



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101855351 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200880115971. 3

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(22) 申请日 2008. 09. 12

代理人 吴贵明 张英

(30) 优先权数据

60/972, 595 2007. 09. 14 US

61/080, 092 2008. 07. 11 US

(51) Int. Cl.

C12N 15/34 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/076210 2008. 09. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/036299 EN 2009. 03. 19

(71) 申请人 特拉纳探索公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 理查德·H·京特

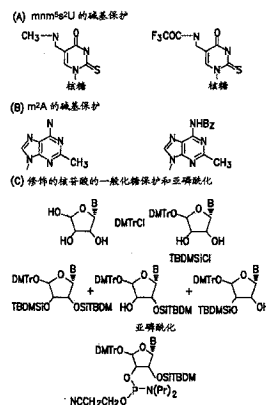
权利要求书 5 页 说明书 19 页 附图 7 页

(54) 发明名称

鉴别反转录病毒感染抑制剂的组合物和方法

(57) 摘要

本发明披露了鉴别反转录病毒增殖抑制剂的方法、所述方法中使用的 tRNA 以及可以在所述方法中使用的包含所述 tRNA 的试剂盒。本发明还披露了通过给予有效量的所述抑制剂以及包含所述抑制剂的药物组合物治疗或预防反转录病毒感染的方法。所述方法包括形成混合物, 其包含不能形成茎-环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子和测试化合物。在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段和所述靶核酸分子结合的条件下孵育所述混合物。然后, 可以进行检测所述测试化合物是否抑制所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合的测定。



1. 一种鉴别反转录病毒的反转录抑制剂的方法,所述方法包含:

形成混合物,其包含不能形成茎-环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中所述靶核酸分子对应于参与反转录的反转录病毒基因组的一部分;

在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合的条件下孵育所述混合物;和

检测所述测试化合物是否抑制所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子的结合,其中所述 tRNA^{ASL} 片段未与所述靶核酸分子结合表明所述测试化合物是反转录病毒的反转录抑制剂,

其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包含序列 5' -GCUXUUAYZCUG,其中 X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

2. 一种鉴别 HIV 病毒 RNA 翻译为前体蛋白质的抑制剂的方法,所述方法包含:

形成混合物,其包含不能形成茎-环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中所述靶核酸分子对应于参与 HIV 病毒 RNA 翻译为前体蛋白质的反转录病毒基因组的一部分;

在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合的条件下孵育所述混合物;和检测所述测试化合物是否抑制所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子的结合,其中所述 tRNA^{ASL} 片段未与所述靶核酸分子结合表明所述测试化合物是反转录病毒翻译的抑制剂,

其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包含序列 5' -GCUXUUAYZCUG,其中 X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

3. 一种鉴别 HIV 新病毒体的最终包装与装配的抑制剂的方法,其中一个这样的实施例或实施方式将包括最终病毒包装所必需的 tRNA^{Lys3},所述方法包含:

形成混合物,其包含不能形成茎-环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中所述靶核酸分子对应于参与最终包装与装配的反转录病毒基因组的一部分;

在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合的条件下孵育所述混合物;和检测所述测试化合物是否抑制所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子的结合,其中所述 tRNA^{ASL} 片段未与所述靶核酸分子结合表明所述测试化合物是通过减少病毒出芽从而抑制二次病毒传播的反转录病毒新病毒体最终包装与装配的抑制剂,

其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包含序列 5' -GCUXUUAYZCUG,其中 X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

4. 一种鉴别 HIV 反转录病毒引物募集的抑制剂的方法,其中所述反转录病毒引物是人 tRNA^{Lys3},所述方法包含:

形成混合物,其包含不能形成茎-环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中所述靶核酸分子对应于参与反转录病毒引物募集的反转录病毒基因组的一部分;

在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合

的条件下孵育所述混合物 ;和

检测所述测试化合物是否抑制所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子的结合,其中所述 tRNA ASL 片段未与所述靶核酸分子结合表明所述测试化合物是反转录病毒引物募集的抑制剂,

其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包含序列 5' -GCUXUUAYZCUG,其中 X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

5. 筛选反转录病毒增殖抑制剂的方法,所述方法包含:

a) 获得

i) 混合物,包含:

tRNA 反密码子茎环片段的线性序列,

靶核酸分子,其对应于参与反转录病毒增殖的反转录病毒基因组的一部分,并能够与所述 tRNA 反密码子茎环片段结合,

效应分子,其与能够改变所述复合物的分子动力学而不影响所述片段与靶核酸分子结合能力的反密码子茎环片段结合,所述靶核酸分子对应于参与反转录病毒增殖的反转录病毒基因组的一部分;

效应分子,其能够与靶 RNA 结合,所述靶 RNA 含有检测信号增强子以放大由结合诱导的所述信号,并因此减少检测所必需的材料用量,和

ii) 测试化合物,

b) 在不存在所述测试化合物而使得所述 tRNA 反密码子茎环片段与所述靶核酸分子结合的条件下孵育所述混合物中的所述靶核酸分子 ;和

c) 检测所述测试化合物是否与所述 tRNA ASL 片段或所述靶核酸分子结合,

其中,所述结合表明所述测试化合物是反转录病毒增殖的抑制剂,

其中,通过检测作为中断所述复合物形成的结果的光谱信号变化进行阳性测定,和

其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包含序列 5' -GCUXUUAYZCUG,其中 X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述修饰的核苷选自由未知修饰的腺苷(? A)、I- 甲基腺苷(m1A)、2- 甲基腺苷(m2A)、N6- 异戊烯基腺苷(i6A)、2- 甲硫基-N6- 异戊烯基腺苷(ms2i6A)、N6- 甲基腺苷(m6A)、N6- 苏氨酰基氨甲酰基腺苷(t6A)、N6- 甲基-N6 苏氨酰基氨甲酰基腺苷(m6t6A)、2- 甲硫基-N6- 苏氨酰基氨甲酰基腺苷(ms2t6A)、2' -0- 甲基腺苷 I 肌苷(Am)、I- 甲基肌苷 Ar(p)、2' -0-(5- 磷酸基)腺嘌呤核糖苷(m1I)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷(i06A)、未知修饰的胞苷(? C)、2- 巯基胞苷(s2C)、2' -0- 甲基胞苷(Cm)、N4- 乙酰基胞苷(ac4C)、5- 甲基胞苷(m5C)、3- 甲基胞苷(m3C)、赖西丁(k2C)、5- 甲酰胞苷(f5C)、2' -0- 甲基-5- 甲酰胞苷(f5Cm)、未知修饰的鸟苷(? G)、2' -0-(5 磷酸基)鸟嘌呤核糖苷(Gr(p))、I- 甲基鸟苷(mIG)、N2- 甲基鸟苷(m2G)、2' -0- 甲基鸟苷(Gm)、N2, N2- 二甲基鸟苷(m22G)、N2, N2, 2' -0- 三甲基鸟苷(m22Gm)、7- 甲基鸟苷(m7G)、古嘌呤(fa7d7G)、Q 苷(Q)、甘露糖基-Q 苷(manQ)、半乳糖基-Q 苷(galQ)、3-(3- 氨基-3- 羧基-丙基)尿苷(yW)、过氧 3-(3- 氨基-3- 羧基-丙基)尿苷(02yW)、未知修饰的尿苷(? U)、5- 甲基氨基甲基尿苷(mnm5U)、2- 巯基尿苷(s2U)、2' -0- 甲基尿苷(Um)、4- 巯基尿苷(s4U)、5- 氨甲酰基甲基尿苷(ncm5U)、5- 甲氧基羰基

甲基尿苷 (mcm5U)、5 甲基氨基甲基 -2- 硫基尿苷 (mnm5s2U)、5- 甲氧基羰基甲基 -2- 硫基尿苷 (mcm5s2U)、尿苷 5- 羟乙酸 (cm05U)、5- 甲氧基尿苷 (mo5U)、5- 羧基甲基氨基甲基尿苷 (cmnm5U)、5- 羧基甲基氨基甲基 -2- 硫基尿苷 (cmnm5s2U)、3-(3- 氨基 -3- 羧基丙基) 尿苷 (acp3U)、5(羧基羟基甲基) 尿苷甲酯 (mchm5U)、5- 羧基甲基氨基甲基 -2' -0- 甲基尿苷 (cmnm5Um)、5- 氨甲酰基甲基 -2' -0- 甲基尿苷 (ncm5Um)、二氢尿苷 (D)、假尿苷 (ψ)、1- 甲基假尿苷 (m1 ψ)、2' -0- 甲基假尿苷 (ψ m)、胸腺嘧啶核糖核苷 (mSU)、5- 甲基 -2- 硫基尿苷 (m5s2U)、和 5,2' -0- 二甲基尿苷 (m5Um) 所构成的组。

7. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述修饰的核苷选自自由 mnm5s2U、mcm5s2U、ms2t6A、s2U、 ψ 和 t6A 所构成的组。

8. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法, tRNA 反密码子茎环片段包含核酸序列 5' -CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A('假 U)CUGC。

9. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法, tRNA 反密码子茎环片段包含核酸序列 5' -GCU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(假 U)CUG。

10. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段包括核酸序列 5' -CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(假 U)CUGC(荧光素)。

11. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段基本上由核酸序列 5' -CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(假 U)CUGC(荧光素) 组成。

12. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段为具有 10 至 14 个核苷酸的线性片段。

13. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述 tRNA 反密码子茎环片段为具有 11 至 13 个核苷酸的线性片段。

14. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中所述 tRNA 反密码子茎环片段为具有 12 个核苷酸的线性片段。

15. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,形成所述混合物的步骤包括向所述混合物中加入一种或多种测试化合物。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述测试化合物选自自由肽、肽类似物、核酸、核酸类似物、抗体、激素、天然或合成的化合物、有机化合物和它们的组合所构成的组。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,所述核酸选自自由反义寡聚物、siRNA、RNAi 和 dsRNA 所构成的组。

18. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的方法,其中,所述 tRNA 片段还包含标记。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,所述标记能够通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法或化学法直接地或间接地检测。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,所述标记选自放射性同位素(例如, ^{32}P 、 ^{35}S 和 ^3H)、染料、荧光染料(例如, Cy5 和 Cy3)、荧光团(例如, 萤光素)、电子致密试剂、酶和它们的底物(例如, 酶联免疫测定中常用的, 如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶)、生物素- 抗生物链菌素、地高辛、或半抗原 ;和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质所构成的组。

21. 根据权利要求 18 所述的方法,其中,所述标记为亲合标记物。

22. 一种捕获权利要求 21 所述的分离的 tRNA 片段的方法,所述方法包含与根据权利要求 13 所述的分离的 tRNA 片段相接触,其中所述标记为亲合标记物,其具有结合于固体载体

的互补配体,所述配体使得能够捕获所述亲合标记物标记的 tRNA 片段。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中,所述亲合标记物和互补伴侣选自由生物素-抗生蛋白链菌素、互补的核酸片段(例如,寡聚 dT-寡聚 dA、寡聚 T-寡聚 A、寡聚 dG-寡聚 dC、寡聚 G-寡聚 C)、适体、或半抗原和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质所构成的组。

24. 包含序列 5'-GCUXUUAYZCUG 的分离的 tRNA 片段,其中,X、Y、和 Z 表示修饰的核苷,并且可选地包含标记。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述修饰的核苷选自由未知的修饰的腺苷(? A)、I-甲基腺苷(m1A)、2-甲基腺苷(m2A)、N6-异戊烯基腺苷(i6A)、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷(ms2i6A)、N6-甲基腺苷(m6A)、N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷(t6A)、N6-甲基-N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷(m6t6A)、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨甲酰基腺苷(ms2t6A)、2'-O-甲基腺苷 I 肌苷(Am)、I-甲基肌苷 Ar(p) 2'-O-(5-磷酸基)腺嘌呤核糖苷(m1I)、N6-(cis-羟基异戊烯基)腺苷(i06A)、未知修饰的胞苷(? C)、2-硫基胞苷(s2C)、2'-O-甲基胞苷(Cm)、N4-乙酰基胞苷(ac4C)、5-甲基胞苷(m5C)、3-甲基胞苷(m3C)、赖西丁(k2C)、5-甲酰胞苷(f5C)、2'-O-甲基-5-甲酰胞苷(f5Cm)、未知修饰的鸟苷(? G)、2'-O-(5-磷酸基)鸟嘌呤核糖苷(Gr(p))、I-甲基鸟苷(m1G)、N2-甲基鸟苷(m2G)、2'-O-甲基鸟苷(Gm)、N2,N2-二甲基鸟苷(m22G)、N2,N2,2'-O-三甲基鸟苷(m22Gm)、7-甲基鸟苷(m7G)、古嘌呤(ga7d7G)、Q 苷(Q)、甘露糖基-Q 苷(manQ)、半乳糖基-Q 苷(galQ)、3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷(yW)、过氧 3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷(02yW)、未知修饰的尿苷(? U)、5-甲基氨基甲基尿苷(mnm5U)、2-硫基尿苷(s2U)、2'-O-甲基尿苷(Um)、4-硫基尿苷(s4U)、5-氨甲酰基甲基尿苷(ncm5U)、5-甲氧基羰基甲基尿苷(mcm5U)、5-甲基氨基甲基-2-硫基尿苷(mnm5s2U)、5-甲氧基羰基甲基-2-硫基尿苷(mcm5s2U)、尿苷 5-羧乙酸(cm05U)、5-甲氧基尿苷(mo5U)、5-羧基甲基氨基甲基尿苷(cmm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫基尿苷(cmm5s2U)、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷(acp3U)、5-(羧基羰基甲基)尿苷甲酯(mchm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2'-O-甲基尿苷(cmm5Um)、5-氨甲酰基甲基-2'-O-甲基尿苷(ncm5Um)、二氢尿苷(D)、假尿苷(ψ)、1-甲基假尿苷(m1ψ)、2'-O-甲基假尿苷(ψm)、胸腺嘧啶核糖核苷(m5U)、5-甲基-2-硫基尿苷(m5s2U)、和 5,2'-O-二甲基尿苷(m5Um)所构成的组。

26. 根据权利要求 24 所述的 tRNA 片段,其中,所述修饰的核苷选自由 mnm5s2U、mcm5s2U、ms2t6A、s2U、ψ 和 t6A 所构成的组。

27. 一种分离的 tRNA 片段,其包含核酸序列 5'-CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A('1')CUGC。

28. 分离的 tRNA 片段,其包含核酸序列 5'-GCU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A('1')CUG。

29. 根据权利要求 24-28 中任一项所述的分离的 tRNA 片段,还包含标记。

30. 根据权利要求 29 所述的分离的 tRNA 片段,其中,所述标记能够通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法或化学法直接地或间接地检测。

31. 根据权利要求 29 所述的分离的 tRNA 片段,其中,所述标记选自由放射性同位素(例如,32P、35S 和 3H)、染料、荧光染料(例如,Cy5 和 Cy3)、荧光团(例如,萤光素)、电子致密试剂、酶和它们的底物(例如,酶联免疫测定中常用的,如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶)、生物素-抗生蛋白链菌素、地高辛或半抗原;和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质所构成的组。

32. 根据权利要求 26 所述的分离的 tRNA 片段,其中,所述标记为亲合标记物。
33. 一种捕获权利要求 32 所述的分离的 tRNA 片段的方法,所述方法包含与根据权利要求 32 所述的分离的 tRNA 片段相接触,其中所述标记为亲合标记物,其具有结合于固体载体的互补配体,所述配体使得能够捕获所述亲合标记物标记的 tRNA 片段。
34. 根据权利要求 33 的所述的方法,其中,所述亲合标记物和互补伴侣选自生物素-抗生蛋白链菌素、互补的核酸片段(例如,寡聚 dT-寡聚 dA、寡聚 T-寡聚 A、寡聚 dG-寡聚 dC、寡聚 G-寡聚 C)、适体、或半抗原和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质所构成的组。
35. 一种试剂盒,其包含根据权利要求 24-32 中任一项所述的分离的 tRNA 片段。
36. 一种治疗或预防反转录病毒感染的方法,所述方法包含给予反转录病毒增殖抑制剂。
37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述抑制剂抑制反转录病毒的反转录。
38. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述抑制剂抑制在翻译中所使用的所述反转录病毒引物的募集,所述反转录病毒引物是人 tRNA^{Lys3} 的病毒。
39. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述抑制剂抑制新病毒体的最终包装和装配。
40. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述抑制剂抑制宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子的结合。
41. 根据权利要求 36-41 中任一项所述的方法,还包含同时给予第二抗反转录病毒化合物。
42. 根据权利要求 42 所述的方法,其中,所述第二抗反转录病毒试剂选自 NRTI、NNRTI、VAP 抗个体基因型抗体、CD4 和 CCR5 受体抑制剂、进入抑制剂、反义寡核苷酸、核糖酶、蛋白酶抑制剂、神经氨酸苷酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、PI-3 激酶抑制剂和干扰素所构成的组。
43. 根据权利要求 36-40 中任一项所述的方法,其中,所述反转录病毒选自由猫免疫缺陷病毒(FIV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、禽白血病病毒、猫白血病病毒、犬腺瘤病毒、人类嗜 T 淋巴细胞病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)所构成的组。
44. 根据权利要求 36-40 中任一项所述的方法,其中,所述反转录病毒为 HIV。
45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述 HIV 选自由 HIV-I、HIV-II、HIV-III(也称为 HTLV-II、LAV-I、LAV-2)、和它们的突变形式所构成的组。

鉴别反转录病毒感染抑制剂的组合物和方法

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本专利申请要求 2007 年 9 月 14 日提交的美国临时专利申请第 60/972595 号和 2008 年 7 月 11 日提交的美国临时专利申请第 61/080092 号的优先权。所述美国临时专利申请第 60/972595 号和第 61/080092 号出于各种目各自作为整体引入本文以供参考。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及鉴别反转录病毒感染和复制抑制剂的组合物和方法。

背景技术

[0004] 灵长类慢病毒包括 1 型和 2 型人类免疫缺陷病毒 (HIV-1 和 HIV-2) 和猿免疫缺陷病毒 (SIV) (Barre-Sinoussi, F., et al. (1983) Science 220 :868-871 ;Clavel, F. (1987) AIDS 1 :135-140 ;Daniel, M. D., et al. (1985) Science 228 :1201-1204 ;Desrosiers, R. C. (1990) Ann. Rev. Immunol. 8 :557-578 ;Gallo, R. C, et al. (1984) Science 224 :500-503)。HIV-1 和 HIV-2 感染人类, HIV-1 类病毒感染黑猩猩, SIV 变种感染非洲猴。由于 CD4⁺ 阳性 T 淋巴细胞的缺失, 受 HIV-1 和 HIV-2 感染的人类以及受某些 SIV 株感染的亚洲猕猴经常发展成威胁生命的免疫缺陷 (Fauci, A., et al. (1984) Ann. Int. Med. 100 :91-106 ;Letvin, N. L., et al. (1985) Science 230 :71-739, 19)。

[0005] 人类中, HIV 感染造成获得性免疫缺陷综合症 (AIDS), 它是一种不可治愈的疾病, 其中机体免疫系统遭到破坏, 使感染者易于罹患机会性感染, 例如, 肺炎和如卡波济肉瘤的某些癌症。AIDS 是全球主要的健康问题。联合国 HIV/AIDS 联合项目 (UNAIDS) 估计目前全球超过 3400 万人感染 HIV 或患有 AIDS ;其中约 2810 万感染者居住在贫穷的撒哈拉沙漠以南的非洲。在美国, 每 500 个人中就约有 1 人感染 HIV 或患有 AIDS。自开始流行以来, 全球已有 1900 万人死于 AIDS, 包括约 425000 个美国人。AIDS 已取代疟疾和肺结核成为全球成人中最致命的传染性疾病, 是全球第四大致死原因。仍需要鉴别反转录病毒感染的抑制剂。为此, 仍然需要开发鉴别这样的抑制剂的方法。

发明内容

[0006] 公开了鉴别反转录病毒增殖的方法, 在这些方法中所使用的分离的 tRNA 片段, 以及包含这些片段的试剂盒。还公开了使用反转录病毒增殖抑制剂以及包含该抑制剂和药物可用载体的药物组合物来治疗和 / 或预防反转录病毒感染的方法。还公开了使用一种或多种该类抑制剂和第二抗反转录病毒化合物的组合治疗。

[0007] 可以通过抑制反转录病毒的反转录、翻译中所使用的反转录病毒引物 (人 tRNA^{Lys3}) 的病毒募集 (viral recruitment), 通过抑制新病毒体的最终包装与装配和通过抑制宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子结合来抑制反转录病毒增殖。

[0008] 筛选反转录病毒增殖抑制剂的方法可以包括形成混合物, 其包含 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与该 tRNA 反密码子茎环片段结合的核酸分子以及测试化合物。

在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与核酸分子结合的情况下孵育该混合物。然后,可以确定测试化合物是否抑制反转录病毒的增殖。对 tRNA ASL 片段与靶核酸分子结合的抑制表明该测试化合物是反转录病毒增殖的抑制剂。

[0009] 在一个方面,本发明涉及鉴别反转录病毒的反转录抑制剂的方法。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的核酸分子、以及测试化合物。在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下孵育该混合物。然后,可以确定该测试化合物是否抑制 tRNA 反密码子茎环片段与核酸分子结合。tRNA ASL 片段与靶核酸分子的结合表明该测试化合物是反转录病毒的反转录的抑制剂。

[0010] 在另一个方面,本发明涉及鉴别宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子结合的抑制剂的方法。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、以及测试化合物。在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下孵育该混合物。然后,可以检测该测试化合物是否抑制 tRNA 片段与靶核酸分子结合。tRNA ASL 片段与靶核酸分子的结合表明该测试化合物是通过抑制 RT 复合物形成的反转录病毒的反转录的抑制剂。

[0011] 在另一个方面,本发明涉及鉴别在病毒 RNA 翻译为前体蛋白质期间 tRNA^{lys3} 的 HIV 募集抑制剂的方法。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中该靶核酸分子对应于参与 HIV 病毒 RNA 向前体蛋白质翻译的反转录病毒基因组的一部分。在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下孵育该混合物。然后,可以检测该测试化合物是否抑制 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合。tRNA ASL 片段未与靶核酸分子结合表明该测试化合物是反转录病毒翻译的抑制剂。

[0012] 在另一方面,本发明涉及鉴别 HIV 新病毒体最终包装和装配抑制剂的方法,其中这样的实施例或实施方式将包含最终病毒包装所必须的 tRNA^{lys3}。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中该靶核酸分子对应于参与最终包装和装配的反转录病毒基因组的一部分。在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下孵育该混合物。然后,可以检测该测试化合物是否抑制 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合。tRNA ASL 片段未与靶核酸分子结合表明该测试化合物是通过降低病毒出芽(viral budding)从而抑制二次病毒传播的反转录病毒新病毒体最终包装与装配的抑制剂。

[0013] 还公开了筛选上述各种过程的抑制剂的试剂盒。该试剂盒包含基本上由 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列组成的核酸分子;和可检测标记。

[0014] 作为上述各种过程抑制剂的化合物可以在治疗 and / 或预防病毒感染(包括反转录病毒感染)的方法中使用。该类方法也在本发明的范围内。这些方法中可用的药物组合物也在本发明的范围内。该类药物组合物包含如本文所述的一种或多种抑制剂和药物可用载体。还公开了使用通过不同机制起作用的其他抗病毒化合物的组合治疗。

附图说明

[0015] 图 1 提供了合成 RNA 寡聚物前修饰的核苷酸保护的示意图。部分 A 示出了用三氟

乙酸进行保护。部分 B 示出了用苯甲酰基进行保护。部分 C 示出了用核糖羟基基团进行常规保护。

[0016] 图 2A 提供了标记的 tRNA 片段和对应的靶序列的图示。图 2B 提供了几种代表性修饰的核苷的结构。

[0017] 图 3 提供了固定化测定的实施例与使用 AlphaScreen™ 的测定之间的比较。

[0018] 图 4A 和 4B 提供了使用 HIV 测定的实施例对于一种化合物所获得的数据总结表。

[0019] 图 5 提供了使用 HIV 测定的实施例对于第二化合物所获得的数据总结表。

[0020] 图 6 提供了使用 HIV 测定的实施例对于对照化合物所获得的数据总结表。

具体实施方式

[0021] 本发明涉及用于鉴别可用于抑制反转录病毒增殖的化合物的组合物和方法,以及通过抑制反转录病毒增殖用于治疗病毒感染的药物组合物和方法。可以通过抑制反转录、病毒复制、病毒 RNA 向蛋白质的翻译,人 tRNA^{lys3} 的募集、新病毒体的包装和装配和 / 或抑制宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子的结合来抑制病毒增殖。

[0022] 然而,在进一步详细说明本发明之前,将首先定义以下术语。

[0023] 定义:

[0024] 如本文所用的,“抑制剂”是指能够预防、减少或限制反转录病毒增殖的任何化合物。抑制剂可以抑制反转录病毒增殖,例如通过预防、减少或限制反转录病毒的反转录。在一些实施方式中,与不存在抑制剂时的增殖相比,该抑制至少为反转录病毒增殖的 20% (例如,至少 50%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%)。一方面,抑制剂预防、减少或限制 tRNA 或其片段与靶核酸分子结合。抑制剂还可以影响人 tRNA^{lys3} 的募集、病毒 RNA 向蛋白质的翻译和 / 或病毒体的最终包装和装配。本文中说明了分析抑制的测定,该测定是本领域中已知的。

[0025] “RNA 依赖性 DNA 聚合酶”或“反转录酶”是可以从 RNA 模板合成互补 DNA 拷贝 (“cDNA”) 的酶。所有已知的反转录酶还具有从 DNA 模板 (靶核酸) 产生互补 DNA 拷贝的能力;因此,它们都是 RNA- 和 DNA 依赖性 DNA 聚合酶。

[0026] 如本文所用的,“标记”或“可检测标记”为可检测的任何组合物,例如,通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法或化学方法直接地或间接地检测。可用的标记包括,但不限于,放射性同位素 (例如,32p、35S 和 3H)、染料、荧光染料 (例如,Cy5 和 Cy3)、荧光团 (例如,萤光素)、电子致密试剂 (或高电子密度试剂, electron dense reagent)、酶和它们的底物 (例如,酶联免疫测定中常用的,如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶)、生物素- 抗生物素链菌素、地高辛或半抗原;和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质。而且,标记或可检测部分可以包含“亲合标记物 (或亲合标签, affinitytag)”,当与靶核酸偶联并且与测试化合物或化合物文库孵育时,使得靶核酸与结合在该靶核酸上的分子一起被亲合捕获。根据定义,本领域技术人员将理解结合在该靶核酸上的亲合标记物具有结合于固体载体上并使其能够捕获的互补配体 (complimentaryligand)。例如,可用的亲合标记物和互补伴侣 (complimentarypartners) 包括,但不限于,生物素- 抗生物素链菌素、互补核酸片段 (例如,寡聚 dT- 寡聚 dA、寡聚 T- 寡聚 A、寡聚 dG- 寡聚 dC、寡聚 G- 寡聚 C)、适体或半抗原,和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质。标记或可检测部分通常通过连接基团 (或连

接子, linker) 或化学结合共价地与待检测分子结合, 或通过离子、范德华力或氢键与待检测分子结合。

[0027] I. 鉴别反转录病毒增殖抑制剂的方法

[0028] 可以使用本文所述的方法鉴别病毒增殖(例如, 反转录病毒增殖)的抑制剂。可以通过下列方式抑制反转录病毒增殖, 例如,

[0029] a) 抑制反转录病毒的反转录,

[0030] b) 抑制宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子结合,

[0031] c) 抑制反转录病毒引物(人 tRNA^{Lys3})的病毒募集,

[0032] d) 抑制 HIV 病毒 RNA 向前体蛋白质的翻译, 和 / 或

[0033] e) 抑制 HIV 的最终包装和装配。

[0034] 以下讨论了这些用于鉴别反转录病毒增殖抑制剂的各种方法。

[0035] 鉴别反转录病毒的反转录的抑制剂

[0036] 一方面, 该方法可用于鉴别反转录病毒的反转录的抑制剂。另一方面, 该方法可用于鉴别 tRNA 与靶核酸分子结合的抑制剂。另一方面, 该方法可以容易地适用于高通量测定。转运 RNA(tRNA) 通过识别反转录病毒基因组上启动反转录的相应位点参与反转录。鉴别反转录的抑制剂可能会造成用于治疗宿主细胞反转录病毒感染的治疗性化合物的鉴别。

[0037] 该方法包括形成混合物, 其具有 tRNA 反密码子茎-环(ASL) 片段、能够与该 tRNA 片段结合的靶核酸分子、和测试化合物。一方面, 靶核酸分子对应于参与反转录的反转录病毒基因组的片段。所得的混合物在不存在该测试化合物而使得 tRNA 片段与靶核酸分子结合的情况下进行孵育。该方法还包括检测该测试化合物是否抑制 tRNA 片段与靶核酸结合, 其中 tRNA ASL 片段未与靶核酸分子结合表明该测试化合物为反转录病毒的反转录的抑制剂。一方面, 检测包括使用标记检测对 tRNA 片段与靶核酸分子结合的抑制。

[0038] 鉴别宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子结合抑制剂的方法

[0039] 另一方面, 该方法还可以用于鉴别 tRNA 与靶核酸分子结合的抑制剂。该方法包括形成混合物, 其包含宿主细胞 tRNAASL 片段、能与该 tRNA 片段结合的靶核酸分子和测试化合物。所得的混合物在不存在该测试化合物而使得 tRNA 片段与靶核酸结合的情况下进行孵育。该方法还包括检测该测试化合物是否抑制 tRNA 片段与靶核酸结合, 其中 tRNAASL 片段与靶核酸分子的结合表明该测试化合物是 tRNA 与靶核酸分子结合的抑制剂。一方面, 检测包括使用标记检测对 tRNA 片段与靶核酸分子结合的抑制。

[0040] 鉴别 HIV 反转录(RT) 复合物形成抑制剂的方法

[0041] 另一方面, 该方法可用于鉴别 HIV 反转录酶(RT) 复合物形成的抑制剂。该方法包括形成混合物, 其包含 tRNA ASL 片段、能够与 tRNA 片段结合的靶核酸分子和测试化合物。所得的混合物在不存在该测试化合物而使得 tRNA 片段与靶核酸结合的情况下进行孵育。该方法还包括检测该测试化合物是否抑制 tRNA 片段与靶核酸结合。一方面, 检测包括使用标记检测对 tRNA 片段与靶核酸分子结合的抑制, 其中该抑制表明该测试化合物能够抑制 RT 复合物的形成。

[0042] 另一方面, 该方法可以包括对测试化合物与 tRNA 片段或与靶核酸, 或与 tRNA 片段和靶核酸两者结合的检测。一方面, 测试化合物的结合表明该测试化合物是反转录病毒增殖、反转录病毒感染、反转录或 tRNA 结合的抑制剂。

[0043] 鉴别人 tRNA^{Lys3} 病毒募集抑制剂的方法

[0044] 在另一个方面,该方法可用于鉴别反转录病毒引物(人 tRNA^{Lys3})的 HIV 募集的抑制剂。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列,能与 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物,其中该靶核酸分子对应于参与反转录病毒引物募集的反转录病毒基因组的一部分。该混合物在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下进行孵育。然后,可以检测该测试化合物是否抑制 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合。tRNA^{ASL} 片段未与靶核酸分子结合表明该测试化合物是反转录病毒引物募集的抑制剂。

[0045] 鉴别病毒 RNA 翻译抑制剂的方法

[0046] 另一方面,提供了鉴别病毒 RNA 向病毒前体蛋白质翻译的抑制剂的方法。该方法包括形成混合物,其包含不能形成茎环的 tRNA 反密码子茎环片段的线性序列、能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的靶核酸分子、和测试化合物;在不存在该测试化合物而使得 tRNA 反密码子茎环片段与靶核酸分子结合的情况下孵育该混合物;和检测该测试化合物是否抑制 tRNA 片段与靶核酸分子结合,其中 tRNA^{ASL} 片段与靶核酸分子的结合表明该测试化合物是病毒 RNA 向病毒前体蛋白质翻译过程中 tRNA 募集的抑制剂。

[0047] 通过本文所公开的任何方法鉴别出的抑制剂可以通过抑制病毒生命周期的任何步骤来抑制反转录病毒感染,所述生命周期的任何步骤包括,但不限于,反转录、病毒装配、RT 复合物形成、反转录病毒引物(人 tRNA^{Lys3})的募集、病毒 RNA 向前体蛋白质的翻译和最终包装与装配。此外,所鉴别的抑制剂可以抑制反转录病毒感染、延缓感染或减慢感染进程。因此,使用抑制剂进行治疗的方法也旨在本发明的范围内。

[0048] II. 增殖可被抑制的反转录病毒

[0049] 可以通过本文所公开的方法鉴别出抑制剂的反转录病毒包括以 RNA 作为其主要遗传物质的任何病毒并使用反转录产生 DNA。该类病毒包括,但不限于,猫免疫缺陷病毒(FIV)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、禽白血病病毒、猫白血病病毒、大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒、人类嗜 T 淋巴细胞病毒和人类免疫缺陷病毒(HIV)。在优选的方面,该反转录病毒为 HIV。HIV 可以是 HIV 家族中的任意株、类型、亚型或变种。HIV 病毒包括,但不限于, HIV-I、HIV-II、HIV-III(也称为 HTLV-II、LAV-I、LAV-2)、其突变形式等。

[0050] HIV 的抑制剂对乙型肝炎病毒(HBV)也具有活性,并且可以在治疗和/或预防 HBV 感染的方法中使用,并且设计了用于该用途的药物组合物。

[0051] III. 可用于本文所述方法的 tRNA 片段

[0052] 在本文所述的筛选方法中使用的 tRNA 片段(或“工具 tRNA 片段(tool tRNA fragments)”)可以是来自任何 tRNA 的片段。以下化学式所说明的具体 tRNA 片段是本发明的另一方面,并且这些片段可以包含在本文所述的试剂盒中。

[0053] 在本发明所述方法中使用的 tRNA 片段(或“工具 tRNA 片段”)可以是来自任何 tRNA 的片段。该 tRNA 片段可以获得自,或来源于,或对应于 tRNA^{Ala}、tRNA^{Arg}、tRNA^{Asn}、tRNA^{Asp}、tRNA^{Cys}、tRNA^{Gln}、tRNA^{Glu}、tRNA^{Gly}、tRNA^{His}、tRNA^{Ile}、tRNA^{Leu}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Met}、tRNA^{Phe}、tRNA^{Pro}、tRNA^{Ser}、tRNA^{Thr}、tRNA^{Trp}、tRNA^{Tyr} 和 tRNA^{Val}。一方面,该 tRNA 片段对应于 tRNA^{Lys}。另一方面,该 tRNA 片段来源于或对应于 tRNA^{Lys} 反密码子茎环(ASL)。另一方面,该 tRNA 片段对应于人 tRNA^{Lys} 核苷酸 32-43 的片段。本文中所用的位置编号表示根据如 Sprinzl, et al. Nucl.

Acids. Res., 26, 148-153 (1998) 中所公开的常规 tRNA 编号的核苷酸位置编号。一方面, tRNA 片段是来自宿主细胞 (如哺乳动物宿主细胞, 其包括, 但不限于, 人类、猫和猿宿主细胞) tRNA 的片段。

[0054] tRNA 片段可以掺入一个或多个修饰的核苷。一方面, 该 tRNA 片段将 1 个、2 个、3 个或更多个修饰的核苷掺入核酸序列。另一方面, tRNA 片段将 3 个修饰的核苷掺入到 tRNA 片段核酸分子中。可以掺入到 tRNA 片段中的修饰的核苷包括任何修饰的核苷酸, 其包括, 但不限于, 未知的修饰的腺苷 (? A)、1- 甲基腺苷 (m1A)、2- 甲基腺苷 (m2A)、N⁶- 异戊烯基腺苷 (i6A)、2- 甲硫基 -N⁶- 异戊烯基腺苷 (ms2i6A)、N⁶- 甲基腺苷 (m6A)、N⁶- 苏氨酰基氨基甲酰基腺苷 (t6A)、N⁶- 甲基 -N⁶- 苏氨酰基氨基甲酰基腺苷 (m6t6A)、2- 甲硫基 -N⁶- 苏氨酰基氨基甲酰基腺苷 (ms2t6A)、2'- 0- 甲基腺苷 I 肌苷 (Am)、1- 甲基肌苷 Ar(p) 2'- 0- (5- 磷酸基) 腺嘌呤核糖苷 (m1I)、N⁶- (顺式 - 羟基异戊烯基) 腺苷 (io6A)、未知修饰的胞苷 (? C)、2- 巯基胞苷 (s2C)、2'- 0- 甲基胞苷 (Cm)、N⁴- 乙酰基胞苷 (ac4C)、5- 甲基胞苷 (m5C)、3- 甲基胞苷 (m3C)、赖西丁 (k2C)、5- 甲酰胞苷 (f5C)、2'- 0- 甲基 -5- 甲酰胞苷 (f5Cm)、未知修饰的鸟苷 (? G)、2'- 0- (5 磷酸基) 鸟嘌呤核糖苷 (Gr(p))、1- 甲基鸟苷 (m1G)、N²- 甲基鸟苷 (m2G)、2'- 0- 甲基鸟苷 (Gm)、N²N²- 二甲基鸟苷 (m22G)、N², N², 2'- 0- 三甲基鸟苷 (m22Gm)、7- 甲基鸟苷 (m7G)、古嘌呤 (archaeosine, fa7d7G)、Q 苷 (Q)、甘露糖基 -Q 苷 (manQ)、半乳糖基 -Q 苷 (galQ)、3- (3- 氨基 -3- 羧基 - 丙基) 尿苷 (wybutosine, yW)、过氧 3- (3- 氨基 -3- 羧基 - 丙基) 尿苷 (peroxywybutosine, 02yW)、未知修饰的尿苷 (? U)、5- 甲基氨基甲基尿苷 (mnm5U)、2- 巯基尿苷 (s2U)、2'- 0- 甲基尿苷 (Um)、4- 巯基尿苷 (s4U)、5- 氨基甲酰基甲基尿苷 (ncm5U)、5- 甲氧基羰基甲基尿苷 (mcm5U)、5 甲基氨基甲基 -2- 巯基尿苷 (mnm5s2U)、5- 甲氧基羰基甲基 -2- 巯基尿苷 (mcm5s2U)、尿苷 5- 羧乙酸 (cmo5U)、5- 甲氧基尿苷 (mo5U)、5- 羧基甲基氨基甲基尿苷 (cmnm5U)、5- 羧基甲基氨基甲基 -2- 巯基尿苷 (cmnm5s2U)、3- (3- 氨基 -3- 羧基丙基) 尿苷 (acp3U)、5 (羧基羟基甲基) 尿苷甲酯 (mchm5U)、5- 羧基甲基氨基甲基 -2'- 0- 甲基尿苷 (cmnm5Um)、5- 氨基甲酰基甲基 -2'- 0- 甲基尿苷 (ncm5Um)、二氢尿苷 (D)、假尿苷 (ψ)、1- 甲基假尿苷 (m1ψ)、2'- 0- 甲基假尿苷 (ψm)、胸腺嘧啶核糖核苷 (m5U)、5- 甲基 -2- 巯基尿苷 (m5s2U) 和 5, 2'- 0- 二甲基尿苷 (m5Um)。

[0055] 在优选的方面, 片段 tRNA 含有对应于 tRNA 反密码子茎环中的位置 34、37 和 39 的修饰的核酸。本文中所用的位置编号表示根据如 Sprinzl, et al. Nucl. Acids. Res., 26, 148-153 (1998) 中所公开的常规 tRNA 编号的核苷酸位置编号。一方面, 该 tRNA 片段包括具有序列 5' -GCUXUAYZCUG 的分子或由该分子组成, 其中 X、Y 和 Z 表示修饰或未修饰的核苷。一方面, X、Y 和 Z 表示修饰的核苷, 如 mnm5s2U、mcm5s2U、ms2t6A、s2U、ψ 和 t6A。另一方面, 该 tRNA 片段具有核酸序列 5' -CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(ψ)CUGC。另一方面, 该 tRNA 片段具有核酸序列 5' -GCU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(ψ)CUG。

[0056] tRNA 片段可以对应于通过直接或间接与反转录病毒基因组结合参与反转录病毒增殖的 tRNA 的任何部分。在优选的方面, tRNA 片段对应于该 tRNA 的反密码子茎环 (ASL)。

[0057] tRNA 片段可以对应于参与核苷酸结合 (如参与反转录 (RT) 复合物的形成) 的宿主细胞 tRNA 的任何部分。例如, tRNA 可以参与结合反转录病毒基因组以引发、启动或辅助反转录病毒基因组的反转录。一方面, 片段 tRNA 对应于任何 tRNA 的反密码子茎环的片段。

一方面,片段对应于来自 tRNA^{-lys} 反密码子茎环的片段。另一方面,tRNA 片段对应于来自人 tRNA^{-lys} 反密码子茎环的片段。另一方面,tRNA 片段对应于来自人 tRNA^{-lys} 的核苷酸 32-43 的片段。

[0058] tRNA 片段也可以为来自 tRNA 的任何长度的片段。一方面,tRNA 片段包含 tRNA 9-15 连续核苷酸片段、或 tRNA 10-14 连续核苷酸片段、或 tRNA 11-13 连续核苷酸片段。另一方面,该片段为 tRNA 的 8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 个连续核苷酸片段。另一方面,该片段为 tRNA 的 12 个连续核苷酸片段。

[0059] tRNA 片段能够或不能形成二级结构。一方面,tRNA 片段不能与自身形成茎环结构。另一方面,片段为不能与自身形成茎环结构的 tRNA 线性片段。

[0060] tRNA 片段也可以与其他核酸连接。例如,根据测定方法,tRNA 片段可以与一个或多个其他核酸连接。一方面,tRNA 片段可以与用于将该片段连接到固体载体表面的核苷酸连接。另一方面,片段 tRNA 在 tRNA 片段的一个或两个末端与其他核酸分子连接。另一方面,片段 tRNA 在两末端均与其他核酸分子连接。其他核酸序列可以为任何长度,优选长度为 8 至 16 个核苷酸、10 至 14 个核苷酸,更优选为 12 个核苷酸。一方面,末端序列不允许 tRNA 片段形成二级结构,如发卡环结构。

[0061] 靶核酸分子可以对应于任何核酸分子,如参与反转录病毒增殖或反转录病毒的反转录的 DNA 或 RNA 分子。一方面,靶核酸分子对应于能够与 tRNA 片段结合并参与反转录病毒增殖或反转录的任何核酸分子。另一方面,靶核酸分子对应于参与反转录病毒基因组反转录的核酸分子。另一方面,靶核酸分子对应于来自反转录病毒基因组的核糖核酸。另一方面,靶核酸分子对应于参与启动反转录病毒的反转录的核酸分子。

[0062] 靶核酸分子可以为任何长度并且可以包含整个反转录病毒基因组及其片段。一方面,靶核酸分子包含参与 tRNA 结合的反转录病毒基因组的任何片段,并且包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50 或更多个核苷酸的片段。另一方面,靶核酸与工具 tRNA 片段的长度大致相同或相同。

[0063] 另一方面,靶核酸分子对应于来自人类免疫缺陷性病毒 (HIV) 的核酸分子,如 HIV-1 或 HIV-2。另一方面,靶分子对应于 HIV-1。另一方面,靶核酸分子对应于参与启动 HIV 反转录的核酸分子。

[0064] 该类靶核酸分子可以来源于或对应于通过与宿主细胞 tRNA 结合或联合而参与反转录的 HIV 基因组的任何部分。一方面,靶核酸分子来源于或对应于 HIV 基因组的 5' 未翻译区域。另一方面,靶核酸分子对应于包含 HIV-1 的 5' 未翻译区域中 157 至 169 残基的片段。靶核酸序列可以与 tRNA 片段互补。一方面,靶核酸分子包含核酸序列 5' -GCGGUGUAAAAG。

[0065] 具体分离的 tRNA 片段

[0066] 一方面,分离的 tRNA 片段包含序列 5' -GCUXUAYZCUG,其中 X、Y 和 Z 表示修饰的核苷。

[0067] 代表性的修饰的核苷包括未知的修饰的腺苷 (? A)、I- 甲基腺苷 (m1A)、2- 甲基腺苷 (m2A)、N⁶- 异戊烯基腺苷 (i6A)、2- 甲硫基 -N⁶- 异戊烯基腺苷 (ms2i6A)、N⁶- 甲基腺苷 (m6A)、N⁶- 苏氨酰基氨甲酰基腺苷 (t6A)、N⁶- 甲基 -N⁶- 苏氨酰基氨甲酰基腺苷 (m6t6A)、2- 甲硫基 -N⁶- 苏氨酰基氨甲酰基腺苷 (ms2t6A)、2' -O- 甲基腺苷 I 肌苷 (Am)、1- 甲基

肌苷 Ar(p) 2' -O-(5-磷酸基)腺嘌呤核糖苷 (m1I)、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷 (io6A)、未知修饰的胞苷 (? C)、2-巯基胞苷 (s2C)、2' -O-甲基胞苷 (Cm)、N4-乙酰基胞苷 (ac4C)、5-甲基胞苷 (m5C)、3-甲基胞苷 (m3C)、赖西丁 (k2C)、5-甲酰胞苷 (f5C)、2' -O-甲基-5-甲酰胞苷 (f5Cm)、未知修饰的鸟苷 (? G)、2' -O-(5-磷酸基)鸟嘌呤核糖苷 (Gr(p))、1-甲基鸟苷 (m1G)、N²-甲基鸟苷 (m2G)、2' -O-甲基鸟苷 (Gm)、N²N²-二甲基鸟苷 (m22G)、N², N², 2' -O-三甲基鸟苷 (m22Gm)、7-甲基鸟苷 (m7G)、古嘌呤 (fa7d7G)、Q 苷 (Q)、甘露糖基-Q 苷 (manQ)、半乳糖基-Q 苷 (galQ)、3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷 (yW)、过氧 3-(3-氨基-3-羧基-丙基)尿苷 (02yW)、未知修饰的尿苷 (? U)、5-甲基氨基甲基尿苷 (mnm5U)、2-巯基尿苷 (s2U)、2' -O-甲基尿苷 (Um)、4-巯基尿苷 (s4U)、5-氨甲酰基甲基尿苷 (ncm5U)、5-甲氧基羰基甲基尿苷 (mcm5U)、5-甲基氨基甲基-2-巯基尿苷 (mnm5s2U)、5-甲氧基羰基甲基-2-巯基尿苷 (mcm5s2U)、尿苷 5-羧乙酸 (cmo5U)、5-甲氧基尿苷 (mo5U)、5-羧基甲基氨基甲基尿苷 (cmnm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2-巯基尿苷 (cmnm5s2U)、3-(3-氨基-3-羧基丙基)尿苷 (acp3U)、5-(羧基羟基甲基)尿苷甲酯 (mchm5U)、5-羧基甲基氨基甲基-2' -O-甲基尿苷 (cmnm5Um)、5-氨甲酰基甲基-2' -O-甲基尿苷 (ncm5Um)、二氢尿苷 (D)、假尿苷 (ψ)、1-甲基假尿苷 (m1ψ)、2' -O-甲基假尿苷 (ψm)、胸腺嘧啶核糖核苷 (m5U)、5-甲基-2-巯基尿苷 (m5s2U) 和 5, 2' -O-二甲基尿苷 (m5Um)。

[0068] 在一种实施方式中,该修饰的核苷为 mnm5s2U、mcm5s2U、ms2t6A、s2U、ψ 或 t6A。

[0069] 一个具体的 tRNA 片段包含核酸序列 5' -CU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(' 1') CUGC。

[0070] 另一个具体的 tRNA 片段包括核酸序列 5' -GCU(mnm5s2U)UU(ms2t6A)A(' 1') CUG。

[0071] 任何这些 tRNA 片段还可包含标记。该标记可以直接地或间接地通过分光光度法、光化学法、生物化学法、免疫化学法或化学方法进行检测。

[0072] 代表性标记包括放射性同位素(例如,³²P、³⁵S 和 ³H)、染料、荧光染料(例如,Cy5 和 Cy3)、荧光团(例如,萤光素)、电子致密试剂、酶和它们的底物(例如,酶联免疫测定中常用的,如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶)、生物素-抗生蛋白链菌素、地高辛或半抗原;和可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质。该标记还可以是“亲和标记物”。

[0073] 在标记包含亲合标记物的情况下,可以用结合于固体载体使得能够捕获亲和标记物标记的 tRNA 片段的互补配体来捕获该分离的 tRNA 片段。代表性的亲合标记物和互补伴侣包括生物素-抗生蛋白链菌素、互补的核酸片段(例如,寡聚 dT-寡聚 dA、寡聚 T-寡聚 A、寡聚 dG-寡聚 dC、寡聚 G-寡聚 C)、适体、或半抗原以及可用于抗血清或单克隆抗体的蛋白质。

[0074] 当生物相互作用使珠聚集在一起时,级联化学反应起作用以产生大幅放大的信号。经激光激发,“供体”珠中的光敏剂将环境中的氧转换为更加激发的单线态。单线态氧分子四处扩散以与受体珠中的二甲基噻吩衍生物反应从而在 370nm 处产生化学发光,其进一步活化包含在相同珠中的荧光团。该荧光团随后在 520-620nm 处发光。

[0075] 在可商购的 α 珠的一个实施例中,供体珠包含生物素或直接与 RNA 结合。受体珠包含 His6 标记物、血球凝集素(HA)、地高辛/地高新配基(DIG)或萤光素(FITC)。

[0076] IV. 产生分离的核糖核苷酸的合成方法

[0077] 用于制备具有特定序列或含有特定酸碱基、糖、核苷间键合、化学部分以及其他成分和特征的核酸的各种方法在本领域中是已知的。这些方法中的任何一个或任何组合可用于制备本发明的核酸、多核苷酸或寡核苷酸。所述方法包括,但不限于:(1) 化学合成(通常,但不总是,使用核酸合成仪器);(2) 合成后化学修饰或衍生化;(3) 在核酸克隆载体中克隆天然存在的或合成的核酸(例如,参见 Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Approach 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989),所述载体如,但不限于,质粒、噬菌体(例如, mB 或 λ)、噬菌粒、粘粒、F 粘粒(fosmid)、YAC 或 BAC 克隆载体,包括产生单链 DNA 的载体;(4) 使用具有 DNA 模板依赖性 DNA 聚合酶活力的酶进行引物延伸,所述的酶如,但不限于, klenow、T4、T7、rBst、Taq、Tfl 或 Tth DNA 聚合酶,包括突变的、截短的(例如,外-负(exo-minus))或该类酶的化学修饰形式;(5) PCR(例如,参见 Dieffenbach, C.W., and Dveksler, eds., PCR Primer: A Laboratory Manual, 1995, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.);(6) 使用具有反转录酶活力的酶进行反转录(包括等温合成和 RT-PCR),所述的酶如,但不限于,来源于禽类成髓细胞瘤病毒(AMV)、莫洛尼鼠白血病毒(MMLV)、嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus, rBst)、嗜热栖热菌(thermosthermophilus, Tth)的反转录酶;(7) 使用具有 RNA 聚合酶活力的酶进行体外转录,所述的酶如,但不限于, SP6、T3 或 T7 RNA 聚合酶、Tth RNA 聚合酶、大肠杆菌 RNA 聚合酶或另一种酶;(8) 限制性酶和/或修饰酶的使用,包括,但不限于,核酸外切酶或核酸内切酶、激酶、连接酶、磷酸酶、甲基酶、糖基化酶、末端转移酶,包括包含用于在核酸中进行特定修饰的该类修饰酶和其他试剂的试剂盒;(9) 使用多核苷酸磷酸化酶制备新的随机化核酸;(10) 其他组合物,如,但不限于,连接 RNA 分子的核糖酶连接酶;和/或(11) 任何上述内容的任何组合或本领域已知的其他技术。可商购获得寡核苷酸和多核苷酸,包含具有非天然存在的碱基、糖和核苷间连接的嵌合(即复合)分子和寡核苷酸(例如,参见 2000 Product and Service Catalog, TriLink Biotechnologies, San Diego, Calif., USA)。

[0078] tRNA 片段或靶核酸,或 tRNA 片段和靶核酸两者均可以被可检测地标记以便于检测。在优选的方面,用荧光团标记 tRNA 片段以便于检测。另一方面,用生物素标记靶核酸分子以便于检测。在另一优选的方面,用荧光团标记 tRNA 片段并且用生物素标记靶核酸分子。

[0079] 可以在,例如,5' 末端、3' - 末端或 5' - 末端和 3' 末端的组合处标记 tRNA 片段和靶核酸分子以便于检测。另外,也可以标记测试化合物。在另一实施方式中, tRNA 片段和靶核酸分子可以具有连接至该分子内部位置的可检测标记以便于检测。

[0080] V. 检测靶 RNA 与 tRNA 结合(或对其抑制)的方法

[0081] 可以通过使用用于该检测的任何方法来执行检测靶 RNA 与 tRNA 结合或对该结合抑制的方法。例如, **AlphaScreen®** 测定(Packard Instrument Company, Meriden, Conn.)。 **AlphaScreen®** 技术是利用含有光敏剂(供体珠)或化学发光基团和荧光受体分子(受体珠)的乳胶微珠(250nm 直径)的“扩增发光接近均相测定法(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)”。在用 680nm 的激光照射后,供体珠中的光敏剂将环境中的氧转换为单线态氧。在快速衰减前,激发的单线态氧分子约扩散 250nm(一

个珠直径)。如果受体珠与供体珠的位置紧密接近(即,依靠靶 RNA 和 tRNA 片段的相互作用),则单线态氧分子与受体珠上的化学发光基团反应,其立即将能量传递给同一珠上的荧光受体。这些荧光受体将发射波长迁移至 520-620nm,从而得到可检测信号。靶 RNA 与 tRNA 片段间相互作用的拮抗剂将因此抑制发射波长的迁移,而该相互作用的增效剂(或激动剂, agonists) 将会提高该迁移。

[0082] 可以通过以任何顺序或同时混合组分核苷酸(例如,工具 tRNA 和靶 RNA) 和测试化合物来执行所公开的方法。例如,靶 RNA 可以首先与测试化合物结合以形成第一混合物,然后可以加入工具 tRNA 片段以形成第二混合物。在另一实施例中,靶 RNA、工具 tRNA 和测试化合物均可以在孵育前同时混合。一方面,在不存在该测试化合物而使得 tRNA 片段与靶核酸结合的条件下孵育所述混合物。

[0083] 可以使用抑制检测可用的任何方法用测试化合物检测对 tRNA 片段与靶核酸分子结合的抑制。一方面,可以使用以下方法执行确定步骤,所述方法包括,但不限于,凝胶迁移测定、化学和酶印记法、圆二色和核磁共振光谱法、平衡透析或以探针或测试化合物组合文库中常规使用的任何结合检测机制。结合的抑制表明该测试化合物可以用于抑制宿主中病毒的增殖。

[0084] VI. 评价化合物抑制结合的能力

[0085] 可以使用本文中所述的方法测试任何化合物以鉴别能够抑制反转录病毒增殖的化合物。可以用本发明方法筛选出的测试化合物包括,但不限于,多肽、 β -转角模拟物(beta-turn mimetics)、多糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、芳族化合物、杂环化合物、苯(并)二氮卓类、寡聚 N-取代甘氨酸、寡聚氨基甲酸酯、多肽、糖类、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或它们的组合。一些测试化合物为合成分子,而其它的为天然分子。

[0086] 可以从包含合成或天然化合物文库的多种来源获得测试化合物。可以对可以通过逐步方式合成的多种类型化合物产生组合文库(combinatorial library)。通过 WO 95/12608、WO 93/06121、WO94/08051、WO 95/35503 和 WO 95/30642 中所述的编码合成文库(ESL)方法,可以构建大型化合物组合文库。也可以通过噬菌体展示方法(参见,例如,Devlin, WO 91/18980) 生产肽文库。可以从商业来源获得或从野外采集以细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库。已知的药理学试剂可以经受定向或随机的化学修饰,如酰化作用、烷化作用、酯化作用、酰胺化作用(amidification)以产生结构类似物。

[0087] 肽或其他化合物的组合文库可以完全随机化,它在任何位置没有序列偏好或恒定序列。可替代地,文库可以是有偏向性的,例如,序列内的一些位置保持不变,或选自有限数目的可能性。例如,一些情况下,核苷酸或氨基酸残基在限定的种类内,例如,疏水性氨基酸、亲水性残基、空间偏向(小或大)残基,对于交联,向产生半胱氨酸的方向,对于 SH-3 域,向产生脯氨酸的方向随机化,对于磷酸化作用位点,向产生丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或组氨酸的方向随机化,或向产生嘌呤的方向随机化。

[0088] 另一方面,测试化合物可以是天然存在的蛋白质或它们的片段。该类测试化合物可以从天然来源获得,例如,细胞或组织的溶胞产物。也可以制备多肽试剂文库,例如,从可商购的或用常规方法产生的 cDNA 文库制备。测试化合物也可以是肽,例如,约 5 至约 30 个氨基酸的肽,优选约 5 至约 20 个氨基酸的肽,特别优选约 7 至约 15 个氨基酸的肽。肽可以是天然存在的蛋白质的消化物、随机肽或“偏向”的随机肽。一些方法中,测试化合物为多

肽或蛋白质。

[0089] 另一方面,测试化合物可以是核酸。核酸测试化合物可以是天然存在的核酸、随机核酸、或“偏向”的随机核酸。例如,原核或真核基因组的消化物可以如上述用于蛋白质的方法相似地使用。

[0090] 在一些优选的方法中,测试化合物为小分子,例如,分子量不超过约 500 或 1000 的分子。优选地,调整高通量测定并用于筛选该类小分子。在一些方法中,可以容易地使用如上所述的小分子测试化合物组合文库以筛选反转录病毒增殖的小分子调节剂。多种测定对该类筛选有效,例如,如 Schultz et al. *Bioorg Med Chem Lett* 8:2409-2414, 1998; Weller et al., *Mol Divers* 3:61-70, 1997; Fernandes et al., *Curr Opin Chem Biol* 2:597-603, 1998 和 Sittampalam et al., *Curr Opin Chem Biol* 1:384-91, 1997 中所述的。

[0091] 本发明的方法还可以适用于筛选反转录病毒增殖抑制剂(如反转录酶抑制剂)的高通量测定。该类高通量(HTS)测定可以包括将 tRNA 片段或靶核酸分子连接或结合至固体载体上。“固体载体”可以是分子通过共价或非共价键可以连接的任何表面。这包括,但不限于,膜、塑料、磁性珠、带电纸、尼龙、朗缪尔-布洛杰特膜(Langmuir-Bodgett film)、功能化玻璃、锗、硅、PTFE、聚苯乙烯、砷化镓、金和银。还考虑了本领域已知的能够将下列官能团掺入至其表面上的任何其他材料,所述官能团如氨基、羧基、巯基或羟基。这包括具有任何拓扑结构的表面,其包括,但不限于,球面和凹槽表面。HTS 方法一般指能够,例如,通过抑制 tRNA 片段与靶核酸分子结合从而快速测定测试化合物的治疗潜能的技术。HTS 技术采用测试材料的机器处理、阳性信号检测以及数据解释。可以通过使用放射性或通过依赖于吸光度、荧光或发光性作为读数的光学测定经检测是否发光来鉴别测试化合物。Gonzalez, J. E. et al., (1998) *Curr Opin Biotech* 9:624-631.。

[0092] 本发明还包括用于本发明方法的试剂盒和组合物(例如,反应混合物等)。试剂盒是可用于或足以执行本发明方法的一步或多步步骤的各个组合物的组合,其中为了在该方法中一同使用,对组合物进行了优化。组合物包括用于本发明方法中至少一步的各个组分。本发明还提供了用于筛选反转录病毒的反转录抑制剂的试剂盒,其包括:tRNA 反密码子茎环片段的线性序列和用于检测与靶序列结合的试剂,如标记。在一些实施方式中,试剂盒还包括能够与 tRNA 反密码子茎环片段结合的一种或多种靶核酸分子。在一些实施方式中,试剂盒还包括执行筛选方法的其他试剂。在一些实施方式中,试剂盒还包括反转录病毒的反转录的多种抑制剂。在一些实施方式中,试剂包括与核酸结合后经历荧光增强的染料(例如,该染料为 RIBOGREEN、SYBR Gold、SYBR Green I 或 SYBER Green II)。在一些实施方式中,试剂盒还包括对照试剂(例如,阳性对照的样品聚合酶和/或抑制剂,阴性对照的聚合酶和/或抑制剂负样品(inhibitor minus samples)等)。在一些实施方式中,试剂盒还包括说明执行该方法的说明书。在一些实施方式中,该说明书包含在协助用户获得、分析、显示和/或存储该方法结果的计算机软件中。该软件还可以包含与科学仪器(例如,检测仪器)等集成的样品信息管理说明书。

[0093] VII. 鉴别抑制剂的试剂盒

[0094] 还提供了用于鉴别本文所述各种过程的抑制剂的试剂盒,所述抑制剂即反转录病毒增殖、反转录病毒的反转录、与宿主细胞 tRNA 和靶核酸分子结合、病毒 RNA 翻译和最终病毒包装与装配的抑制剂。

[0095] 一方面,该试剂盒包含如本文所述的 tRNA 片段和能够与该 tRNA 片段结合的核酸分子。本发明的试剂盒还可以包含靶核酸序列和 / 或用于进行测定的试剂。该试剂盒还可以包含用于检测测试化合物是否抑制片段 tRNA 与核酸分子结合的标记组分。

[0096] VIII. 治疗方法

[0097] 如本文所公开的,例如,在以下实施例中,已经鉴别了能够抑制病毒增殖的几种化合物。可以通过抑制反转录病毒的反转录、翻译中所用的反转录病毒引物 (人 tRNA^{Lys3}) 的病毒募集、抑制新病毒体的最终包装与装配和 / 或抑制宿主细胞 tRNA 与靶核酸分子结合来抑制反转录病毒增殖。

[0098] 因此,这些化合物可以在治疗患有反转录病毒感染的患者的方法中使用。也就是说,可以通过给予一种或多种反转录病毒增殖抑制剂来治疗或预防反转录病毒的病毒感染,所述反转录病毒增殖抑制剂例如,反转录病毒的反转录抑制剂、结合宿主细胞 tRNA 和靶核酸分子的抑制剂、反转录病毒引物 (人 tRNA^{Lys3}) 募集抑制剂、病毒 RNA 向病毒蛋白质翻译的抑制剂以及病毒体最终病毒包装与装配的抑制剂。迄今为止,还没有使用该类抑制剂完成病毒疾病的治疗。

[0099] 该类化合物可用于治疗或预防病毒感染 (包括反转录病毒感染) 和 / 或抑制病毒复制、增殖、反转录、mRNA 翻译和 / 或最终病毒包装与装配。可以通过本文所公开的方法鉴别出抑制剂的反转录病毒包括以 RNA 作为其主要遗传物质的任何病毒并使用反转录产生 DNA。该类病毒包括,但不限于,猫免疫缺陷病毒 (FIV)、猿免疫缺陷病毒 (SIV)、禽白血病病毒、猫白血病病毒、大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒、人类嗜 T 淋巴细胞病毒和人类免疫缺陷病毒 (HIV)。在优选的方面,反转录病毒为 HIV。HIV 可以是 HIV 家族中的任何株、类型、亚型或变种。HIV 病毒包括,但不限于, HIV-I、HIV-II、HIV-III (也称为 HTLV-II、LAV-I、LAV-2) 等。

[0100] 该类化合物还可以结合现有的治疗方法在处理上述病毒感染类型中作为辅助疗法使用。在该类情况下,优选地以对病毒 (包括突变的、多种药物抗性病毒) 作用最优化而对正常细胞类型作用最小的方式向患者给予活性成分。尽管这主要是依靠化合物本身的作用完成的,但这也可以通过靶向施药和 / 或通过调节剂量来完成,从而在未达到出现显著副作用的阈值剂量而获得所需效果。

[0101] IX. 药物组合物

[0102] 可以将如本文所述的抑制性化合物掺入药物组合物并用于治疗或预防病毒感染,如反转录病毒感染。本文所述的药物组合物包括如本文所述的抑制性化合物和药物可用载体和 / 或赋形剂。

[0103] 该类化合物的给予方式可以是不同的。优选地,该类组合物为口服给予 (例如,以液体形式包含在如水性或非水液体的溶剂中,或包含在固体载体中)。口服给予的优选组合物包括丸剂、片剂、胶囊、囊片、糖浆和溶液,包括硬胶囊和定时释放胶囊。可以将组合物配制为单位剂量形式,或多个或亚单位剂量。优选的组合物为液态或半固态形式。可以使用包含液体药物惰性载体 (如水或其他药物相容的液体或半固体) 的组合物。本领域的技术人员熟知该类液体和半固体的使用。

[0104] 也可以通过注射,即静脉内注射、肌肉注射、皮下注射、腹膜内注射、动脉内注射、鞘内注射和脑室内注射给予该类组合物。静脉内给予为优选的注射方法。本领域那些技术

人员熟知用于注射的适合载液,其包括 5% 的右旋糖溶液、盐水和磷酸盐缓冲盐水。还可以作为输注液或注射液给予该类化合物(例如,作为悬浮液或作为药物可用液体或液体混合物中的乳状液)。

[0105] 还可以使用其他方法给予该类剂型,例如,直肠给予。本领域那些技术人员熟知用于直肠给予的剂型,如栓剂。也可以通过吸入法给予该类化合物(例如,以鼻腔气雾剂的形式或使用授权 Brooks 等人的美国专利 No. 4922901 中所述输送物件类型的气雾剂形式,该专利公开整体并入本文);局部给予(例如,以洗液的形式);或经皮给予(例如,使用皮肤贴,使用可商购自 Novartis and Alza Corporation 的技术)。尽管可能以散装活性化学品的形式给予该类化合物,但是为了高效和有效给予,每种化合物优选地以药物组合物或剂型的形式存在。

[0106] 对于熟练的技术人员来说,给予该类化合物的示例性方法将是显而易见的。这些剂型的有用性可以取决于所用的特定组合物和接受治疗的特定受试者。这些剂型可以包含油性的、水性的、乳化的液体载体或包含适合给予模式的某些溶剂。

[0107] 可以间歇地,或以逐步、连续、恒定或受控的速率向恒温动物(例如,哺乳动物,如小鼠、大鼠、猫、兔、狗、猪、牛或猴)给予该类组合物,但有利地将该类组合物给予人类。另外,药物剂型给予的天数以及每天给予的次数可以是不同的。

[0108] 优选地,给予该类组合物从而使活性成分与病毒感染区域相互作用。本文所述的化合物对治疗这些病毒感染非常有效。

[0109] 在某些情况下,本文所述的化合物可以作为药物组合物的一部分与设计用于预防或治疗特定病毒感染的其他化合物一同使用,即组合治疗。除本文所述的有效量的化合物之外,该类药物组合物还可以包含作为添加剂或辅助剂的各种其他组分。

[0110] 组合治疗

[0111] 可以以下列方式给予组合治疗,(a) 作为单一药物组合物,其包含如本文所述的抑制性化合物、本文所述的至少一种其他药物试剂和药物可用的赋形剂、稀释剂或载体;或(b) 作为两种不同的药物组合物,其包含(i) 第一组合物,其包含如本文所述的抑制性化合物和药物可用的赋形剂、稀释剂或载体,和(ii) 第二组合物,其包含本文所述的至少一种其他药物试剂和药物可用的赋形剂、稀释剂或载体。可以同时或以任何顺序顺次给予该类药物组合物。

[0112] 在治疗或预防病毒疾病中使用, (一种或多种) 抑制性化合物可以与作为单一药物组合物一部分的至少一种其他抗病毒试剂一同给予。可替代地,它可以不与其他抗病毒试剂一同给予。在该实施方式中,基本上同时给予抑制性化合物和至少一种其他抗病毒试剂,即同时或相继给予该类化合物,只要该类化合物在血液中达到治疗水平一段时间。

[0113] 组合治疗包括结合至少一种抗病毒试剂一同给予如本文所述的抑制性化合物,或该抑制性化合物的药物可用盐或药物前体,理想地,所述至少一种抗病毒试剂通过不同于本文所述的病毒增殖抑制剂的机制起作用。

[0114] 代表性抗病毒试剂

[0115] 可用于组合治疗的一些抗病毒试剂包括干扰病毒渗入靶细胞能力的试剂。病毒必须经历一系列步骤来进行该过程,其开始于与宿主细胞表面上的特异“受体”分子结合,而结束于病毒在细胞内部“脱壳”并释放其内容物。在可以脱壳之前,具有脂包膜的病毒还必

须将它们的包膜与靶细胞融合,或与将它们运送入细胞的囊融合。

[0116] 抑制病毒复制这一阶段的活性剂有两种类型。一种类型包括模拟病毒相关蛋白质(VAP)并与细胞受体结合的试剂,其包括 VAP 抗个体基因型抗体、受体的天然配体和抗受体抗体、受体抗个体基因型抗体、外源受体和合成受体模拟物。另一种类型包括抑制病毒进入的试剂,例如,在病毒附着并进入宿主细胞时,抑制病毒进入。例如,正在开发用于抗 HIV 的多种“进入-抑制”或“进入-阻断”药物,其靶向称为“辅助性 T 细胞”的免疫系统白血球并通过表示为“CRX4”和“CCR5”的 T 细胞表面受体鉴别这些靶细胞。因此,如金刚烷胺和金刚乙胺的 CRX4 和 CCR5 受体抑制剂可用于抑制病毒感染,如 HIV、流感、乙肝和丙肝病毒感染。另一种进入-阻断剂为普来可那立(pleconaril),其通过阻断控制脱壳过程的病毒表面上的袋(pocket)来抵抗导致感冒的鼻病毒。

[0117] 可以结合本文所述的抑制性化合物使用的其他抗病毒试剂包括在病毒侵入细胞后干扰合成病毒组分的病毒过程的试剂。代表性试剂包括核苷酸和核苷类似物,其类似 RNA 或 DNA 的结构单元,但一旦掺入该类似物后会使合成 RNA 或 DNA 的酶失活。阿昔洛韦是核苷类似物并对疱疹病毒感染有效。还可以使用齐多夫定(AZT)、3TC、FTC 和其他核苷反转录酶抑制剂(NRTI)以及非核苷反转录酶抑制剂(NNRTI)。也可以使用整合酶抑制剂。

[0118] 一旦病毒基因组开始在宿主细胞中运行,那么它将产生指导病毒蛋白质合成的信使 RNA(mRNA)分子。mRNA 的产生由被称为转录因子的蛋白质引发,并且某些活性剂阻断了转录因子与病毒 DNA 的连接。

[0119] 其他活性剂包括反义寡核苷酸和核糖酶(在选中的位点将病毒 RNA 或 DNA 切开的酶)。

[0120] 如 HIV 的一些病毒包含蛋白酶酶类,其切割病毒蛋白质链从而使它们可以装配为最终的构形。蛋白酶抑制剂是另一类抗病毒试剂,其可以结合本文所述的抑制性化合物使用。

[0121] 病毒生命周期中的最后阶段为从宿主细胞中释放完整的病毒。如扎那米韦(Relenza)和奥塞米韦(Tamiflu)的一些活性剂通过阻断位于流感病毒表面上的名为神经氨酸酶的分子来阻止病毒颗粒的释放从而治疗流感。

[0122] 其他的活性剂通过刺激患者的免疫系统起作用。包括聚乙二醇干扰素在内的干扰素是这一类中的代表性化合物。干扰素 α 用于,例如,治疗乙型肝炎和丙型肝炎。包括单克隆抗体在内的多种抗体也可以用于靶向病毒。

[0123] 任何上述化合物可以与本文所述的抑制剂一同用于组合治疗。

[0124] 化合物的适当剂量为有效预防疾病症状发生或治疗病人所患疾病的一些症状的量。“有效量”、“治疗量”或“有效剂量”表示足以获得所需的药理学或治疗效果并因此疾病得到有效预防或治疗的量。

[0125] 治疗病毒感染时,抑制性化合物的有效量为足以抑制病毒生长和增殖的量。可以通过以预防方式给予本文所述的化合物在一开始时或从复发时预防病毒感染。优选地,有效量为足以获得所需结果但不足以产生明显副作用的量。

[0126] 根据如患者状况、病毒感染严重程度和药物组合物的给予方式等因素,有效剂量可以是不同的。对于不同的患者,化合物的有效剂量当然也将不同,但是一般说来,有效剂量在产生所需治疗效果的量之上而在观察到显著副作用的量之下。

[0127] 当根据本文所述方法以有效量使用时,化合物对抑制某些病毒的增殖有效而不显著影响正常细胞。

[0128] 对于人类患者,典型化合物的有效剂量通常需要以至少约 1 μ g/24 小时 / 患者的量给予,通常以至少约 10 μ g/24 小时 / 患者的量给予,并且经常以至少约 25 μ g/24 小时 / 患者的量给予。有效剂量通常不超过约 500 μ g/24 小时 / 患者,通常不超过约 400 μ g/24 小时 / 患者,并且经常不超过约 300 μ g/24 小时 / 患者。另外,给予有效剂量从而使得患者血浆中的化合物浓度一般不超过 500ng/ml 并且经常不超过 100ng/ml。

[0129] 本发明将通过以下示例性实施例进一步进行解释,这些实施例不旨在进行限制。

[0130] 实施例

[0131] 实施例 I 线性 tRNA 反密码子茎环序列的合成

[0132] 产生片段 tRNA 反密码子茎环 (ASL) 序列的第一步为合成修饰的核苷酸,也称为亚磷酰胺 (Agris et.al Biochimie. (1995) 77 (1-2) :125-34)。然后,在 RNA 寡聚物合成时使用该修饰的核苷酸 (Ogilvie et.al.Proc Natl Acad Sci USA. (1988) 85 :5764-8)。合成方法克服了获得足够量天然产品用于功能性表征研究的基本阻碍。除提供用于表征片段 tRNA :靶核苷酸结合的完全修饰的 ASL 外,该合成方法使得能够制备修饰材料的中间步骤 / 形式,其可以进一步阐明每个修饰步骤在提高 tRNA 结合中各自的贡献。

[0133] 使用合成、掺入和纯化 ASL^{Lys3} 人 tRNA 中所发现的所有修饰的核苷酸的方法组合制备了修饰的碱基核酸分子。使用如 Ogilvie et.al., 1988 中公开的那些已知的方法制备了修饰的碱基亚磷酰胺。ASL^{Lys3} 含有表示为 mcm5s2U、ms2t6A 和假尿苷的 3 个修饰的碱基。以下详细说明了制备合成模拟物所需的磷酰胺的合成。聚合物合成方案遵循为自动 RNA 合成 (Ogilvie et.al, 1988) 所开发的那些方法,并针对下述 ASL^{Lys3} 模拟物的合成做出改变。该说明包括自动合成所需的保护基团的除去方法和测定中使用的最终产品的纯化方法。

[0134] 接着在合成 RNA 寡聚物之后除去保护基。说明了向每个修饰的碱基和核糖中加入保护基团。尽管在标准 RNA 合成方案中 2 位的硫 - 基团可以被氧化,但这已经通过使用过氧化氢叔丁酯 (10% 的乙腈溶液) 氧化剂 (Kumar and Davis, 1997) 得到克服。这些合成的 RNA 寡聚物已用于功能 (Yarian 2002 和 Phelps 2004) 和结构研究 (Stuart 2000 和 Murphy 2004)。

[0135] 实施例 IA :保护的单体亚磷酰胺 mcm5s2U 的合成

[0136] 按照公开的方法 (Reese 和 Sanghvi 1984) 制备了 mcm5s2U 核苷。简要地,将 2 硫尿核苷与均为 5 摩尔当量的吡咯烷和甲醛水溶液回流加热 1 小时从而得到 2', 3' -O 异亚丙基 -5- 吡咯烷甲基 -2- 硫尿核苷。随后,在室温下用 10 摩尔当量的甲基碘乙腈溶液处理该碱基。16 小时后,减压浓缩该产物以得到推定的甲碘化物,然后将该甲碘化物溶于乙腈并使其与 3 摩尔当量的甘氨酸叔丁酯在室温下反应 16 小时。然后,纯化该产物并按照如下所述的常规方案保护核糖和亚磷酰化 (phosphitylation)。

[0137] ms2t6A

[0138] 在消除氨基酸外消旋的情况下,通过 ms2A 的 2', 3', 5' -O- 三乙酰衍生物与来源于 L- 苏氨酸 -O- 叔 - 丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS) - 对硝基苯乙基酯的异氰酸酯之间的缩合反应获得该单体。选择性地对该产物的糖基部分脱保护。采用标准程序,分别用二甲氧三苯甲基 (DMTr) 和 TBDMS 基团对 5' -O- 和 2' -O- 官能进行最终保护,以及进行

3' -O- 亚磷酸化 (Agris et al.1995)。

[0139] S2U

[0140] 在这一合成中,硫基基团不被保护。核糖和亚磷酸化的保护遵循图 1 中部分 C 的常规方案。核糖和亚磷酸化的保护遵循下述常规方案。

[0141] 从 1-O- 乙酰 -2,3,5- 三 -O- 苯甲酰呋喃核糖合成了 t6A 核苷的糖 - 保护的氨基甲酸苯酯 6。使用 Hong 和 Chheda 提出的方法,用 L- 苏氨酸处理氨基甲酸酯以提供糖 - 保护的 t6A 核苷。剩余的合成变换遵循下述的常规方案。

[0142] 实施例 IB :核糖保护和亚磷酸化的一般步骤。

[0143] 提供了在合成 RNA 寡聚物之前用于保护修饰的核苷酸碱基的方法 (图 1)。图 1 的部分 A 示出了用三氟乙酸进行保护。部分 B 示出了用苯甲酰基的保护,而部分 C 示出了核糖羟基基团的常规保护。

[0144] 碱基保护后,对于两种修饰的核苷酸来说,5' -O-(4,4' - 二甲氧三苯甲基)-2' -O- 叔丁基二甲基甲硅烷基 - 修饰的核糖核苷 -3' -O-(2- 氰基乙基 -N- 二异丙基)亚磷酸胺的合成方法是相同的 (图 1,部分 C)。通过与吡啶进行两次共蒸发对保护的核苷进行干燥并溶于吡啶。加入叔 - 丁基二甲基氯硅烷和咪唑并在室温下反应 4 小时。用水和二氯甲烷分解过量的甲硅烷基氯。用二氯甲烷萃取水层两次,并与有机层合并。真空蒸发溶剂得到胶状物,随后将其溶于醚并在搅拌的情况下通过缓慢倒入石油醚 (40-60°C) 进行沉淀。收集沉淀物并用石油醚清洗两次。此时,粗产物含有三种成分;2',3' 二甲硅烷基化的、2' 甲硅烷基化的 (主要产物) 和 3' 甲硅烷基化的异构体。用硅胶柱色谱法纯化出纯 2' 保护的异构体。然后,该产物准备在亚磷酸化中使用。

[0145] 通过与无水吡啶和 THF 进行两次共蒸发使 N- 保护 -5' -O- 二甲氧三苯甲基 -2' -O- 叔 - 丁基二甲基甲硅烷基核糖核苷干燥。然后在氩气下将残余物溶于无水 THF。通过橡胶隔片加入二甲基氨吡啶、N, N, N- 乙基二异丙胺和氰 - 乙氧基二异丙基氨基 - 氯膦。2 小时后,用乙酸乙酯淬灭该反应混合物,并先用 5% 的碳酸氢钠清洗再用水清洗。再用乙酸乙酯萃取水清洗液。用硫酸钠干燥合并的有机层。蒸发溶剂后得到粘稠的油。将该产物与甲苯共蒸发两次,并用快速硅胶色谱法纯化该浅黄色的亚磷酸胺产物。

[0146] 实施例 IC :合成修饰的 RNA 聚合物的方案。

[0147] 按照通过用 2' -OTBDMS 保护 (Usman et al.,1987) 和 N-4- 叔丁基苯氧基乙酰基 (tac) 保护 A、G 和 C 单体 (Sinha et al.,1993) 的固相 b- 氰基乙基亚磷酸胺化学的 1 摩尔水平标准方案合成 RNA。用 tac 和 2' -O-TBDMS 保护的 A、G、C 和 U 单体和 rC(tac)- 琥珀酰控制的具孔玻璃 (pore glass) (CPG) 支持以下变化形式。在存在 0.3M 的 5-(苯甲硫基)-IH- 四唑的乙腈溶液的情况下,加入的未修饰的 A、C、G 和 U 单体以 5 倍摩尔过量的情况偶联 6 分钟,而 mcm5s2U 和 ms2t6A 单体则以 3 倍过量的情况使用并偶联 10 分钟。偶联后,用 tac 酐 (tac anhydride) 封端 2 分钟,然后用 1M 异丙基苯过氧化氢的甲苯溶液氧化 3 分钟。合成结束时,5' 二甲氧三苯甲基基团保留在适当位置。

[0148] 实施例 ID :中间体脱保护的方案

[0149] 以如下 3 个步骤进行 RNA 脱保护。在 45°C,用 20 毫升完全无水的 10% 的 1,8- 二氮杂双环 [5.4.0] 十一烷 -7- 烯 (DBU) 的四氢呋喃溶液处理带有完全保护 RNA 的用氩气干燥的 CPG 45 分钟以去除 p- 硝基苯乙基和 2- 氰基乙基保护基团。在氩气层下除去上清液,

并用干 THF 冲洗 CPG 两次。然后,在室温并且在氩气下,用 20mL 10% 的 DBU 干甲醇溶液处理带有部分脱保护 RNA 的 CPG18h 以从 CPG 上切割核碱基保护基团和切割 RNA。在 Speedvac 中用 Falcon 管干燥上清液和甲醇清洗液,然后在高真空度 (10)³ 托) 情况下用五氧化二磷干燥 3 天以除去残留的 DBU。使用 12mL 的三乙胺三氢氟酸盐在室温并且剧烈搅拌下对 2' -O-TBDMS 保护的 RNA 进行脱甲硅烷基 (Gasparutto et al., 1992) 24 小时。在该步骤中,还从 5' 末端 G 残基上除去了 DMT 基团。通过添加无菌水 (1.2ml) 结束反应,用丁醇使粗 RNA 沉淀并在 20°C 保持 24 小时以完全沉淀。通过离心收集 RNA 并用丁醇清洗。

[0150] 实施例 IE: RNA 聚合物的纯化

[0151] 通过 HPLC 纯化合成的 RNA 聚合物产物。使用 C18SEP-PAK 对脱保护材料脱盐,并通过使用氯化钠梯度的制备型阴离子交换 HPLC 进行纯化。一些情况下,需要使用反相色谱法的其他纯化步骤。为确保该聚合物产物是正确的,通过电喷雾质谱法和核苷组成分析法对其进行分析。

[0152] 实施例 II. 抑制剂筛选测定

[0153] 使用工具和靶 RNA 开展了两个测定,分别为固定化测定和 Alphascreen 测定 (图 3)。两个测定均使用了相同的两个 RNA 组分 (靶 RNA 和 tRNA 片段)。在该实施例中, HIV 病毒 RNA 靶标为具有 3' 生物素的 12 聚体 (12mer), 而人 tRNA 模拟物为含有天然修饰的核苷酸和 3' 荧光素的合成 12 聚体。这两个 RNA 模拟了 HIV 复制复合体的必要复合物。

[0154] 如以下更详细地说明的,固定化测定使用了三步骤方法,该方法首先包括靶 RNA 与抗生物素蛋白涂敷的微量滴定板的结合。然后,用星号表示的测试化合物 (药物 / 小分子) 与靶序列一同孵育 30 分钟。然后,加入 tRNA 模拟物以确定是否形成或抑制了复合物。在这一测定中,磷酸盐缓冲液可以与 1M 的 NaCl 一同使用以改善这两种 RNA 的亲合力。复合物的稳定性依赖于浓度,因此使用了 μ M 浓度并且在 4°C 进行该测定。

[0155] 通过向各个孔中加入 150 μ l 的靶溶液将 5' 标记的靶 RNA 序列 (5' -CGGUGUAAAAGC) 结合到抗生物素蛋白微量滴定板 (Roche 高载量板, 96-孔抗生物素蛋白微量滴定板) 上 (图 3, 步骤 A)。将该板在 37°C 下覆盖并孵育 1 小时。然后,用结合缓冲液漂洗该板两次,并在 37°C 孵育第二漂洗液 5 分钟。然后,用结合缓冲液再将该板漂洗两次,覆盖后备用。

[0156] 通过将化合物溶液解冻至室温制备测试化合物。通过用二甲亚砜稀释并震荡 1 小时制备了测试化合物的稀释液 (1 : 10 和 1 : 500)。

[0157] 通过向板上的各个孔中加入 98.5 μ l 的上样缓冲液 (pH 7.5, 100mM 的 Tris HCl、150mM 的 NaCl 和 0.1% 的 Tween 20, 用 10M 的 NaOH 将 pH 从约 4.5 调节至 7.5) 进行该测定。分别向各个孔中加入测试化合物 (每个孔 1.5 μ l), 并将板混合 1 小时 (图 3, 步骤 B)。

[0158] 然后,将含有工具 tRNA (5' -GCUXUUAYZCUG; 其中 X、Y 和 Z 独立地选自修饰的核苷 mnm5s2U、mcm5s2U、ms2t6A、s2U、 ψ 和 t6A) 的 50 微升溶液加入至各个孔中并将板在 4°C 下震荡孵育 1 小时 (图 3, 步骤 C)。然后除去反应混合物,在该混合物仍为冷的时,还除去了剩余的化合物溶液。

[0159] 除去剩余溶液后,再向各个孔中加入读数缓冲液 (pH 7.5, 50mM 的 Hepes、100mM 的 NaCl、PEG (40mg/200ml)) 并使用板读数器读取结果。

[0160] 如图 3 所示,阳性 (+) 反应表明测试化合物抑制工具 tRNA 与靶核酸结合 (例如,

测试化合物与工具 tRNA 或靶核酸分子结合,或与工具 tRNA 和靶核酸分子两者结合)。阴性(-)反应表明测试化合物未抑制工具 tRNA 与靶核酸结合(例如,测试化合物既不与工具 tRNA 结合也不与靶核酸结合)。

[0161] 在 α 筛选配置中(图 3),在溶液中使用与固定化测定相同的 RNA 进行测定。供体和受体珠与它们各自的 RNA 结合。在筛选期间, RNA 和测试药物/小分子一同孵育并使用 α 筛选检测条件测量复合物的形成。利用 α 筛选测定可使得该测定能够在室温并且在较低 RNA 浓度下进行,并提高了该复合物的稳定性。

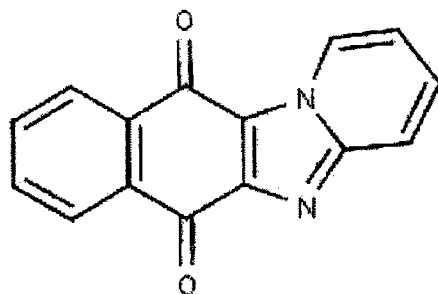
[0162] 实施例 III. HIV 筛选测定的验证

[0163] 验证 HIV 筛选测定以证实阳性和阴性对照将按照预期起作用,并且测试小化合物文库以证实可以检测出差异抑制。分别用 4275 和 4616 种化合物完成两种验证,每种验证使用 17 块板。两种测定之间有 3961 种化合物相同,并且仅使用这些化合物以及阳性和阴性对照完成统计分析。每块板含有约 30 个阳性和 30 个阴性对照,这些对照的表现与预期相同。当分析发光性时,观察到了验证运行之间的差异;然而,当评价在两次运行中均具有活性的化合物(命中, hit)的抑制百分数时,这些差异被最小化或消除了。基于阳性和阴性对照的结果,该测定满足了功能性要求。

[0164] 为评价在筛选这一小化合物文库中所表现出的抑制,将截止点设定在 42.96%抑制,即平均值加上化合物抑制百分数(%)标准偏差的三倍。使用该截止点,鉴别出 34 种重复化合物(命中)。通过使用 99.75%抑制作为截止点,即平均值减去阳性对照(工具+靶标)抑制百分数(%)标准偏差的三倍,只有 1 个重复命中。如果将 29.02%定义为截止点,即平均值加上阴性对照(工具)抑制百分数(%)标准偏差的三倍,则在所分析的 3961 种化合物中有 51 个重复命中。这些结果与评价小型随机化合物文库时的预期相符。

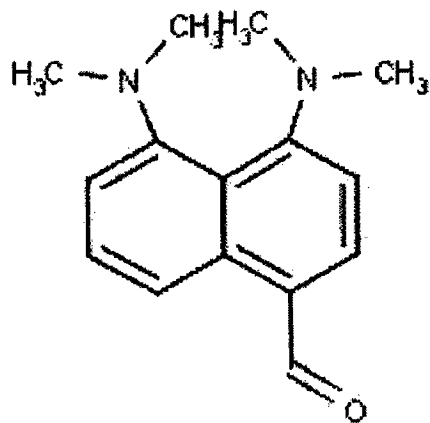
[0165] 为选择在第二 HIV 测定中使用以证实该测定能够鉴别出具有生物活性的 HIV 特异化合物的化合物,在两种验证运行其中至少一种中将截止点设定为大于 60%抑制。这导致选择了 29 种化合物。在新鲜采集的 PBMC 细胞中分析了这些化合物的抗 HIV 活性。在 30 种所测试的化合物中,有 15 种在浓度小于 100 μ M(最高测试浓度)时有活性。在这 15 种化合物中,有 9 种在 100 μ M 浓度下对 PBMC 细胞无毒性;因此,对这 9 种化合物不能绝对地认为它们对 HIV 和 PBMC 细胞具有毒性差异。两种其他化合物具有可接受的大于 25 的抗病毒指数(抑制 HIV 细胞而不抑制 PBMC 细胞)。两种鉴别的化合物为:

[0166]



[0167] 萘并[2',3',4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-6,11-二酮;和

[0168]

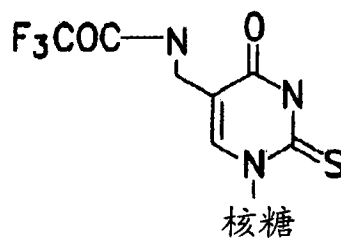
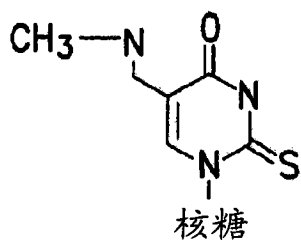


[0169] 4,5-双(二甲基氨基)-1-萘醛。

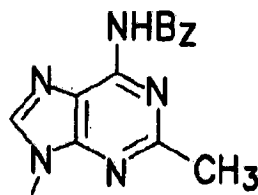
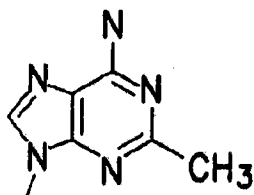
[0170] 这两种化合物在 0.63 和 0.022 μM 时显示出了抗 HIV 活力,并且抗病毒指数大于 25。一个化合物在反转录酶测定中无活性,表明该化合物对该酶无抑制,还表明该化合物抑制该测定设计用于模拟的 RNA:RNA 相互作用。图 4、图 5 和图 6 中示出了这两种化合物以及对照化合物的测定结果。

[0171] 尽管出于使理解清楚的目的,已经通过例证说明和实施例详细说明了上述发明,但显然可以在所附权利要求的范围内进行某些变化和改进。

(A) $\text{mnm}^5\text{s}^2\text{U}$ 的碱基保护



(B) m²A 的碱基保护



(C) 修饰的核苷酸的一般化糖保护和亚磷酰化

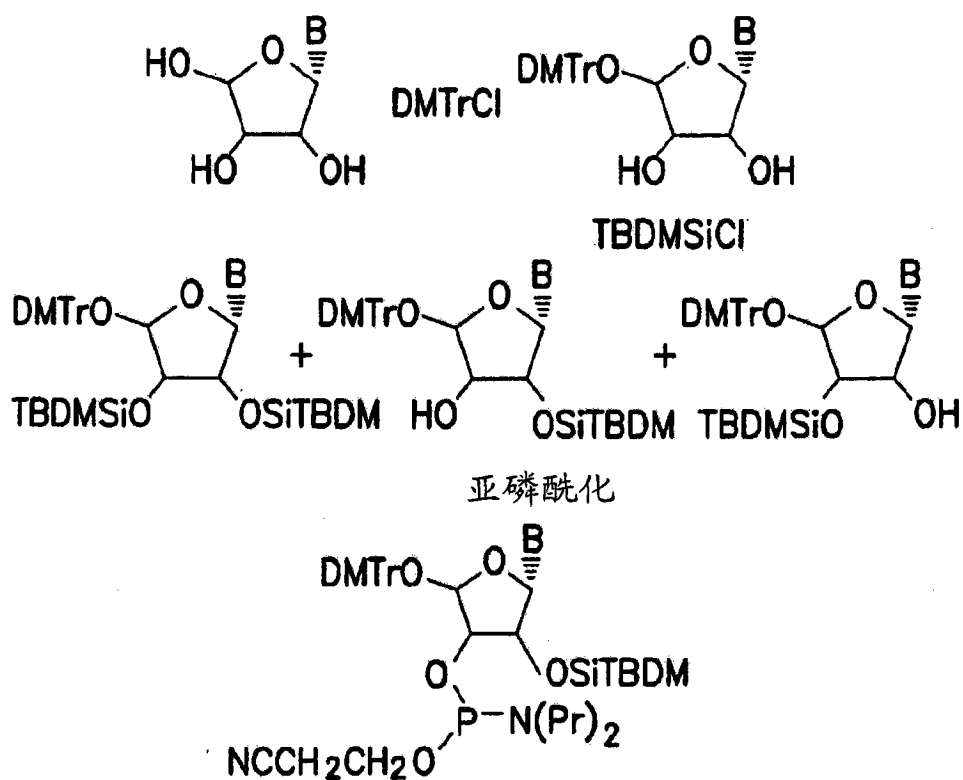


图 1

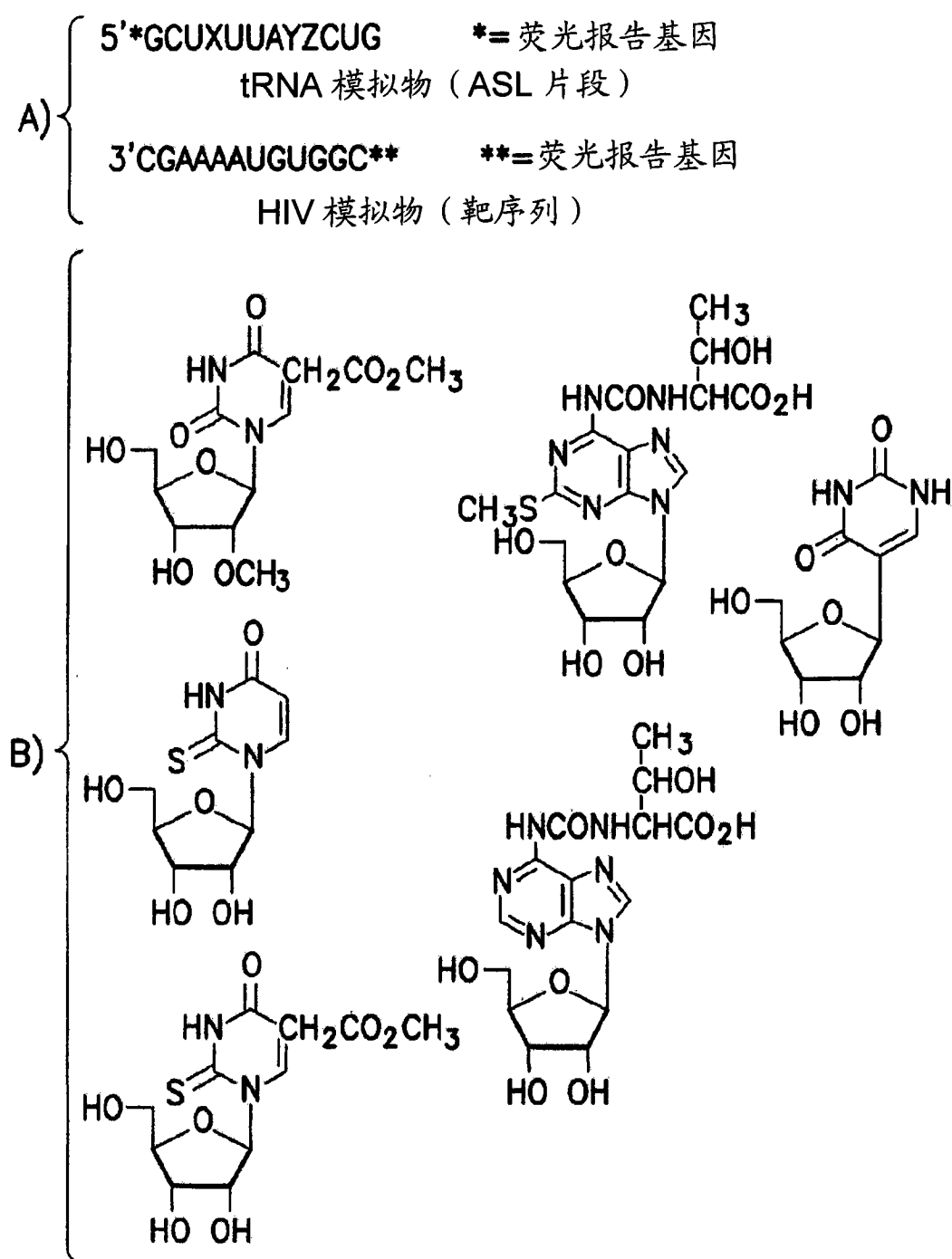


图 2

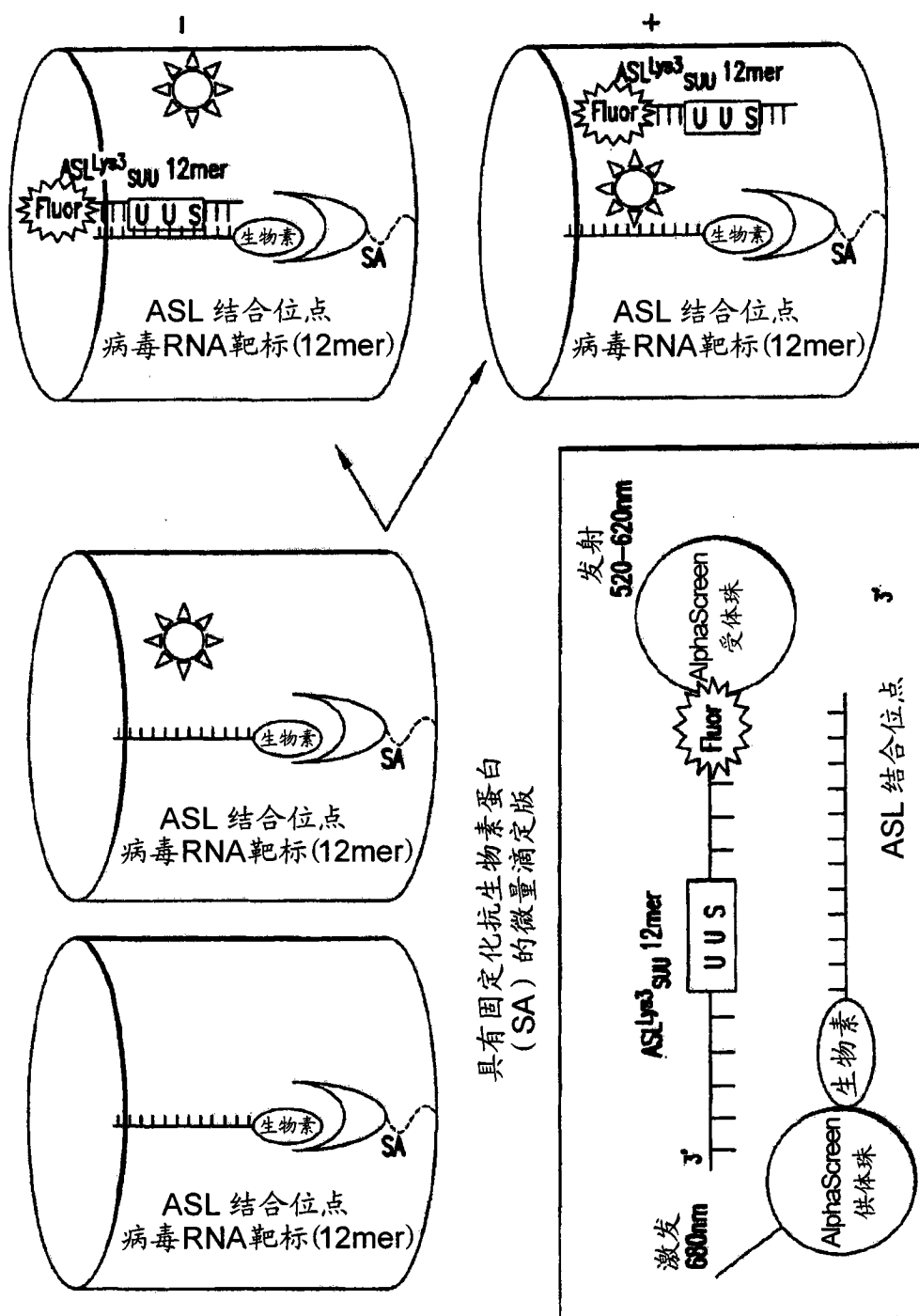


图 3

化合物 X 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

RT 值 (cpm)										
浓度 (μM)	0.0	0.01	0.03	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100
样品 1	12006	4542	5357	5389	945	216	24	20	48	48
样品 2	9613	2117	4578	1478	3898	68	20	28	20	68
样品 3	10364	2782	4157	1971	3862	909	24	16	24	44
平均值	10660.9	3140.2	4697.2	2945.9	2901.6	397.6	22.6	21.2	30.6	53.2
%VC	100.0	29.5	44.1	27.6	27.2	3.7	0.2	0.2	0.3	0.5

毒性值 (细胞滴定 96 - O.D. @ 490/650 nm)										
浓度 (μM)	0.0	0.01	0.03	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100
样品 1	1.027	1.230	0.888	1.017	0.841	0.211	0.051	0.051	0.059	0.006
样品 2	1.074	1.264	1.194	0.890	0.939	0.164	0.060	0.038	0.055	0.093
样品 3	0.996	0.993	0.976	0.874	0.789	0.390	0.080	0.045	0.042	0.149
平均值	1.032	1.162	1.019	0.927	0.856	0.255	0.064	0.045	0.052	0.083
%CC	100.0	112.6	98.7	89.8	82.9	24.7	6.2	4.3	5.0	8.0

药物: X	50%	90%	95%
TC (μM)	0.61	2.49	6.57
IC (μM)	<0.01	0.74	0.94
抗病毒指数 (AI)	>61.0	3.38	6.99

化合物 X 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

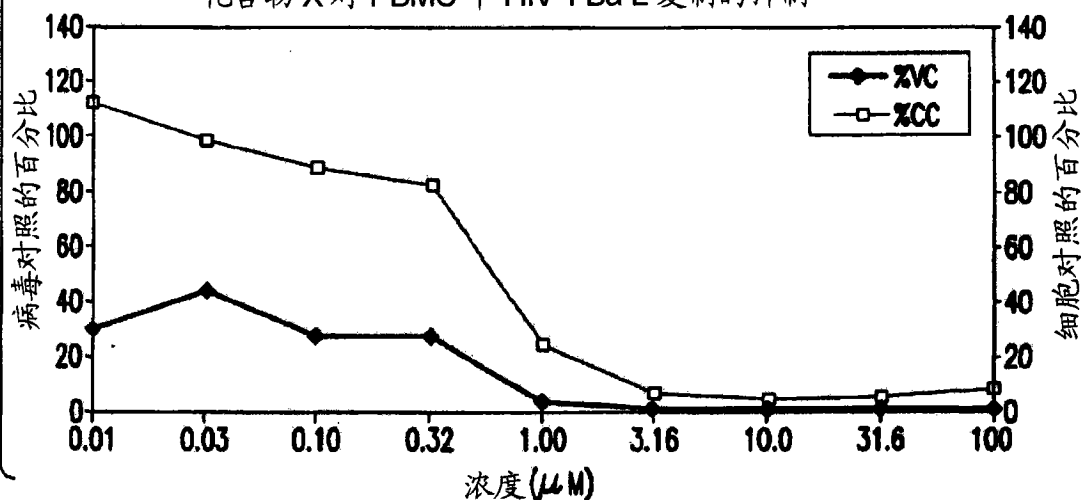


图 4A

化合物 X 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

RT 值 (cpm)										
浓度 (nM)	0.0	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100	316	1000
样品1	14185	9336	7049	15385	11253	9924	5965	6994	2813	24
样品2	13961	12328	10090	11834	7131	7777	6377	5859	6809	44
样品3	13575	12122	9214	10320	10565	7788	6537	5072	2067	20
平均值	13907.1	11262.4	8784.8	12513.4	9650.1	8496.8	6293.4	5975.4	3896.8	29.8
%VC	100.0	81.0	63.2	90.0	69.4	61.1	45.3	43.0	28.0	0.2

毒性值 (细胞滴定 96 - O.D. @ 490/650 nm)										
浓度 (nM)	0.0	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100	316	1000
样品1	0.911	0.989	0.837	0.830	1.012	0.795	1.071	0.836	0.762	0.230
样品2	0.800	0.915	0.950	0.838	0.923	0.909	0.882	1.098	0.991	0.208
样品3	1.015	0.815	0.935	0.869	0.853	0.744	0.654	0.719	0.714	0.248
平均值	0.909	0.906	0.907	0.846	0.929	0.816	0.869	0.884	0.822	0.228
%CC	100.0	99.8	99.9	93.1	102.3	89.8	95.6	97.3	90.5	25.1

药物: X	50%	90%	95%
TC (nM)	645	>1000	>1000
IC (nM)	22.4	667	820
抗病毒指数(AI)	28.8	>1.50	>1.22

化合物 X 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

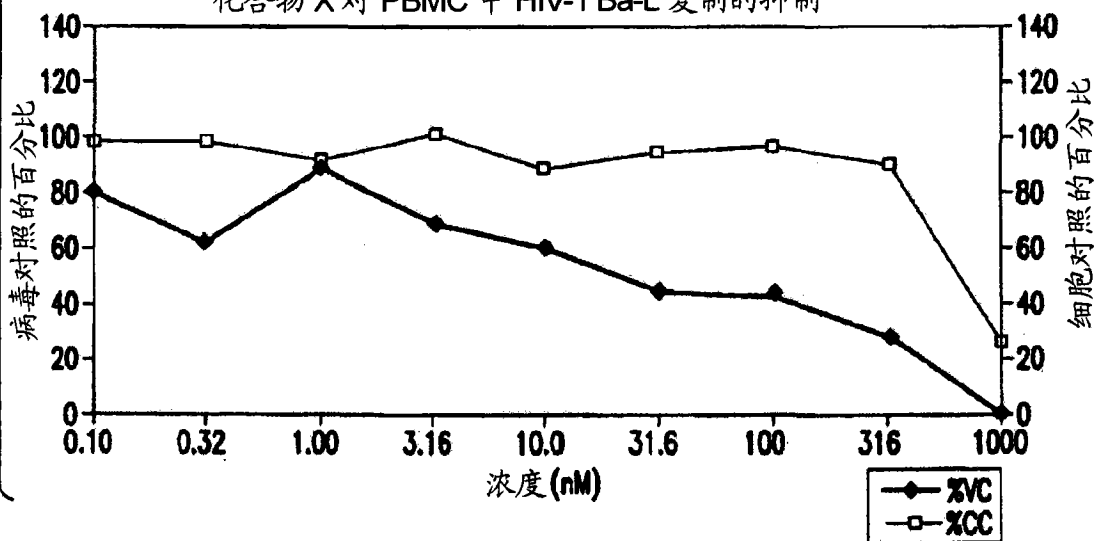


图 4B

化合物 Y 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

RT 值(cpm)										
浓度(μM)	0.0	0.01	0.03	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100
样品1	11409	3772	10249	7056	9395	4060	3263	1183	634	85
样品2	9204	6603	6755	7858	5143	5472	3600	394	37	29
样品3	9140	10920	11671	2609	2794	3623	2381	854	45	81
平均值	9917.7	7098.7	9558.7	5841.3	5777.7	4385.3	3081.7	810.7	239.0	65.3
%VC	100.0	71.6	96.4	58.9	58.3	44.2	31.1	8.2	2.4	0.7

毒性值(细胞滴定 96 - 0.D. @ 490/650 nm)										
浓度(μM)	0.0	0.01	0.03	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100
样品1	0.993	0.970	0.770	0.741	0.802	0.960	0.919	0.763	0.809	0.073
样品2	0.800	0.741	0.913	1.026	1.126	1.196	0.873	0.860	1.083	0.096
样品3	0.877	1.032	0.866	0.955	1.127	1.057	0.866	0.903	1.174	0.082
平均值	0.890	0.915	0.850	0.907	1.018	1.071	0.886	0.842	1.022	0.084
%CC	100.0	102.8	95.5	101.9	114.4	120.3	99.5	94.6	114.8	9.4

药物: Y	50%	90%	95%
TC (μM)	64.2	99.3	>100
IC (μM)	0.63	9.12	18.8
抗病毒指数(AI)	103	10.9	>5.31

化合物 Y 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

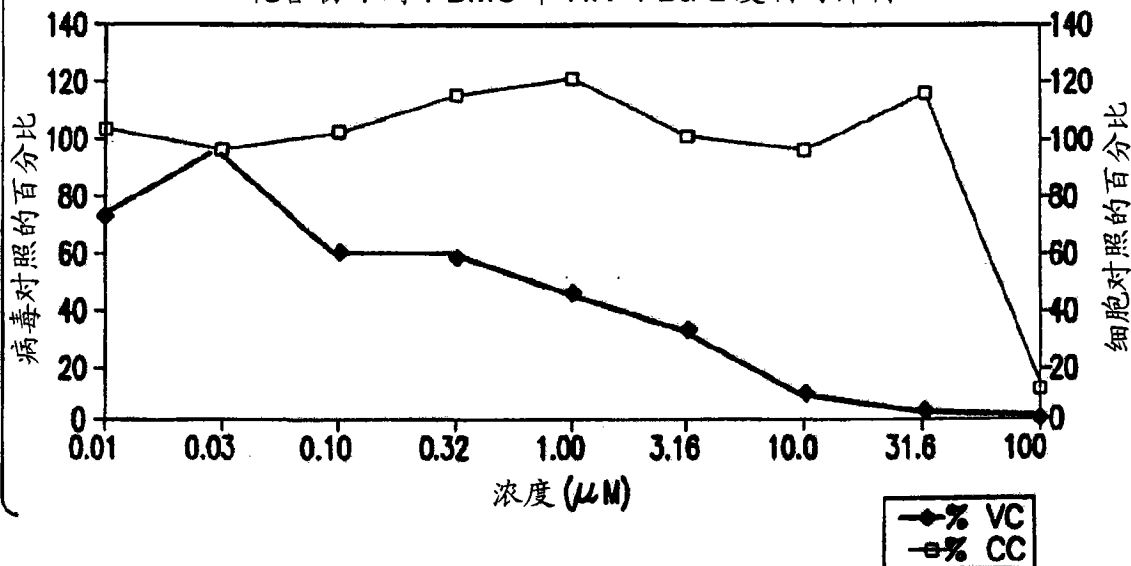


图 5

化合物 Y 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

RT 值 (cpm)										
浓度 (nM)	0.0	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100	316	1000
样品 1	14185	9379	7779	6156	650	1969	393	213	108	28
样品 2	13961	11806	9189	6323	4602	1199	898	52	20	4
样品 3	13575	11886	9754	9561	3956	1864	168	0	44	0
平均值	13907.1	11024.1	8907.8	7347.1	3069.8	1677.8	486.8	88.6	57.8	11.0
%VC	100.0	79.3	64.1	52.8	22.1	12.1	3.5	0.6	0.4	0.1

毒性值 (细胞滴定 96 - 0.D. @ 490/650 nm)										
浓度 (nM)	0.0	0.10	0.32	1.00	3.16	10.0	31.6	100	316	1000
样品 1	0.911	0.817	1.073	0.858	0.899	1.095	0.686	0.664	0.778	0.694
样品 2	0.800	1.201	0.743	0.840	1.252	1.254	0.849	0.701	0.689	0.678
样品 3	1.015	1.070	1.034	1.082	1.003	1.010	1.014	0.997	0.927	1.063
平均值	0.909	1.029	0.950	0.927	1.051	1.120	0.850	0.787	0.798	0.812
%CC	100.0	113.3	104.6	102.0	115.7	123.2	93.5	86.6	87.8	89.3

药物: AZT	50%	90%	95%
TC (nM)	>1000	>1000	>1000
IC (nM)	1.11	13.2	25.8
抗病毒指数 (AI)	>900	>75.8	>38.7

化合物 Y 对 PBMC 中 HIV-1 Ba-L 复制的抑制

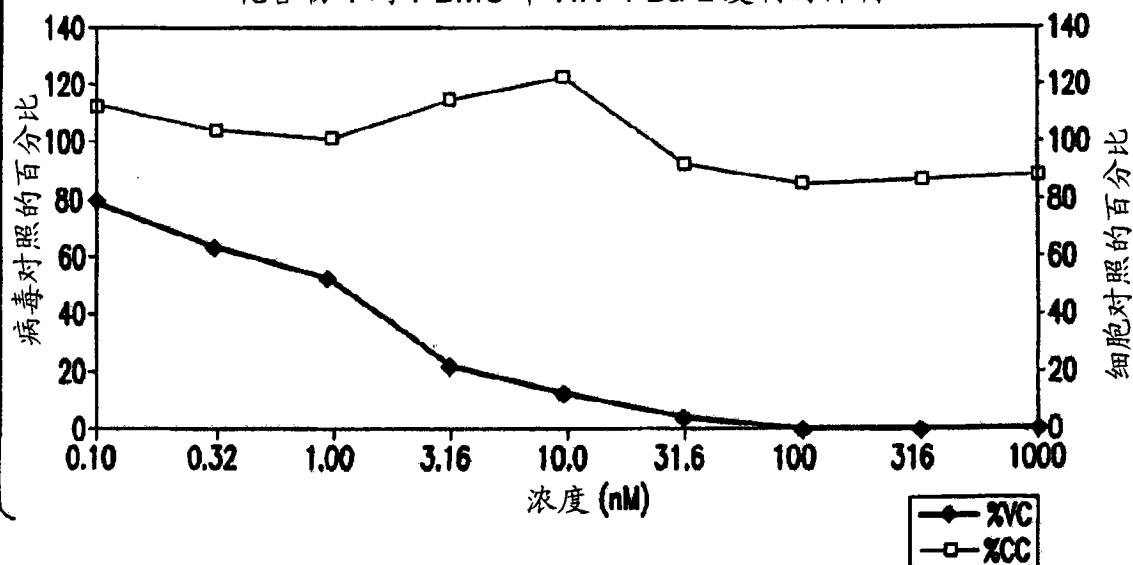


图 6