粒体暴露高达八小时导致其立体特异性转换为二核苷酸R_p,S_p-SB 40。微粒体温育的LC/MS评估揭示代谢的一种或多种主要产物是R_p,S_p-二核苷酸SB 40。如通过MS分析测定的,还检测到少量脱硫产物(<5%)。还可见少数次要代谢产物(<10%)。然而,这些代谢产物的身份基于分子离子无法充分确定。在所有情况下,在微粒体代谢中,前体药物SB 44的R_p和S_p异构体均经历立体特异性转换为活性SB 40,仅观察到具有少量脱硫产物[对应于SB 40]。在SB 44的个别R_p和S_p异构体分别转换为SB 40的R_p和S_p异构体中,不存在显著速率差异。

[0312] 类似于血清介导的SB 44至SB 40转换,在微粒体的情况下,肝酯酶看起来是涉及SB 44至SB 40水解转换的主要代谢酶。在使用血清的早期R_p,S_p-SB 44生物可逆性研究中,个别异构体以几乎相等的速率立体特异性转换为R_p-SB 44,S_p-SB 40。在肝和血浆中SB 44至SB 40的温和生物转换也与遍在的酯酶的广泛底物特异性一致。

[0313] 实施例9:SB 44通过S9级分的体外代谢

[0314] 类似于纯化的人肝微粒体研究,前体药物SB 44暴露于人肝S9级分导致SB 44立体特异性转换为二核苷酸SB 40。通过LC/MS的温育评估揭示除了主要产物SB 40之外,还形成对应于SB 40的少量脱硫产物(<5%)。还观察到少数次要产物。关于S9级分的代谢产物模式类似于用纯化的肝微粒体观察到的那种。因此,不存在SB 44或最初形成的活性代谢产物SB 40的任何II期缀合反应的明显证据。

[0315] 实施例10:SB 44的体外临床前毒物学研究

[0316] 对SB 44实施针对细胞系的实验对象组的细胞毒性评估,所述细胞系的实验对象组包括Madin-Darby牛肾(MDBK)、Vero和HFF(人包皮成纤维细胞),以测定其CC₅₀。Standard Microculture Tetrazolium Assay(MTT)测定法在96孔板中执行,使用MDBK、Vero和HFF细胞系(得自美国典型培养物中心)。对照包括核苷类似物3TC、AZT和ddC,以及不含药物的培养基。SDS用作阳性细胞毒性对照。所有前体药物均以100、300和1000 μ M的浓度一式三份地进行测试。在细胞与测试物质温育24小时后,进行MTT测定法。

化合物	Vero CC ₅₀ μ M	MDBK, CC ₅₀ μ M	HFF, CC ₅₀ μ M
SB 44	>1000	>1000	>1000

[0317] SB 40的CC₅₀为>1000 μ M。

[0318] 实施例11:SB 44的细菌突变测试(筛选形式)

[0319] 该研究的目的是使用筛选(非GLP)形式的细菌突变测试,评估测试物品的基因毒性。

[0320] 研究设计:测试仅在一个场合下执行。标准测试菌株亚集(列表菌株)用于评估测试物品的具遗传毒性潜力。

[0321] 测试物品在二甲亚砜(DMSO)中进行配制,并且以5000 μ g/板(该测定法的标准限制剂量)的最大浓度连同大约半对数稀释进行测试,使用预温育形式的细菌突变测试。在无菌性检查板上的菌落的不存在证实微生物污染的不存在。关于媒介物对照的平均逆转株菌落计数接近于实验室历史对照数据,或在实验室历史对照数据内。适当的阳性对照化合物(+/-S9混合物)诱导的逆转株菌落数目中的增加是使用适当细菌菌株的同时媒介物对照水平的至少两倍(对于菌株TA 100为1.5X),证实测试相同的灵敏度和S9混合物的活性。在暴露于SB 44后,未获得非逆转株细菌的本底菌苔的明显变薄,指示测试物品在测试的水平上对细菌是无毒的。未观察到沉淀。

[0322] 在S9混合物的不存在或存在下,在暴露于测试物品后,在任何菌株中未获得逆转株菌落计数中的大量增加。因此得出结论SB 44在这种体外诱变测定法中未显示任何具遗传毒性活性的证据。

[0323] 实施例12:体位心血管安全性测定法(hERG测试)。

[0324] 该研究的目的是检查SB 40和SB 44对hERG(人ether-a-go-go相关基因)钾通道电流(IKr,快速激活延迟整流心脏钾电流的替代物)的体外作用。

[0325] 在该研究中,hERG通道在缺乏内源IKr的人胚肾(HEK293)细胞系中表达。HEK293细胞用hERG cDNA稳定转染,并且评估在室温下使用QPatch HT®(自动化平行膜片钳系统)来完成。每种测试物品以10、50、100和200 μ M进行评估,其中每种浓度在三种细胞中进行测试(n=3)。暴露于每种测试物品浓度的持续时间为3分钟。

[0326] 因为通过测试的最高浓度的hERG电流抑制小于50%,所以无法测定两种测试物品的IC₅₀值。阳性对照E-4031证实测试系统对hERG抑制的灵敏度。

[0327] 总之,SB 40和SB 44在hERG测定法中未显示出任何活性,并且IC₅₀为>200 μ M。

[0328] 实施例13:SB 44的体内临床前毒物学研究

[0329] SB 44是两种非对映体(Rp,Sp)的混合物,其中SB 1B是Rp异构体,在混合物中存在至55-60%的程度。许多临床前研究通过使用经由经口管饲法施用的SB 44进行,并且研究结果是当SB 1B单独使用时的可能结果的举例说明。研究已奠定了SB 1B的临床前研究的坚实基础,因为分析和生物分析方法、毒物学研究的制剂、毒物学方案等可以转移至SB 1B。

[0330] 实施例14:SB 44在Sprague-Dawley大鼠中的剂量范围发现研究

[0331] 该研究的目的是在SB 44对成年雄性和雌性Sprague-Dawley大鼠连续7天的每日经口管饲法后,测定潜在的毒性效应,鉴定潜在的毒性靶器官,且测定最大耐受剂量(MTD)和对于检查的终点未观察到不利效应的水平(NOEL)。来自该研究的信息用于设计后续毒性研究且测定提议的人剂量的适合性。该研究由A期和B期组成。A期是剂量范围发现研究。在该研究中包括两只大鼠(1只雄性和1只雌性)。动物通过经口管饲法(po)给予以1000mg/kg的SB 44的单一剂量,且观察3天。两只动物均具有预期的体重增加,且在研究自始至终看起来是正常的,直至其预定处死时。未执行尸检。

[0332] 在B期中,大鼠(3/性别/组)给予以50、250和1000mg/kg/天的SB 44的每日经口剂量连续7天。对照组(3/性别)也给予以相等体积的媒介物的每日经口剂量共7天,所述媒介物是50%PEG 400加上50%HPMCT(无菌水中的0.1%羟丙基甲基纤维素和0.2%Tween 80)。动物在第8天时处死。评估下述参数:死亡率/发病率、临床观察、体重、临床病理学(血液学和血清化学)、器官重量,以及在尸检时,肝组织的肉眼观察和显微镜组织病理学。

[0333] 在B期中的所有动物均存活直至其预定尸检时。在剂量施用后不同天时,在处理组中的所有动物中注意到剂量依赖性“铲土(shoveling)”模式,除了在低剂量组中的雄性之外。因为不存在与神经系统功能或其他毒物学参数相关的其他不利体征,所以该观察最可能指示大鼠将测试物品的味道和/或质地察觉为令其不快的。对于体重、临床病理学、器官重量、以及肉眼和显微镜评估,未发现其他药物相关效应。总之,SB 44每日经口服法施用于雄性和雌性Sprague-Dawley大鼠连续7天,未产生明显的生物学或毒物学显著的不利效应。当SB 44通过每日经口施用给予连续7天时,NOAEL视为至少1000mg/kg/天。

[0334] 实施例15:SB 44在大鼠中的14天毒性研究,伴随两周恢复期和骨髓微核评估

[0335] 该研究的目的是测定在每日经口剂量施用14天后,SB 44的潜在毒性效应,并且如通过微核评估测定的,评估SB 44的具遗传毒性。雄性和雌性Sprague-Dawley大鼠每天以50、200和500mg/kg/天的剂量施用SB 44,共连续14天。卫星组类似地处理用于毒代动力学(TK)评估的目的,并且血浆就SB 40(SB 44的活性代谢产物)的水平进行分析。执行微核评估以测定SB 44的潜在基因毒性。对于主要研究组中的大鼠在第15天时,并且对于恢复组中的大鼠在第28天时,执行尸检。

[0336] 所有大鼠均存活至研究结束。如通过临床观察、临床病理学、体重、尿参数、尸检和器官重量测定的,SB 44不引起明显毒性。然而,组织的显微镜评估揭示在胸腺中与测试物品相关的变化。在以200和500mg/kg/天的雄性和雌性两者中,均观察到胸腺吞噬性巨噬细胞中的极轻度至轻度增加,指示增加的胸腺淋巴细胞破坏。这种胸腺变化存在于主要和恢复组两者中,但与胸腺萎缩或增加的胸腺退化的任何组织病理学证据无关。在其他器官中不存在增加的淋巴细胞破坏的证据。该观察可以是GI应激相关的,并且因此视为具有有限的毒物学意义。在该研究的微核测定法部分中,未发现SB 44在大鼠骨髓红细胞中诱导微核。

[0337] 实施例16:毒代动力学分析

[0338] 仅报告在经口施用后的最大血浆浓度(C_{max})和直到最后取样时间点的血浆浓度时间曲线下面积(AUC_{last}),因为大多数样品具有在或接近LLOQ的SB 40血浆浓度,使得所有TK参数的测定成问题。在第1和14天两者时,对于雄性和雌性大鼠中的 C_{max} 和 AUC_{last} 不存在非线性剂量关系。在第14天时,对于雄性和雌性两者,在最高剂量(500mg/kg)时测量最高的全身暴露,并且对于施用的每个剂量,关于SB 40的第14天 C_{max} 和 AUC_{last} 高于第1天时的那些。在SB 44每天施用共14天后的这种SB 40累积可以通过与缓慢回释到血浆内组合的对肝的显著分布引起。雌性一般具有比雄性更大的全身暴露,其中最大差异是在500mg/kg剂量组中在第14天时约两倍。在胸腺中的显微镜下发现和不存在来自SB 44的这些效应的恢复证据的基础上,该研究中的未观察到效应的水平(NOEL)测定为50mg/kg/天。

[0339] 实施例17:SB 44在食蟹猴中的剂量范围发现研究

[0340] 该研究的目的是在SB 44对食蟹猴连续4天的每日经口服法后,测定最大耐受剂

量(MTD)和对于检查的终点未观察到不利效应的水平(NOAE)。来自该研究的信息用于设计后续剂量范围毒性研究,且测定所提议人剂量的适合性。

[0341] SB 44以500mg/kg/天经口施用于食蟹猴连续4天。该剂量是临床上充分耐受的,并且伴随约2倍的ALT升高和约6倍的AST升高,这在处理停止后约一周回到基线。所有血液学参数看起来均为正常的,并且不存在其他明显毒性的证据。

[0342] 结论:如上所述,SB 44是两种异构体(Rp,Sp)的混合物,其中SB 1B是Rp异构体,以大于55%存在。在小鼠中的短期初次和长期Mtb攻击实验中,SB 1B看起来作为佐剂比SB 44更有效。另外,关于SB 44的第二种异构体(Sp-异构体)作为佐剂的功效知之甚少。许多临床前研究通过使用SB 44进行。研究结果是由SB 44代表的二核苷酸组合物的极佳安全性的举例说明。因此,预料关于皮下施用的SB 1B的极佳安全性概况。

[0343] 实施例18:在用BCG和化合物处理的PBMC中的干扰素的诱导

[0344] 对于该测定法,PBMC以1百万细胞/ml铺平板在24孔板中。一组板用BCG、BCG+化合物进行处理,并且温育24小时。将细胞裂解且收获上清液。使用ELISA测定法与标准试剂盒,评价细胞因子和I型干扰素的产生。根据相同实验,BCG的确诱导其他细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-10和TNF)。与单独的BCG相比较,用BCG和化合物处理的细胞诱导IFN的产生增加。结果在图17中提供。

[0345] 根据相同实验,BCG的确诱导其他细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-10和TNF)。与单独的BCG相比较,用BCG和化合物处理的细胞诱导IFN的产生增加。

[0346] 总之,本发明中请求保护的化合物充当细胞内微生物传感器的激活物,并且引起免疫应答的活化。当与疫苗结合使用时,该化合物充当佐剂且加强由疫苗诱导的免疫应答。

[0347] 实施例19. 体外细胞毒性研究

[0348] 使用预测肝、肾、骨髓和线粒体毒性的细胞系实验对象组(内部的),一种或多种先导化合物的体外细胞毒性研究。

[0349] 化合物1和3具有极佳的安全性概况,在许多细胞系中具有 $CC_{50} > 1000$ 微摩尔。标准MTT测定法在96孔板中执行,使用与96孔板阅读器(ThermoMax, Molecular devices)结合的Promega CellTiter96 Non-radioactive Cell Proliferation Assay Kit,以及MDBK、Vero和HFF细胞系(得自ATCC)。采用几种对照,包括核苷类似物3TC、AZT和ddC,以及不含药物的培养基。SDS用作阳性细胞毒性对照。化合物以100、300和1000 μ M的浓度一式三份地进行测试。在细胞与测试物质温育24小时后,进行MTT测定法。所有测试的化合物均显示 $CC_{50} > 1000$ 微摩尔,指示化合物的高安全性指数。

[0350] 引用的参考文献

[0351] 1.(a)WHO REPORT:Global prevalence of hepatitis A,B,C.Weekly Epidemiological Record,Vol 77,6,2002;(b)Delwaide,J.,Gerard,C.Evidence-based medicine treatment of chronic hepatitis C.Liege study Group on Viral hepatitis.Revue medicale de Liege 55,337,2000.

[0352] 2.(a)Sorrell,M.F.,Belongia,E.A.,Costa,J.,Gareen,I.F.,Grem,J.L.,Inadomi,J.M.,Kern,E.R.,McHugh,J.A.,Peterson,G.M.,Rein,M.F.,Strader,D.B.,Trotter,H.T.National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement:Management of Hepatitis B.Ann.Int.Med.150,204,2009.

- [0353] (b)Wild,C.P.,Hall,A.J.Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries.Mutation Res.462,381,2000.Liang,T.J.,Rehermann,B., Seeff,L.B.,Hoofnagle,J.H.Pathogenesis,natural history,treatment,and prevention of hepatitis C.Ann.Intern.Med.132,296,2000.
- [0354] 3.Akira,S.,Uematsu,S.,Takeuchi,O.Pathogen recognition and Innate immunity.Cell,24,783-801,2006.
- [0355] 4.Katze,M.G.,He,Y.,Gale,M.Viruses and interferon:A fight for supremacy.Nature Reviews,2,675,Sept 2002.
- [0356] 5.Takeda,K.,Akira,S.Toll-like receptors in innate immunity.International Immunology,17,1-14,2005.
- [0357] 6.Saito,T.,Hirai,R.,Loo,Y-M.,Owen,D.,Johnson,C.L.,Sinha,S.C,Akira,S., Fujita,T.,Gale,M.Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,10,No.2,582-587, 2007.
- [0358] 7.Meylan,E.,Curran,J.,Hofmann,K.,Moradpour,D.,Binder,M., Bartenschlager,R.,Tschopp,J.Cardif is an acceptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus.Nature,437,1167-1172, 2005.
- [0359] 8.Hiscott,J.,Lin,R.,Nakhaei,P.,Paz,S.MasterCARD:A priceless link to innate immunity.TRENDS in Molecular Medicine,12,53-56,2006.
- [0360] 9.Cui,S.,Eisenacher,K.,Kirchhofer,A.,Brozka,K.,Lammens,A.,Lammens,K., Fujita,T.,Conzelmann,K-K.,Krug,A.,Hopfner,K-P.The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I.Molecular Cell,29,169-179, 2008.
- [0361] 10.Yoneyama,M.,Kikuchi,M.,Natsukawa,T.,Shinobu,N.,Imaizumi,T., Miyagishi,M.,Taira,K.,Akira,S.,Fujita,T.The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.Nat.Immunol.5,730-737,2004.
- [0362] 12.Hornung,V.,Ellegast,J.,Kim,S.,Brzozka,K.,Jung,A.,Kato,H.,Poeck,H., Akira,S.,Conzelmann,K-K.,Schlee,M.,Endres,S.,and Hartmann,G.5'-triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.Science,314,994-997,2006.
- [0363] 13.Pichlmair,A.,Schulz,O.,Tan,C.P.,Naslund,T.I.,Liljestrom,P.,Weber, F.,Reis e Sousa,C.RIG-I mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.Science,314,997-1001,2006.
- [0364] 14.Myong,S.,Cui,S.,Cornish,P.V.,Kirchhofer,A.,Gack,M.U.,Jung,J.U., Hopfner,K-P.,Ha,T.Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA.Science,323,1070,2009.
- [0365] 15.Gack,M.U.,Kirchhofer A.,Shin,Y.C,Inn K.S.,Liang C,Cui S.,Myong S., Ha T.,Hopfner,K-P.,Jung,J.U.Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice

variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*.105(43):16743-8,2008.

[0366] 15.(a)Sabbah,A.,Chang,T.H.,Harnack,R.,Frohlich,V.,Tominaga,K.,Dube,P.H.,Xiang,Y.,Bose,S.Activation of innate immune antiviral responses by NOD2. *Nat. Immunol.*10,1073,2009.(b)Franchi,L.,Warner,N.,Viani,K.,Nunez,G.Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol.Rev.*227,106,2009.

[0367] 16.(a)Iyer,R.P.,Pandey,R.,Kuchimanchi,S.RNA interference:An exciting new approach for target validation, gene expression analysis and therapeutics. *Drugs of the Future*,2003,28,51-59.(b)For reviews on antisense approach see:(i)Mirabelli,C.T.,Crooke,S.T.Antisense Oligonucleotides in the context of modern molecular drug discovery and development. In: *Antisense Research and Applications*,S.T.Crooke and B.Lebbleu(Eds.,)CRC Press,New York 1993,7-35.(ii)Szymkowski,D.E.Developing antisense oligonucleotides from the laboratory to clinical trials. *Drug.Disc.Today*,1996,1,415-28

[0368] 17.Iyer,R.P.,Jin,Y.,Roland A.,Morrey,J.D.,Mounir,S.,Korba,B.E.Phosphorothioate Di-and Tri-nucleotides as a novel class of anti-HBV agents. *Antimicrob.Agents Chemother.*48(6):2199-2205,2004.

[0369] 18.Iyer,R.P.,Roland A.,Jin,Y.,Mounir,S.,Korba,B.E.,Julander,J.,Morrey,J.D.Anti-hepatitis B virus activity of ORI-9020,a novel phosphorothioate dinucleotide,in a transgenic mouse model. *Antimicrob Agents Chemother.*48(6):2318-20,2004.

[0370] 19.For examples of nucleotide combinatorial synthesis and antiviral evaluation, see:(a)Jin,Y.,Roland,A.,Zhou,W.,Fauchon,M.,Lyaku,J.,Iyer,R.P. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*10,1921-25,2000.(b)Jin,Y.,X.Chen,M.-E.Cote,A.Roland,B.Korba,S.Mounir,Iyer,R.P. *Bioorg.Med.Chem.Lett.*11,2057-2060,2001.

[0371] 20.Iyer,R.P.,Coughlin,J.,Padmanabhan,S.Microwave-assisted functionalization of solid supports for rapid loading of nucleosides. *Current Protocols Unit 3.13*,(Beaucage et al Eds,)John Wiley and Sons,2006.

[0372] 21.Padmanabhan,S.,Coughlin,J.,Iyer,R.P.Microwave-assisted functionalization of solid supports.Application in the rapid loading of nucleosides on controlled-pore-glass(CPG). *Tet.Lett.*46,343-347,2005.

[0373] 22.Iyer,R.P.,Coughlin,J.,Padmanabhan,S.Rapid functionalization and loading of solid supports. *Organic Preparations&Procedure International*,37, 205-212,2005.

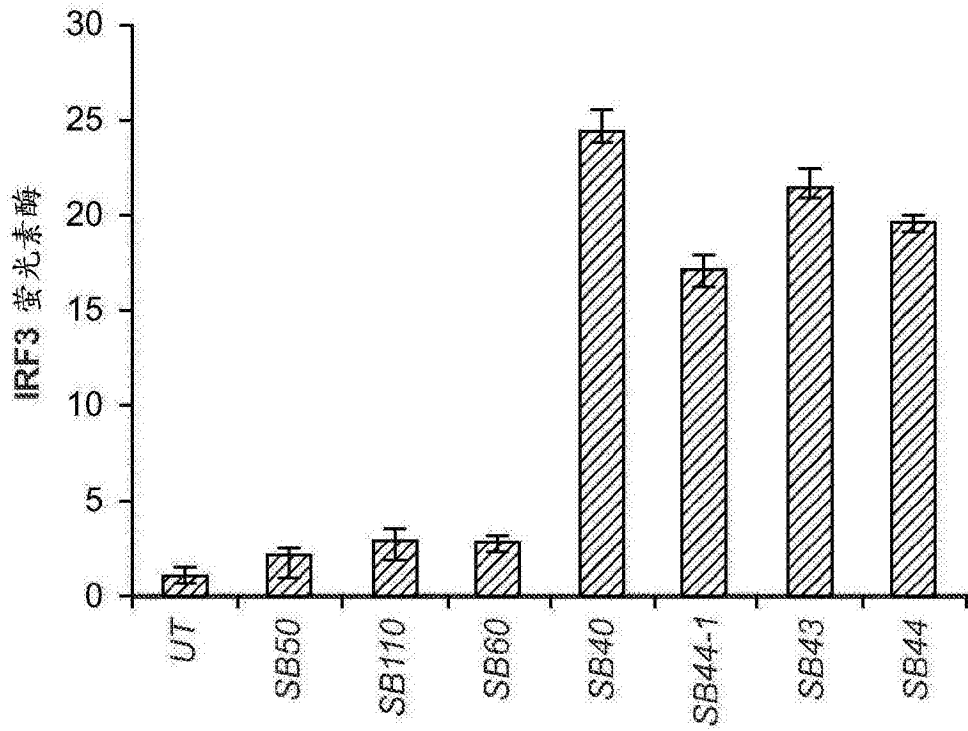


图1

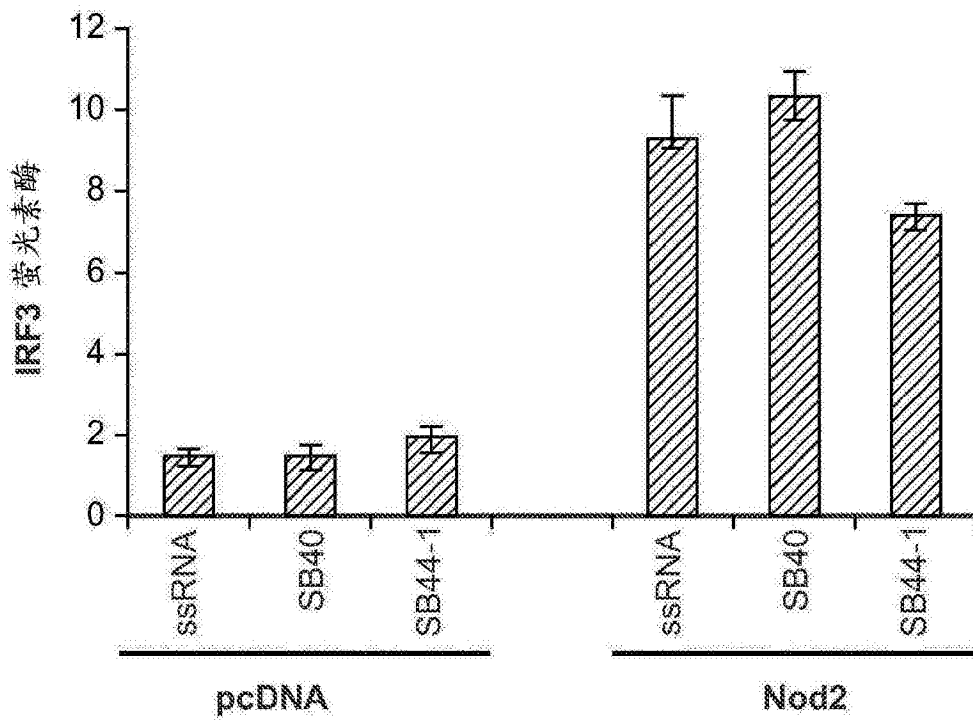


图2

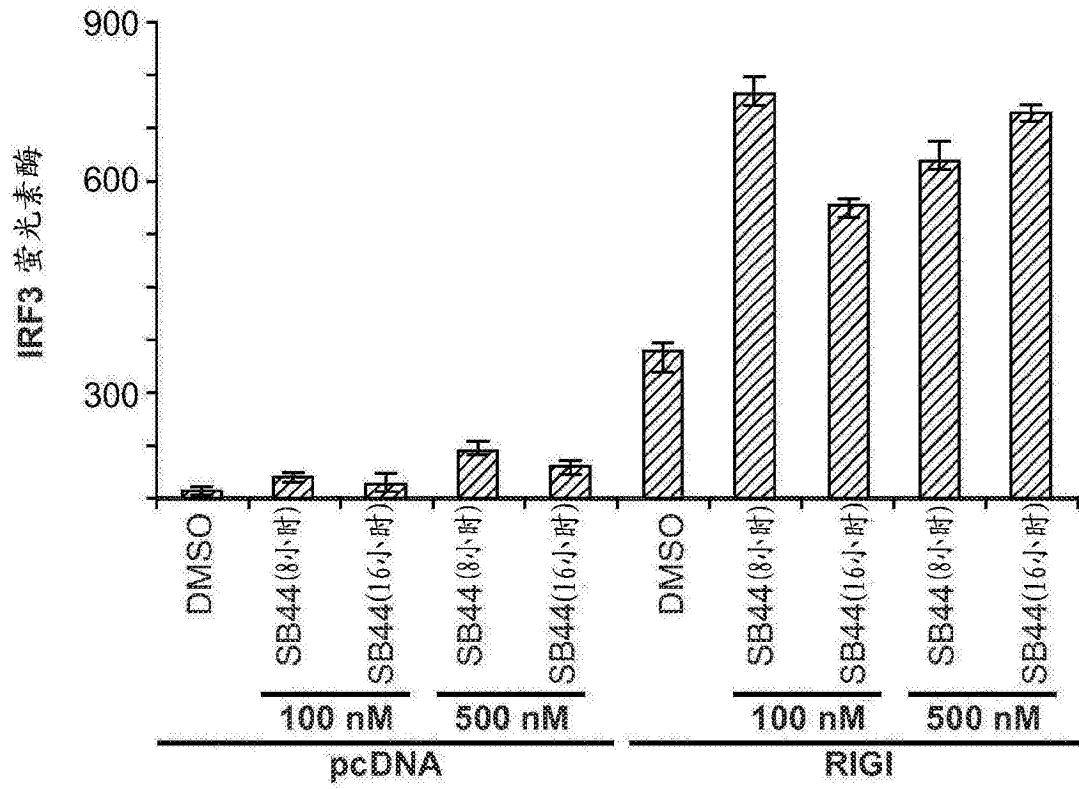


图3

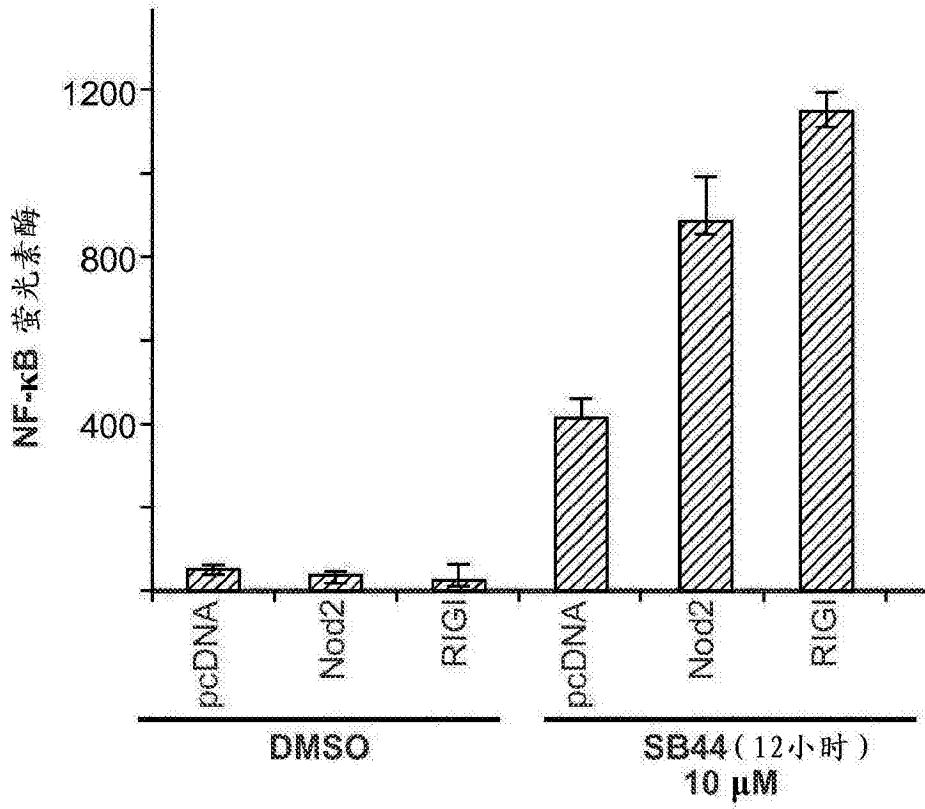


图4

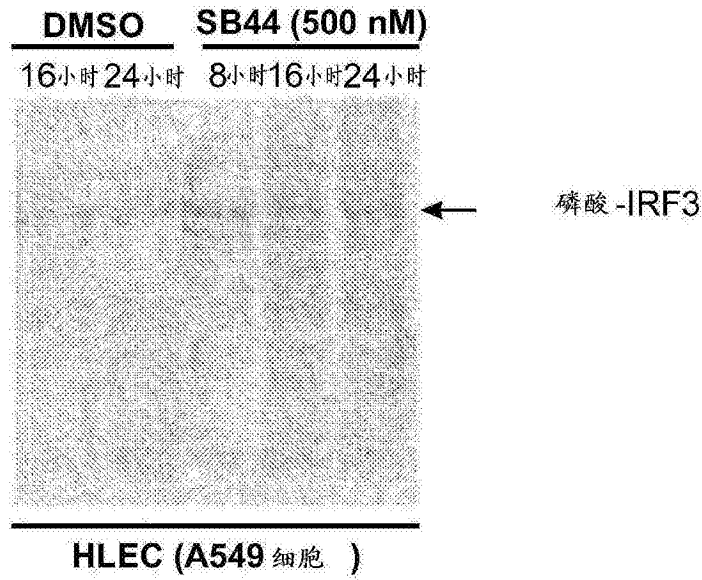
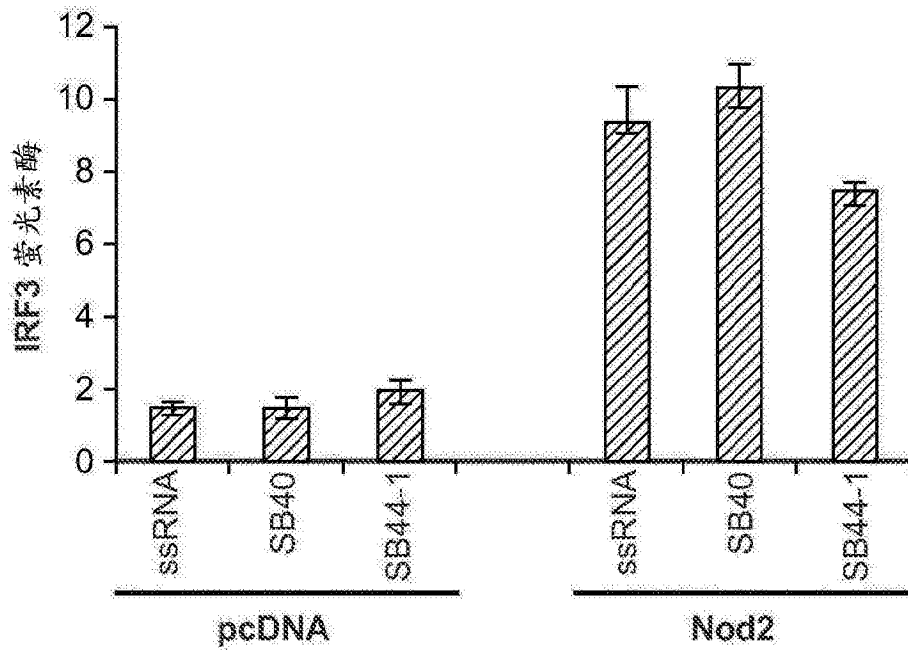
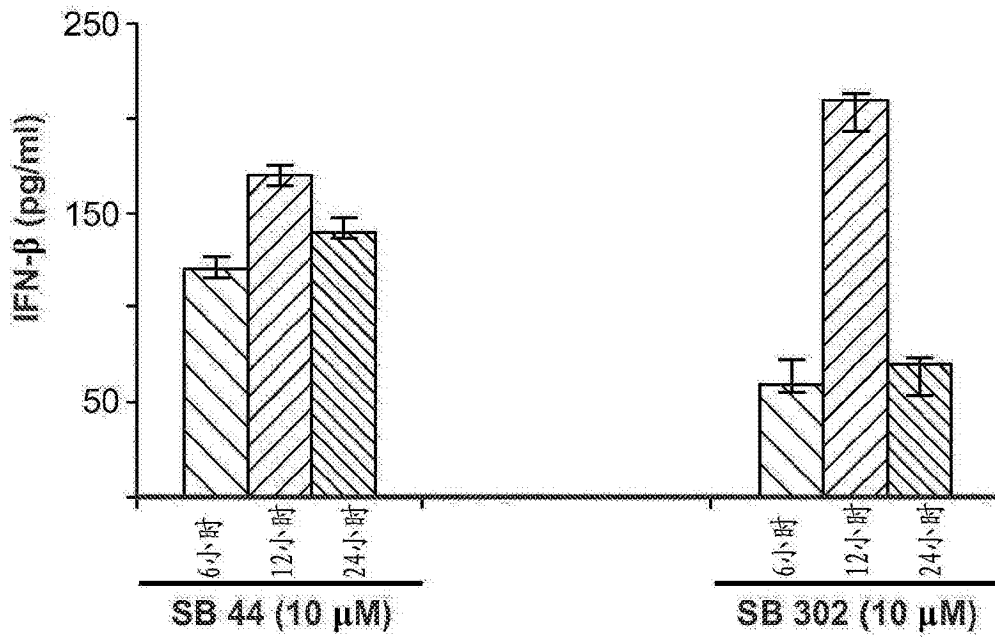


图5



经由 NOD2 活化, 通过 SMNH 化合物 (SB 40 和 SB 44) 的抗病毒应答的诱导。HEK 293 细胞用 NOD2、pcDNA 和 IRF3 荧光素酶进行转染。细胞随后与 ssRNA (0.5 mg/ml) 或 SMNH 化合物 (1 μ M) 一起温育。在 12 小时温育后, 如先前描述的测量荧光素酶活性。荧光素酶测定法结果呈现为来自三次独立实验的平均值+S.D.。

图6



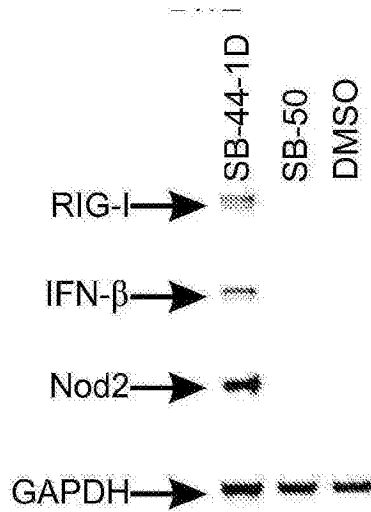
SMNH 化合物 (SB 44 和 SB 302) 诱导来自人肺上皮 A549 细胞的干扰素-β (IFN-β) 产生。细胞与 SMNH 化合物 SB 44 (10 μM) 和 SB 302 (10 μM) 一起温育。在 6 小时、12 小时、24 小时温育后, 收集培养基上清液以通过 ELISA 检测 IFN-β。用 DMSO 获得的值 (在处理 6 小时、12 小时或 24 小时) 从得自 SMNH 化合物处理的细胞的相应值中扣除。

图7



SB 44-1-D 处理导致来自肺上皮细胞的 IFN- β 产生。人肺上皮 A549 细胞用 DMSO (媒介物对照) 或 SB 44-1 (10 μ M) 处理 24 小时。在处理后的培养基上清液执行 ELISA 测定法, 以测量在处理后的细胞中释放的 IFN- β 水平。数据代表具有相似结果的三次独立实验的平均值。结果 - SB 44-1-D 处理触发来自肺上皮细胞的 IFN- β 释放。

图8



通过 SB 44-1-D 的先天性免疫应答者基因的诱导。人肺上皮 A549 细胞用 DMSO (媒介物对照)、SB-50 (10 μM) 或 SB 44-1 (10 μM) 处理 12 小时。在处理后的, 从细胞中收集的 RNA 用于 RT-PCR 分析, 以检测 RIG-I、Nod2 和干扰素-β (IFN-β) 基因的表达。结果 - SB 44-1-D 诱导 A549 细胞中的 RIG-I、Nod2 和 IFN-β 基因表达。

图9

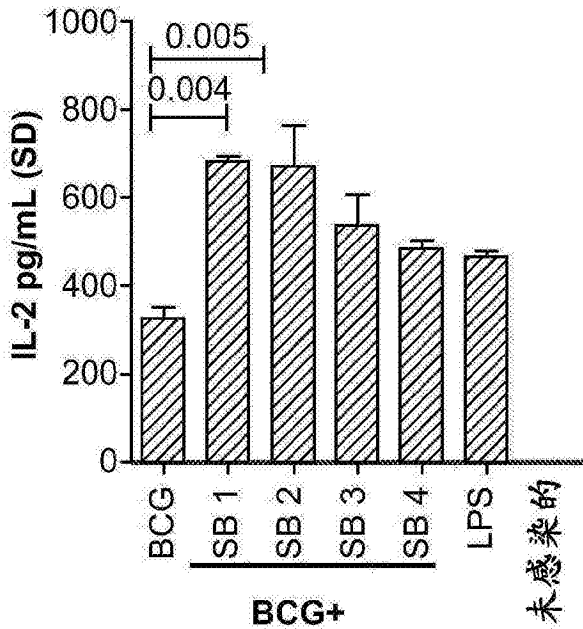


图10A

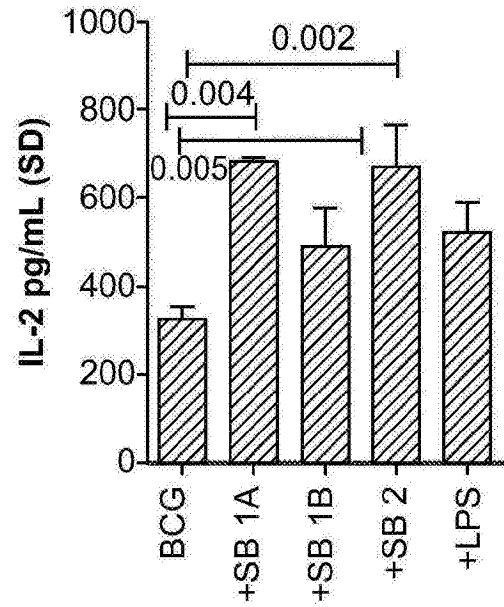


图10B

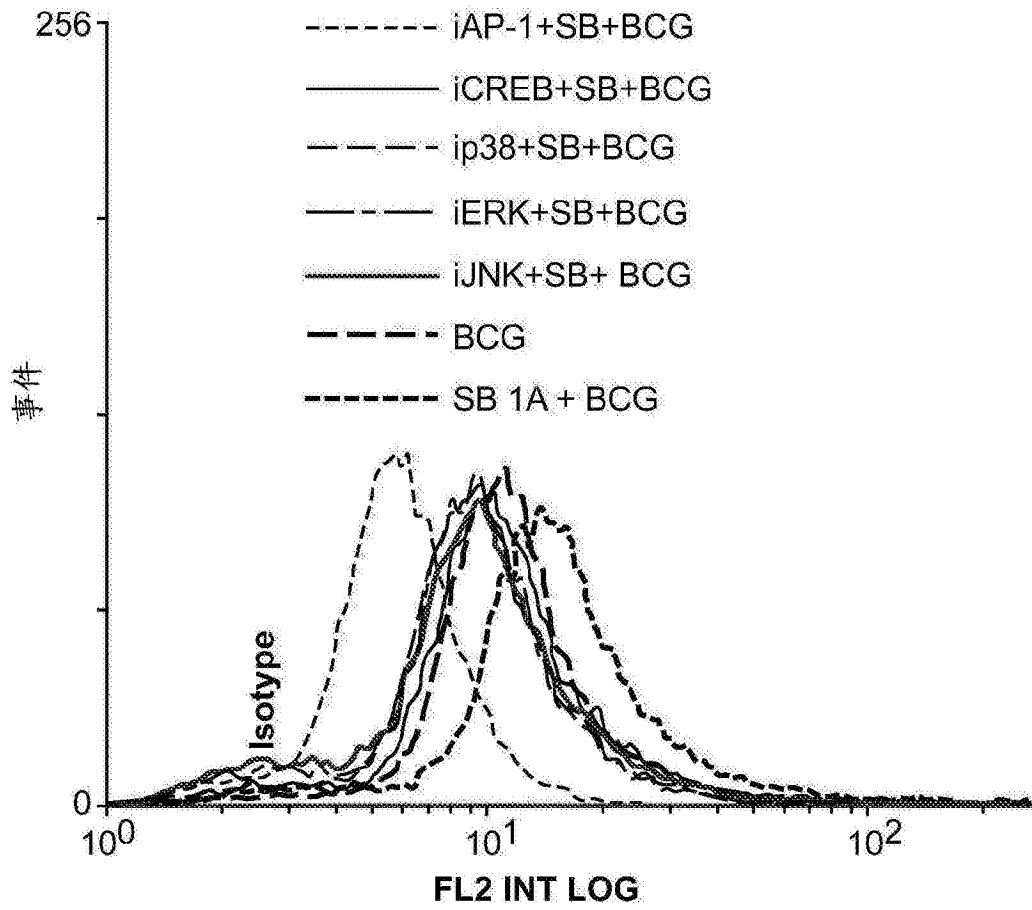


图10C

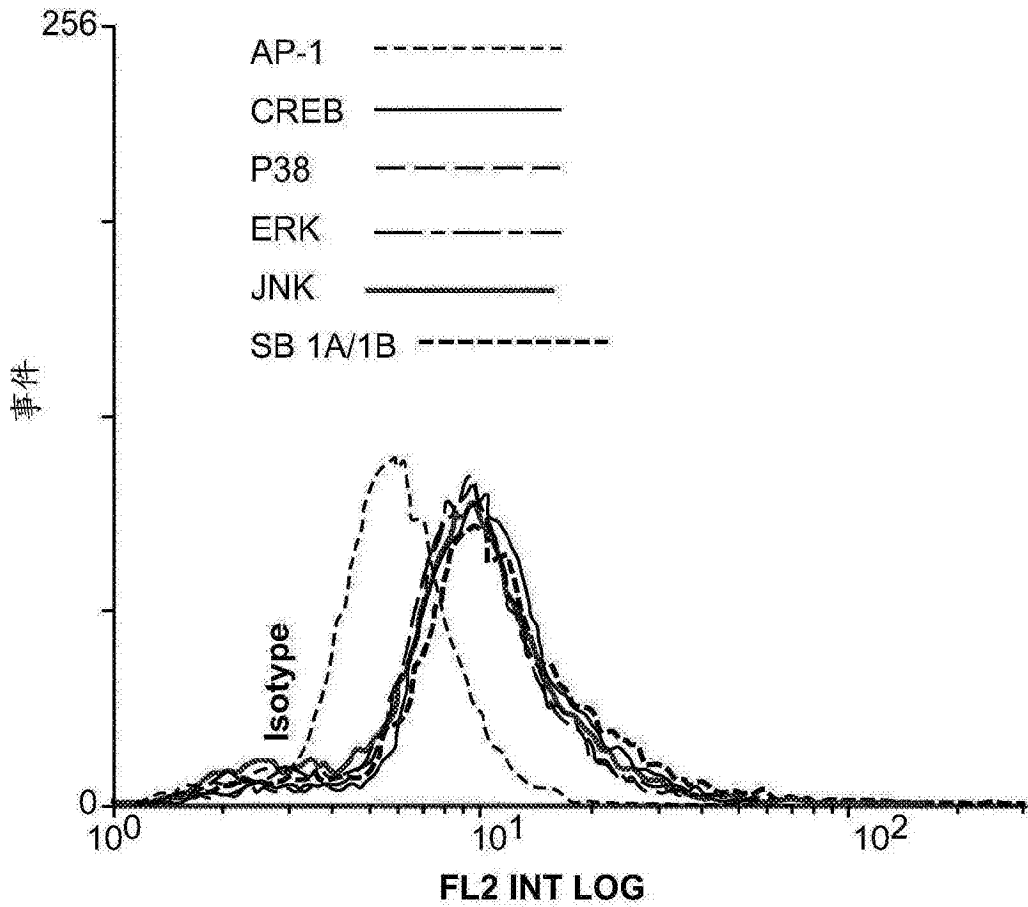


图10D

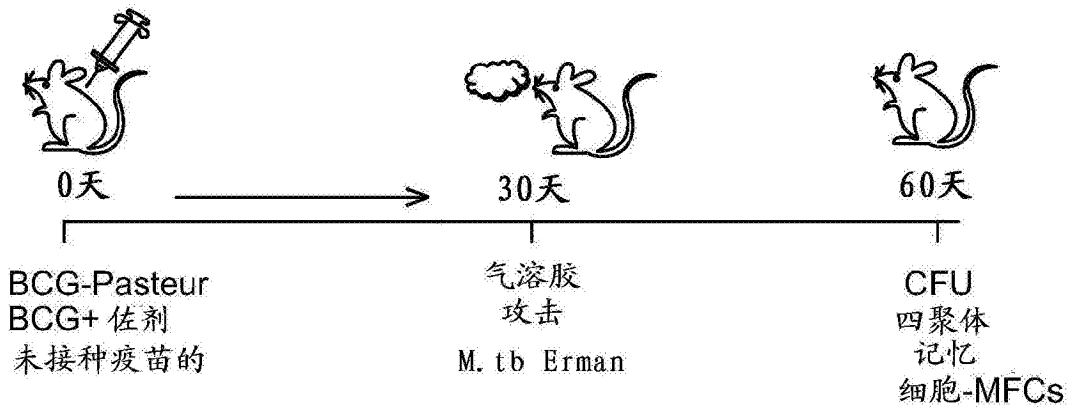


图11A

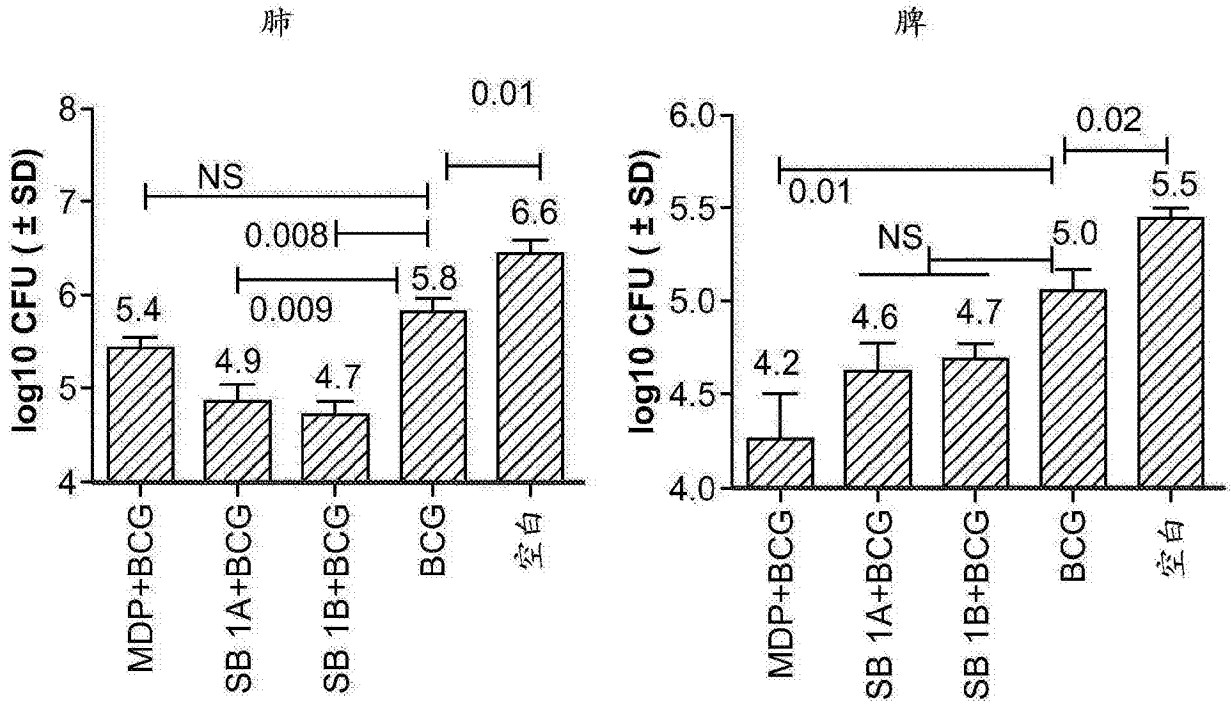


图11B

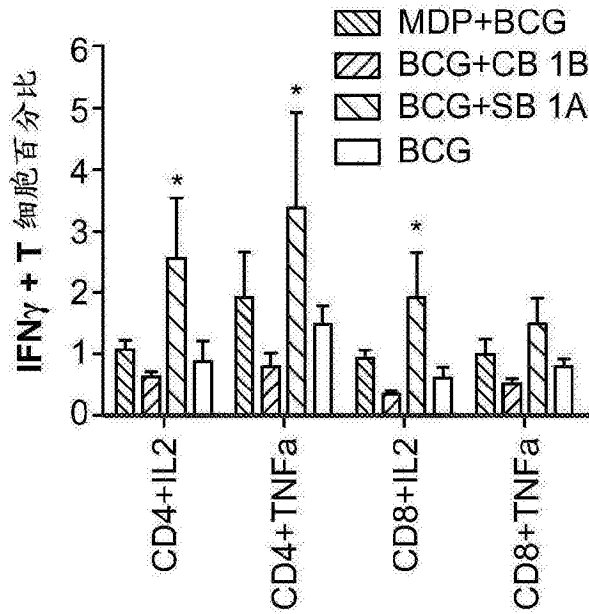


图11C

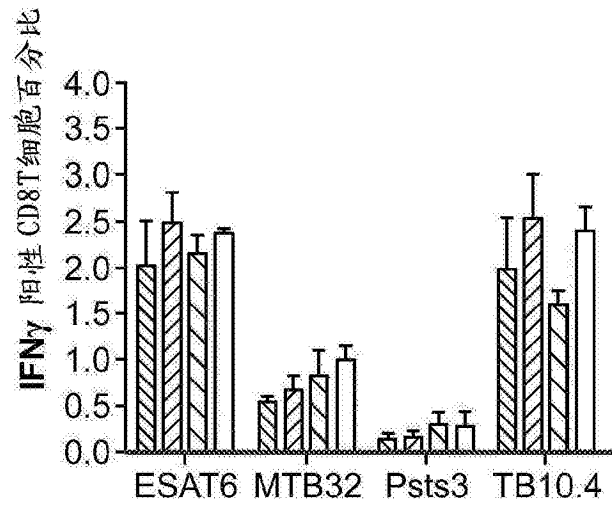


图11D

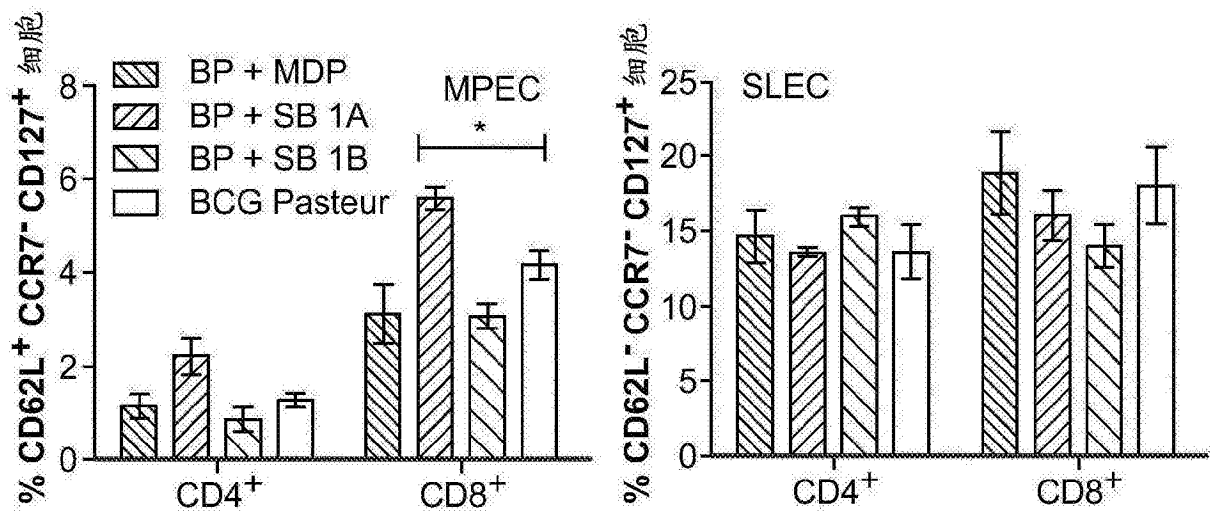


图11E

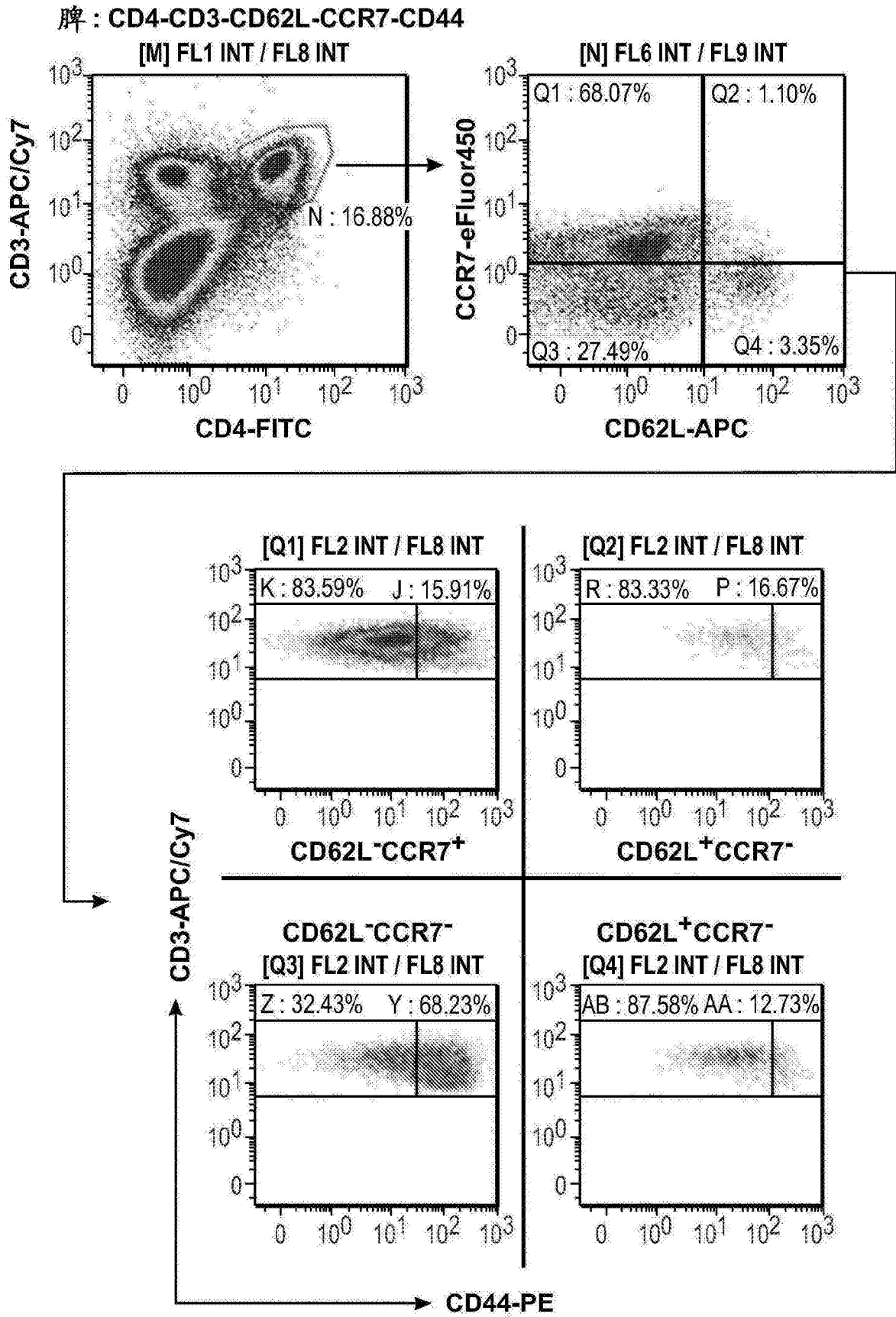


图12A-1

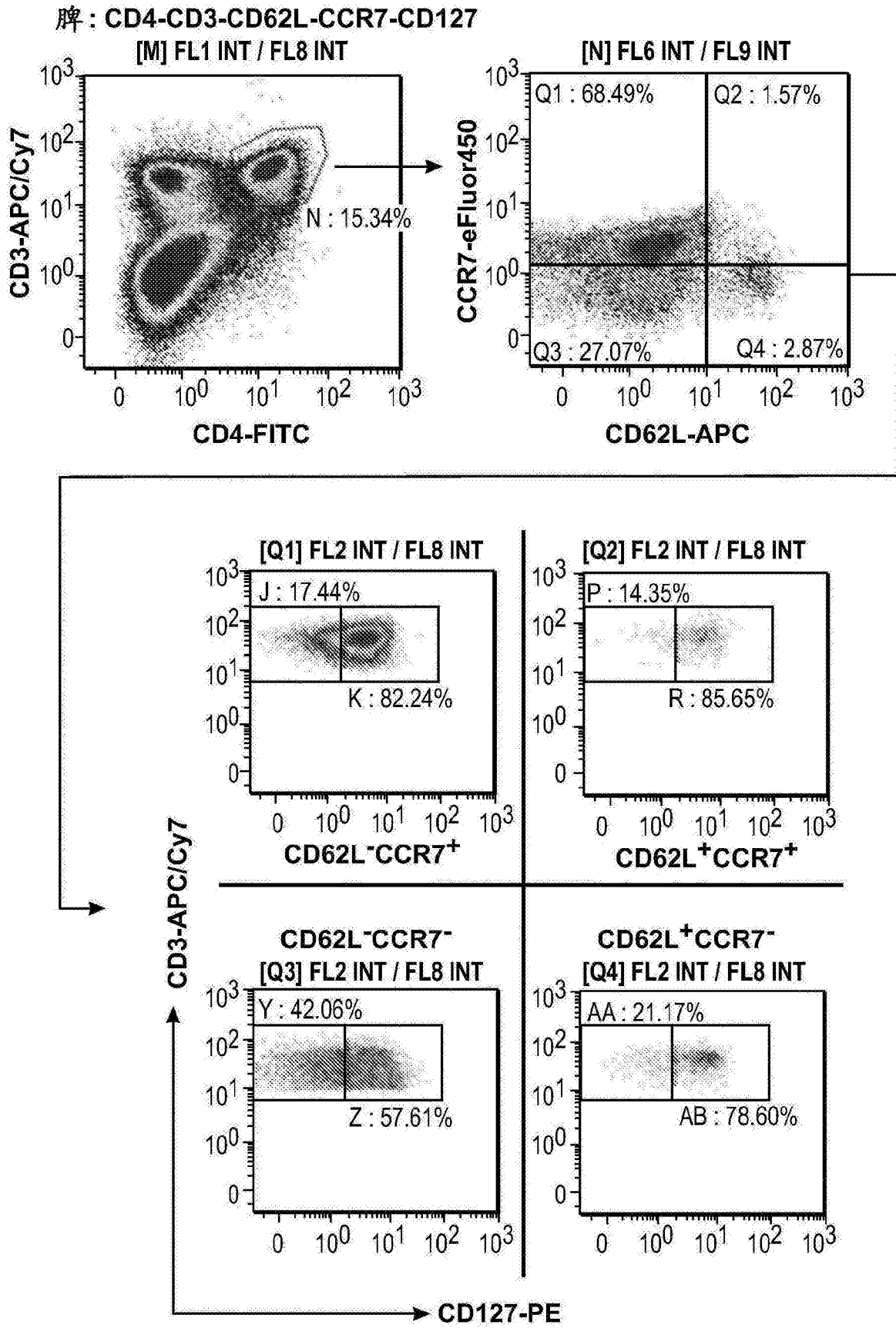


图12A-2

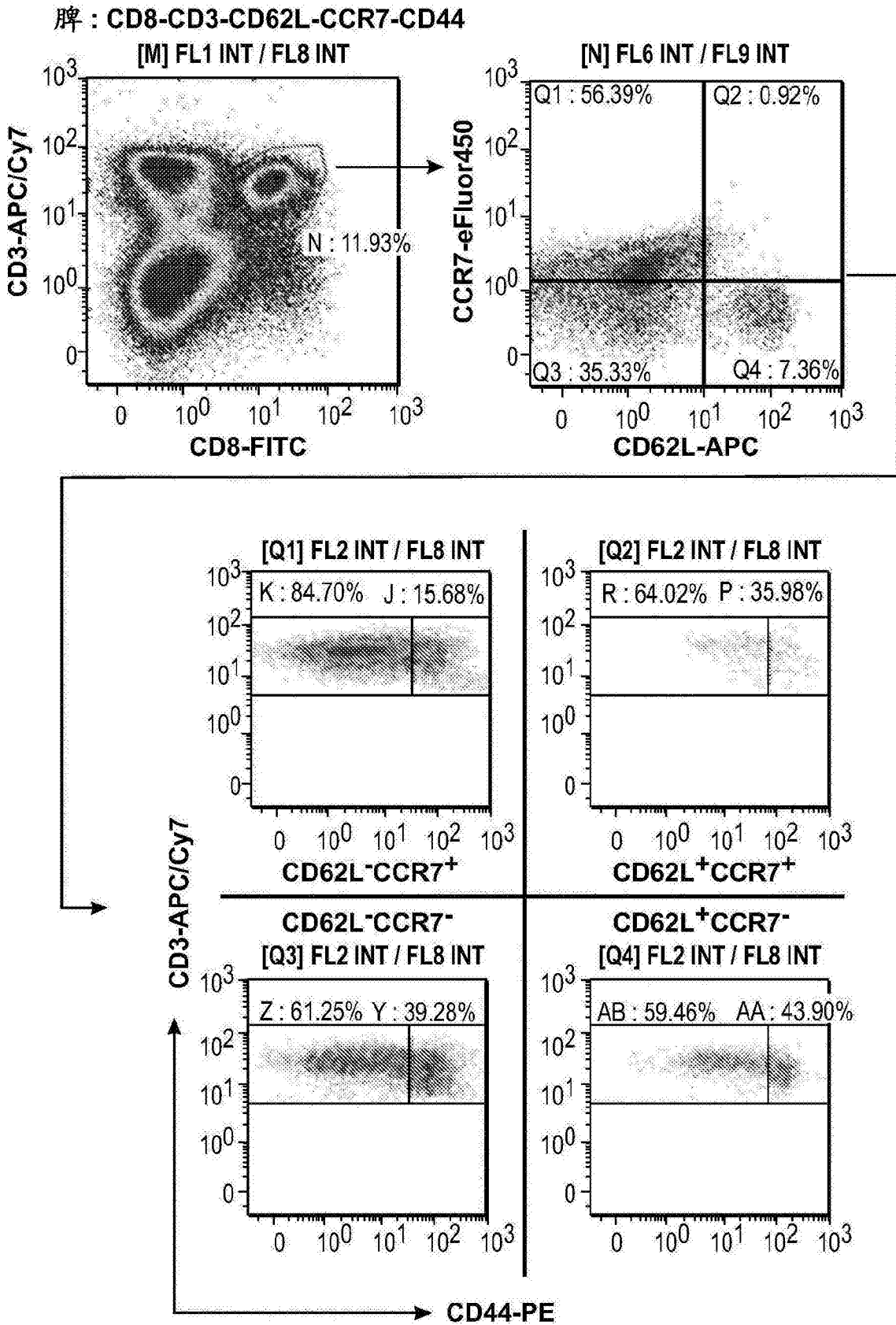


图12B-1

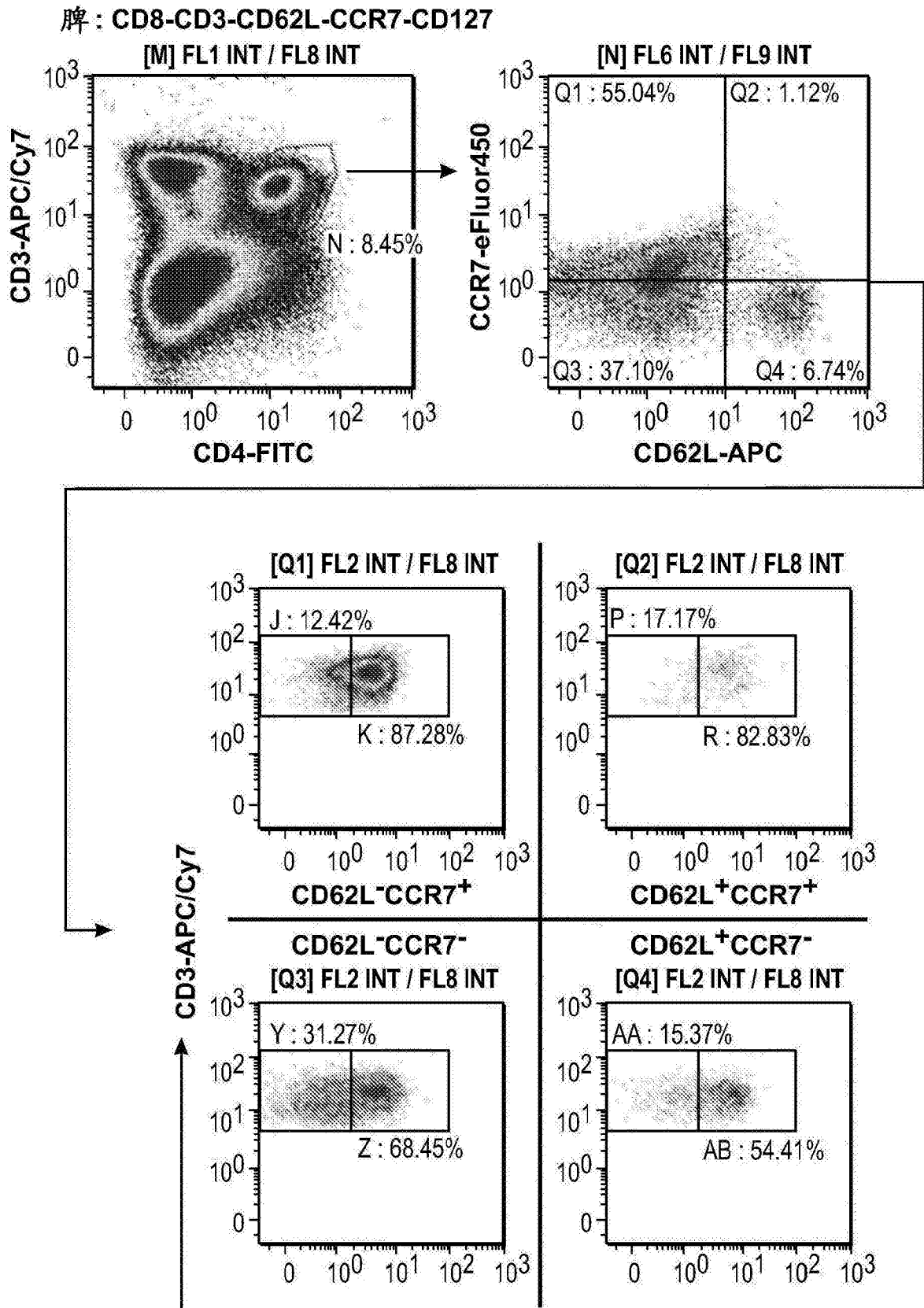


图12B-2

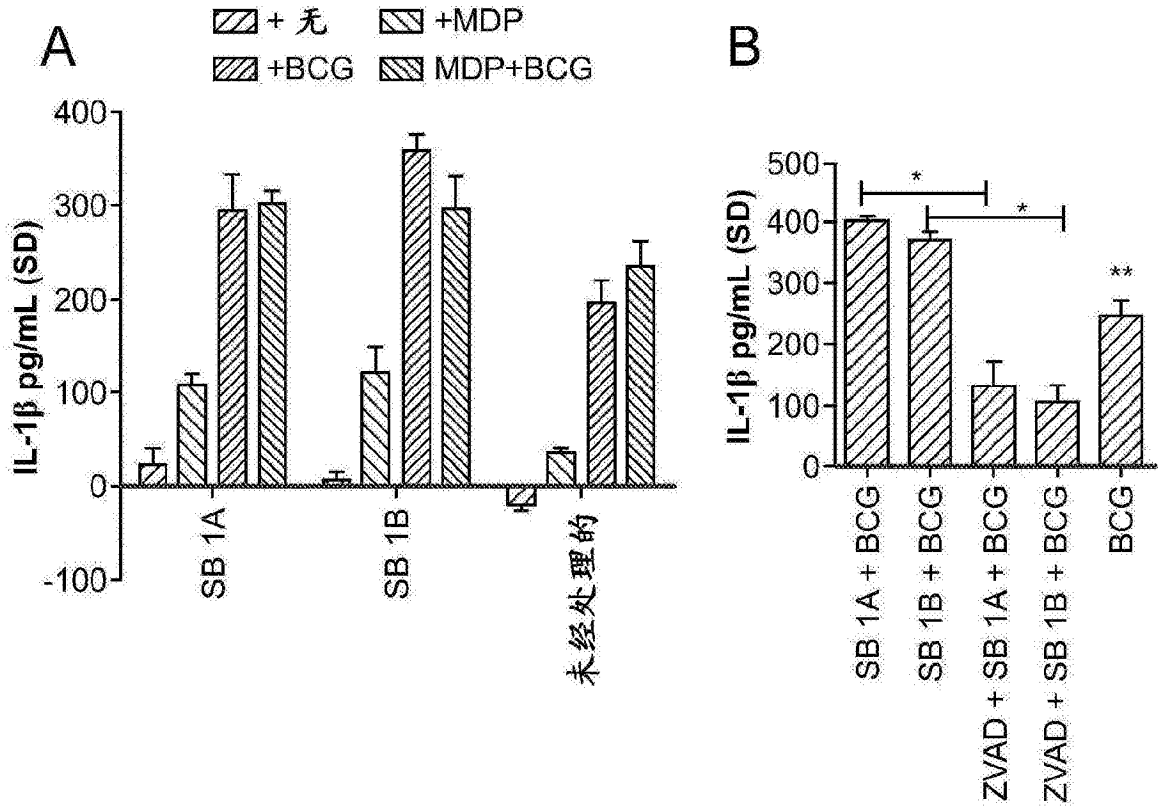


图13

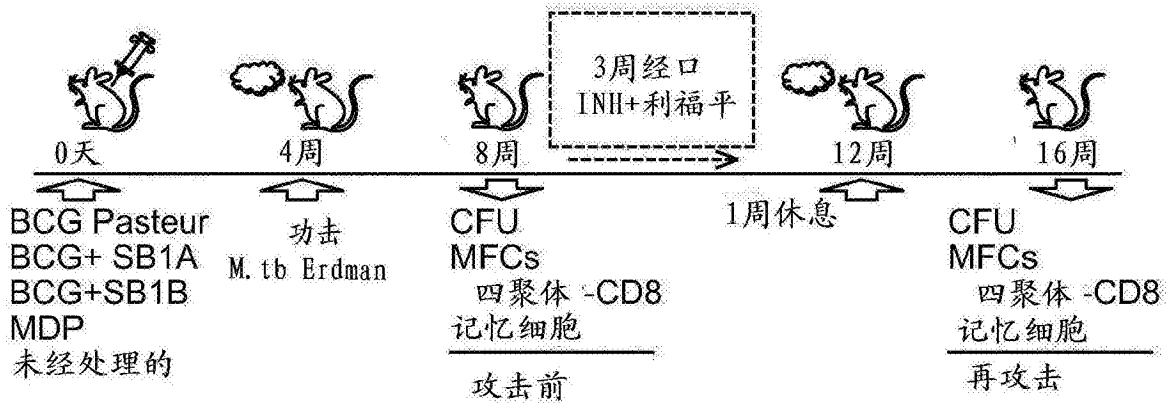
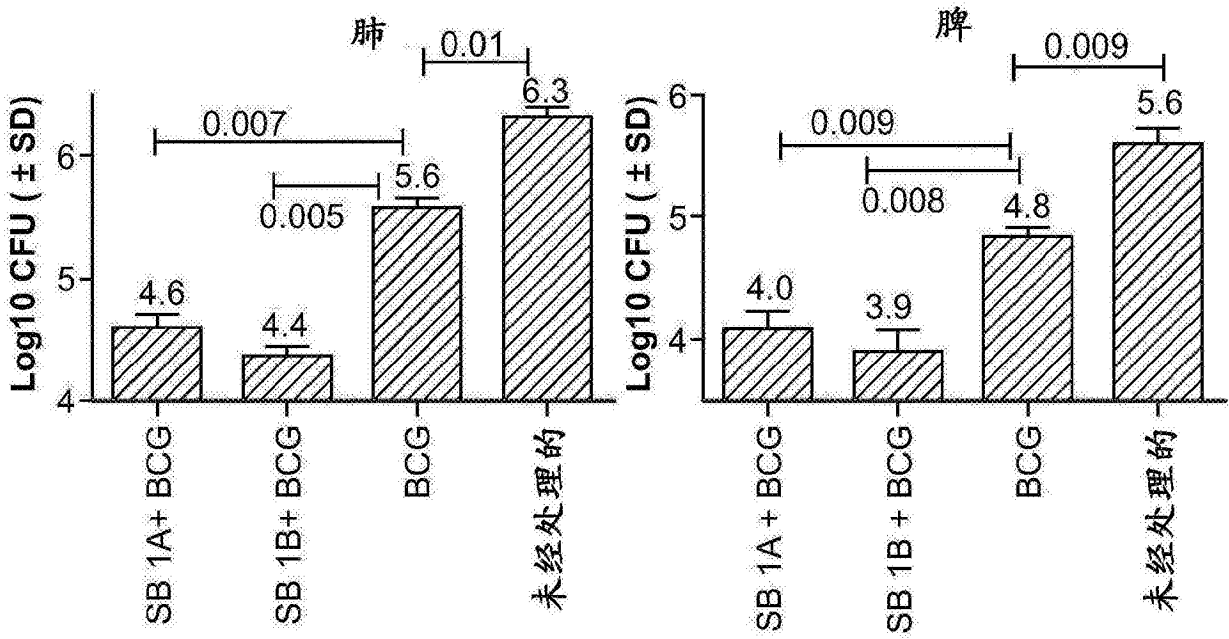


图14

A 初次攻击



B 再攻击

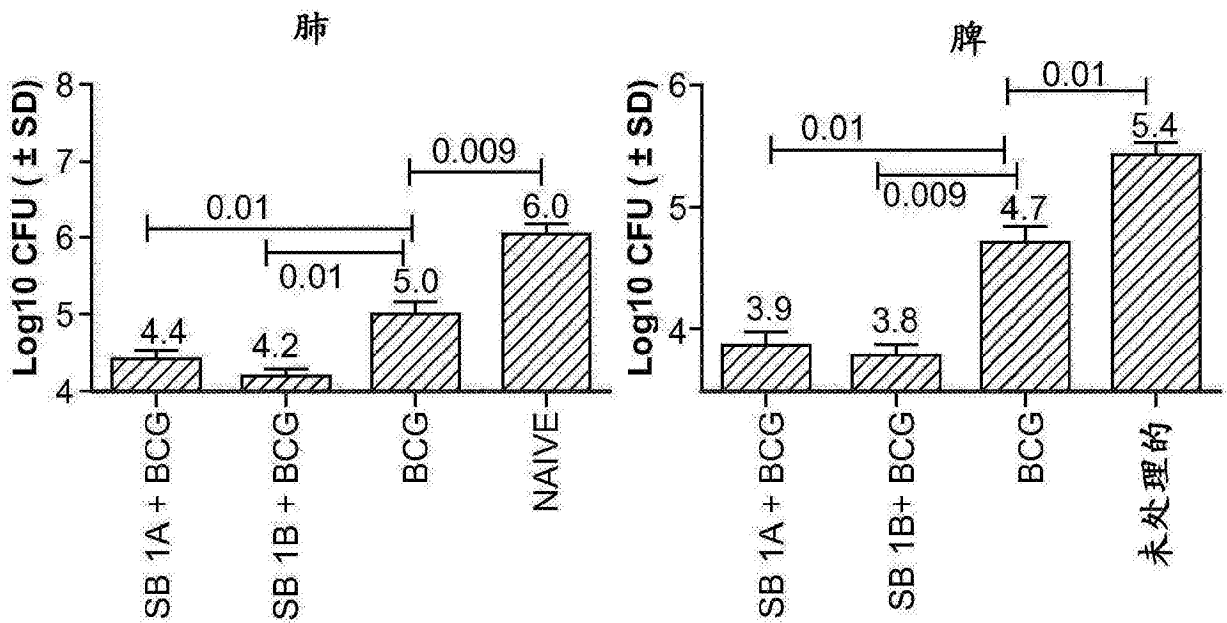


图15

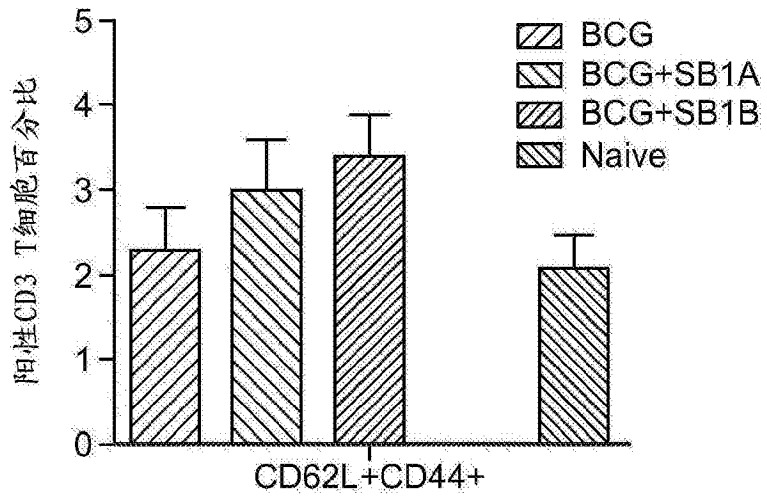


图16A

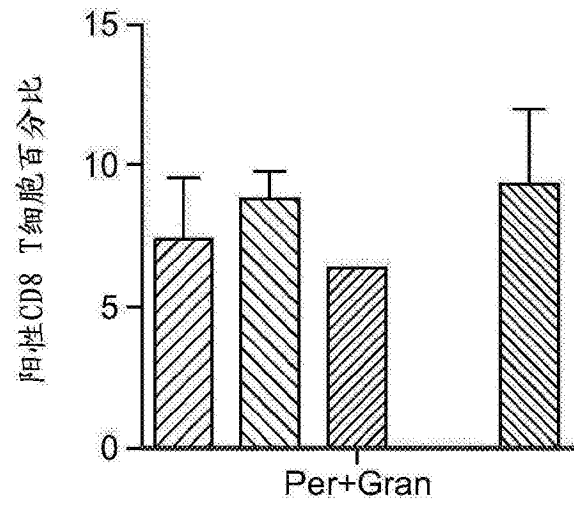


图16B

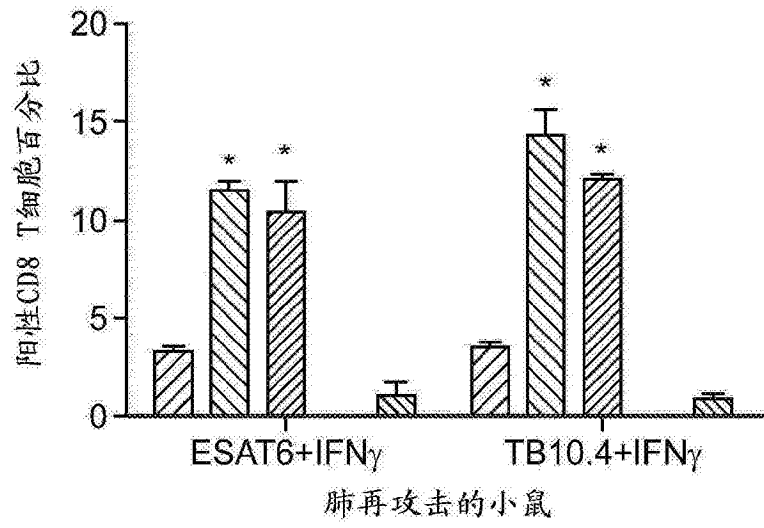


图16C

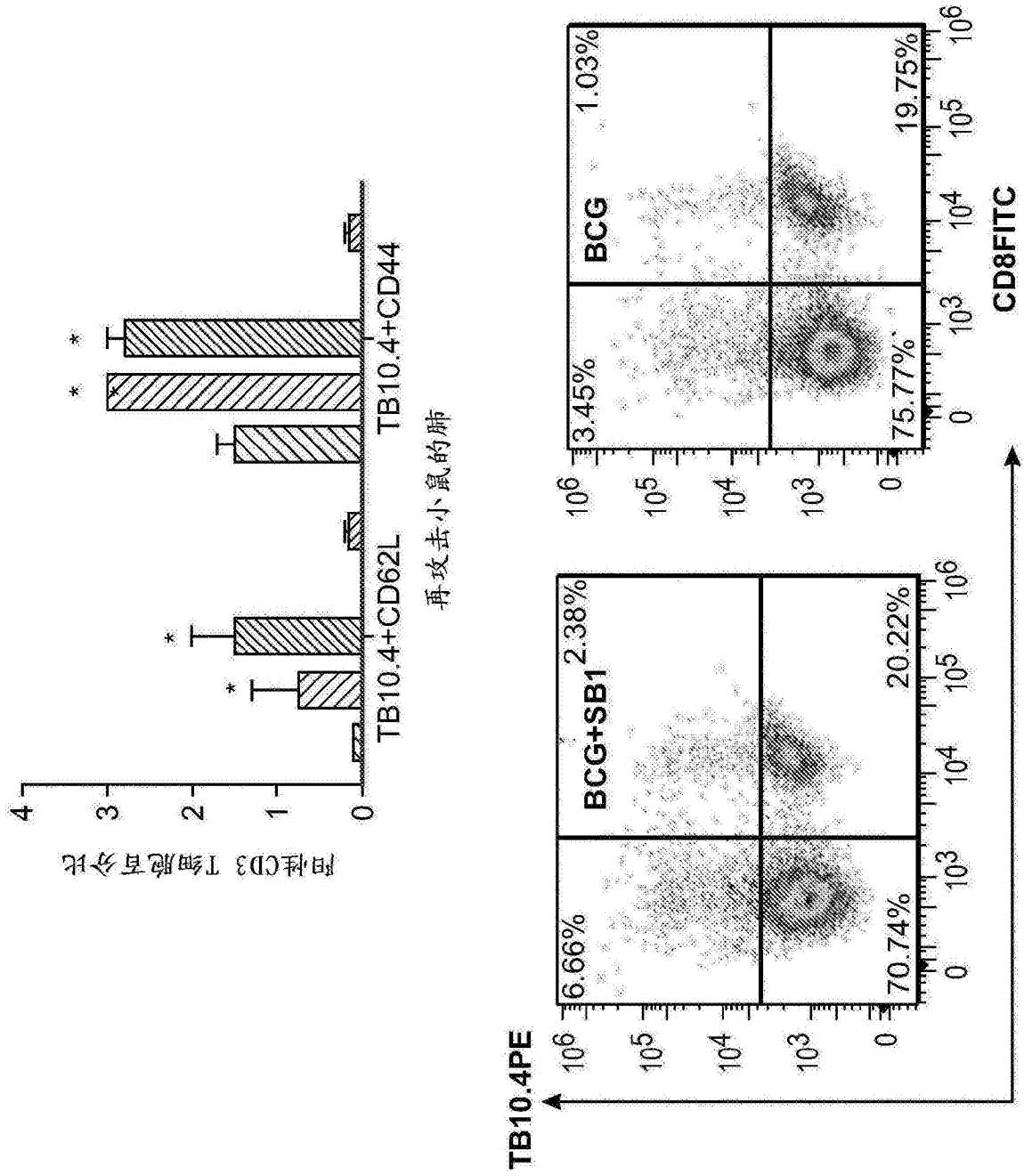
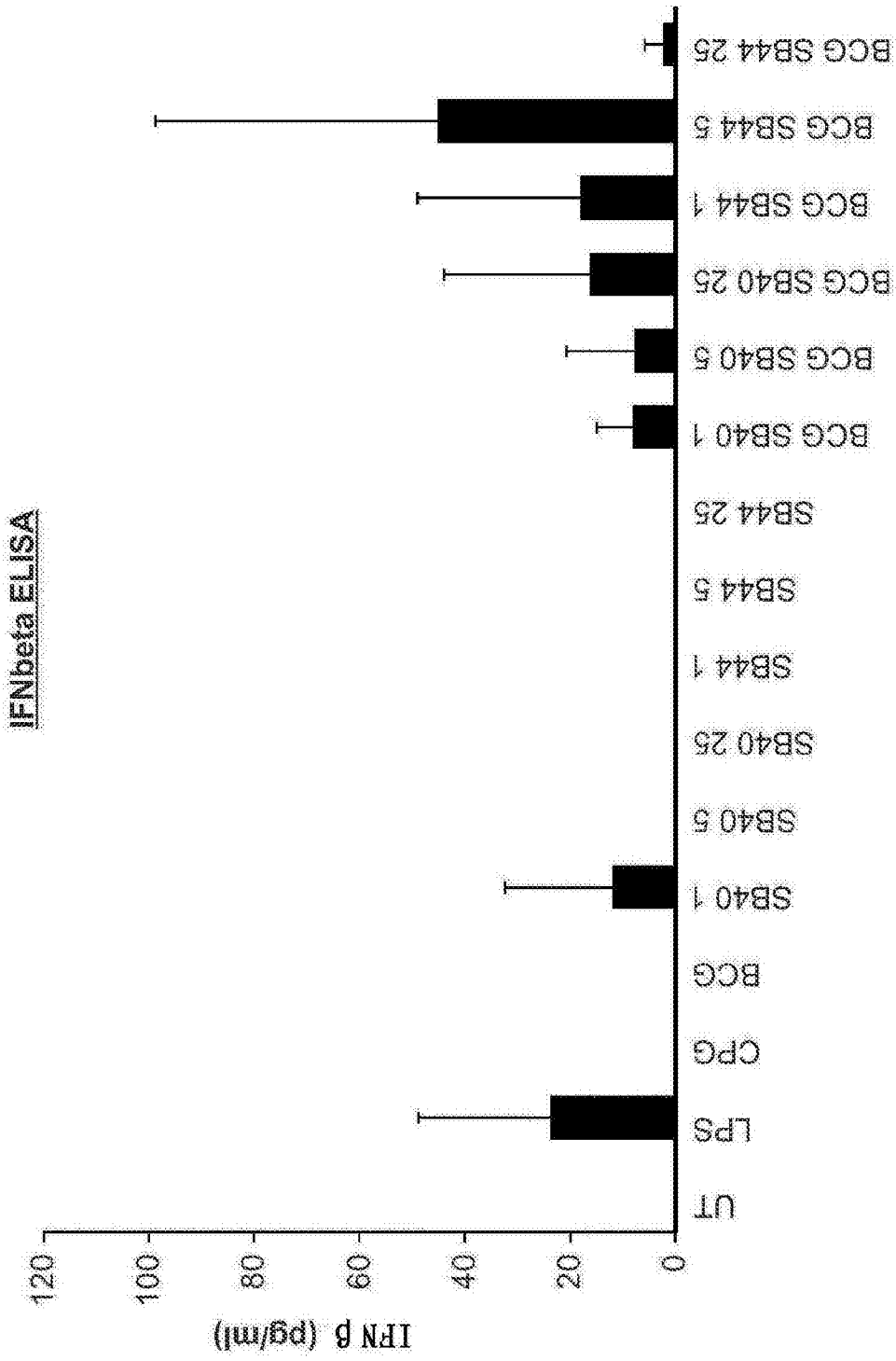


图16D



在24孔板中1百万/ml的PBMC温育24小时且收获上清液。
根据相同实验，BCG的确诱导其他细胞因子（IL1、6、8、10和TNF），但cpG则不是。

图17