



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107096032 A

(43)申请公布日 2017. 08. 29

(21)申请号 201611145115.5

A61K 39/39(2006.01)

(22)申请日 2012.05.15

A61P 31/12(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

61/486,728 2011.05.16 US

A61P 31/04(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 33/02(2006.01)

201280035142.0 2012.05.15

A61P 31/06(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(71)申请人 罗马克实验室有限公司

地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 让-弗朗索瓦·罗西尼奥尔

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

代理人 黄志华 石磊

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/426(2006.01)

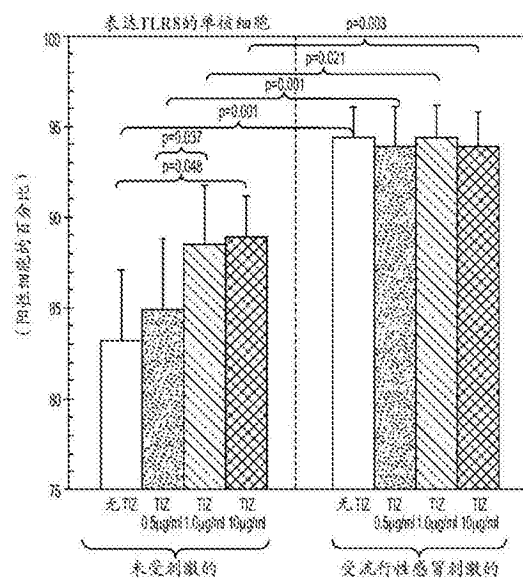
权利要求书1页 说明书13页 附图28页

(54)发明名称

在有需要的对象中刺激免疫应答的方法

(57)摘要

本发明涉及一种在有需要的对象中刺激免疫应答的方法,包括向所述对象施用药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物,其中,所述噻唑化物类化合物为硝唑尼特或替唑尼特或RM-4848、或其盐、其多形体、其酯、其酰胺、其前体药物或其衍生物,其中,所述对象患有病毒性感染、癌症或细胞内原生动感染或存在患病毒性感染、癌症或细胞内原生动感染的危险。



1. 一种在有需要的对象中刺激免疫应答的方法,包括向所述对象施用药物组合物,所述药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物,其中,所述噻唑化物类化合物为硝唑尼特或替唑尼特或RM-4848、或其盐、其多形体、其酯、其酰胺、其前体药物或其衍生物,其中,所述对象患有病毒性感染、癌症或细胞内原生动物感染或存在患病毒性感染、癌症或细胞内原生动物感染的危险。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与疫苗联合施用。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与免疫刺激剂联合施用。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述免疫刺激剂为咪喹莫特或雷西莫特。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与选自那尼纳米韦、奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦的神经氨酸酶抑制剂联合施用。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与金刚烷类似物联合施用。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与重组唾液酸酶融合蛋白联合施用。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,刺激所述免疫应答引起治疗或预防所述对象中的癌症。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述癌症为白血病。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述白血病为毛细胞白血病或慢性髓性白血病。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述癌症为黑色素瘤。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述癌症为非霍奇金淋巴瘤。

13. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述癌症为肾细胞癌。

14. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与疫苗联合施用。

15. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与免疫刺激剂联合施用。

16. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与抗癌药物联合施用。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述抗癌药物选自STI571、CGP74588、1- β -D-阿糖呋喃胞嘧啶(Ara-C)、阿霉素、达卡巴嗪、顺氯氨铂、博莱霉素、长春新碱、洛莫司汀、长春花碱、卡莫司汀、DTIC、它莫西芬、舒尼替尼、索拉非尼和干扰素 α 。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中,刺激所述免疫应答引起治疗或预防所述对象中的细胞内原生动物感染。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述细胞内原生动物感染选自隐孢子虫属、利什曼原虫属、刚地弓形虫和克氏锥虫。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与疫苗、或免疫刺激剂、或抗原生动物药联合施用。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中,所述噻唑化物类化合物与选自甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑、阿托伐醌、克林霉素、乙胺嘧啶、螺旋霉素、二脒那秦、胡米铵、苏拉明、美拉索明、葡萄糖酸锑钠和锑酸葡甲胺的抗原生动物药联合施用。

22. 根据权利要求18所述的方法,其中,刺激所述免疫应答引起治疗或预防细胞内细菌感染。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述细胞内细菌感染为结核分支杆菌。

在有需要的对象中刺激免疫应答的方法

[0001] 本申请是申请日为2012年05月15日、申请号为201280035142.0、发明名称为“噻唑化物类化合物用于预防和治疗病毒性疾病、癌症和由细胞内感染引起的疾病的用途”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年5月16日递交的美国临时申请61/486,728的优先权,该临时申请全部内容以引用的方式并入本文。

技术领域

[0004] 本发明针对用于免疫调节(包括预防或治疗病毒性疾病、癌症和由细胞内原生动物感染引起的疾病)的组合物和方法。

背景技术

[0005] 流行性感为高度传染性的急性呼吸系统疾病,该疾病影响所有年龄群,并且每年仅在美国就引起大约36,000人死亡,超过226,000人住院治疗。流感病毒根据其核蛋白和基质蛋白的抗原差异而进行分类(甲型、乙型和丙型),流感病毒为有包膜的负链RNA病毒。甲型流感病毒的许多亚型在它们的两个表面糖蛋白(血凝素“HA”和神经氨酸酶“NA”)方面存在不同,这两个表面糖蛋白是保护性免疫反应的主要目标,且根据血凝素(用H数字表示)和神经氨酸酶(用N数字表示)的类型进行标记。由于抗原漂移和抗原转变,HA和NA连续不断地变化。已知16个H亚型(或“血清型”)和9个N亚型。

[0006] 乙型肝炎为由乙型肝炎病毒(HBV)引起的传染性疾病。大约世界人口的四分之一,即多于20亿人,已感染了乙型肝炎病毒。该急性疾病导致肝脏发炎、呕吐、黄疸和罕有的死亡。慢性乙型肝炎可最终导致肝硬化和肝癌一对目前的化疗有非常差的反应的绝症。乙型肝炎病毒具有由部分双链的DNA构成的环状基因组,且相似于逆转录酶病毒,通过RNA中间体利用逆转录复制。尽管复制发生在肝脏中,但病毒扩散至血液,在受到感染的人的血液中,发现病毒特异性蛋白和其相应的抗体。

[0007] 癌症的特征在于异常细胞的不受控制的生长和扩散。由于肿瘤细胞源于正常细胞,故宿主免疫系统不会将肿瘤细胞抗原识别为外来的。另外,一些肿瘤细胞通过消除抗原或减少细胞表面上的受体的数目,来逃脱宿主免疫防御系统。

[0008] 黑素瘤为起源于黑色素细胞中的恶性皮肤癌。如果早期发现和治疗,黑素瘤几乎是百分之百可治愈的。没有早期治疗,癌症会发展、扩散,然后是致命的。黑素瘤为引起最多死亡人数的皮肤癌。表浅扩散型黑素瘤为最常见的黑素瘤类型,尤其在年轻人中。这种黑素瘤在渗透更深之前,相当长的时间影响皮肤的表层。恶性雀斑样痣最常在长期暴露于太阳下的老年人中发现。肢端雀斑样黑素瘤也在渗透更深之前表面地扩散,且是非洲裔美国人和亚洲人中最常见的黑素瘤,在白种人中是最不常见的。结节性黑素瘤在首次诊断出时通常是入侵性的,且是黑素瘤的最具攻击性的形式。

[0009] 白血病为血癌或骨髓癌,其特征不在于白血球的异常增多。毛细胞白血病为罕见的

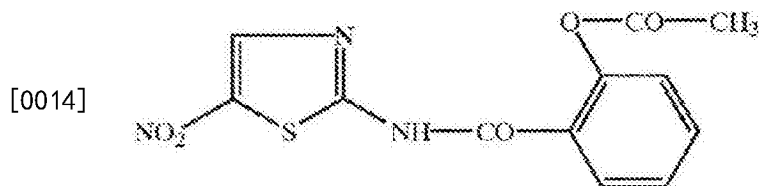
恶性血液肿瘤,其特征在于骨髓中异常B淋巴细胞的累积,该异常B淋巴细胞干扰正常白血球、红血球和血小板的生成。慢性髓性白血病(CML)为白血球癌症,其特征在于骨髓中主要的骨髓细胞的增强的且不受调控的生长以及血液中这些细胞的累积。非霍奇金淋巴瘤会是攻击性的或无痛的,可以出现在任何年龄段,且通常特点为淋巴结大于正常、发烧和体重减轻。B细胞非霍奇金淋巴瘤包括伯基特淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(CLL/SLL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴瘤母细胞性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。T细胞非霍奇金淋巴瘤包括蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤和前体T淋巴瘤母细胞性淋巴瘤。

[0010] 肾细胞癌,包括肾细胞癌、肾盂癌和肾母细胞瘤,是成年人中最常见的肾癌类型。在2010年,仅在美国就有58,240个估计新病例和13,040人死亡。

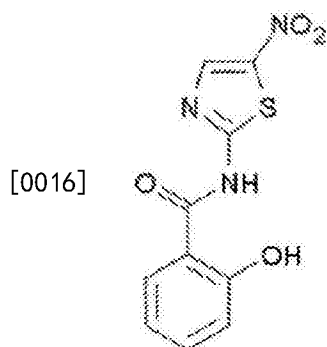
[0011] 尽管通过分子生物学在肿瘤抗原的识别及其以重组和合成形式的生成方面取得的重大进展已使得许多复杂的方法运用到癌症治疗中,但肿瘤细胞疫苗的产生免疫性的成功最终取决于抗原递呈细胞上的主要组织相容性复合体(MHC)的表达和由宿主免疫系统将肿瘤抗原看作“外来的”的识别。然而,预防和治疗受到病原体的逃避宿主免疫反应的能力的阻碍。

[0012] 因此,对于病毒性疾病和癌症疾病,在本领域中强烈地需要开发新的预防和治疗方案。

[0013] 硝唑尼特(nitazoxanide)(2-(乙酰氧基)-N-(5-硝基-2-噻唑基)苯甲酰胺)为噻唑化物类(thiazolide)抗寄生虫药,具有下面的结构:



[0015] 替唑尼特(tizoxanide)为硝唑尼特的活性循环代谢物。人类口服硝唑尼特或硝唑尼特和替唑尼特的混合物后,这些化合物部分被肠道吸收,且硝唑尼特在血浆中被快速地水解形成替唑尼特。替唑尼特与血浆蛋白结合,替唑尼特的排尿半衰期为7.3小时。替唑尼特与葡萄糖醛酸共轭,且该药物在尿液和胆汁中排泄为替唑尼特或替唑尼特葡萄糖苷酸。在血浆中替唑尼特的半衰期仅大约为1.5小时。替唑尼特具有下面的结构:



[0017] RM-4848为替代的噻唑化物类,其具有与替唑尼特相同结构,但包括替代硝基的氯代基团,从而产生化合物N-(5-氯代噻唑-2-基)-2-羟基苯甲酰胺。硝唑尼特(Alinia®, NTZ)和替唑尼特(TIZ)为具有抗寄生虫、厌氧细菌和病毒的活性的噻唑化物类化合物。NTZ

在美国被批准用于治疗由小球隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*) 和蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) 引起的腹泻。NTZ和TIZ也抑制包括甲型流感病毒和丙型肝炎病毒的RNA病毒和DNA病毒的复制。在临床试验中,NTZ被证明在治疗轮状病毒性胃肠炎、诺罗病毒性胃肠炎和慢性丙型肝炎中是有效的,且对于治疗流行性感,正处于后期临床开发阶段。

发明内容

[0018] 本发明提供了包含噻唑化物类的药物组合物用于免疫调节有需要的对象的用途,包括用于预防和/或治疗病毒性疾病、癌症和由细胞内原生动感染或细菌感染引起的疾病的用途。在特定实施方式中,本发明提供了一种在有需要的对象中刺激免疫应答的方法,包括向该对象施用药物组合物,该药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物。本发明可接受的噻唑化物类化合物包括在美国专利No.7,645,783、No.7,550,493、No.7,285,567、No.6,117,894、No.6,020,353、No.5,968,961、No.5,965,590、No.5,935,591和No.5,886,013中描述的那些噻唑化物类化合物,这些专利全部内容以引用的方式并入本文。在优选的实施方式中,噻唑化物类试剂为硝唑尼特。在另一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为替唑尼特。在又一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为RM-4848或其酯前体药物RM-5038。在本发明的优选方面,所述对象患有病毒性感染。在本发明的另一个优选方面,所述对象存在发展成病毒性感染的危险。在本发明的一个方面,病毒性感染为流行性感。流行性感可由选自H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3和H10N7的病毒所引起。在本发明的另一个方面,病毒性感染为乙型肝炎。在优选的实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。在其它的优选实施方式中,噻唑化物类化合物与神经氨酸酶抑制剂(如,那尼纳米韦、奥司他韦、扎那米韦或帕拉米韦)、或免疫刺激剂(如,咪喹莫特或雷西莫特)、或金刚烷类似物、或重组唾液酸酶融合蛋白、或抗乙型肝炎药物联合施用。在又一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗联合施用。

[0019] 在本发明的另一优选方面,所述对象患有癌症。在本发明的一不同的优选方面,所述对象存在发展成癌症的危险。在一个实施方式中,癌症为白血病。优选地,白血病为毛细胞白血病或慢性髓性白血病。在本发明的不同的方面,癌症为黑素瘤。在本发明的又一方面,癌症为非霍奇金淋巴瘤。在本发明的另一个方面,癌症为肾细胞癌。在一个优选实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。在本发明的另一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗、或免疫刺激剂、或抗癌药物联合施用。抗癌药物可以包括但不限于STI571、CGP 74588、1- β -D-阿糖呋喃胞嘧啶(Ara-C)、阿霉素、达卡巴嗪、顺氯氨铂、博来霉素、长春新碱、洛莫司汀、长春花碱、卡莫司汀、DTIC、它莫西芬、舒尼替尼、索拉非尼和干扰素 α 。

[0020] 在本发明的另一优选方面,所述对象患有细胞内原生动感染。在本发明的不同的优选方面,所述对象存在发展成细胞内原生动感染的危险。在一个实施方式中,细胞内原生动感染为隐孢子虫属(*Cryptosporidium* spp.)。在本发明的不同方面,细胞内原生动感染为利什曼原虫属(*Leishmania* spp.)。在本发明的又一方面,细胞内原生动感染为刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)。在本发明的另一方面,细胞内原生动感染为克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)。在一个优选实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。

[0021] 在本发明的另一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗、或免疫刺激剂、或抗原生动药联合施用。抗原生动药可以包括但不限于甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑、阿托

伐醌、克林霉素、乙胺嘧啶、螺旋霉素、二脒那秦(diminazine)、胡米铵、苏拉明、美拉索明(melarsamine)、葡萄糖酸锑钠和锑酸葡甲胺。

[0022] 在本发明的另一优选方面,所述对象患有细胞内细菌感染。在本发明的不同优选方面,所述对象存在发展成细胞内细菌感染的危险。在一个实施方式中,细胞内细菌感染为结核分支杆菌。

[0023] 在一个特定实施方式中,本发明提供了一种治疗或预防有需要的对象中的病毒性感染的方法,包括向该对象施用药物组合物,该药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物。在优选的实施方式中,噻唑化物类试剂为硝唑尼特。在另一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为替唑尼特。在又一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为RM-4848或其药学上可接受的前体药物。在本发明的一个方面,病毒性感染为流行性感。流行性感可由选自H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3和H10N7的病毒所引起。在本发明的另一个方面,病毒性感染为乙型肝炎。在本发明的另一个方面,病毒性感染为由轮状病毒或诺罗病毒引起的腹泻或胃肠炎。在优选的实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。在其它的优选实施方式中,噻唑化物类化合物与神经氨酸酶抑制剂(如,那尼纳米韦、奥司他韦、扎那米韦或帕拉米韦)、或免疫刺激剂(如,咪喹莫特或雷西莫特)、或金刚烷类似物、或重组唾液酸酶融合蛋白、或抗乙型肝炎药物联合施用。在又一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗联合施用。

[0024] 在另一特定实施方式中,本发明提供了一种治疗或预防在有需要的对象中的癌症的方法,包括向该对象施用药物组合物,该药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物。在优选的实施方式中,噻唑化物类试剂为硝唑尼特。在另一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为替唑尼特。在又一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为RM-4848。在本发明的特别方面,癌症为白血病。优选地,白血病为毛细胞白血病或慢性髓性白血病。在本发明的不同的方面,癌症为黑素瘤。在本发明的又一方面,癌症为非霍奇金淋巴瘤。在本发明的另一个方面,癌症为肾细胞癌。在一个优选实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。在本发明的另一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗、或免疫刺激剂、或抗癌药物联合施用。抗癌药物可以包括但不受限于STI571、CGP 74588、1-β-D-阿糖呋喃胞嘧啶(Ara-C)、阿霉素、达卡巴嗪、顺氯氨铂、博莱霉素、长春新碱、洛莫司汀、长春花碱、卡莫司汀、DTIC、它莫西芬、舒尼替尼、索拉非尼和干扰素α。

[0025] 在又一特定实施方式中,本发明提供了一种治疗或预防在有需要的对象中的细胞内原生动物感染的方法,包括向该对象施用药物组合物,该药物组合物包括治疗有效量的噻唑化物类化合物。在优选的实施方式中,噻唑化物类试剂为硝唑尼特。在另一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为替唑尼特。在又一优选实施方式中,噻唑化物类试剂为RM-4848。在本发明的特别方面,细胞内原生动物感染为隐孢子虫属。在本发明的不同方面,癌症为黑素瘤。在本发明的不同方面,细胞内原生动物感染为利什曼原虫属。在本发明的又一方面,细胞内原生动物感染为刚地弓形虫。在本发明的另一方面,细胞内原生动物感染为克氏锥虫。在一个优选实施方式中,单独施用噻唑化物类化合物。在本发明的另一优选实施方式中,噻唑化物类化合物与疫苗、或免疫刺激剂、或抗原生动物药联合施用。抗原生动物药可以包括但不受限于甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑、阿托伐醌、克林霉素、乙胺嘧啶、螺旋霉素、二脒那秦(diminazine)、胡米铵、苏拉明、美拉索明(melarsamine)、葡萄糖酸锑钠和锑酸葡甲胺。

[0026] 在患有免疫缺陷的对象中,有效地治疗或预防病毒性疾病、癌症或细胞内原生动感染或细菌感染所需的免疫应答可不由噻唑化物类利用通常用于成功地治疗具有完全胜任的免疫系统的对象的给药方案而产生。患有极度免疫缺陷的对象不会是利用噻唑化物类治疗的好的人选。患有中度免疫缺陷的对象相比于具有完全胜任的免疫系统的对象,可能需要较高剂量的噻唑化物类治疗、较频繁地给药、或较长的给药时间段。还未发展成免疫缺陷的患有HIV(人类免疫缺陷病毒)感染的对象可以通过噻唑化物类有效地治疗,然而,患有与HIV感染相关联的免疫缺陷的对象,在通过噻唑化物类治疗之前或与噻唑化物类治疗同时,可能需要通过抗逆转录病毒药物的治疗以减小HIV病毒滴度,以及部分地恢复免疫功能。因此,使用噻唑化物类刺激免疫应答可基于免疫状态而为病人特别设计。

[0027] 前述一般说明和下面的附图的简要说明和详细的说明书是示例性的和解释性的,用来提供所要求保护的本发明的进一步解释。对于本领域的技术人员而言,从本发明的下面的详细描述中,其它的目的、优点和新颖特征将是显而易见的。

附图说明

[0028] 图1A、图1B和图1C为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特时CD 14+单核细胞的图。显示了平均值、S.E.(标准误差)和p值。

[0029] 图2A、图2B和图2C为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特时,在未受刺激和受流行性感冒刺激的外周血单核细胞(PBMC)中的TLR(Toll样受体)路径的替唑尼特调节的图。显示了平均值。

[0030] 图3A、图3B和图3C为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特时,在未受刺激和受流行性感冒刺激的PBMC中的IFN(干扰素)路径的替唑尼特调节的图。显示了平均值。

[0031] 图4A和图4B为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特时,辅助性T细胞的功能(分泌IFN γ 和IL2(白细胞介素2)的CD4+T细胞)的图。显示了平均值、S.E.和p值。

[0032] 图5A、图5B和图5C为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特时,细胞毒性T细胞的功能(表达穿孔素、颗粒酶和脂肪酸合成酶(Fas)的CD8+T细胞)的图。显示了平均值、S.E.和p值。

[0033] 图6A、图6B和图6C为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,表达TLR3(图6A)、TLR7(图6B)和TLR8(图6C)的CD14+细胞的百分比的图。显示了不存在RM4848或存在五种不同剂量的RM4848(0.5 μ g/ml;1.0 μ g/ml;10 μ g/ml;20 μ g/ml;40 μ g/ml)时所获得的数据。示出了平均值、S.E.和p值。

[0034] 图7A和图7B为表示在未受刺激(图7A)和受流行性感冒刺激(图7B)的条件下,在通过三种不同剂量的RM4848(1.0 μ g/ml;10 μ g/ml;20 μ g/ml)刺激之后的Toll样受体信号路径mRNA(信使核糖核酸)表达的图。在Toll样受体信号路径中涉及的84个基因的表达已通过实时定量反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)而评估,相对于5个管家基因而计算,且显示为自未受刺激样品的倍数变化表达。在图中仅显示了在替唑尼特刺激之后示出了不同的表达水平的靶点。

[0035] 图8A和图8B为表示在未受刺激(图8A)和受流行性感冒刺激(图8B)的条件下,在通过三种不同剂量的RM4848(1.0 μ g/ml;10 μ g/ml;20 μ g/ml)刺激之后的I型干扰素信号路径mRNA表达的图。在I型干扰素信号路径中涉及的84个基因的表达已通过实时定量RT-PCR而评估,相对于5个管家基因而计算,且显示为自未受刺激样品的倍数变化表达。在图中仅显示了在替唑尼特刺激之后示出了不同的表达水平的靶点。

[0036] 图9A和图9B为表示在未受刺激和受流行性感冒刺激(图9B)的条件下,分泌IFN γ (图9A)和IL2(图9B)的CD4+T细胞的百分比的图。显示了不存在RM4848或存在五种不同剂量的RM4848(0.5 μ g/ml;1.0 μ g/ml;10 μ g/ml;20 μ g/ml;40 μ g/ml)时所获得的数据。示出了平均值、S.E.和p值。

[0037] 图10A、图10B和图10C为表示本发明的实施方式的图,其中表示在未受刺激和受流行性感冒刺激(图10B)的条件下,表达颗粒酶(图10A)、穿孔素(图10B)和Fas(图10C)的CD8+T细胞的百分比。显示了不存在RM4848或存在五种不同剂量的RM4848(0.5 μ g/ml;1.0 μ g/ml;10 μ g/ml;20 μ g/ml;40 μ g/ml)时所获得的数据。示出了平均值、S.E.和p值。

[0038] 图11A和图11B示出表示本发明的实施方式的图,其中,评估了在感染后的5天时,不存在替唑尼特或存在不同剂量的替唑尼特(1.0 μ g/ml;10 μ g/ml)时HIV-1复制的抑制:在暴露于HIV的PBMC中的p24水平(图11A)和HIV复制的抑制百分比(图11B)。示出了平均值、S.E.和p值。

具体实施方式

[0039] 除另有规定外,“一”意为“一个或多个”。

[0040] 本发明的组合物和方法用来刺激有需要的对象中的免疫应答,从而预防和治疗感染和/或癌症疾病。本发明的目的是提供有效的非侵入性的方法以通过在有需要的对象中刺激强烈的免疫应答来预防和治疗该对象中的病毒性感染、癌症疾病和/或由细胞内原生动感染引起的疾病,该免疫应答由先天的和后天的免疫系统介导。

[0041] 先天免疫系统给予对抗感染的立即的短期的防御,在炎症部位处提供吞噬细胞、尤其是中性粒细胞的聚集,该吞噬细胞、尤其是中性粒细胞接着刺激白细胞和淋巴细胞的释放,并伴随着产生细胞因子,包括TNF(肿瘤坏死因子)、HMGB1(高迁移率族蛋白1)和IL-1(白细胞介素-1)。先天的白细胞包括自然杀伤细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和吞噬细胞,该吞噬细胞包括巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞。Toll样受体(TLR)为先天免疫系统的关键组分,这是因为TLR检测微生物感染,且引发抗微生物宿主防御应答。TLR控制多个树突状细胞功能,且引发导致后天免疫系统应答(包括生成I型干扰素(IFN))的级联。TLR3、TLR7、TLR8和TLR9参与病毒检测,且识别病原体核酸。TLR7、TLR8和TLR9位于细胞内溶酶体的区室中。

[0042] 当病原体逃脱了先天免疫系统时在脊椎动物中所引发的后天免疫系统或适应性免疫系统负责在抗原呈递期间识别特定的“非自体”抗原和负责目的在于消除外来病原体或病原体所感染的细胞的免疫应答。在后天免疫系统中,B细胞参与体液免疫应答,且T细胞负责细胞介导免疫应答。通过树突状细胞的抗原呈递刺激T细胞,以成为“细胞毒性”CD8+细胞或“辅助性”CD4+细胞。

[0043] 在淋巴结中,树突状细胞通过将“非自体”抗原结合至主要组织相容性复合体

(MHC,在人类中也被称为人类白细胞抗原(HLA))而在其表面上呈现出“非自体”抗原,该主要组织相容性复合体由穿过淋巴结的T细胞识别。外源性抗原通常显示在MHC II类分子上,该外源性抗原激活CD4+辅助性T细胞。由在宿主细胞内复制的病毒产生的内源性抗原通常显示在MHC I类分子上,且激活CD8+细胞毒性T细胞。后天免疫系统包括细胞毒性T细胞,也被称为TC、杀伤性T细胞或细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。一旦细胞毒性T细胞中的T细胞受体(TCR)与肽结合的MHC I类分子相互作用,CTL变得有活性,且变成效应器CTL,释放细胞毒素(如穿孔素和颗粒溶素),该细胞毒素在靶细胞的质膜中形成孔。通过CD4+淋巴细胞或辅助性T细胞调控CTL激活。辅助性T细胞表达T细胞受体(TCR),该TCR识别与MHC II类分子结合的抗原。效应器CD4+T辅助性细胞可以通过引发Th1型或Th2型应答来对感染进行应答。Th1应答导致细胞介导免疫,且特征在于生成干扰素 γ ,该干扰素 γ 激活巨噬细胞,且诱导B细胞产生抗体。Th2应答导致体液免疫,且特征在于释放白细胞介素4,随后激活B细胞和产生中和抗体。通常,Th1应答更加有效地抵抗细胞内病原体(如在宿主细胞内部的病毒和细菌),而Th2应答更加有效地抵抗细胞外细菌、寄生虫和毒素。

[0044] 本发明人发现,噻唑化物类试剂(尤其是硝唑尼特、替唑尼特和RM-4848)或其前体药物的抗病毒效应起因于这些试剂的免疫调节活性,这些试剂能够通过激活先天的和后天的免疫系统而刺激强烈的免疫应答。特别地,本申请的发明人发现,硝唑尼特、替唑尼特和RM-4848通过诱导如下方面的增加来刺激T辅助性细胞和CTL的活性、TLR7和TLR8的表达和I型干扰素应答:1)分泌IFN γ 和IL2的CD4+T细胞,2)CTL脱粒,3)表达Fas的CD8+T细胞,4)表达TLR8的单核细胞,5)IFN α -mRNA表达和IFN β -mRNA表达,6)对于I型IFN诱导型基因(MXA、PRKCZ、ADAR、CXCL10、IRF1、PRKRA)特异性的mRNA,和7)对于在MHC I类呈递中涉及的基因(HLA-A、HLA-B、TAP1)特异性的mRNA。因此,在有需要的对象中,尤其是在存在发展成需要强烈的免疫应答的疾病(如病毒性感染、癌症或由细胞内原生动感染所引起的疾病)的危险或患有这样的疾病的对象中,这些噻唑化物类试剂可用于刺激免疫应答。此外,本发明的方法可用来减轻疾病的症状,或在对象中用作预防措施。

[0045] 术语“对象”和“患者”可交换地使用,且意思是指患有病毒性感染或癌症疾病或存在发展成病毒性感染或癌症疾病的风险的任何哺乳动物,包括人类。该对象或患者典型地为人类,然而,其他适合的对象或患者包括但不受限于实验用动物(如小鼠、大鼠、兔子或豚鼠)、农场动物和家畜或宠物。也包括非人灵长类动物。

[0046] 本文中使用的术语“治疗”指的是降低症状的严重程度和/或发生率、消除症状和/或根本病因、预防症状的发生和/或症状的根本病因(如,预防性治疗)、改善或修复损伤、或降低感染的强度。

[0047] 本文中使用的“治疗有效量”为对于引起临床上显著的细胞应答有效的量。

[0048] “药学上可接受的”意为生物学上或其它方面可取的材料,即,该材料可被包含在药物组合物中,且可向患者施用,而不造成任何不良的生物效应或不以有害的方式与包含该材料的组合物中的任何其他组分相互作用。当术语“药学上可接受的”用来指药物载体或赋形剂时,意味着该载体或赋形剂已满足毒理学和生产测试的必需标准,或意味着该载体或赋形剂包含在由美国药物管理局编制的非活性成分指南中。

[0049] 本发明的方法考虑施用含有噻唑化物类化合物的制剂。本发明可接受的噻唑化物类化合物为在美国专利No.7,645,783、No.7,550,493、No.7,285,567、No.6,117,894、No.6,

020,353、No.5,968,961、No.5,965,590、No.5,935,591、No.5,886,013中公开的那些噻唑化物类化合物,这些专利全部内容以引用的方式并入本文。优选的噻唑化物类化合物为硝唑尼特、替唑尼特或RM-4848、或RM-4848的酯类前体药物RM-5038。应当理解,与RM-5038相似或同源的其它前体药物也被考虑,且作为本发明的实施方式。本文所使用的术语“噻唑化物类”指的是噻唑化物类、噻唑化物类类似物或被取代的噻唑化物类。本文所使用的术语“硝唑尼特”指的是硝唑尼特(2-(乙酰氧基)-N-(5-硝基-2-噻唑基)苯甲酰胺)和硝唑尼特类似物,例如,在美国专利No.7,285,567或US 2007/0167504中公开的化合物之一。本文所使用的术语“替唑尼特”指的是替唑尼特、替唑尼特类似物或被取代的替唑尼特。硝唑尼特、替唑尼特、RM-4848或任何一种噻唑化物类类似物可以以化合物本身的形式施用,和/或,在适当情况下,可以以盐、多形体、酯、酰胺、前体药物、衍生物等形式施用,条件是所述的盐、多形体、酯、酰胺、前体药物或衍生物为药理学上适宜的。这些活性试剂的这样的盐、酯、酰胺、前体药物和其它衍生物可利用标准方法而制备,该标准方法是有机合成化学领域中的技术人员熟知的,且例如由以下文献描述:J.March,Advanced Organic Chemistry:Reactions, Mechanisms and Structure,第四版(纽约:Wiley-Interscience,1992)。本发明的组合物中的硝唑尼特或替唑尼特的总量通常大约为组合物的重量的60%至75%。该组合物可配制成为用于速释、控释或缓释。该组合物可含有一种或多种另外的药学上可接受的添加剂或赋形剂。这些赋形剂是本领域中公知的且认可的治疗惰性成分。本文中所使用的术语“惰性成分”指的是制药科学领域熟知的治疗上的惰性成分,这些惰性成分可单独地使用或以各种组合的方式使用,所述惰性成分包括:例如,稀释剂、崩解剂、粘合剂、悬浮剂、助流剂、润滑剂、填充剂、包衣剂、增溶剂、甜味剂、着色剂、芳香剂和抗氧化剂。例如,参见Remington:由E.W.Martin编辑的The Science and Practice of Pharmacy 1995,马克出版公司,第19版,宾夕法尼亚州伊斯顿。

[0050] 稀释剂或填充剂的示例包括但不限于淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、糖果店的糖、可压缩糖、葡萄糖结合剂、糊精、右旋糖、左旋糖、乳糖醇、甘露醇、蔗糖、滑石、微晶纤维素、碳酸钙、二元磷酸钙或三元磷酸钙、二水磷酸氢钙、硫酸钙等。稀释剂或填充剂的量可以在整个组合物的重量的大约2%至大约15%之间的范围内。

[0051] 崩解剂的示例包括但不限于海藻酸、甲基丙烯酸DVB(二乙烯基苯)、交联PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、微晶纤维素、可斯卡麦勒斯钠、交聚维酮、波拉克林钾、羧基乙酸淀粉钠、淀粉(包括玉米淀粉或玉蜀黍淀粉、预胶化淀粉)等。通常地,崩解剂占整个组合物的重量的大约2%至大约15%。

[0052] 粘合剂的示例包括但不限于:淀粉,如马铃薯淀粉、小麦淀粉、玉米淀粉;微晶纤维素;纤维素,如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、乙基纤维素、羧基甲基纤维素钠;天然树胶,如阿拉伯树胶、海藻酸、瓜尔豆胶;液体葡萄糖、糊精、聚维酮、糖浆、聚氧化乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、聚-N-乙烯基酰胺、聚乙二醇、明胶、聚丙二醇、黄蓍胶等。粘合剂的量为整个组合物的重量的大约0.2%至大约14%。

[0053] 助流剂的示例包括但不限于二氧化硅、胶态无水二氧化硅、三硅酸镁、磷酸三钙、硅酸钙、硅酸镁、胶态二氧化硅、粉状纤维素、淀粉、滑石等。助流剂的量为整个组合物的重量的大约0.01%至大约0.3%。

[0054] 润滑剂的示例包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸、聚

乙二醇、山嵛酸甘油酯、矿物油、硬脂富马酸钠、滑石、氢化植物油等。润滑剂的量为整个组合物的重量的大约0.2%至大约1.0%。

[0055] 组合物可以包含作为低粘度聚合物的粘合剂。低粘度聚合物的示例包括但不限于低粘度羟丙基甲基纤维素聚合物(如由Dow Chemical出售的商标名“**Methocel**®”(如**Methocel E50LV**®、**Methocel K100LV**®和**Methocel F50LV**®)的产品)和低粘度羟乙基纤维素聚合物。通常地,低粘度聚合物占整个组合物的总重量的大约10%至大约20%,或大约10%至大约15%,或优选大约12%,或者,在具有控释部分和速释部分的实施方式中,通常地,在控释部分中的低粘度聚合物占控释部分的重量的大约15%至大约20%,优选大约18%。

[0056] 组合物还可以包括包衣材料。通常地,包衣材料呈现为剂型上的完全覆盖制剂的外层。例如,在一些实施方式中,剂型为口服片剂,在该口服片剂中,控释部分形成片剂的第一层,速释部分形成在第一层上面沉积的第二层,从而形成芯片剂。在这种实施方式中,例如,包衣材料可以处于在芯片剂的上面沉积的外包衣层的形式。通常地,包衣材料为组合物的重量的大约1%至大约5%,且可以包括羟丙基甲基纤维素和/或聚乙二醇和选自包衣剂、遮光剂、掩味剂、填充剂、抛光剂、着色剂、抗粘着剂等中的一种或多种赋形剂。对于本领域的技术人员而言,包膜物质和用于使用这种包衣物质的方法的示例是公知的。

[0057] 本发明的组合物可有效地用来在有需要的对象中刺激免疫系统,从而治疗或预防病毒性感染、癌症或由细胞内原生动物感染或细胞内细菌感染引起的疾病。病毒性感染可以为流行性感(尤其是由选自H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3和H10N7的病毒所引起的流行性感)、或乙型肝炎、或由轮状病毒或诺罗病毒引起的腹泻或胃肠炎。癌症可以为白血病(包括毛细胞白血病和慢性髓性白血病)、黑素瘤、非霍奇金淋巴瘤或肾细胞癌。由细胞内原生动物感染引起的疾病可以为隐孢子虫属、利什曼原虫属、刚地弓形虫、克氏锥虫。由细胞内细菌感染引起的疾病可以为结核分支杆菌。组合物可被施用任何时间长度,该时间长度适合于有效地治疗或预防病毒性感染、癌症或由细胞内原生动物感染引起的疾病。任何适当的剂量和方案可用于该组合物。通常地,在大约3天至大约104周的时间段内可进行施用,然而可以在长于104周的时间段内进行施用,甚至可以无限期地施用。适当的方案可由医师确定。

[0058] 噻唑化物类化合物可被单独施用或结合一种或多种另外的活性试剂施用,该活性试剂包括神经氨酸酶抑制剂(如,那尼纳米韦、奥司他韦、扎那米韦或帕拉米韦)、免疫刺激剂(如,咪喹莫特或雷西莫特)、金刚烷类似物和重组唾液酸酶融合蛋白。噻唑化物类化合物也可被单独施用或结合一种或多种包括抗原生动物药的另外的活性试剂施用。抗原生动物药可以包括但不受限于甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲恶唑、阿托伐醌、克林霉素、乙胺嘧啶、螺旋霉素、二脒那秦(diminazine)、胡米铵、苏拉明、美拉索明(melarsamine)、葡萄糖酸锑钠和锑酸葡甲胺。在预防上,可以结合疫苗或结合抗癌药物施用噻唑化物类化合物。抗癌药物可以包括但不受限于STI571(甲磺酸伊马替尼)、CGP 74588、1-β-D-阿糖呋喃胞嘧啶(阿糖胞苷)、阿霉素、达卡巴嗪、顺氯氨铂、博莱霉素、长春新碱、洛莫司汀、长春花碱、卡莫司汀、DTIC、它莫西芬、舒尼替尼、索拉非尼和干扰素α。可以同时地、或分开地、或在不同的组合物(包括在剂型、释放曲线等方面不同的分开的组合物)中施用所述组合物和另外的活性试剂(如干扰素)。要理解,上文的描述以及随后的实施例用来说明但不限制本发明的范围。对于

本发明所属领域的技术人员而言,在本发明的范围内的其他方面、优点和变型将是显而易见的。

[0059] 在患有免疫缺陷的对象中,有效地治疗或预防病毒性疾病、癌症或细胞内原生动感染或细胞内细菌感染所需的免疫应答不可由噻唑化物类利用通常用于成功地治疗具有完全胜任的免疫系统的对象的给药方案而产生。患有极度免疫缺陷的对象不会是利用噻唑化物类治疗的好的人选。患有中度免疫缺陷的对象相比于具有完全胜任的免疫系统的对象,可需要较高剂量的噻唑化物类治疗、较频繁地给药、或较长的给药时间段。还未发展成免疫缺陷的患有HIV(人类免疫缺陷病毒)感染的对象可以通过噻唑化物类有效地治疗,然而,患有与HIV感染相关联的免疫缺陷的对象,在通过噻唑化物类治疗之前或与噻唑化物类治疗同时,可需要通过抗逆转录病毒药物的治疗以减小HIV病毒滴度,以及部分地恢复免疫功能。因此,使用噻唑化物类刺激免疫应答可基于免疫状态而为病人特别设计。

[0060] 实施例

[0061] 实施例1:细胞制备

[0062] 单核血细胞在免疫应答系统中具有重要作用,这是因为单核血细胞响应于病原体感染而产生不同的细胞因子。因此,在从10名健康的捐赠者获得的且在菲科帕克(Ficoll-Paque)上通过离心分离而分离的外周血单核细胞(PMBC)中,测试替唑尼特(TIZ)的免疫调节效应。在未受刺激的条件下和受流行性感冒刺激的条件下,在存在或不存在三种不同剂量的TIZ(0.5mg/ml;1.0mg/ml和10mg/ml)下,在补充有10%的人血清的RPMI-1640培养基中培养PMBC。

[0063] 实施例2:免疫分析

[0064] 在不存在或存在不同剂量的替唑尼特下,针对辅助性T细胞和CTL的活性以及TLR7表达和TLR8表达和I型IFN应答,分析未受刺激的PMBC和受刺激的PMBC。免疫分析如下:

[0065] 通过确定分泌IFN γ 和IL-2的CD4+T细胞的量来检测辅助性T细胞的功能。通过确定表达穿孔素、颗粒酶和Fas的CD8+T细胞的量来检测CTL的活性。

[0066] 通过测量表达TLR8、TLR7和TLR3的CD14+单核细胞来检测TLR的表达。通过人类I型干扰素(IFN)的PCR阵列分析来检测TLR路径的替唑尼特的调节。

[0067] 特别地,在未受刺激的PMBC中和受流行性感冒刺激的PMBC中通过如下分析来确定TIZ的免疫调节效应:

[0068] 人类I型干扰素(IFN)和TLR路径(PCR阵列):

[0069] 干扰素:用于干扰素 α 受体和干扰素 β 受体的配体:IFNA1、IFNA4、IFNB1、IFNK、IFNW1。用于干扰素 γ 受体的配体:IFNG。用于红细胞生成素受体和干扰素类(D200域)细胞因子受体的配体:IFNA14、IFNA2、IFNA21、IFNA5、IFNA6、IFNA8、IFNE1、IL15。与干扰素有关的其它基因:IFRD1、IFRD2、IL28A、IL29、IL6。

[0070] 干扰素受体:干扰素 α 受体和干扰素 β 受体:IFNAR1、IFNAR2。干扰素 γ 受体:IFNGR1、IFNGR2。其它的红细胞生成素受体和干扰素类(D200域)细胞因子受体:CNTFR、CRLF2、CSF2RA、CSF3R、EBI3、F3、IL20RB(FNDC6)、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12B、IL13RA1、IL20RA、IL21R、IL22RA2、IL28RA、IL2RB、IL2RG、IL31RA、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL9R、LEPR、MPL、TTN。

[0071] 干扰素调节因子:转录调节因子:IRF1、IRF2、IRF3、IRF4、IRF5、IRF6、IRF7、IRF8。

其它的干扰素调节蛋白:IRF2BP1、IRF2BP2。干扰素诱导蛋白:参与对病毒应答的基因:ISG15 (G1P2)、IFI16、IFI35、IFI44、IFIH1、MX1、OAS1。转录调节因子:IFI16、SP110。其它的干扰素诱导基因:ADAR、CXCL10、IFI6 (G1P3)、IFI27、IFI30、IFI44L、IFIT1、IFIT1L、IFIT2、IFIT3、IFITM1、IFITM2、IRGM、PSME1、PYHIN1。

[0072] T₀11样受体:LY64、SIGIRR、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10。

[0073] 衔接子&TLR互作蛋白:BTK、CD14、HMGB1、HRAS、HSPA1A、HSPD1、LY86 (MD-1)、LY96 (MD-2)、MAPK8IP3、MYD88、PELI1、RIPK2、SARM1、TICAM2、TIRAP、TOLLIP、TRIF。

[0074] 效应子:CASP8、EIF2AK2、FADD、IRAK1、IRAK2、MAP3K7 (TAK1)、MAP3K7IP1 (TAB1)、NR2C2、PPARA、PRKRA、SITPEC、TRAF6、UBE2N、UBE2V1。

[0075] 下游路径和靶基因:NF κ B (核因子 κ B) 路径:CCL2、CHUK、CSF2 (GMCSF)、CSF3 (GCSF)、IFNA1、IFNB1、IFNG、IKKBK、IL1A、IL1B、IL2、IL6、IL8、IL10、IL12A、LTA、MAP3K1、MAP4K4、NFKB1、NFKB2、NFKBIA、NFKBIL1、NFRKB、REL、RELA、TNF、TNFRSF1A。

[0076] JNK/p38路径:ELK1、FOS (c-Fos)、JUN、MAP2K3、MAP2K4 (JNKK1)、MAP3K1 (MEKK)、MAPK8 (JNK1)。

[0077] NF/IL6 (核因子/白细胞介素6) 路径:CLECSF9、PTGS2。

[0078] IRF (干扰素调节因子) 路径:CXCL10、IFNA1、IFNB1、IFNG、IRF1、IRF3、TBK1。

[0079] 适应性免疫的调节:CD80、CD86、RIPK2、TRAF6。

[0080] 实施例3:替唑尼特的免疫调节效应

[0081] TIZ显示出了诱导如下方面增加的强有力的免疫调节效应:1) 分泌IFN γ 和IL2的CD4+T细胞 (图4A和图4B); 2) CTL脱粒 (图5B); 3) 表达Fas的CD8+T细胞 (图5C); 4) 单核细胞上的TLR3、TLR8和TLR7的表达 (图1A-图1C); 5) IFN α -mRNA表达和IFN β -mRNA表达 (图3A); 6) 对于I型IFN诱导型基因 (MXA、PRKCZ、ADAR、CXCL10、IRF1、PRKRA) 特异性的mRNA (图3B); 和7) 对于MHC I类呈递中涉及的基因 (HLA-A、HLA-B、TAP1) 特异性的mRNA (图3C)。

[0082] 这些结果清晰地证明:TIZ具有显著的免疫调节活性且刺激强烈的免疫应答,该免疫应答通过先天的和后天的免疫系统而介导。

[0083] 实施例4:单核细胞上TLR的表达

[0084] 在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下,在CD 14+细胞 (单核细胞) 上评估TLR3、TLR7和TLR8的表达。与流行性感冒抗原刺激下的对照相比,RM-4848诱导了表达TLR7的CD 14+细胞的百分比的增加 (1.0 μ g/ml剂量:p=0.001;10 μ g/ml剂量:p=0.023),然而,在未受刺激条件下没有观测到明显的差异。对于在未受刺激和受流行性感冒刺激条件下测试的所有五种剂量,不存在对表达TLR3和TLR8的CD 14+细胞的影响 (图1A、1B和1C)。

[0085] 实施例5:TLR路径和RM-4848

[0086] 为了确定由RM-4848对TLR表达施加的影响是否依赖于与TLR相关的转导路径的差异化调节,我们采用了实时PCR阵列,该实时PCR阵列筛选在TLR路径激活中涉及的84个基因的表达。在通过RM-4848培育3小时后,在未受刺激的PBMC中获得的数据显示:如图2A所示,84个基因中只有3个被上调,在20 μ g/ml的剂量下,IL1A和IL1B大约增加5倍,IL6大约增加6倍。

[0087] 在通过RM-4848培育3小时后,在受流行性感冒刺激的PBMC中获得的数据显示:如

图2B所示,84个基因中只有7个被上调。在1 μ g/ml的剂量下,INFA1和INFB1大约增加6倍,TLR3和TLR5增加7倍,TLR9增加6倍,但在20 μ g/ml的剂量下,而对于所有测试的剂量,TLR-7和TLR8稍微超过2倍基线。

[0088] 实施例6:IFN路径和RM-4848

[0089] 为了确定在通过RM-4848培育的PBMC中I型干扰素表达水平的增加是否可以影响干扰素诱导型基因的表达,我们采用了实时PCR阵列,该实时PCR阵列筛选在干扰素 α 和干扰素 β 应答中所涉及的84个基因的表达。

[0090] 在通过RM-4848培育的未受刺激的PBMC中进行的分析结果显示:所测试的84个基因中没有一个被上调,相反,16个基因被下调。特别地,在20 μ g/ml的高剂量下,报告显示出,对于INFA1降低20倍,对于INFA2和INFB1降低15倍,INFA4降低10倍。在1 μ g/ml和10 μ g/ml的两个较低剂量下,未见到这种下调效应(图3A)。

[0091] 在通过RM-4848培育的受流行性感冒刺激的PBMC中进行的分析结果显示:所测试的84个基因中的12个基因被上调。在通过RM-4848培育3小时后,在受流行性感冒刺激的PBMC中获得的数据显示:在1 μ g/ml的低剂量下,对于INFA1和INFA4增加10倍,对于INFB1增加8倍,对于IFNA2增加6倍。三种剂量水平中等地上调了ISG、IFI27和IFIT1,在10 μ g/ml的剂量下,具有更显著的效果(大于4倍)(图3B)。

[0092] 实施例7:辅助性T细胞的功能和RM-4848

[0093] 在基础条件下和在利用流行性感冒特异性抗原刺激之后评估了通过CD4+T细胞的IFN- γ 生成和IL2生成。0.5 μ g/ml的低剂量的RM-4848诱导了在未受刺激的细胞中($p=0.035$)和在受刺激的条件下($p=0.050$) IFN- γ 生成的在统计上显著的上调(图4A)。在未受刺激(0.5 μ g/ml剂量: $p=0.047$)和受流行性感冒刺激(0.5 μ g/ml剂量: $p=0.037$)的条件下,在分泌IL2的CD4+T细胞中观测到相似的趋势(图4B)。

[0094] 实施例8:CTL活性和RM-4848

[0095] 在未受刺激的条件下和基于流行性感冒抗原刺激,分析了表达颗粒酶、穿孔素和Fas的CD8+T细胞。在所测试的三种较高剂量水平下,RM-4848诱导了CTL脱粒,这通过穿孔素表达的减少来评估(图5B)。在未受刺激($p=0.006$)和受刺激($p=0.003$)的条件下,存在20 μ g/ml和40 μ g/ml的较高的RM-4848剂量时,表达Fas的CD8+T细胞的百分比也统计上显著地增加(图5C)。

[0096] 从实施例4至实施例8显而易见的是:TLR上调和激活,尤其直接的是,TLR7导致选择性地增加I型干扰素(IFN- α 、IFN- β)的生成,随后激活被干扰素刺激的基因(IsG)的路径。更特别地,I型IFN诱导型基因(CD70、COL16A1、HSPA1L、IFI27、IFIT1、NRG1和SHB)被上调。这些基因都参与控制病毒复制。RM4848同时激活CD4+T淋巴细胞和CD8+T淋巴细胞。特别地,在CD4+T淋巴细胞中,IFN- γ 生成和IL-2生成上调,然而,与细胞介导免疫的激活一致,CD8+T细胞被诱导脱粒。

[0097] 这些结果支持了RM4848的广谱抗病毒活性,RM4848刺激免疫系统以对抗病毒感染。特别显著的是,药物不仅刺激先天免疫应答,很可能负责在感染导致可察觉的疾病之前清除大多数感染,即使许多病原体已逐步形成了阻碍其检测的机制。从临床角度看,表明RM4848和可能的具有相似的刺激免疫的属性的其它噻唑化物类可用来预防疾病或限制疾病的传播。RM4848针对适应性免疫的活性是显著的,不仅是因为RM4848针对先天免疫的效

果,更是因为RM4848为治愈病毒性疾病所利用的机制。适应性免疫基于淋巴细胞,该淋巴细胞具有单一类型的受体,但具有基本上不受限制的一组识别抗原的变体,变体即为反映淋巴细胞多功能性的操作上定义的术语。除了生成几种淋巴细胞、辅助性细胞或杀伤性细胞之外,它们将以通过B细胞生成抗体而结束。如果在特异性感染开始时,适应性免疫被延迟几天,则适应性免疫在生成对病原体有毒的粒子方面的作用和免疫记忆的形成是通过先天免疫观察到的最有力的抗病毒性机制,同时是必要的和互相关联的。

[0098] 尽管前述内容涉及特定优选实施方式,但要清楚,本发明不如此受限。本领域的普通技术人员会想到,对于公开的实施方式可以进行各种改动,并且这样的改动意在包括于本发明的范围内。

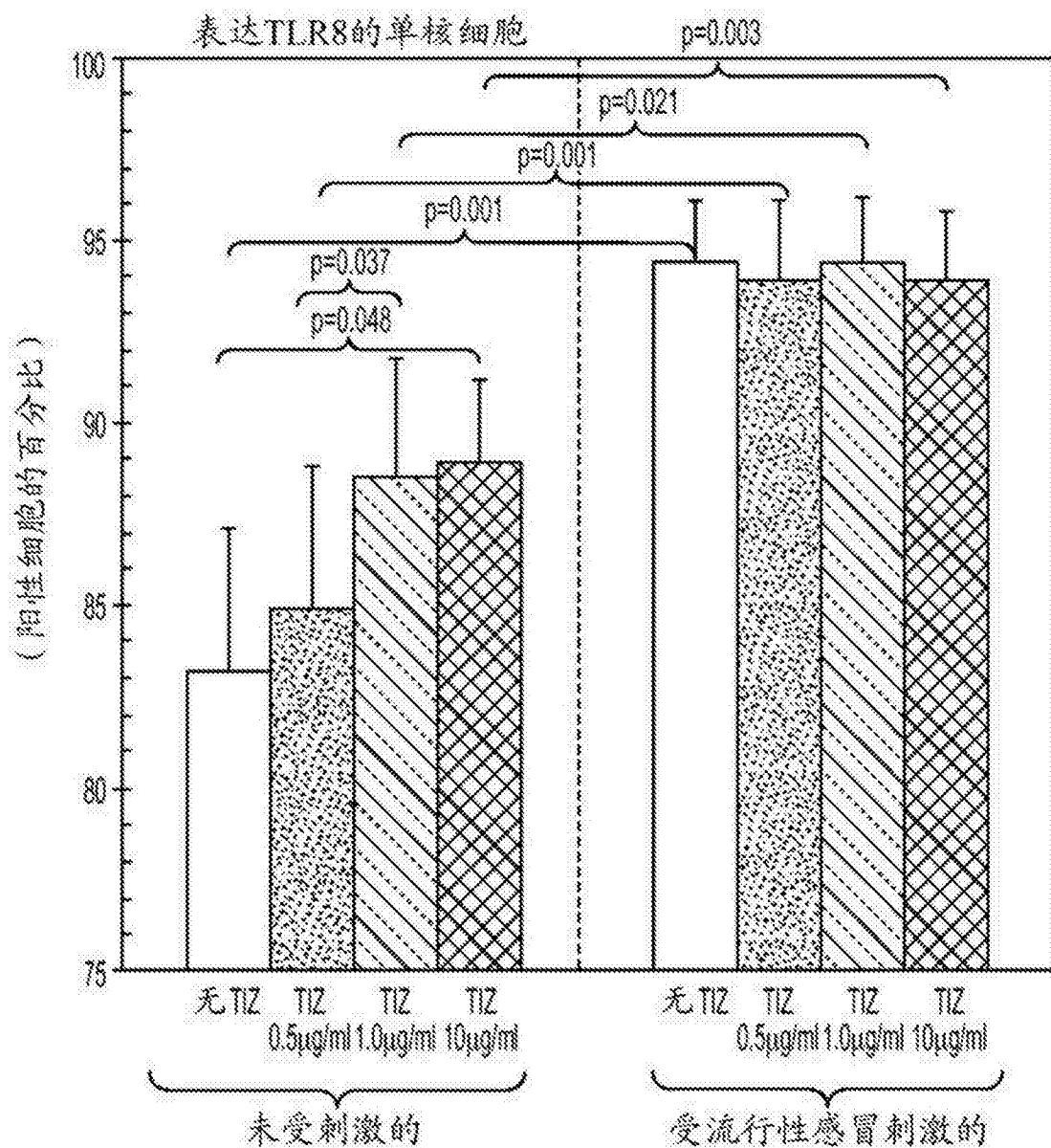


图1A

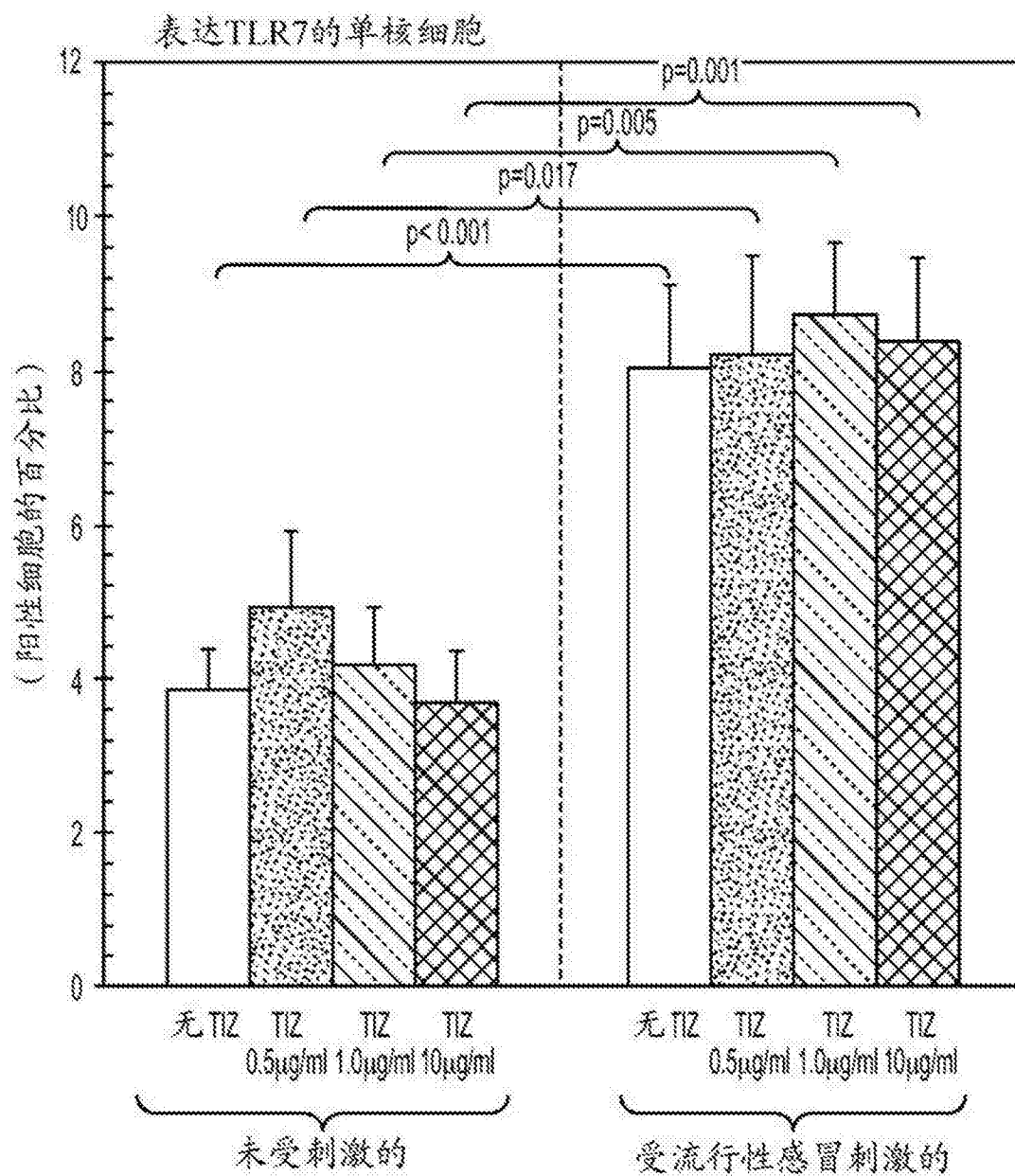


图1B

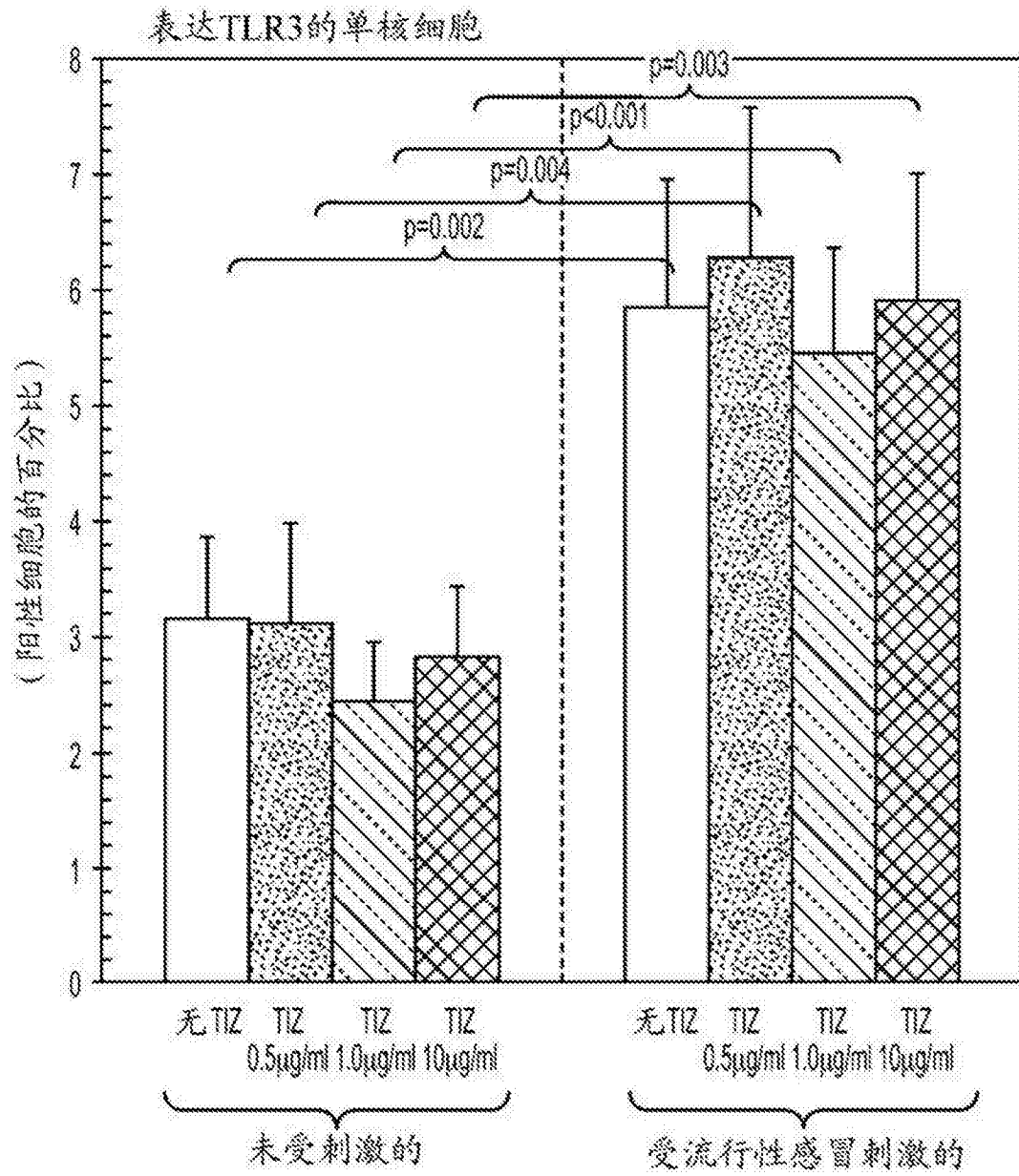


图1C

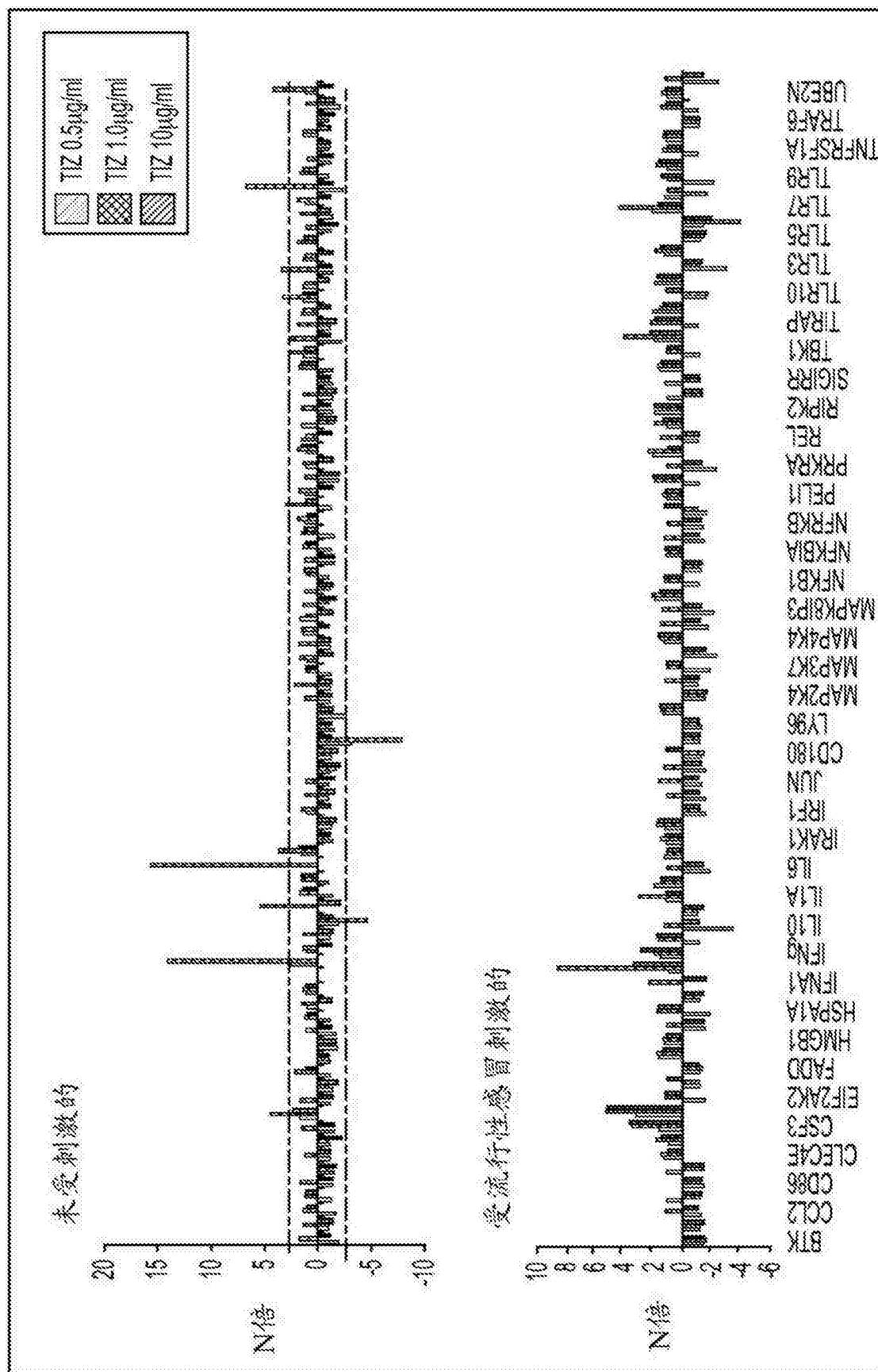


图2A

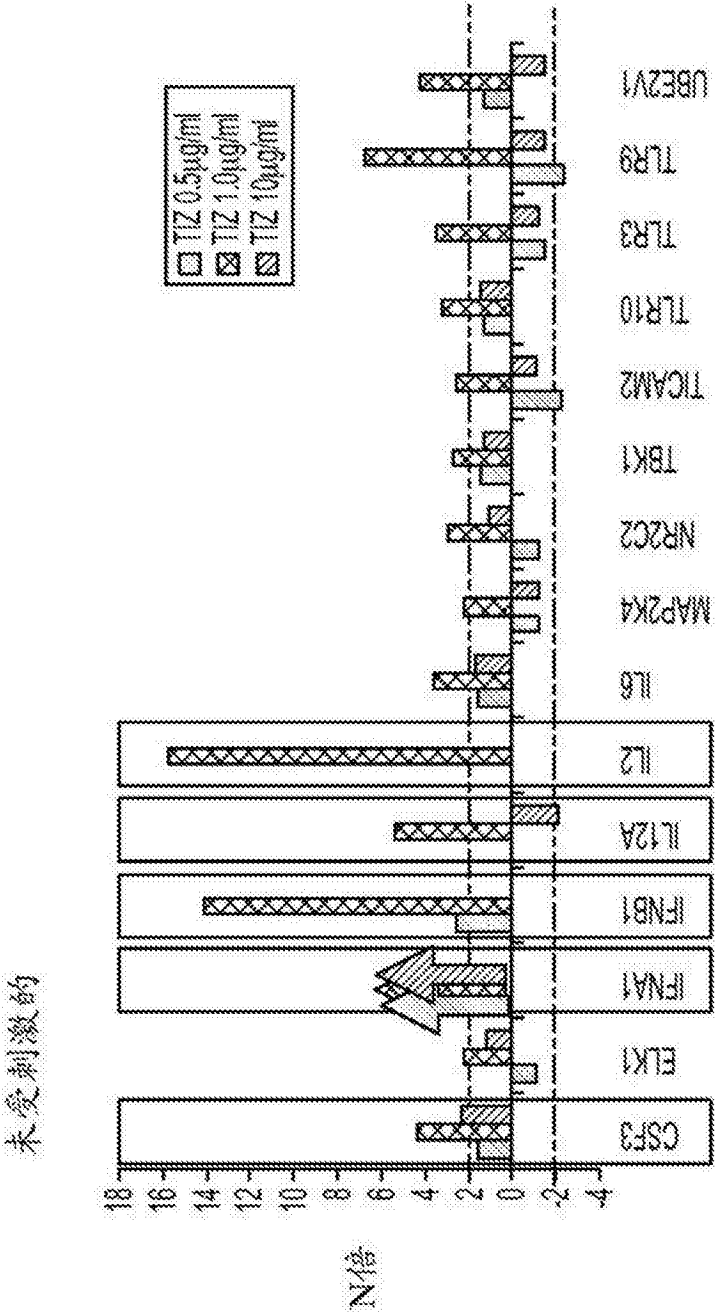


图2B

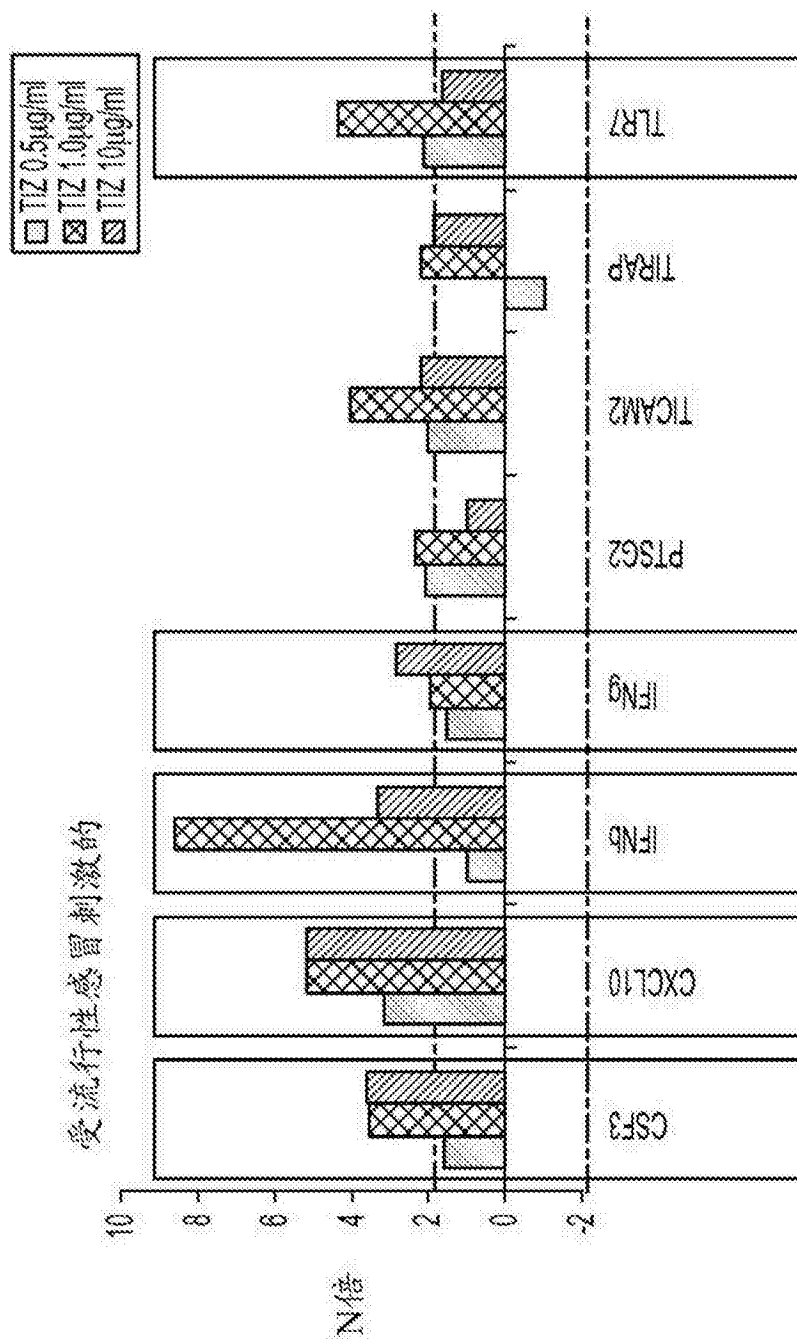


图2C

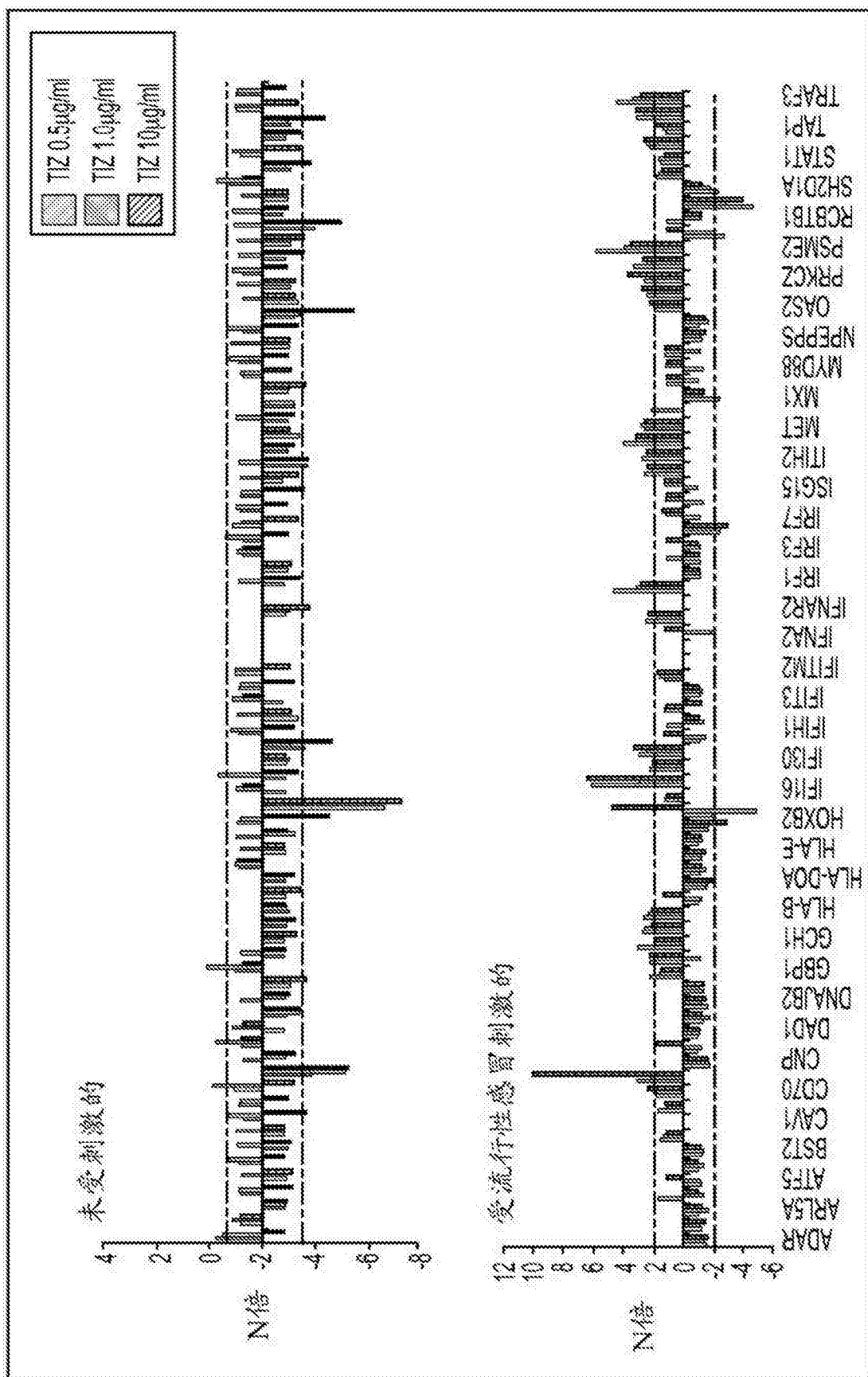


图3A

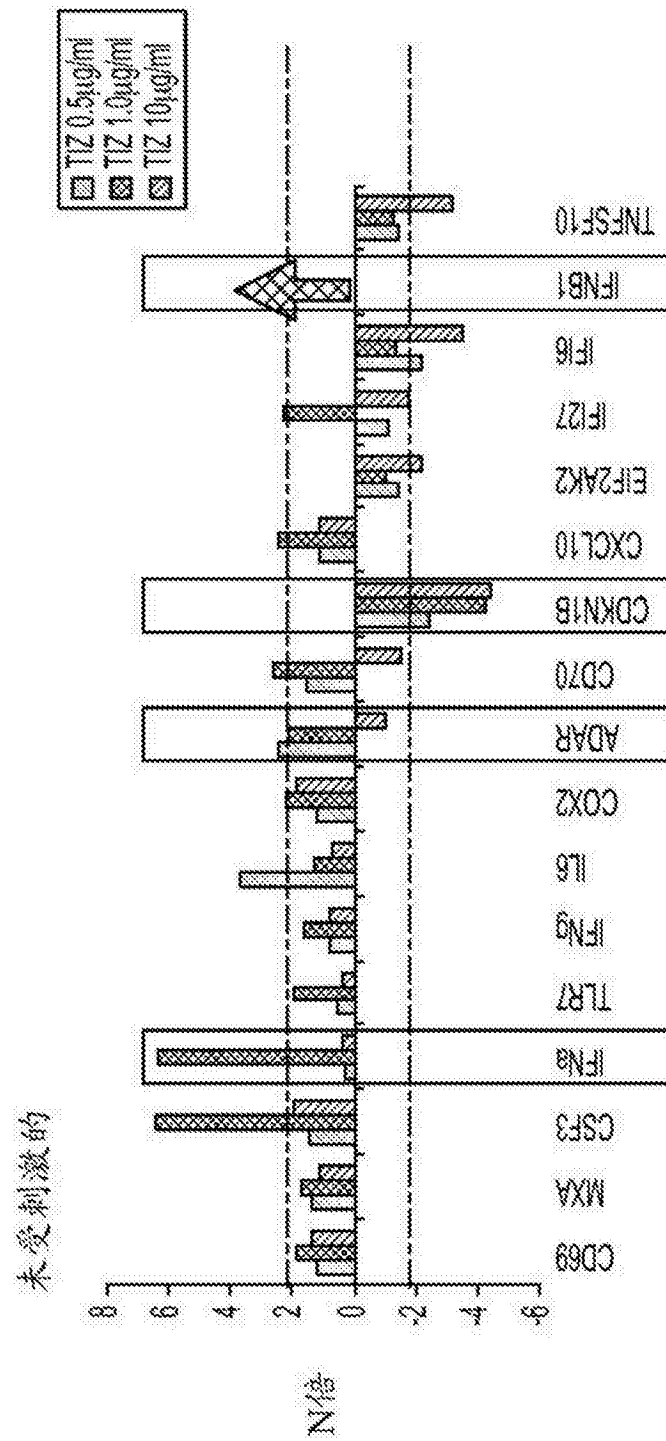


图3B

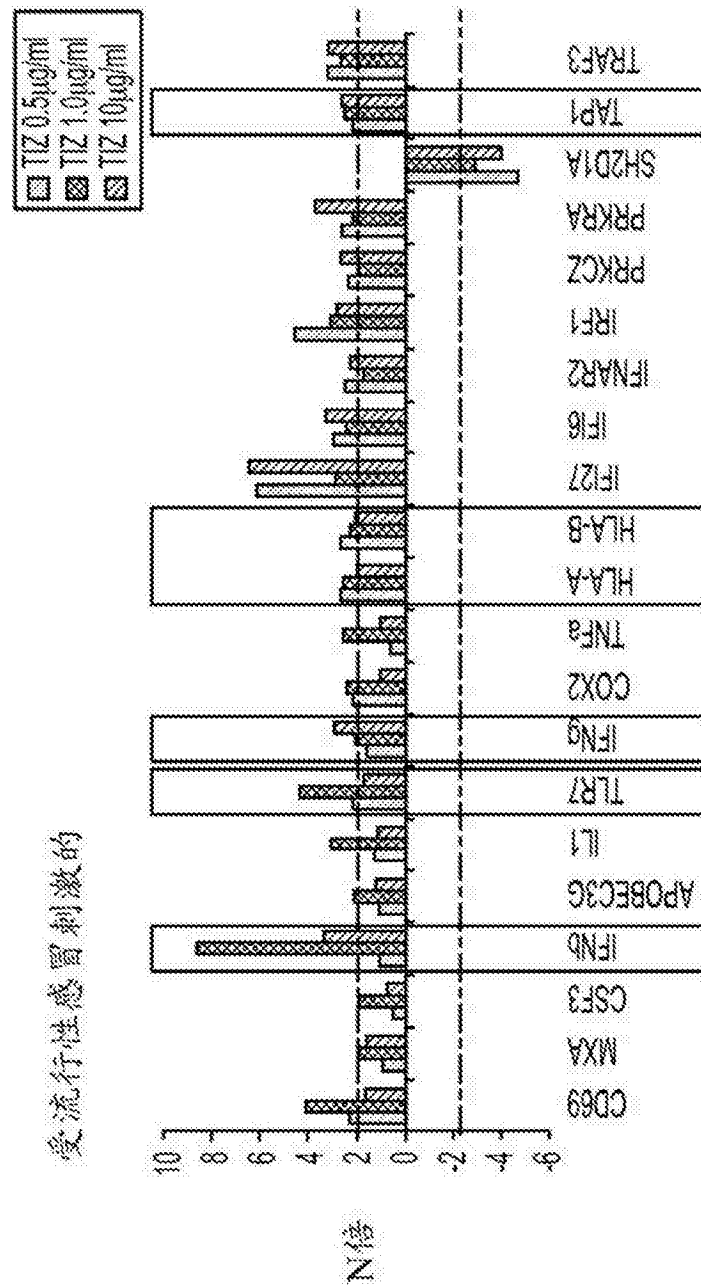


图3C

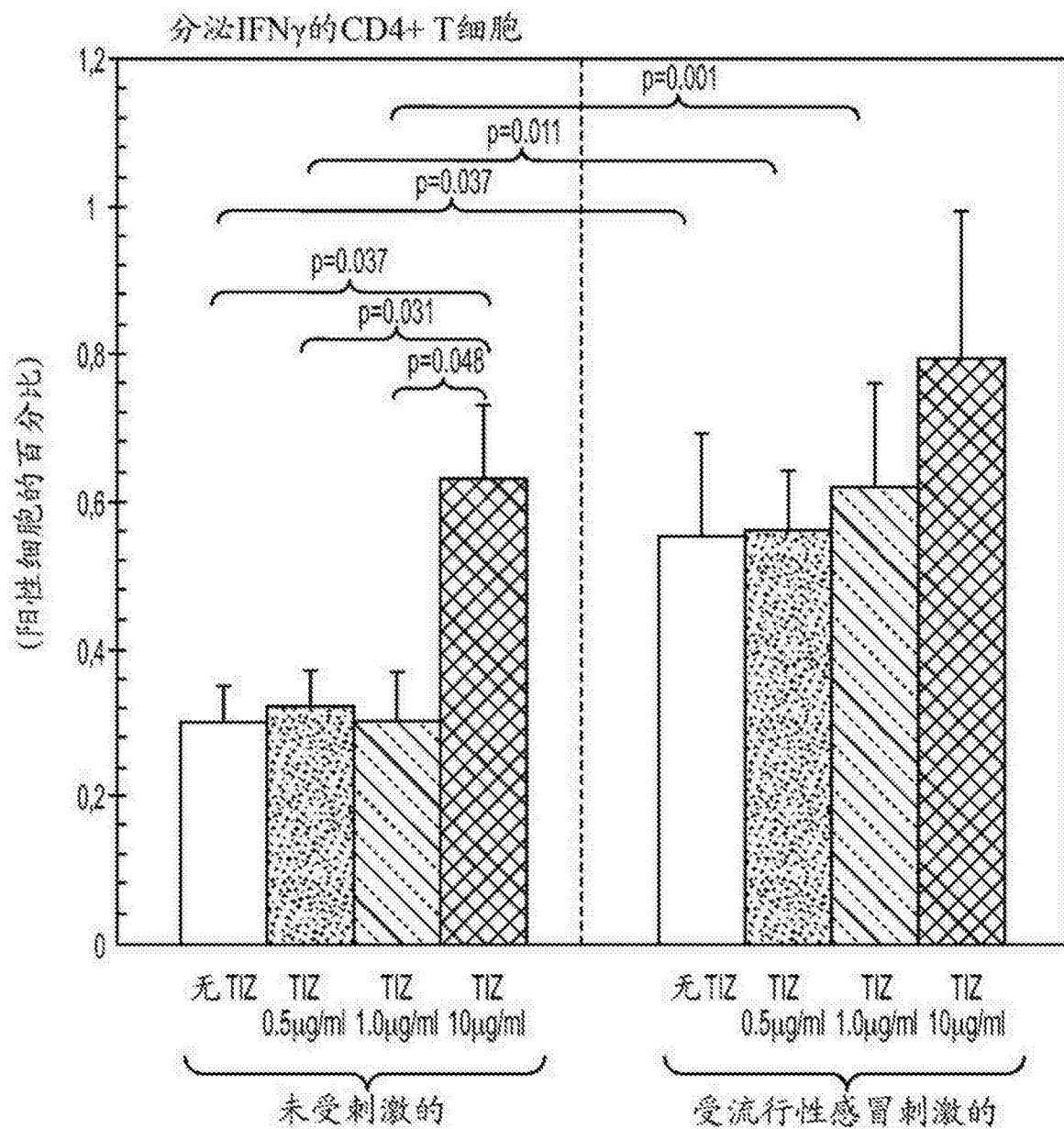


图4A

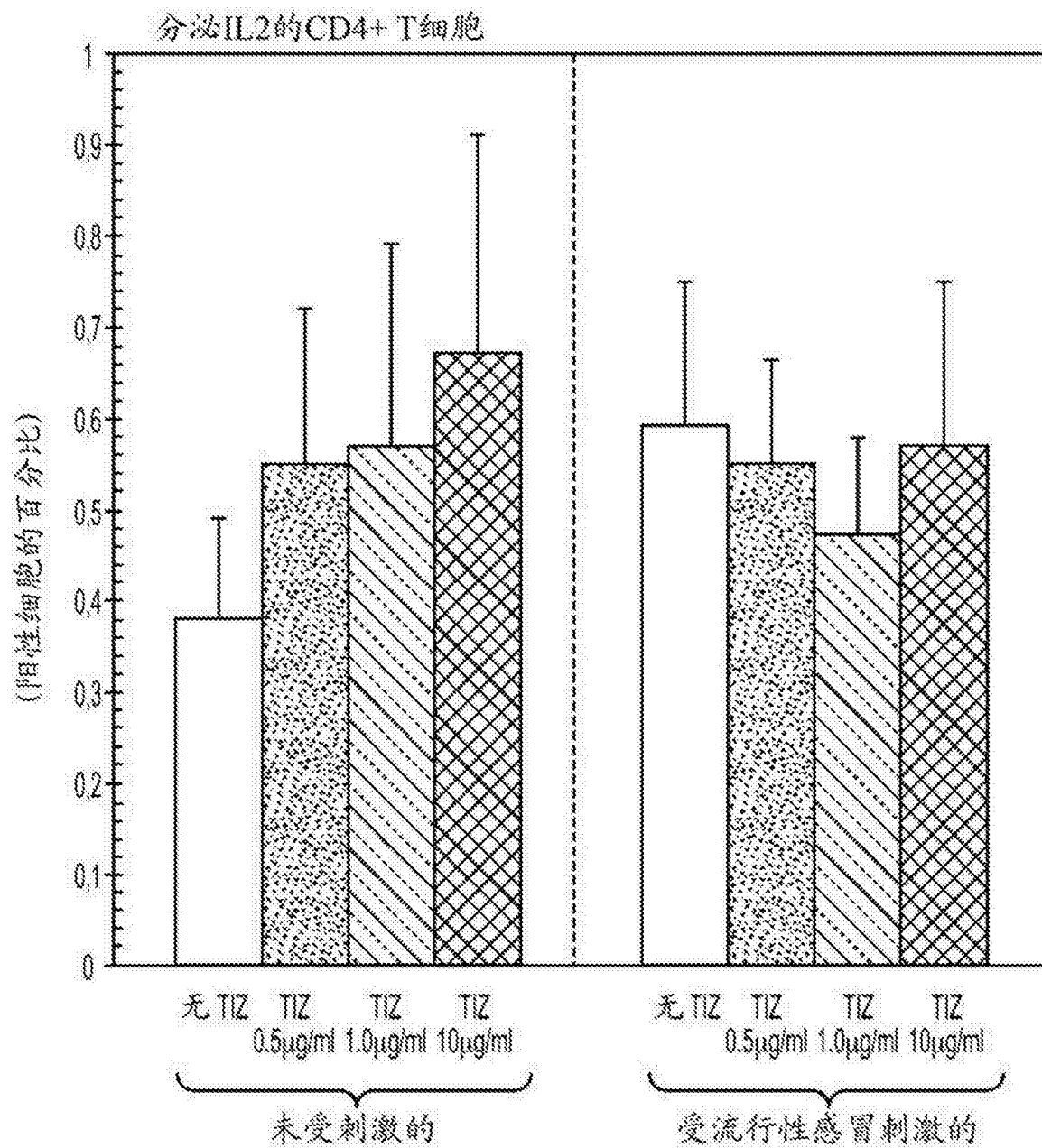


图4B

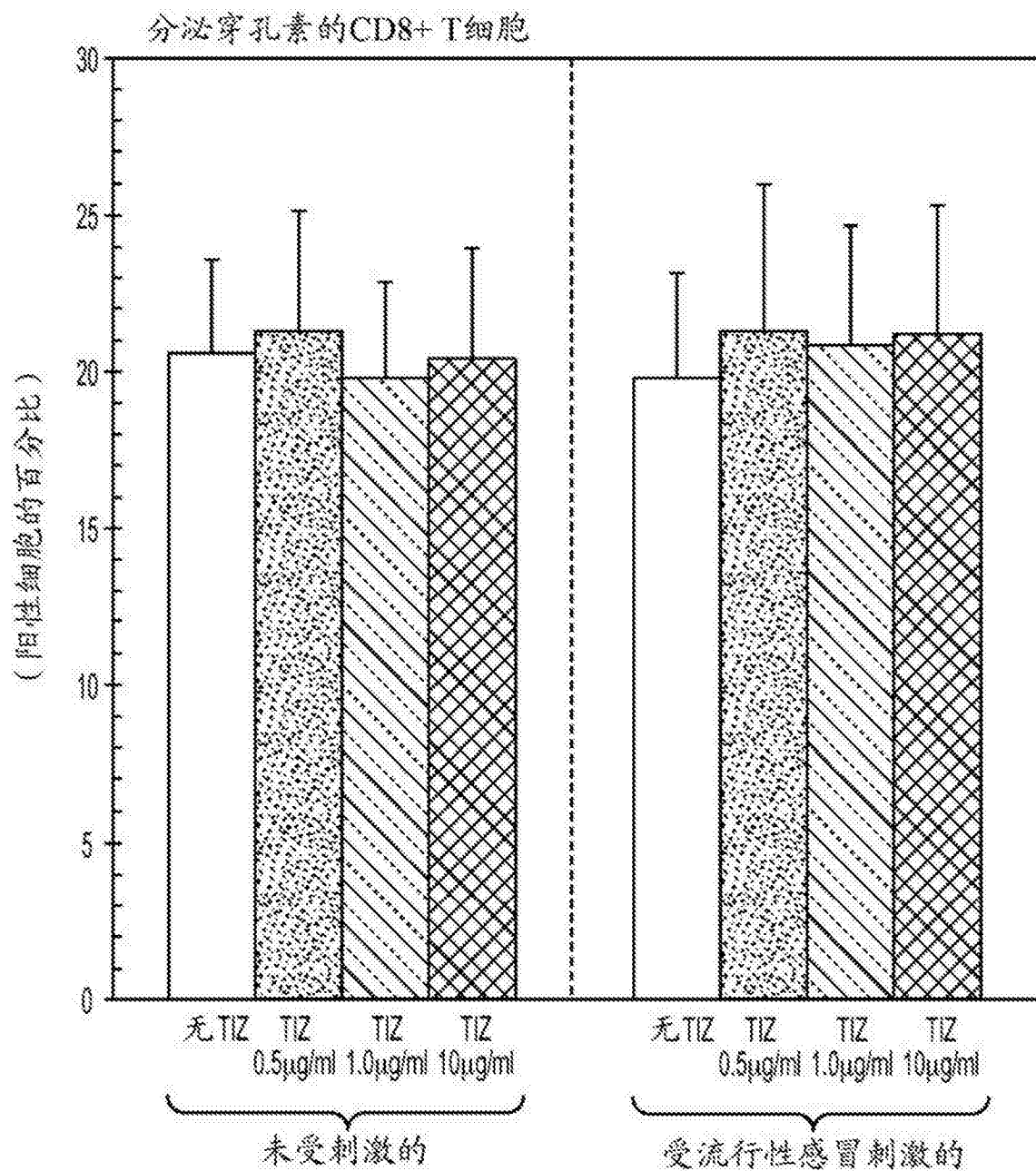


图5A

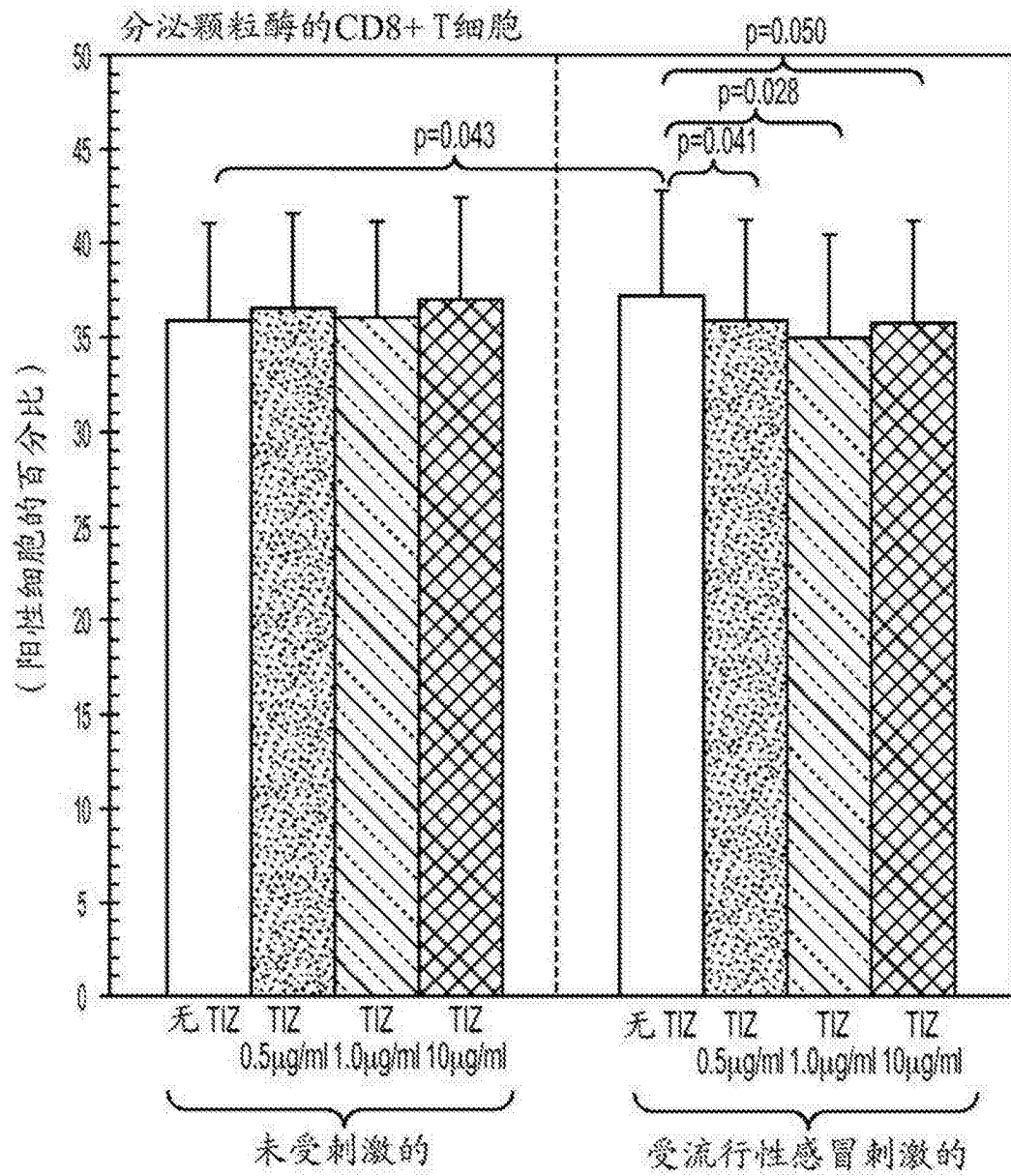


图5B

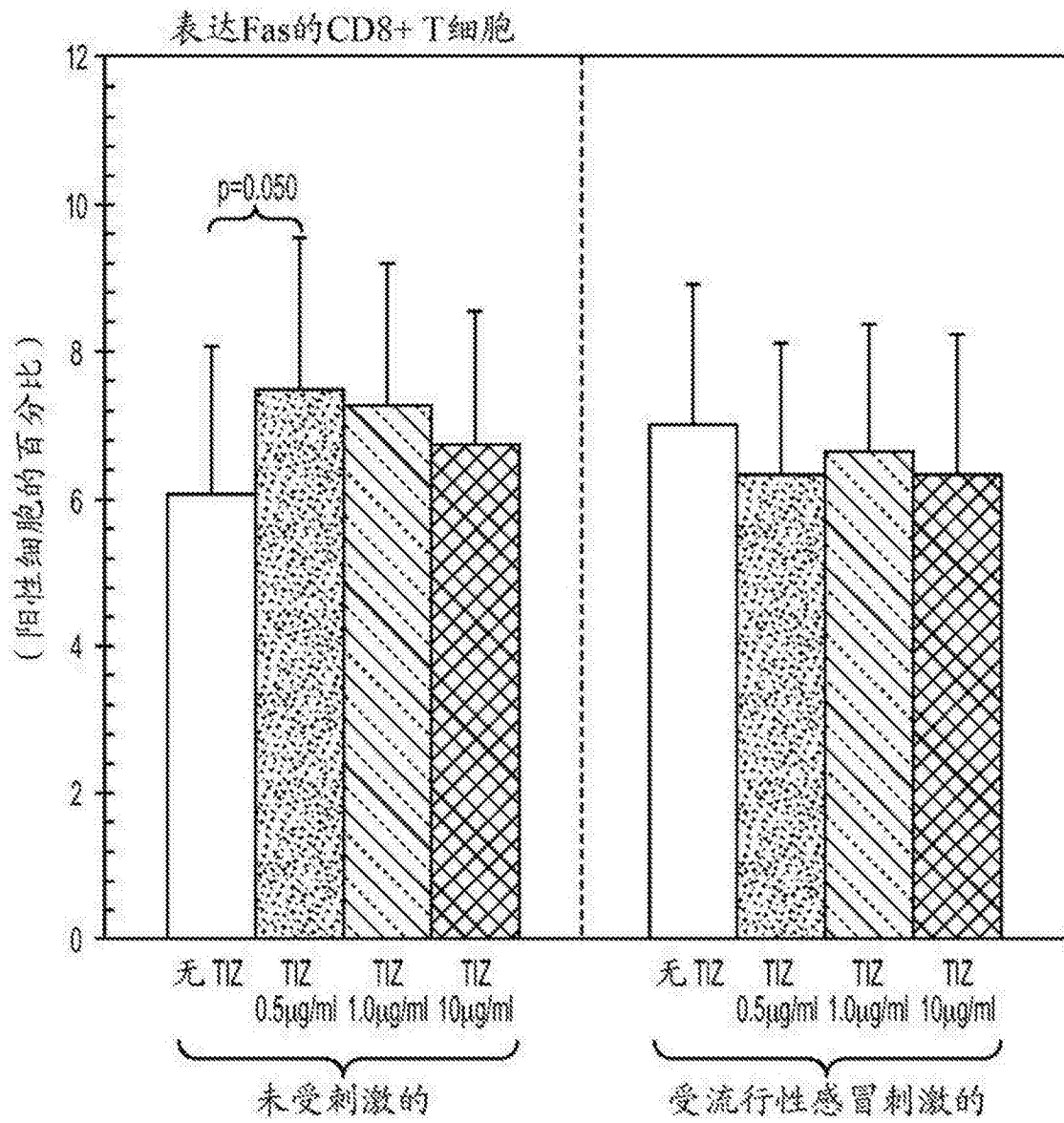


图5C

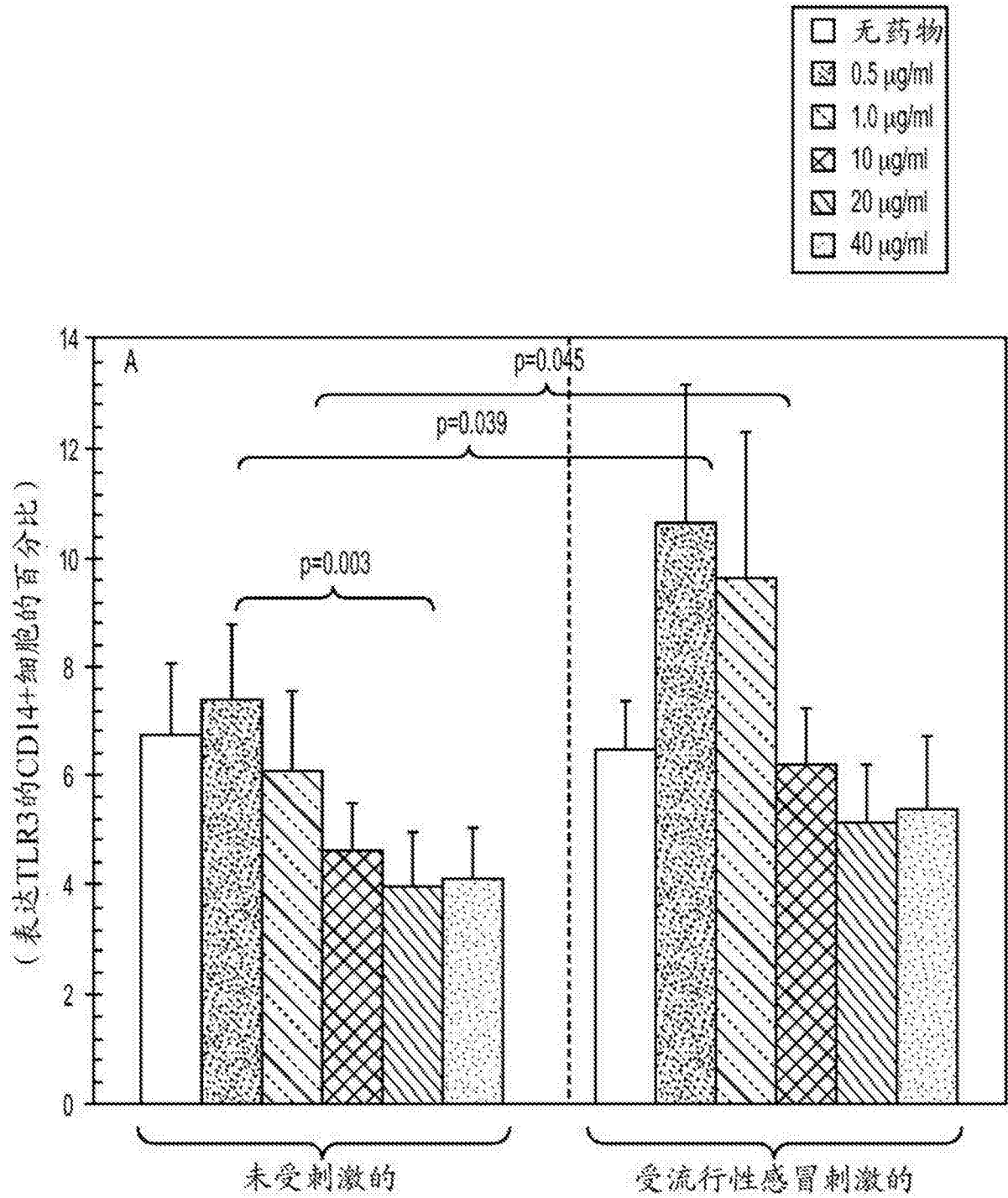


图6A

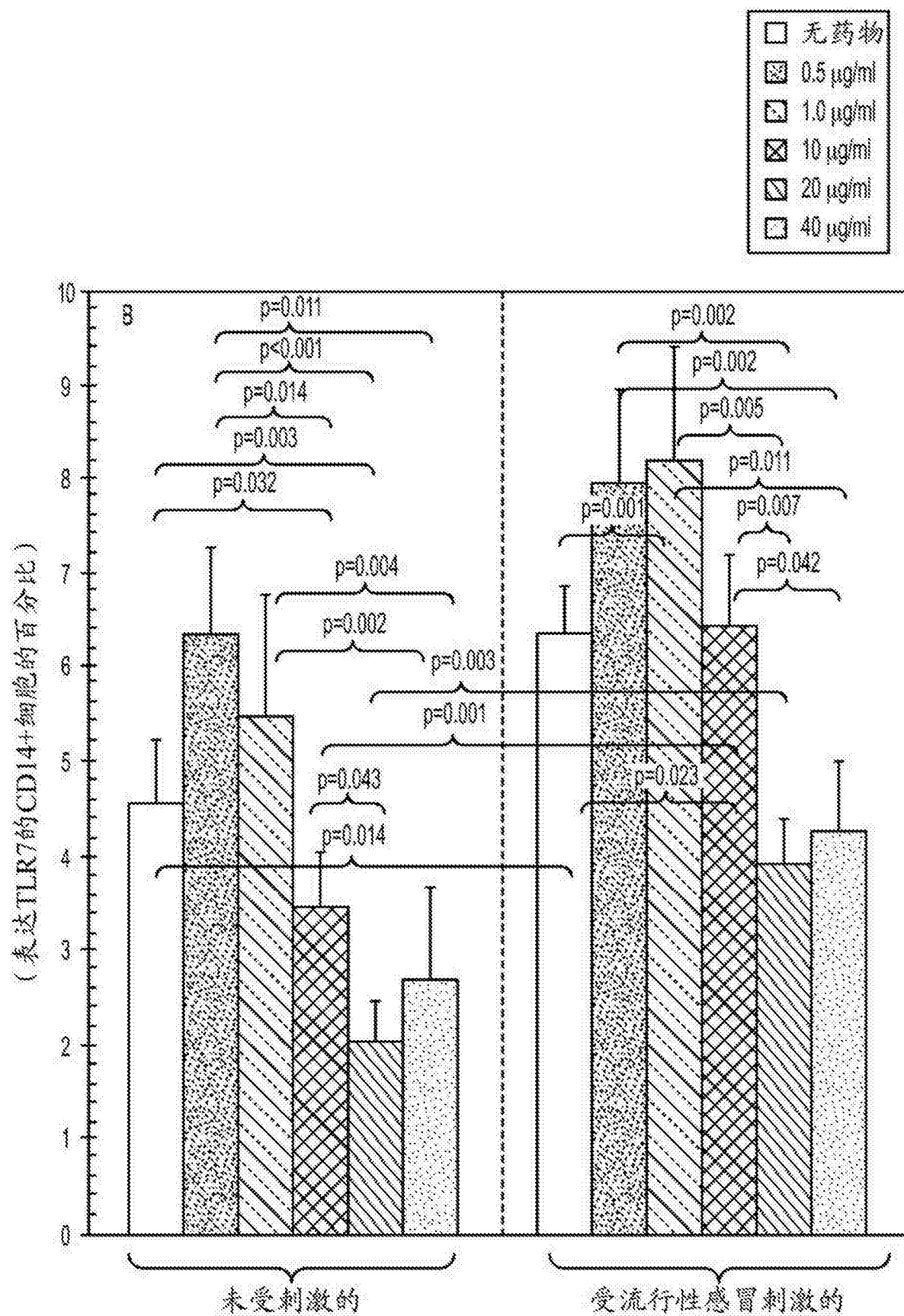


图6B

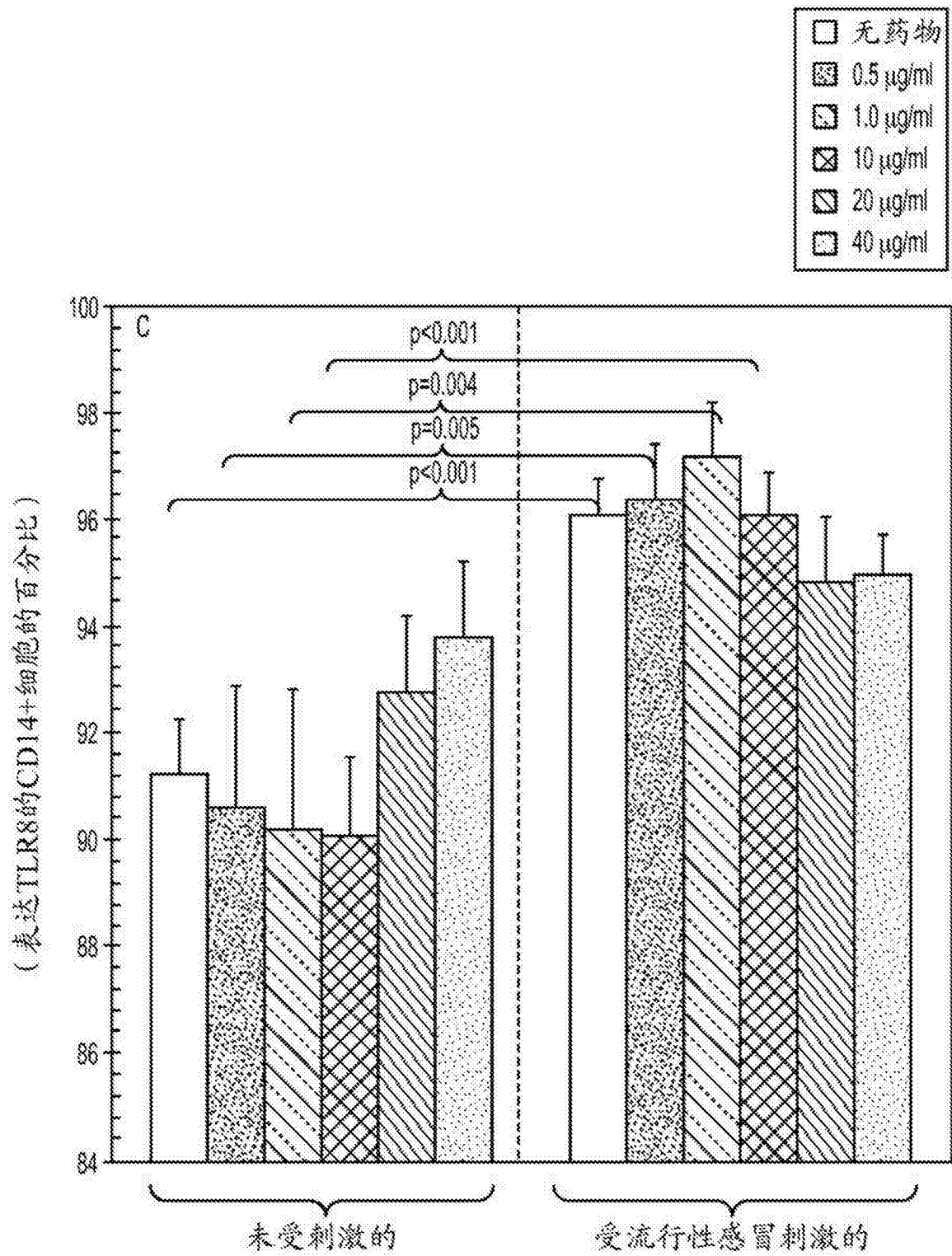


图6C

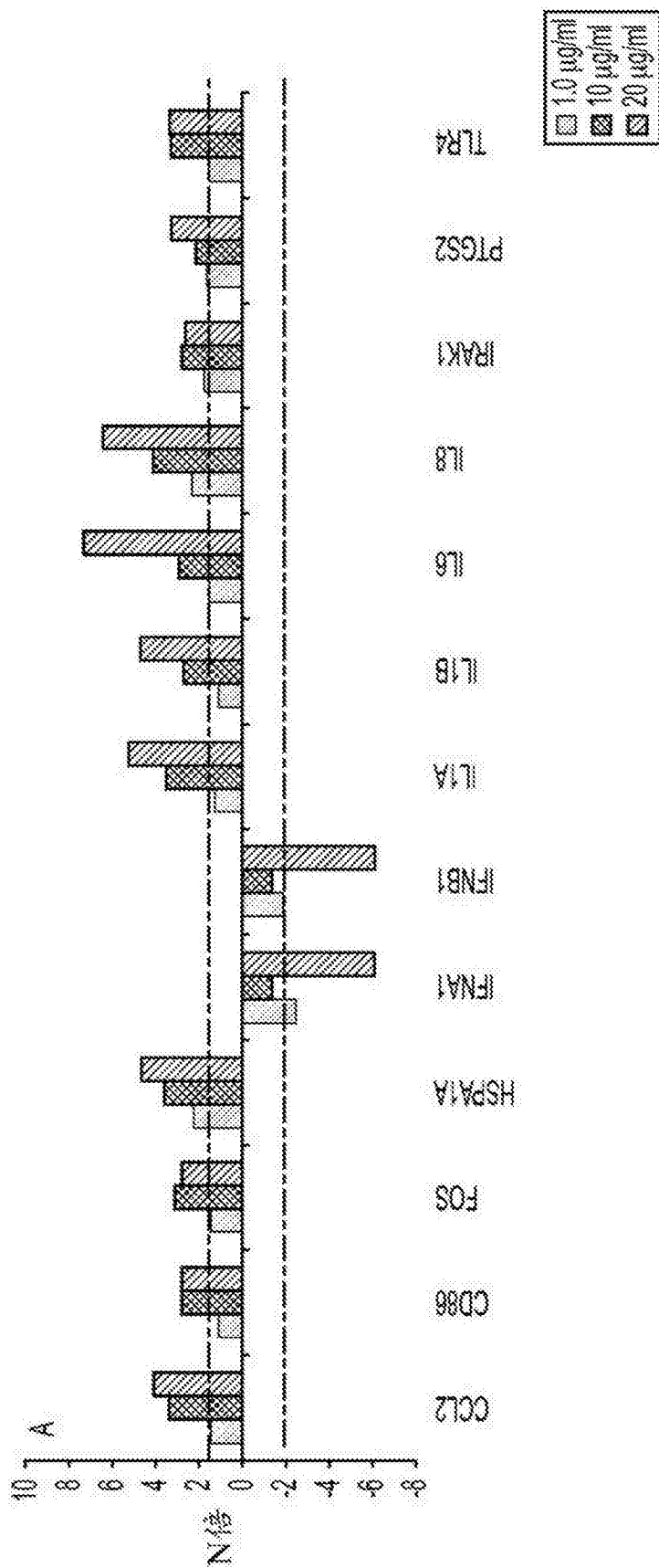


图7A

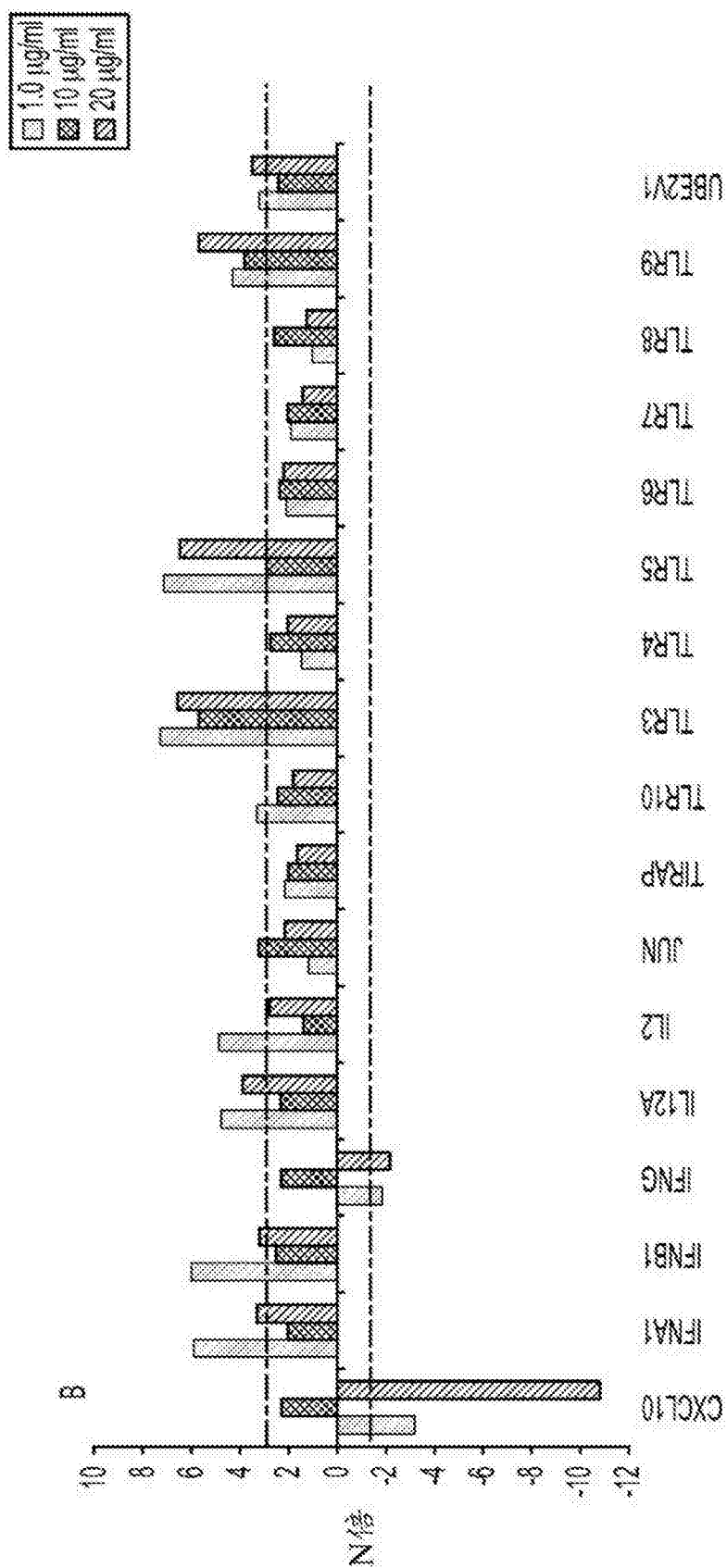


图7B

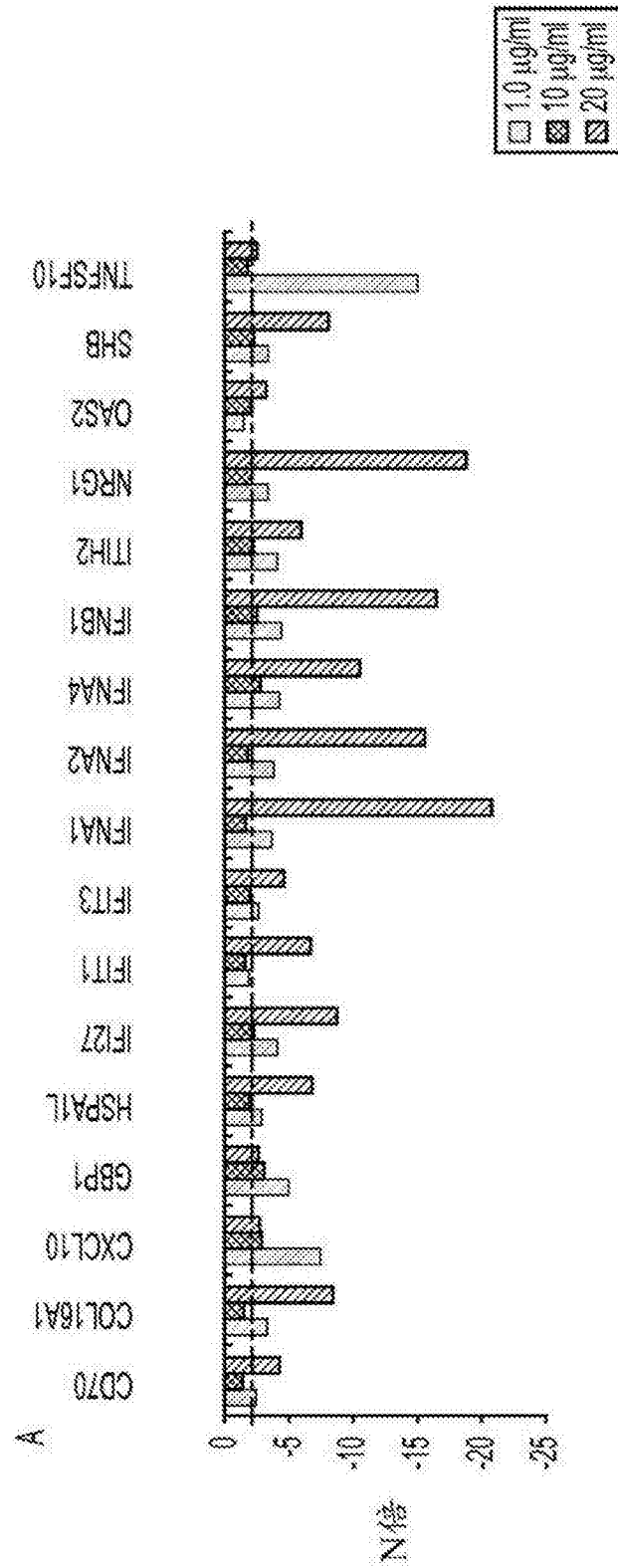


图8A

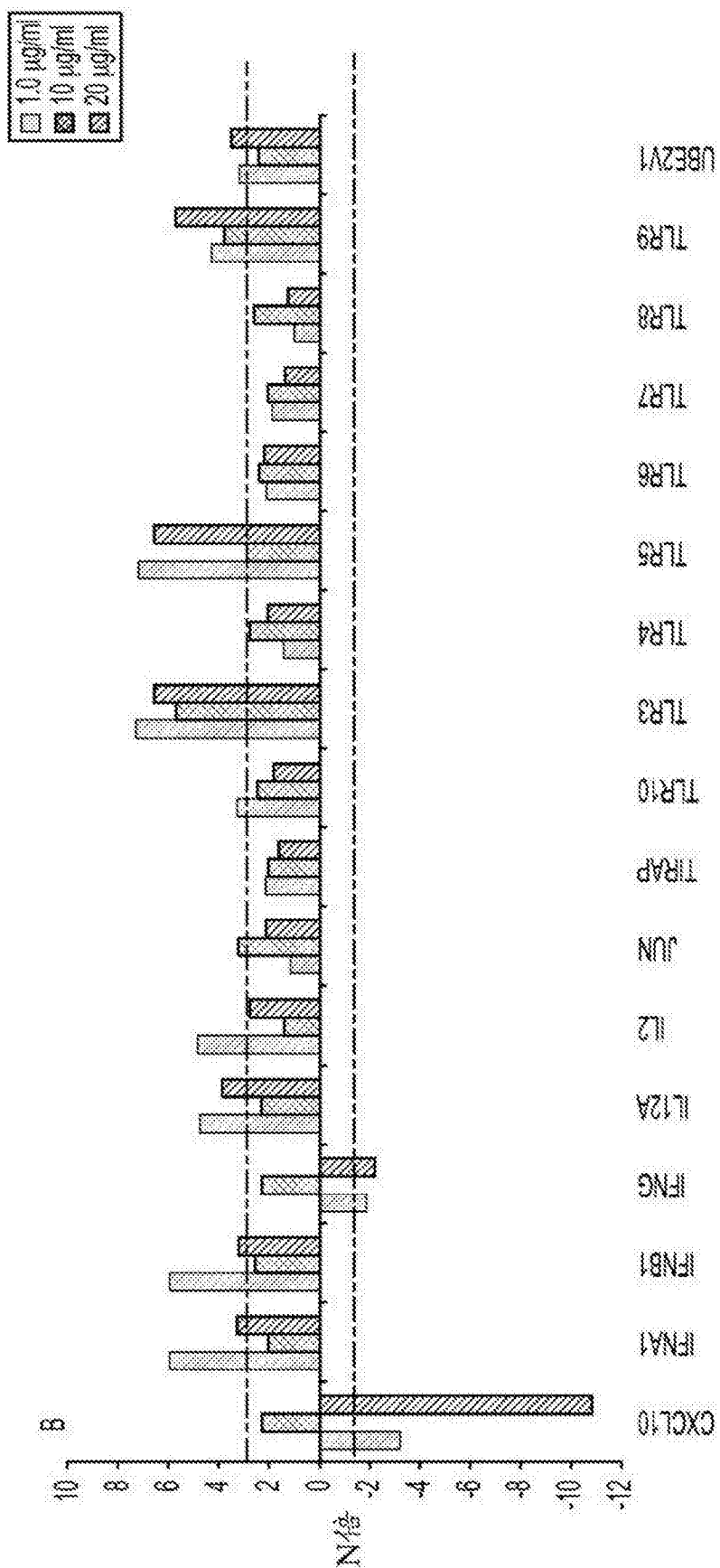


图8B

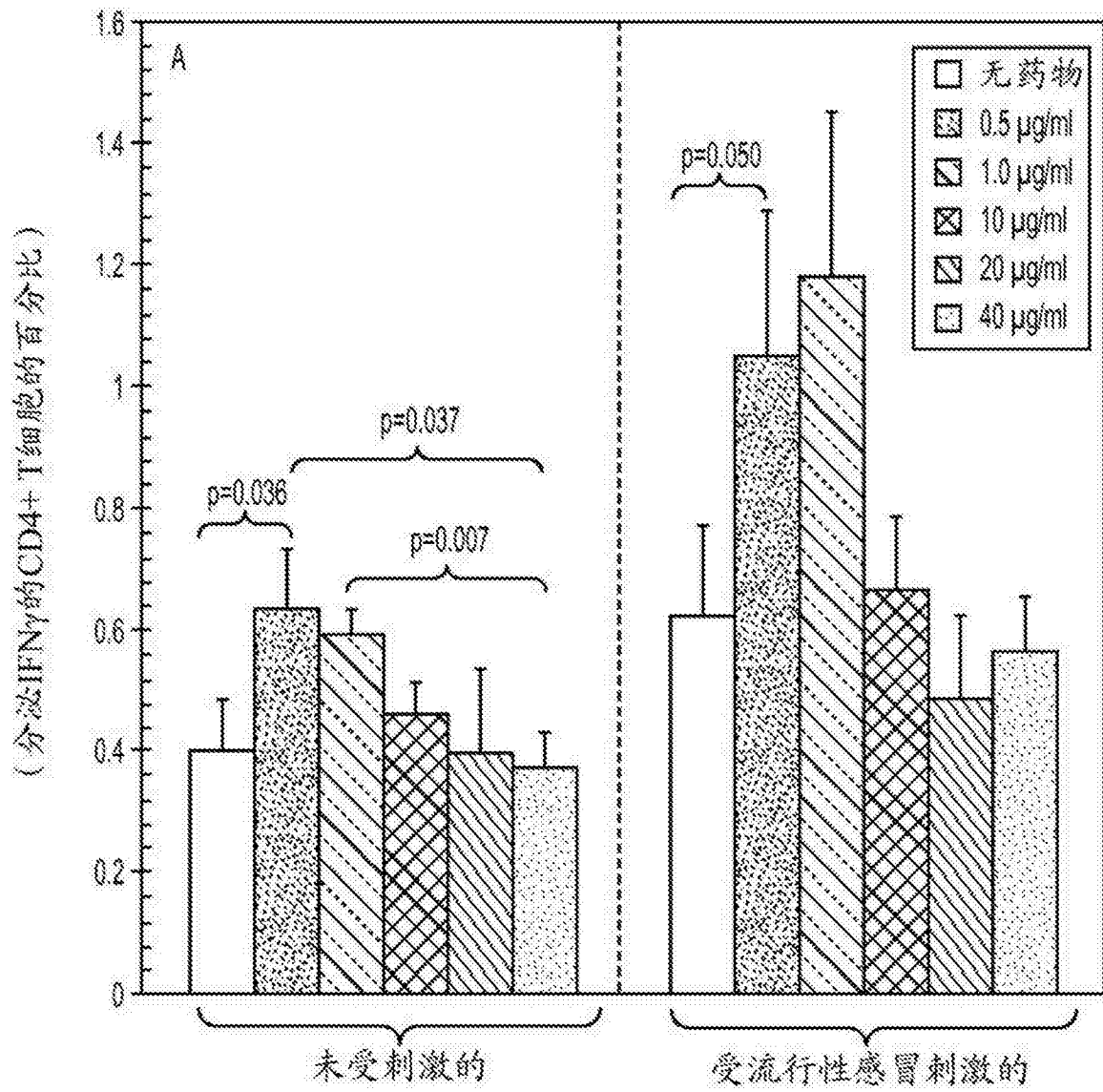


图9A

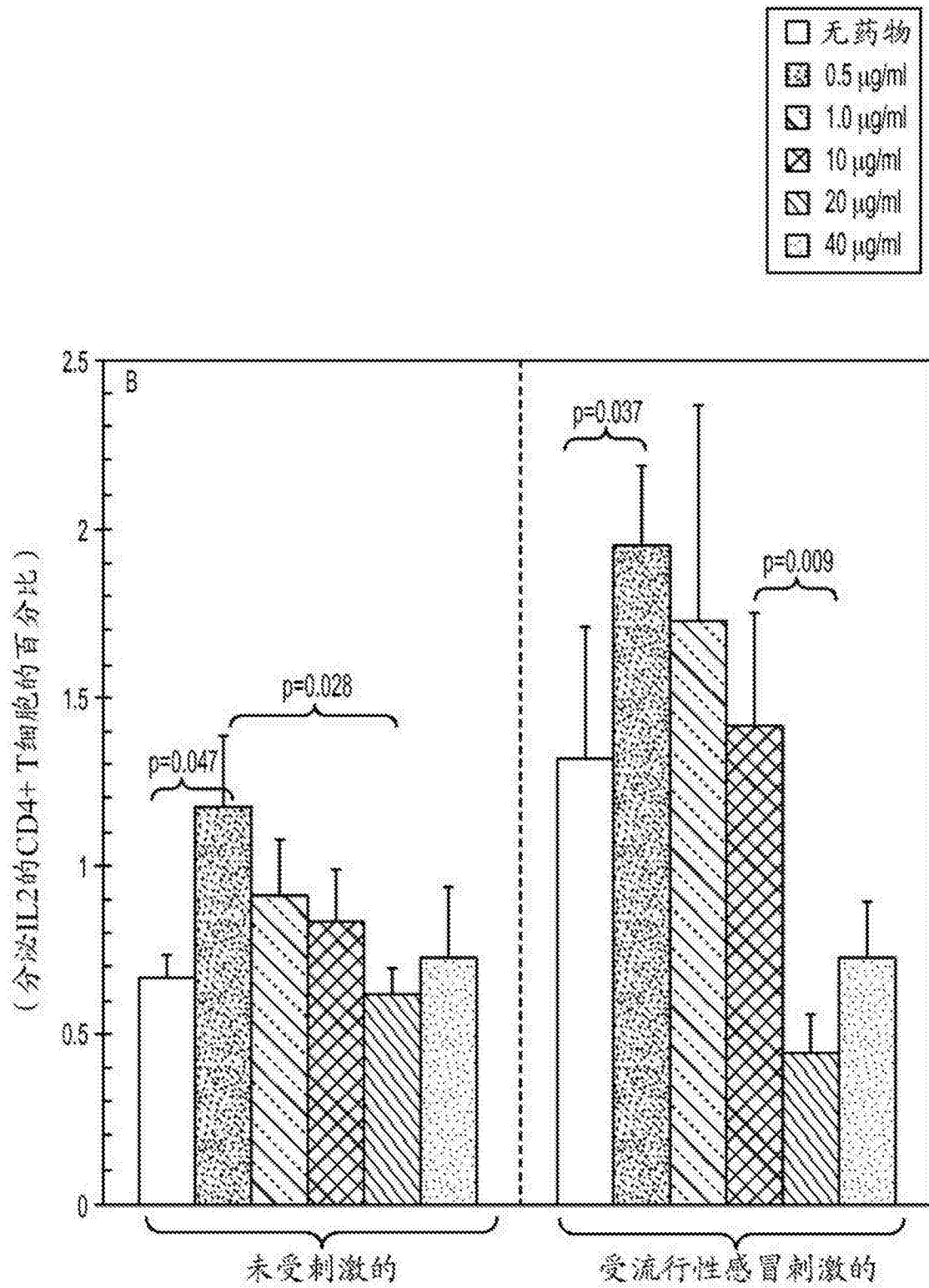


图9B

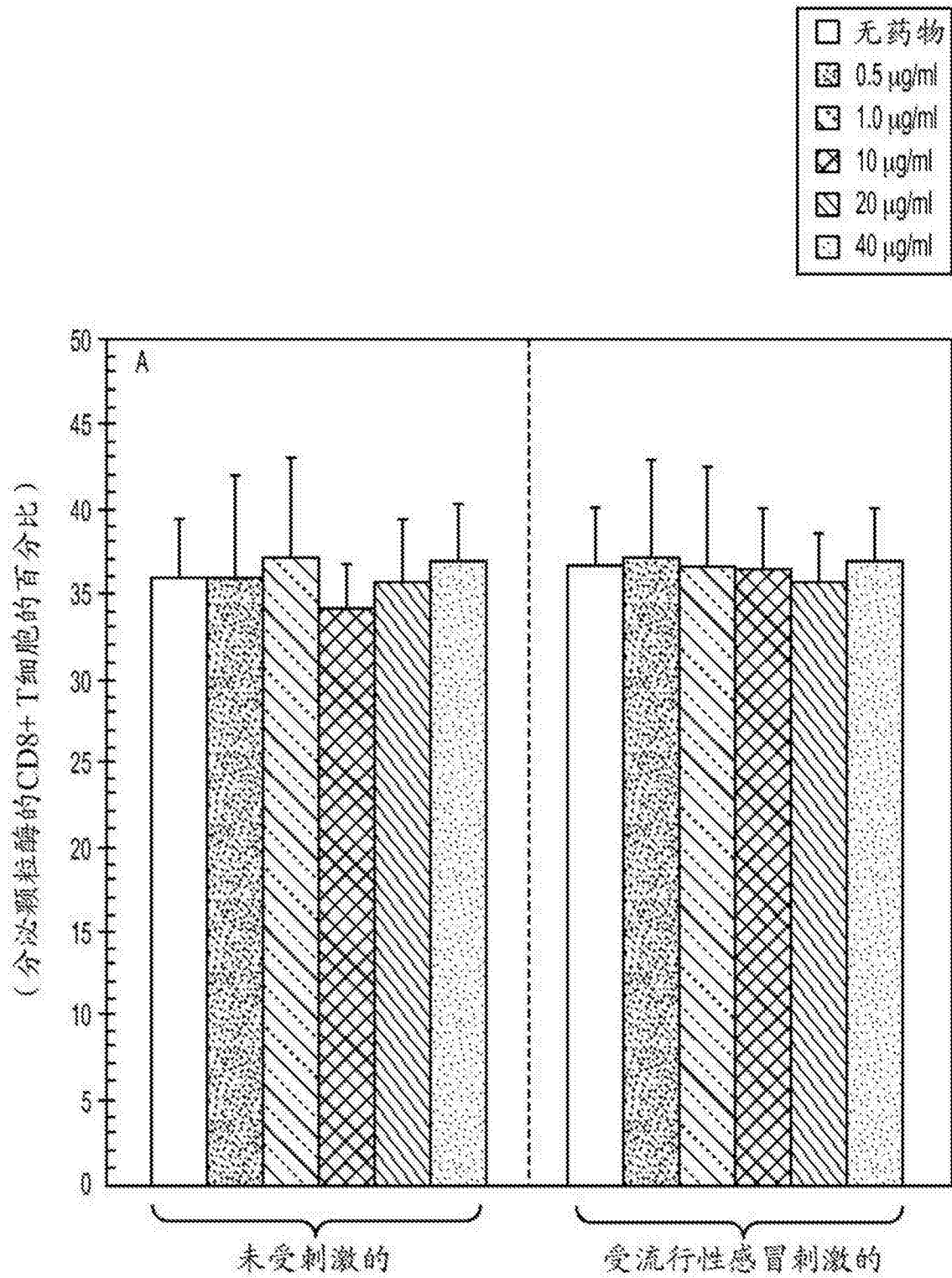


图10A

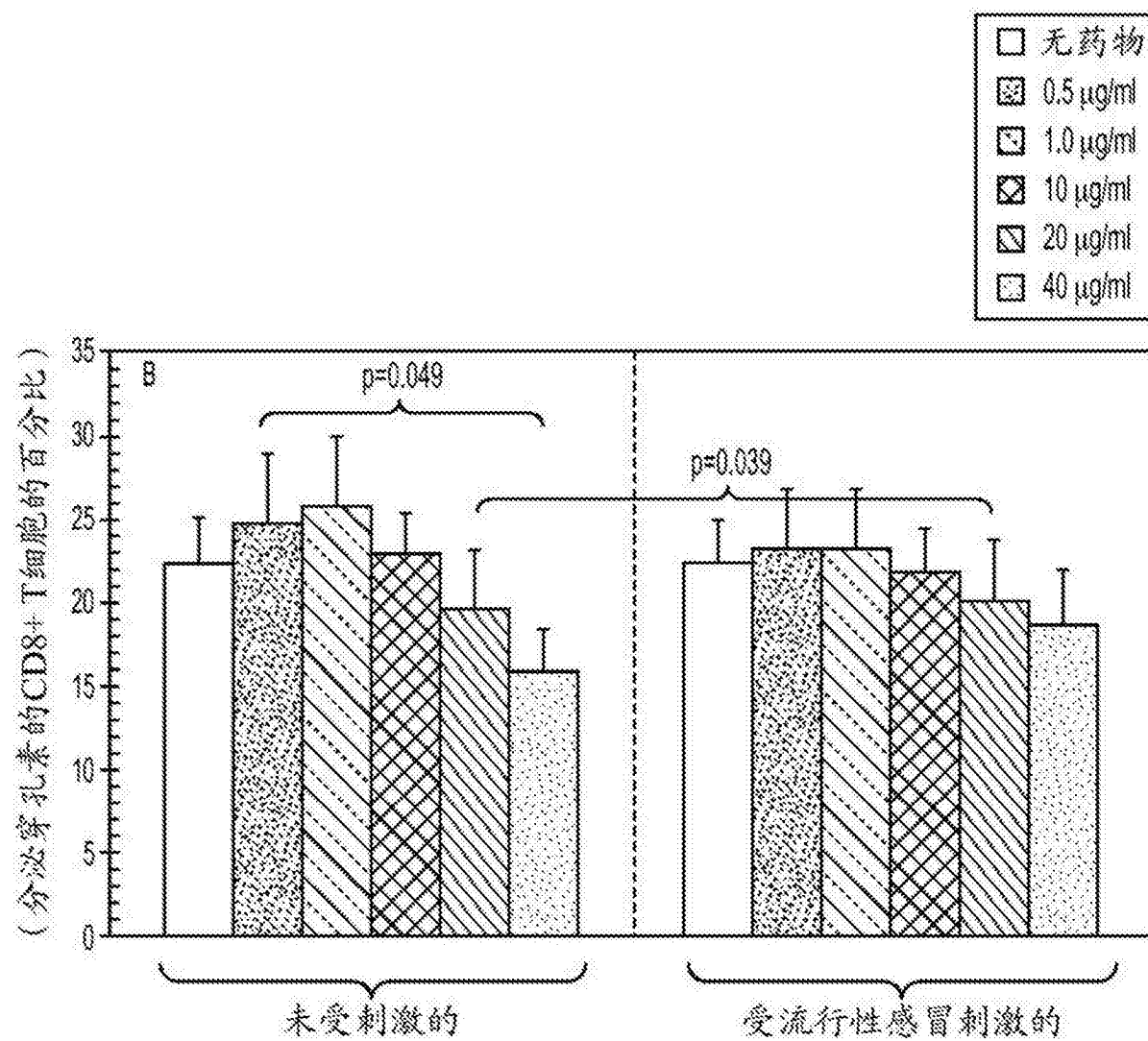


图10B

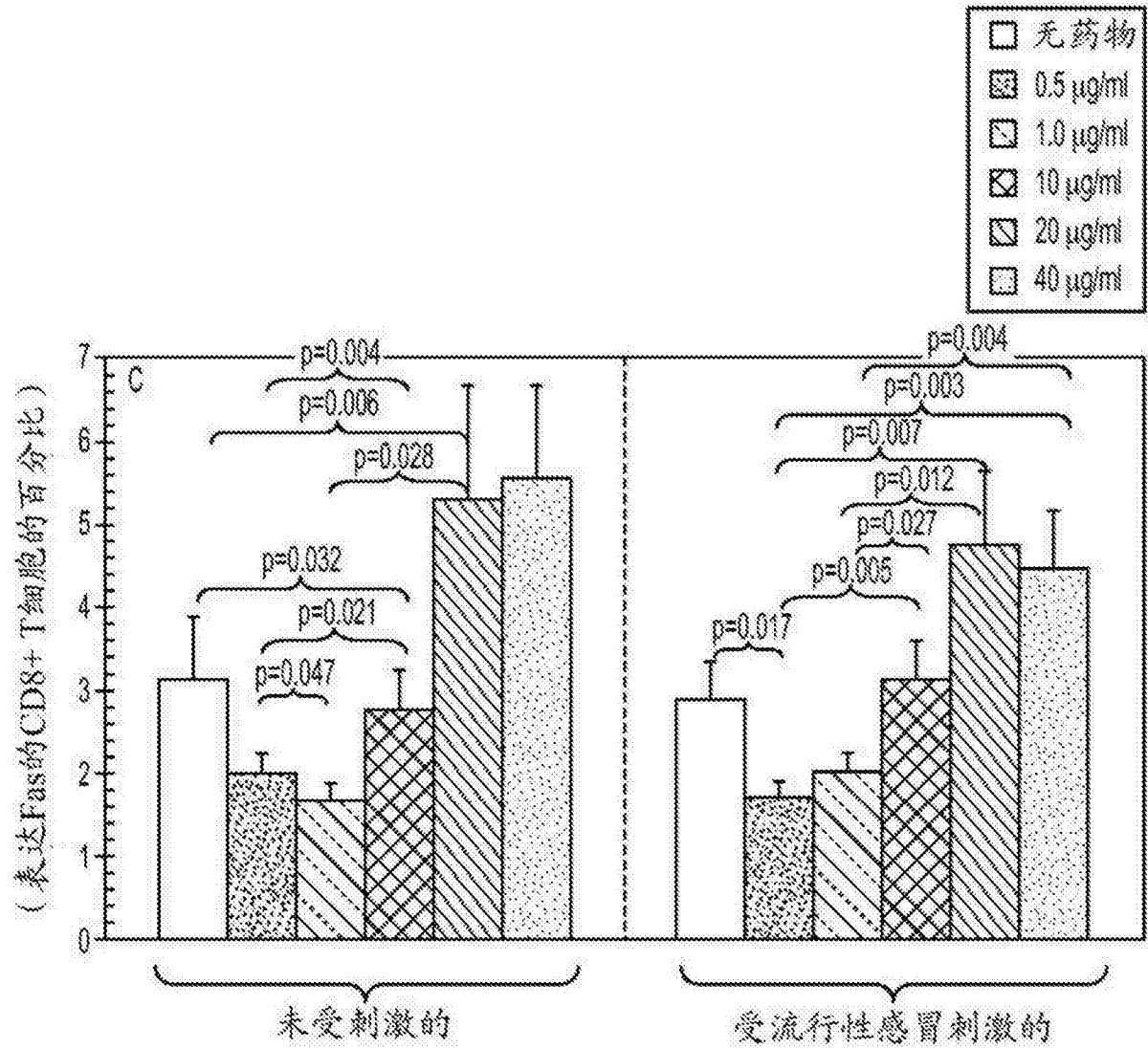


图10C

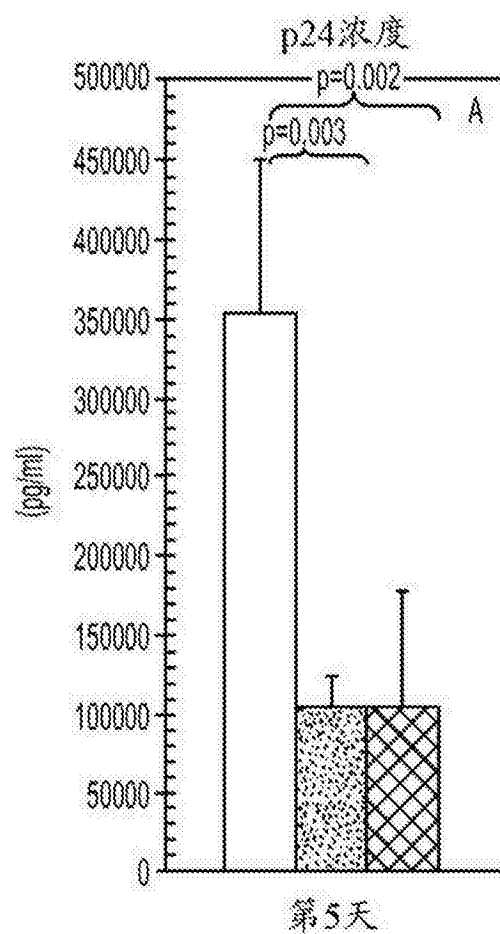


图11A

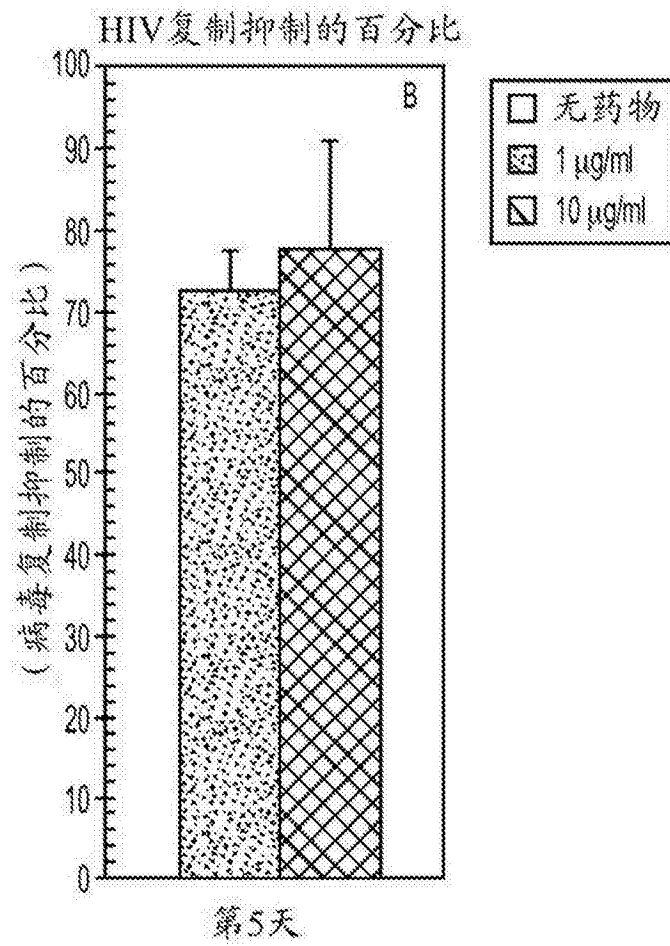


图11B