(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112384228 A
(43)申请公布日 2021.02.19

(21)申请号 201980038898.2
(22)申请日 2019.04.12
(30)优先权数据
62/656861 2018.04.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/027364 2019.04.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/200340 EN 2019.10.17
(71)申请人 莫迪斯治疗公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D·迪皮特罗
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 王颖煜 梅黎
(51)Int.Cl.
A61K 31/7068(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书20页

(54)发明名称

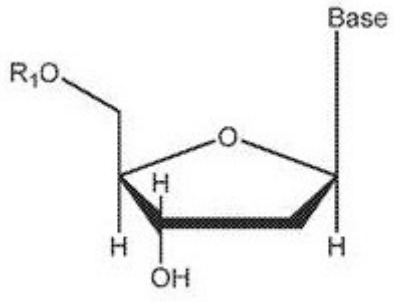
用于治疗由失衡的核苷酸池引起的疾病的脱氧核苷的前药

(57)摘要

本文提供了用于治疗特征为失衡的核苷酸池的疾病的脱氧核苷酸前药。

CN 112384228 A

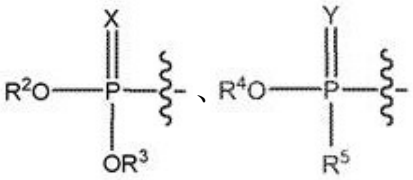
1.在有需要的对象中治疗特征在于失衡的核苷酸池的疾病或病症的方法，包括向所述对象施用治疗有效量的至少一种式I的前药：

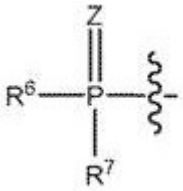


式I

，

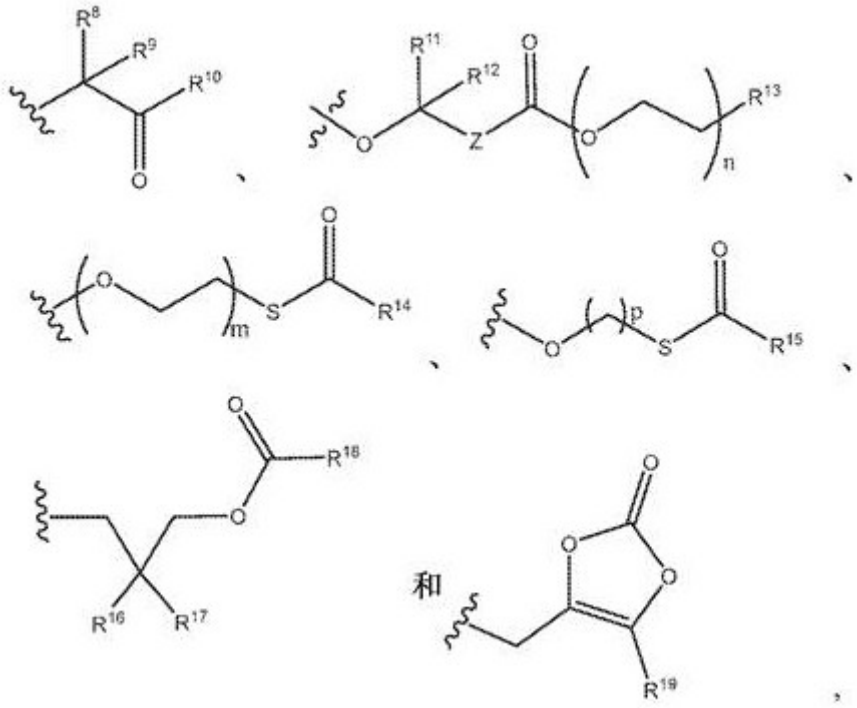
其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱；

R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、、

和 ，

X、Y和Z各自独立地选自O和S；

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



或者R^2 和R^3可以一起形成环状基团；

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

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

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

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

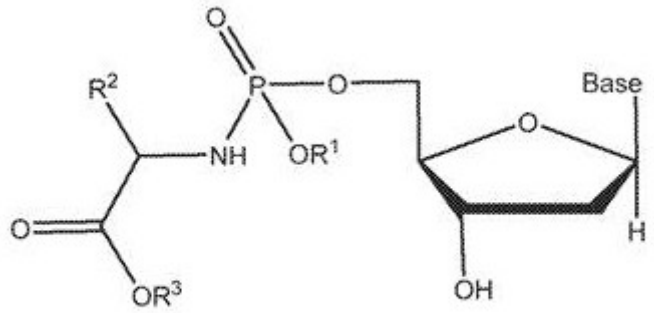
R^{16} 和R^{17} 各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8} 有机基羰基、C_{2-8} 烷氧基羰基和C_{2-8} 有机基氨基羰基；

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

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

n、m和p 各自独立地选自0、1、2或3。

2.权利要求1的方法，其中所述前药是式Ia的化合物：

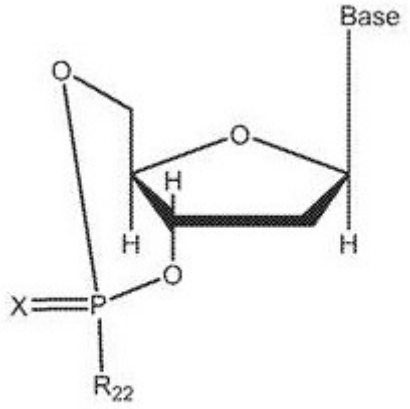


式Ia ，

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

3.权利要求2的方法，其中R^1 是芳基，R^2 是C_{1-24} 烷基 和R^3 是C_{1-24} 烷基。

4.权利要求1的方法，其中所述前药是式II的化合物：

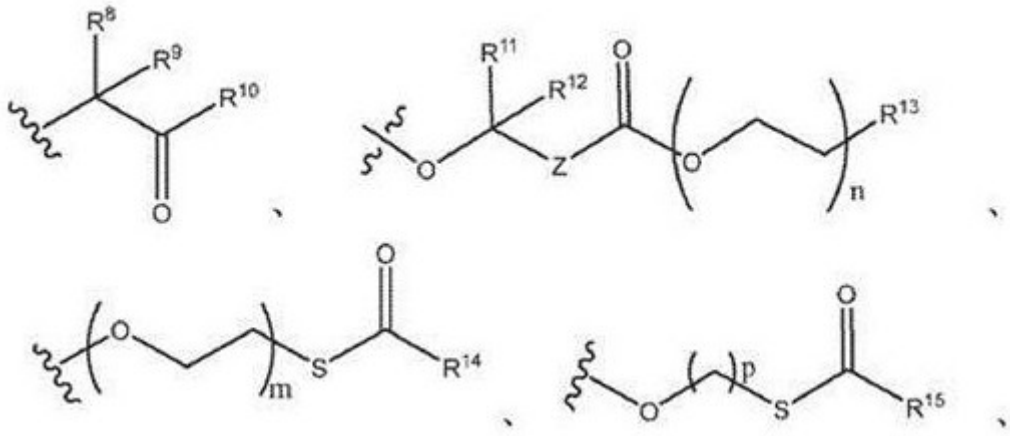


式II ，

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱；

X 选自S和O；和

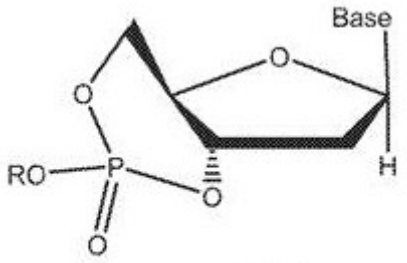
R^{22} 选自-O-、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6} 烷氧基、



任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯；

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

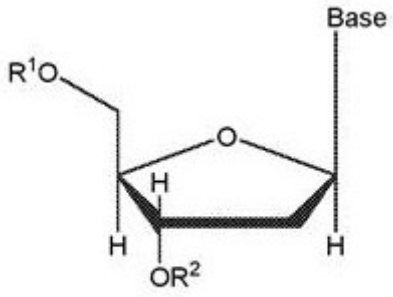
5.权利要求4的方法,其中所述前药是式IIa的化合物:



式IIa ,

其中R是C_{1-4} 烷基。

6.权利要求1的方法,其中所述前药是式III的化合物:

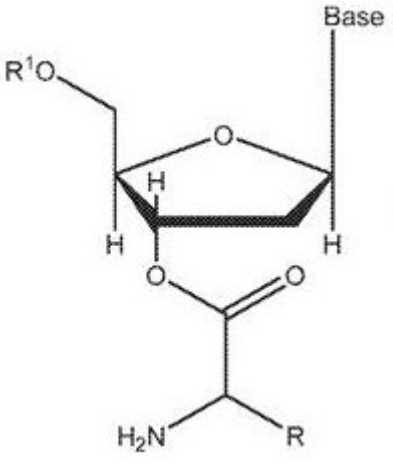


式III ,

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱;

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

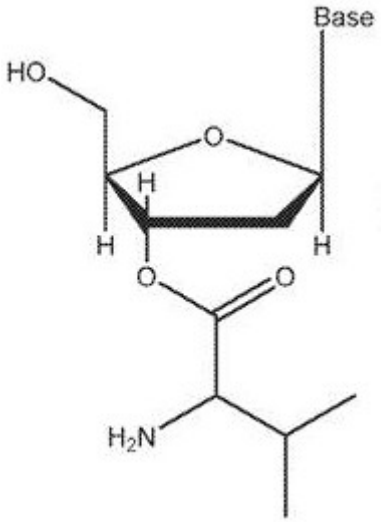
7.权利要求6的方法,其中所述前药是式IIIa的化合物:



式IIIa ,

其中R是氨基酸的侧链。

8.权利要求6的方法,其中所述前药是式IIIb的化合物:

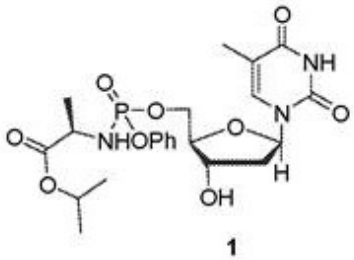


式IIIb

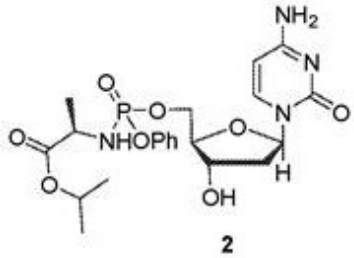
，

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱。

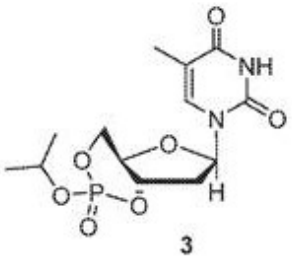
9.权利要求1的方法，其中所述至少一种前药选自以下：



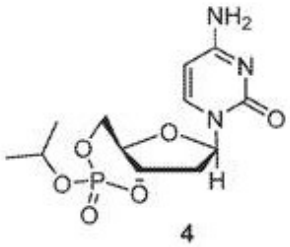
1



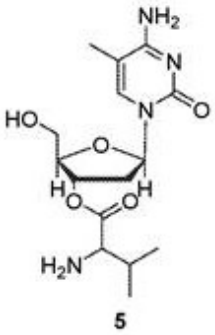
2



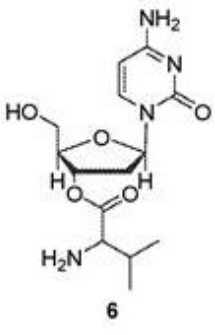
3



4

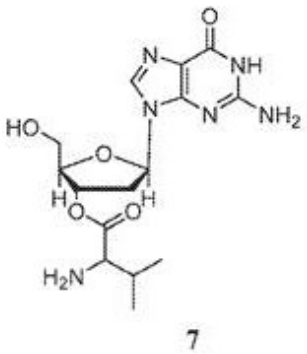


5

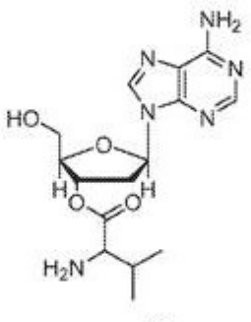


6

。



7



8

10.权利要求9的方法，其中施用至少两种前药。

11.权利要求10的方法，其中所述两种前药选自 (i) 1和2、(ii) 3和4、(iii) 5和6、(iv) 7 和8。

12.权利要求10或11的方法，其中一种前药与另一种前药的重量比为50/50、5/95、10/

90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、55/45、60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10或95/5。

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

14.权利要求1-13中任一项所述的方法，其中所述疾病或病症选自TK2 缺乏症、RRM2B缺乏症、TYMP中的突变、SUCLA2 缺乏症、SUCLG1 缺乏症、MPV17 缺乏症和DGUOK突变。

15.权利要求1-14中任一项所述的方法，其中施用方法为口服。

16.权利要求1-15中任一项所述的方法，其中施用剂量为约200 mg/kg/天至约1,000 mg/kg/天。

17.权利要求1-16中任一项所述的方法，其中每天至少一次施用前药或包含其的组合物。

用于治疗由失衡的核苷酸池引起的疾病的脱氧核苷的前药

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2018年4月12日提交的美国临时专利申请No. 62/656,861的优先权，该临时专利申请以其全部内容通过引用合并于本文。

发明领域

[0002] 本发明一般地涉及用于递送脱氧核苷的前药及其在治疗由失衡的核苷酸池引起的疾病中的用途，所述疾病包括线粒体DNA耗竭综合征。

背景技术

[0003] 线粒体疾病是由于线粒体呼吸链(RC)和氧化磷酸化的缺陷引起的临床异质性疾病，所述线粒体呼吸链(RC)和氧化磷酸化是将电子中的能量转化到三磷酸腺苷(ATP)中的生化途径。呼吸链由转移电子以产生跨越线粒体的内膜的质子梯度的四种多亚基酶(复合物I-IV)组成，并且质子流通过复合物V驱动ATP合成(DiMauro和Schon 2003;DiMauro和Hirano 2005)。辅酶Qio (CoQio)是使电子从复合物I和II穿梭到复合物III的必要分子。由于受线粒体DNA(mtDNA)及核DNA(nDNA)两个基因组控制，呼吸链在真核(例如，哺乳动物)细胞中是独特的。因而，任一基因组中的突变都可能引起线粒体疾病。大多数线粒体疾病影响多种身体器官，并且在儿童期或成年早期中通常是致命的。对于线粒体疾病没有经证实的有效治疗，只有支持性疗法，如施用CoQio及其类似物以增强呼吸链活性并给活性氧物质(ROS)解毒，活性氧物质(ROS)是功能失调的呼吸链酶的有毒副产物。

[0004] 线粒体DNA耗竭综合征(MDS)，其是线粒体疾病的一个亚组，是严重儿童期脑肌病的常见病因，其分子特征在于组织中的线粒体DNA(mtDNA)拷贝数减少以及线粒体RC复合物的合成不足(Hirano等人，2001)。若干核基因中的突变已被认为是婴幼儿MDS的病因，所述核基因包括:TK2、DGUOK、POLG、POLG2、SCLA25A4、MPV17、RRM2B、SUCLA2、SUCLG1、TYMP、OPA1和ClOorfl (PEOl)。(Bourdon等人，2007;Copeland 2008;Elpeleg等人，2005;Mandel等人，2001;Naviaux和Nguyen 2004;Ostergaard等人，2007;Saada等人，2003;Sarzi等人，2007;Spinazzola等人，2006)。此外，这些核基因中的突变也可引起伴有或没有mtDNA耗竭的mtDNA的多重缺失(Behin等人，2012;Garone等人，2012;Longley等人，2006;Nishino等人，1999;Paradas等人，2012;Ronchi等人，2012;Spelbrink等人，2001;Tyynismaa等人，2009;Tyynismaa等人，2012;Van Goethem等人，2001)。

[0005] 这些基因之一是TK2，其编码胸苷激酶(TK2)，该酶是嘧啶核苷(胸苷和脱氧胞苷)磷酸化以产生脱氧胸苷单磷酸(dTMP)和脱氧胞苷单磷酸(dCMP)所需的一种线粒体酶(Saada等人，2001)。TK2中的突变损害合成脱氧核苷三磷酸(dNTP)所需的线粒体核苷/核苷酸补救途径，脱氧核苷三磷酸(dNTP)是用于mDNA复制和修复的结构单元。

[0006] Saada及同事(Saada等人，2001)于2001年首次描述了罹患严重的毁灭性肌病的来自四个不同家庭的四名患病儿童的TK2缺乏症。在平稳的早期发育之后，在6-36月龄时患者产生高CK血症、严重肌肉张力减退和随后的自发活动丧失。该疾病进展迅速，并且两名患者

在3岁时接受机械通气,而另两名患者在报告之时已经死亡。

[0007] 在首次描述之后,文献中已报道了另外六十名患者,并且至少另有二十六名患者已被诊断但未被报道(Alston, 等人,2013; Bartesaghi, 等人,2010: Behin, 等人,2012;Blakely, 等人,2008: Carrozzo, 等人,2003; Chanprasert, 等人,2013;Collins, 等人,2009; Galbiati, 等人,2006;Gotz, 等人,2008; Leshinsky-Silver, 等人,2008; Lesko, 等人,2010: Mancuso, 等人,2002; Mancuso, 等人,2003; Marti, 等人,2010; Oskoui, 等人,2006; Paradas, 等人,2012;Roos, 等人,2014;Tulinius, 等人,2005; Tyynismaa, 等人,2012; Vila, 2003;Wang, 等人,2005),结果是九十名患者,53名男性和37名女性。最近诊断的二十六名患者通过下一代DNA测序得到确认。该大量新确认的病例表明,TK2缺乏症是一种诊断不足的病症。

[0008] TK2缺乏症表现出广泛的临床和分子遗传谱,大多数患者在儿童早期表现出毁灭性的临床病程,而其他患者具有经数十年缓慢进展的虚弱。

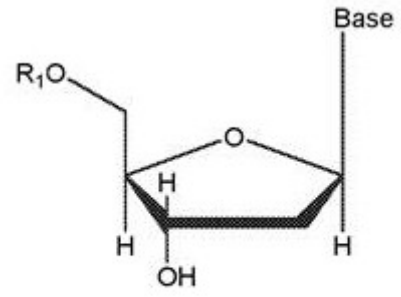
[0009] TK2缺乏症的治疗,像大多数MDS和线粒体病症一样,限于支持性疗法。与脱氧核苷(例如脱氧胸苷(dT)或脱氧胞苷(dC)或其混合物)的施用(WO2016205671,也以其整体并入本文)一样,脱氧胸苷单磷酸(dTMP)和脱氧胞苷单磷酸(dCMP)的施用已经显示出改善了TK2敲入突变小鼠和患有TK2缺乏症的人类患者的病况(系列号为15/082,207的美国申请,将其以其整体并入本文)。然而,仍存在对TK2缺乏症的其它治疗性干预的需求。

[0010] 另外,存在对治疗其它形式的MDS和以失衡的核苷酸池为特征的其它疾病的需求。例如,具有mtDNA耗竭或多重缺失或二者都有的若干孟德尔病 (mendelian disorders)的特征在于失衡的三磷酸脱氧核苷酸池,其导致mtDNA复制的缺陷。一种这样的病症,DGUOK突变,损害线粒体内酶脱氧鸟苷激酶,该酶通常使脱氧嘌呤核苷脱氧鸟苷和脱氧胞苷磷酸化以产生脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)和脱氧胞苷单磷酸(dCMP)。破坏线粒体dNTP池的其它核基因包括TYMP、RRM2B、SUCLA2、SUCLG1和MPV17。恢复dNTP池平衡的疗法也可用于治疗这些病症。

发明内容

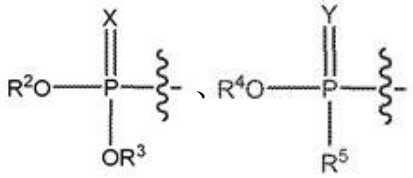
[0011] 本发明一般地涉及用于递送脱氧核苷的前药。

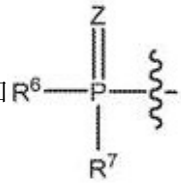
[0012] 在一个方面中,本发明提供了式I化合物:



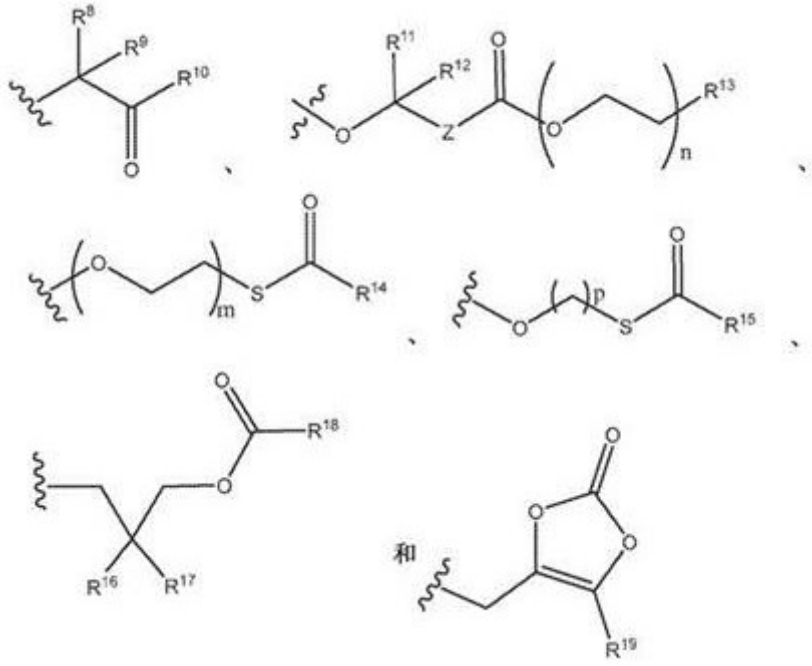
式I

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱;

R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、、

和X、Y和Z各自独立地选自O和S；

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



或者R^2和R^3可以一起形成环状基团；

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

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

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

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

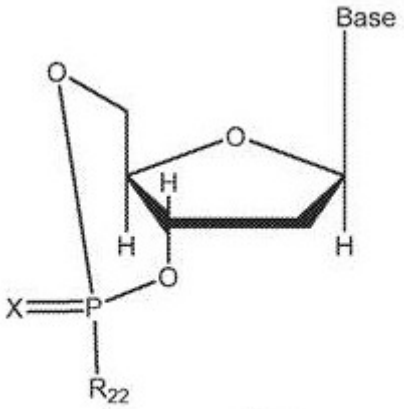
R^{16} 和R^{17} 各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8} 有机基羰基、C_{2-8} 烷氧基羰基和C_{2-8} 有机基氨基羰基；

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

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

n、m和p 各自独立地选自0、1、2或3。

[0013] 在另一方面中,所述前药是式II化合物:



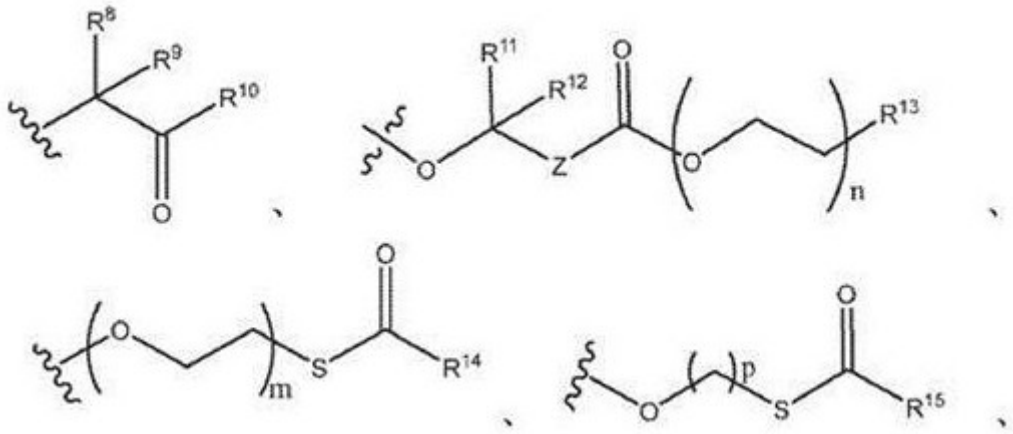
式II

,

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱;

X 选自S和O;和

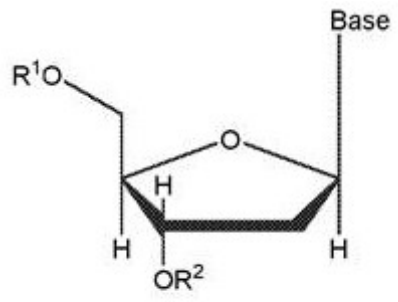
R^{22} 选自-O-、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6} 烷氧基、



任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯;

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

[0014] 在又一方面中,所述前药是式III化合物:



式III

,

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱；

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

[0015] 在另一方面中，本发明还一般地涉及在有需要的对象中治疗特征在于失衡的核苷酸池的疾病或病症的方法，包括向所述对象施用治疗有效量的至少一种本发明的前药。所述前药可以以其本身(即单独地)或以药物组合物的形式施用。

[0016] 合适的疾病或病症包括但不限于，包括TK2缺乏症、RRM2B 缺乏症、TYMP突变、SUCLA2 缺乏症、SUCLG1 缺乏症、MPV17 缺乏症和DGUOK突变。

[0017] 可以经由任何途径施用，包括但不限于，鞘内、肠胃外(parental)、粘膜和经皮。

[0018] 至少一种前药或包含其的组合物的施用量可以为约25 mg/kg/天至约1,000 mg/kg/天。

[0019] 发明详述

I．定义

如本文中所用，“对象”是指哺乳动物。哺乳动物包括犬科动物、猫科动物、啮齿类动物、牛科动物、马科动物、猪科动物(porcine)、羊科动物(ovine)和灵长类动物。因此，本发明可用于兽医学中，例如以治疗伴侣动物、农场动物、动物园中的实验动物和野生动物。本发明对于人类医学应用是特别可取的。

[0020] 如本文中所用，“患者”是指人类对象。在本发明的一些实施方案中，“患者”已知或疑似患有以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症、线粒体疾病、线粒体DNA耗竭综合征或TK2缺乏症。

[0021] 如本文中所用，“治疗有效量”是指这样的量：其足以引起对象临床显著病况的改善、或者使与疾病或病症相关的一种或多种症状延迟或最小化或减轻、或者导致对象所需的生理机能有益变化。

[0022] 如本文中所用，“治疗(treat/treatment)”等是指减慢、解除、改善或减轻疾病或病症的至少一种症状或在疾病或病症发作后将其逆转的手段。

[0023] 如本文中所用，“预防 (prevent/prevention)”等是指在明显的疾病或病症发作之前起作用，以防止疾病或病症发展或使疾病或病症的程度最小化或减缓其发展进程。

[0024] 如本文中所用，“有需要的”是指已知或疑似患有疾病或病症或处于罹患疾病或病症的风险中的对象，所述疾病或病症为以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症、线粒体疾病、线粒体DNA耗竭综合症或TK2缺乏症。

[0025] 如本文中所用，“前药”是指脱氧核苷的衍生物，其在使用条件下(如在体内)发生转化以释放脱氧核苷。前药经常(但非必须)是在药理上无活性的，直到转化为活性形式。前药可以通过将亲脂性的前体部分(promoiety)，通常经由官能团，结合到药物上而获得。

[0026] 如本文中所用，“亲脂性的前体部分(promoiety)”是指经由在指定使用条件下可裂解的键与脱氧核苷、通常与官能团键合的基团。可以通过酶促或非酶促手段使药物与亲脂性的前体部分之间的键裂解。在使用条件下，例如在向患者施用后，可以将药物与亲脂性的前体部分之间的键裂解以释放母体药物。亲脂性的前体部分的裂解可以自发地进行，例

如经由水解反应，或者可以通过另一种试剂，例如通过酶、光、酸的催化或诱导，或者通过改变或暴露于物理或环境参数，如通过改变温度、pH等。该试剂可以是使用条件内源性的，如存在于施用前药的患者的体循环中的酶或胃的酸性条件，或者该试剂可以是外源性提供的。

[0027] 如本文中所用，“不良反应”是由药物施用引起的不希望的反应。在大多数情况下，脱氧核苷的施用不会引起不良反应。最意料之中的不良反应是轻微的胃肠道不耐受。

[0028] 如本文中所用，“约”或“大约”意指对于由本领域普通技术人员确定的特定值在可接受的误差范围内，所述可接受的误差范围将部分地取决于如何测量或确定该值，即测量体系的限制，即对于特定目的(如药物制剂)所需的精确度。例如，“约”可意指按照本领域中的惯例在1个或多于1个标准偏差以内。或者，“约”可意指给定值的最多20％、优选最多10％、更优选最多5％及还更优选最多1％的范围。或者，特别是对于生物体系或过程，该术语可以意指在值的一个数量级以内，优选在值的5倍以内，且更优选在值的2倍以内。在申请和权利要求中描述特定值的情况下，除另有说明外，应认为术语“约”意指在该特定值的可接受误差范围内。

[0029] 每当一个基团被描述为“任选取代的”时，该基团可以是未取代的或被一个或多个所指出的取代基取代。同样，当一个基团被描述为被取代时为“未取代的或取代的”时，如果是取代的，则取代基可以选自一个或多个所指出的取代基。如果没有指出取代基，则意指所指出的“任选取代的”或“取代的”基团可以被一个或多个单独地且独立地选自下述的基团取代：烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基(烷基)、杂芳基(烷基)、杂环基(烷基)、羟基、烷氧基、芳基氧基、酰基、巯基、烷基硫基、芳基硫基、氰基、卤素、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰胺基、N-酰胺基、S-磺酰氨基、N-磺酰氨基、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、氰硫基、异氰硫基、叠氮基、硝基、甲硅烷基、氧硫基、亚硫酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰氨基、氨基、单取代的氨基和二取代的氨基，及其受保护的衍生物。

[0030] 如本文中所用，其中“a”和“b”是整数的“Ca至Cb”是指烷基、烯基或炔基中的碳原子数，或环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环基的环中的碳原子数。即，烷基、烯基、炔基、环烷基的环、环烯基的环、芳基的环、杂芳基的环或杂环基的环可以包含“a”至“b”(含)个碳原子。因此，例如，“C1至C4烷基”是指具有1至4个碳的所有烷基，即CH_3-、CH_3CH_2-、$CH_3CH_2CH_2$-、$(CH_3)_2CH$-、$CH_3CH_2CH_2CH_2$-、$CH_3CH_2CH(CH_3)$-和$(CH_3)_3C$-。如果涉及烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基或杂环基没有指出“a”和“b”，则应认为是在这些定义中描述的最宽范围。

[0031] 如本文中所用，“烷基”是指包含完全饱和的(无双键或三键)烃基的直链或支链烃链。所述烷基可以具有1至20个碳原子(每当其出现在本文中时，诸如“ 1至20”的数值范围是指给定范围内的每个整数；例如，“1至20个碳原子”意指该烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等组成，直至并包括20个碳原子，然而本定义还涵盖了没有指出数值范围的术语“烷基”的出现)。所述烷基也可以是具有1至10个碳原子的中等尺寸的烷基。所述烷基也可以是具有1至6个碳原子的低级烷基。化合物的烷基可以被指定为“C1-C4 烷基”或类似的名称。仅作为实例，“C1-C4 烷基”表示在烷基链中存在一至四个碳原子，即，该烷基链

选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。所述烷基可以是取代的或未取代的。

[0032] 如本文中所用，“烯基”是指在直链或支链烃链中包含一个或多个双键的烷基。烯基的实例包括烯丙基、乙烯基甲基和乙烯基。烯基可以是未取代的或取代的。

[0033] 如本文中所用，“炔基”是指在直链或支链烃链中包含一个或多个三键的烷基。炔基的实例包括乙炔基和丙炔基。炔基可以是未取代的或取代的。

[0034] 如本文中所用，“环烷基”是指完全饱和的(无双键或三键的)单环或多环烃环体系。当由两个或更多个环组成时，这些环可以融合的方式连接在一起。环烷基可以在环中包含3至10个原子或在环中包含3至8个原子。环烷基可以是未取代的或取代的。典型的环烷基包括但绝不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0035] 如本文中所用，“环烯基”是指在至少一个环中含有一个或多个双键的单环或多环烃环体系；然而，如果存在多于一个双键，这些双键不能在所有环上形成完全离域的π电子体系(否则该基团将为“芳基”，如本文中所定义)。当由两个或更多个环组成时，这些环可以融合的方式连接在一起。环烯基可以在环中包含3至10个原子或在环中包含3至8个原子。环烯基可以是未取代的或取代的。

[0036] 如本文中所用，“芳基”是指在所有环上具有完全离域的π电子体系的碳环(全部为碳)的单环或多环芳族环体系(包括两个碳环共享一个化学键的稠合环体系)。芳基中的碳原子数可以变化。例如，所述芳基可以是C6-C14芳基、C6-C10芳基或C6芳基。所述芳基的实例包括但不限于苯、萘和蒽。芳基可以是取代的或未取代的。

[0037] 如本文中所用，“杂芳基”是指单环、双环和三环的芳族环体系(具有完全离域的π电子体系的环体系)，其包含一个或多个杂原子(例如1至5个杂原子)，即，除碳以外的元素，包括但不限于氮、氧和硫。杂芳基的环中的原子数可以变化。例如，所述杂芳基可以在环中包含4至14个原子、在环中包含5至10个原子或在环中包含5至6个原子。此外，术语“杂芳基”包括稠合环体系，其中两个环，例如至少一个芳基环与至少一个杂芳基环，或至少两个杂芳基环，共享至少一个化学键。杂芳基环的实例包括但不限于呋喃、呋咱、噻吩、苯并噻吩、酞嗪、吡咯、噁唑、苯并噁唑、1,2,3-噁二唑、1,2,4-噁二唑、噻唑、1,2,3-噻二唑、1,2,4-噻二唑、苯并噻唑、咪唑、苯并咪唑、吲哚、吲唑、吡唑、苯并吡唑、异噁唑、苯并异噁唑、异噻唑、三唑、苯并三唑、噻二唑、四唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、嘌呤、蝶啶、喹啉、异喹啉、喹唑啉、喹喔啉、噌啉和三嗪。杂芳基可以是取代的或未取代的。

[0038] 如本文中所用，“杂环基”或“杂脂环基”是指三元、四元、五元、六元、七元、八元、九元、十元、直至18元的单环、双环和三环体系，其中碳原子与1至5个杂原子一起构成所述环体系。杂环可以任选地包含一个或多个不饱和键，但是其位置使得在所有环上不会出现完全离域的π电子体系。杂原子是除碳以外的元素，包括但不限于氧、硫和氮。杂环可以进一步包含一个或多个羰基或硫代羰基官能团，以便使该定义包括氧代体系和硫代体系，如内酰胺、内酯、环状酰亚胺、环状硫代酰亚胺和环状氨基甲酸酯。当由两个或更多个环组成时，这些环可以以融合的方式连接在一起。另外，杂脂环基中的任何氮都可以被季铵化。杂环基或杂脂环基可以是未取代的或取代的。这样的“杂环基”或“杂脂环基”基团的实例包括但不限于1,3-二噁英、1,3-二噁烷、1,4-二噁烷、1,2-二氧杂环戊烷、1,3-二氧杂环戊烷、1,4-二氧

杂环戊烷、1,3-氧杂硫杂环己烷、1,4-氧杂硫杂环己二烯、1,3-氧杂硫杂环戊烷、1,3-二硫杂环戊二烯、1,3-二硫杂环戊烷、1,4-氧杂硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-噁嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二氧代哌嗪、乙内酰脲、二氢尿嘧啶、三噁烷、六氢-1,3,5-三嗪、咪唑啉、咪唑烷、异噁唑啉、异噁唑烷、噁唑啉、噁唑烷、噁唑烷酮、噻唑啉、噻唑烷、吗啉、环氧乙烷、哌啶N-氧化物、哌啶、哌嗪、吡咯烷、吡咯烷酮、吡咯烷二酮(pyrrolidione)、4-哌啶酮、吡唑啉、吡唑烷、2-氧代吡咯烷、四氢吡喃、4H-吡喃、四氢噻喃、噻吗啉、噻吗啉亚砜、噻吗啉砜及其苯并稠合类似物(例如苯并咪唑烷酮、四氢喹啉和3,4-亚甲基二氧苯基)。

[0039] 如本文中所用,“芳烷基”和“芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的芳基。芳基(烷基)的低级亚烷基和芳基可以是取代的或未取代的。实例包括但不限于苄基、2-苯基(烷基)、3-苯基(烷基)和萘基(烷基)。

[0040] 如本文中所用,“杂芳烷基”和“杂芳基(烷基)”是指作为取代基经由低级亚烷基连接的杂芳基。杂芳基(烷基)的低级亚烷基和杂芳基可以是取代的或未取代的。实例包括但不限于2-噻吩基(烷基)、3-噻吩基(烷基)、呋喃基(烷基)、噻吩基(烷基)、吡咯基(烷基)、吡啶基(烷基)、异噁唑基(烷基)、咪唑基(烷基)及其苯并稠合类似物。

[0041] 如本文中所用,“烷氧基”是指式-OR,其中R为本文定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。烷氧基的非限制性列表是甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、苯氧基和苯甲酰氧基。烷氧基可以是取代的或未取代的。

[0042] 如本文中所用,“酰基”是指作为取代基经由羰基连接的氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳基(烷基)或杂环基(烷基)。实例包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基。酰基可以是取代的或未取代的。

[0043] 如本文中所用,术语“杂环碱”是指可以连接至任选取代的戊糖基或改性戊糖基上的任选取代的含氮杂环基。在一些实施方案中,所述杂环碱可以选自任选取代的嘌呤碱、任选取代的嘧啶碱和任选取代的三唑碱(例如1,2,4-三唑)。术语“嘌呤碱”在本文中以其如本领域技术人员所理解的一般意义来使用,并且包括其互变异构体。类似地,术语“嘧啶碱”在本文中以其如本领域技术人员所理解的一般意义来使用,并且包括其互变异构体。任选取代的嘌呤碱的非限制性列表包括嘌呤、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、别黄嘌呤、7-烷基鸟嘌呤(例如7-甲基鸟嘌呤)、可可碱、咖啡因、尿酸和异鸟嘌呤。嘧啶碱的实例包括但不限于胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶和5-烷基胞嘧啶(例如5-甲基胞嘧啶)。任选取代的三唑碱的一个实例是1,2,4-三唑-3-甲酰胺。杂环碱的其他非限制性实例包括二氨基嘌呤、8-氧代-N^6-烷基腺嘌呤(例如8-氧代-N^6-甲基腺嘌呤)、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、N^4,N^4-桥亚乙基胞嘧啶(N^4,N^4-ethanocytosin)、N^6,N^6-桥亚乙基(ethano)-2,6-二氨基嘌呤、5-卤尿嘧啶(例如5-氟尿嘧啶和5-溴尿嘧啶)、假异胞嘧啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤和记载于美国专利No. 5,432,272和7,125,855中的其他杂环碱,出于公开其他杂环碱的有限目的,通过引用将其并入本文。在一些实施方案中,杂环碱可以是任选地被胺或烯醇保护基取代的。

[0044] 如本文中所用,“-N-连接的氨基酸”是指经由主链氨基或单取代的氨基与所指出基团连接的氨基酸。当在- N-连接的氨基酸中连接该氨基酸时,作为主链氨基或单取代氨

基的一部分的氢之一不存在，并且该氨基酸经由氮连接。N-连接的氨基酸可以是取代的或未取代的。

[0045] 如本文中所用，“—N-连接的氨基酸酯”是指其中主链羧酸基团已被转化成酯基的氨基酸。在一些实施方案中，所述酯基具有选自以下的结构式：烷基-O—C(=O)—、环烷基-O—C(=O)—、芳基-O—C(=O)— 和芳基(烷基)-O—C(=O)—。所述酯基的非限制性列表包括以下的取代和未取代的形式：甲基-O—C(=O)—、乙基-O—C(=O)—、正丙基-O—C(=O)—、异丙基-O—C(=O)—、正丁基-O—C(=O)—、异丁基-O—C(=O)—、叔丁基-O—C(=O)—、新戊基-O—C(=O)—、环丙基-O—C(=O)—、环丁基-O—C(=O)—、环戊基-O—C(=O)—、环己基-O—C(=O)—、苯基-O—C(=O)—、苄基-O—C(=O)—和萘基-O—C(=O)—。N-连接的氨基酸酯衍生物可以是取代的或未取代的。

[0046] 如本文中所用，“-O-连接的氨基酸”是指经由其主链羧酸基团的羟基与所指出基团连接的氨基酸。当在一个- O -连接的氨基酸中连接该氨基酸时，作为其主链羧酸基团的羟基的一部分的氢不存在，并且该氨基酸经由氧连接。O-连接的氨基酸可以是取代的或未取代的。

[0047] 如本文中所用，术语“氨基酸”是指任何氨基酸(标准和非标准氨基酸两者)，包括但不限于α-氨基酸、β-氨基酸、γ-氨基酸和δ-氨基酸。合适氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、精氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸。合适的氨基酸的其他实例包括但不限于鸟氨酸、羧腐胺赖氨酸(hypusine)、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸、γ-氨基丁酸、瓜氨酸、β-丙氨酸、α-乙基甘氨酸、α-丙基甘氨酸和正亮氨酸。

[0048] 术语“氨基酸”包括天然存在的和合成的β、γ或δ氨基酸。所述氨基酸可以呈D-或L-构型。所述氨基酸可以是下述的衍生物：丙氨酰基、缬氨酰基、亮氨酰基、异亮氨酰基、脯氨酰基、苯丙氨酰基、色氨酰基、甲硫氨酰基、甘氨酰基、丝氨酰基、苏氨酰基、半胱氨酰基、酪氨酰基、天冬酰胺酰基、谷氨酰胺酰基、天冬氨酰基、戊二酰基、赖氨酰基、精氨酰基、组氨酰基、β- 丙氨酰基、β-缬氨酰基、β-亮氨酰基、β-异亮氨酰基、β-脯氨酰基、β-苯丙氨酰基、β-色氨酰基、β-甲硫氨酰基、β-甘氨酰基、β-丝氨酰基、β-苏氨酰基、β-半胱氨酰基、β-酪氨酰基、β-天冬酰胺酰基、β-谷氨酰胺酰基、β-天冬氨酰基、β-戊二酰基、β-赖氨酰基、β-精氨酰基 或β-组氨酰基。

[0049] 如本文中所用，术语“脱氧核苷”是指包含脱氧糖的任何核苷，即，通过用氢原子替代羟基在形式上衍生自糖的任何化合物，例如脱氧核糖。

[0050] 如本文中所用，术语“ dNTP”是指脱氧核糖核苷三磷酸。每个dNTP由磷酸基团、脱氧核糖和含氮碱组成。有四种不同的dNTP，并且可以分为两组：嘌呤类和嘧啶类。dATP(脱氧腺苷5'-三磷酸)和dGTP(脱氧鸟苷5'-三磷酸)组成嘌呤类，而dTTP(脱氧胸苷5'-三磷酸)和dCTP(脱氧胞苷5'-三磷酸)组成嘧啶类。特征在于嘌呤的碱(腺嘌呤和鸟嘌呤)均具有双环结构，而特征在于嘌呤的碱(胸腺嘧啶和胞嘧啶)均具有单环结构。

[0051] 如本文中所用，术语“线粒体DNA耗竭综合征”是指一类表型多样的疾病和病症，其特征在于患病的组织和器官(例如肌肉、肝脑和/或胃肠道)中的线粒体DNA(mtDNA)含量严重减少。该减少或耗竭可以由可用于mtDNA复制的线粒体核苷酸池中的任何失衡以及线粒体复制中的异常引起。基于发病年龄，分为两种亚型：先天性(或早发作)和婴儿型(或较晚

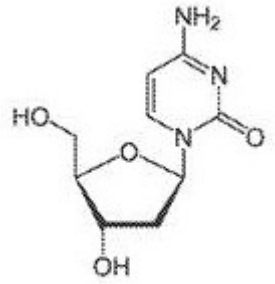
发作)。尽管在较晚发作的形式中存活时间更长,但该综合征对几乎所有患者都是致命的,且目前尚无有效的治疗方法。

[0052] I.前药

本发明提供了脱氧核苷酸前药。“脱氧核苷”是指2'-脱氧核苷,例如脱氧胞苷(dC,如下所示)、脱氧胸苷(dT)脱氧腺苷(dA)和脱氧鸟苷(dG)。每个名称的全名和通用缩写将互换使用。

[0053] 在特定的实施方案中,Base选自胞嘧啶、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和腺嘌呤。

[0054] 同样地,本文中描述的前药是脱氧胞苷前药(dC前药)、脱氧胸苷前药(dT前药)、脱氧鸟苷前药(dG前药)和脱氧腺苷前药(dA前药)。

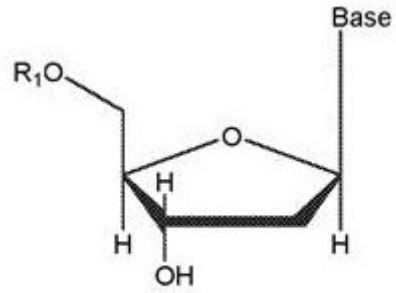


2'-脱氧胞苷

[0055] 所述前药优选呈天然的β-D-构型。

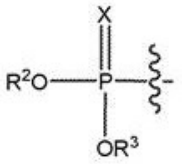
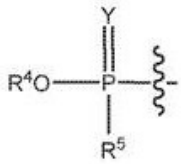
[0056] 在一个实施方案中,前药策略包括掩蔽反应性基团,例如体内带电荷的-OH和磷酸基团,以允许其穿过细胞膜。

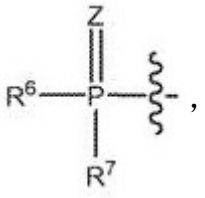
[0057] 在一个实施方案中,本发明提供了式I的前药:



式I

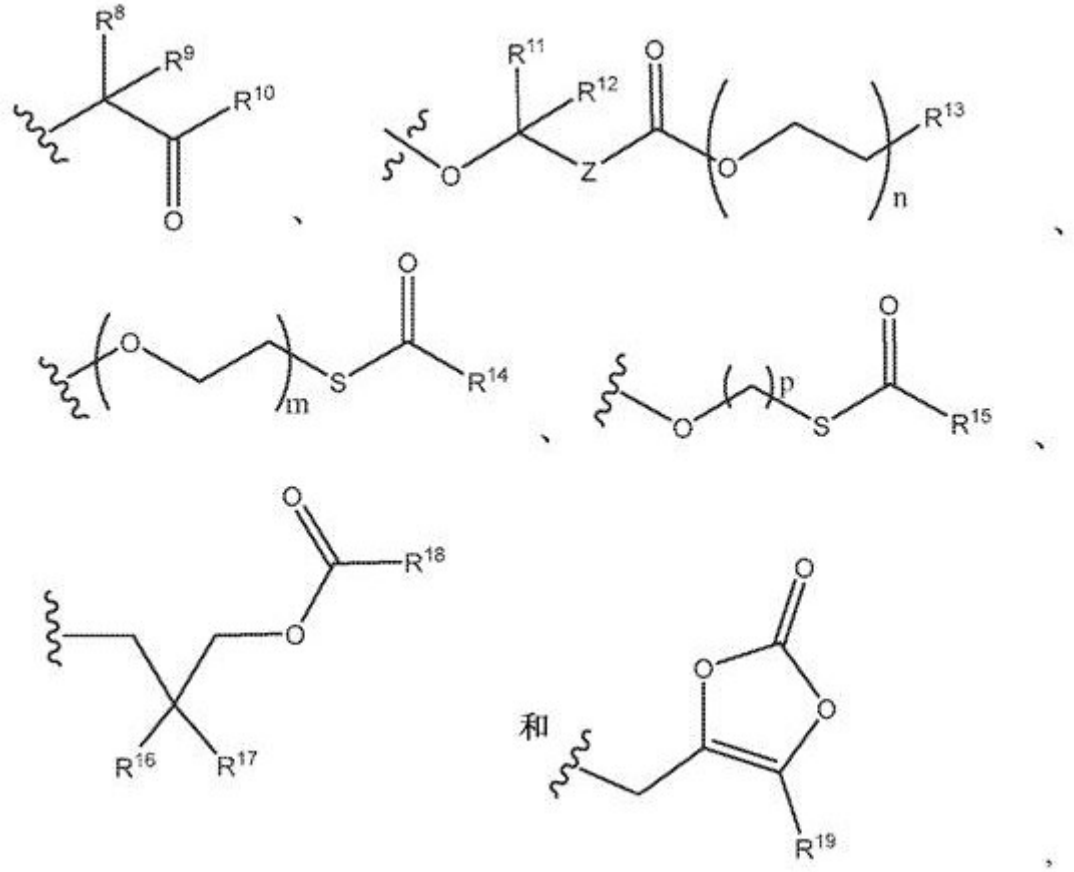
其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱;

R^1选自任选取代的酰基、任选取代的O-连接的氨基酸、、和



X、Y和Z各自独立地选自O和S；

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



或者R^2 和R^3可以一起形成环状基团；

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

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

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

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

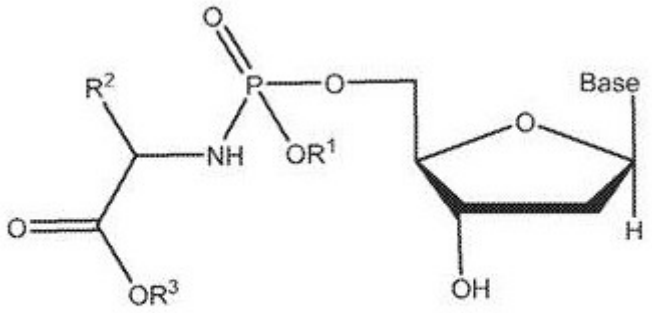
R^{16} 和R^{17} 各自独立地选自-CN、任选取代的C_{2-8} 有机基羰基、C_{2-8} 烷氧基羰基和C_{2-8} 有机基氨基羰基；

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

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

n、m和p 各自独立地选自0、1、2或3。

[0058] 在一个特别的实施方案中,所述前药是式Ia的化合物:



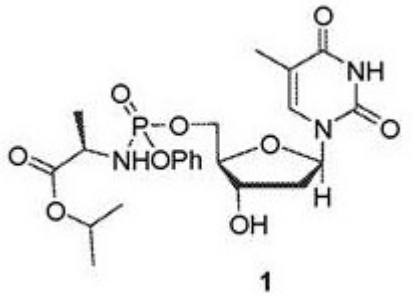
式Ia

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

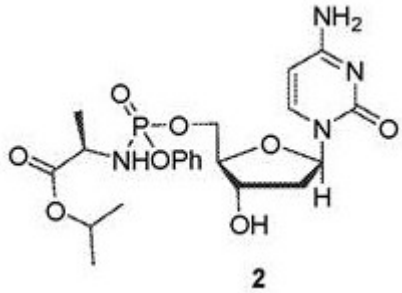
[0059] 在一个特别的实施方案中,R^1是芳基,R^2是C_{1-24} 烷基 和R^3是C_{1-24} 烷基。

[0060] 在另一个特别的实施方案中,R^2是氨基酸侧链。

[0061] 在又一个特别的实施方案中,所述前药选自下述化合物中的一种:

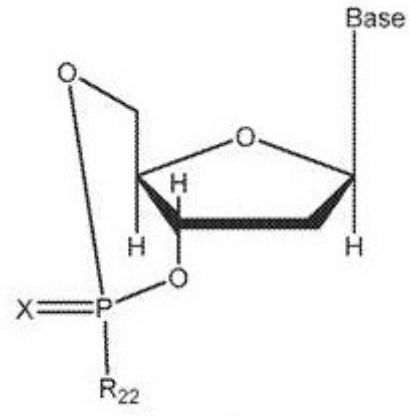


1



2

在另一实施方案中,本发明提供了式II的前药:

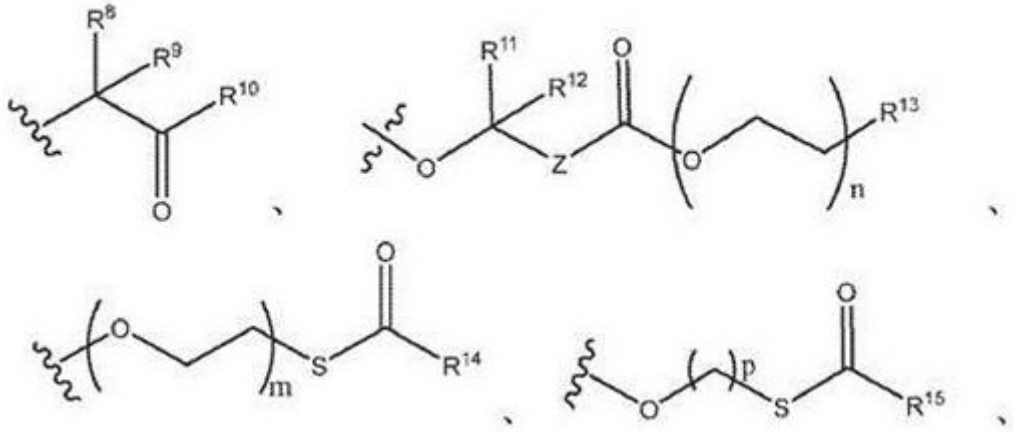


式II

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱；

X 选自S和O；和

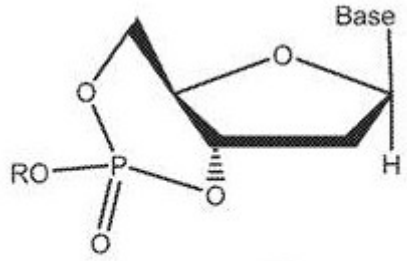
R^{22} 选自-O-、-OH、-O-烷基、任选取代的C_{1-6} 烷氧基、



任选取代的N-连接的氨基酸和任选取代的N-连接的氨基酸酯；

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

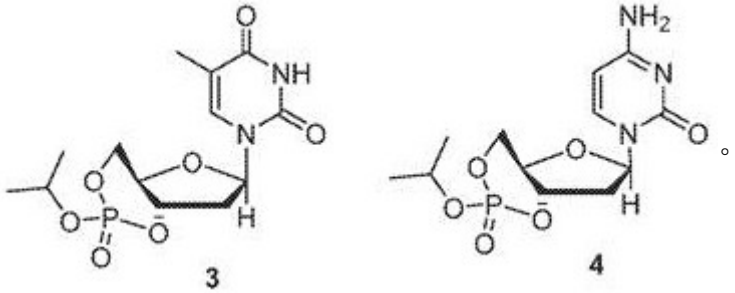
[0062] 在一个特别的实施方案中，所述前药是式IIa的化合物：



式IIa

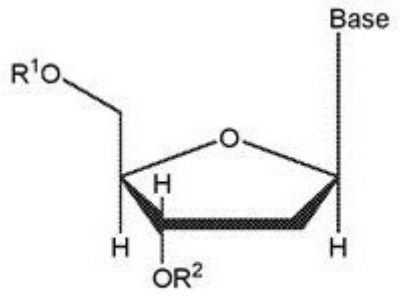
其中R是C_{1-4} 烷基。

[0063] 在又一特别的实施方案中，所述前药选自下述化合物中的一种：



3 4

[0064] 在又一实施方案中，本发明提供了式III的前药：

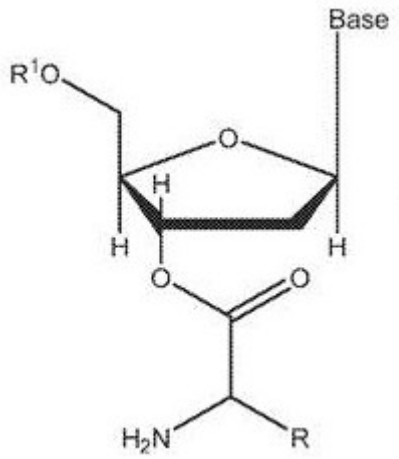


式III

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱;

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

[0065] 在一个实施方案中,R^2是 氨基酸,即式III的化合物是3'-氨基酸酯,例如式IIIa的化合物:

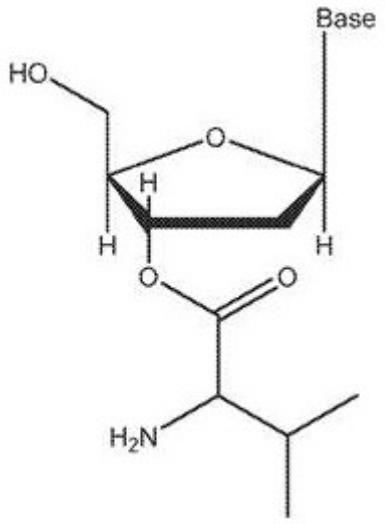


式IIIa

其中R是氨基酸的侧链。

[0066] 在一个特别的实施方案中,所述氨基酸是缬氨酸 (即R是$CH(CH_3)_2$)。

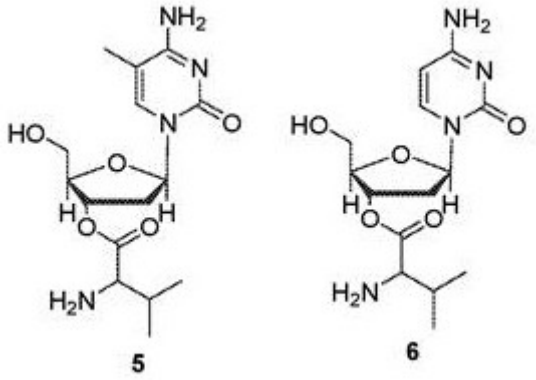
[0067] 在一个更特别的实施方案中,所述前药是式IIIb的化合物:



式IIIb

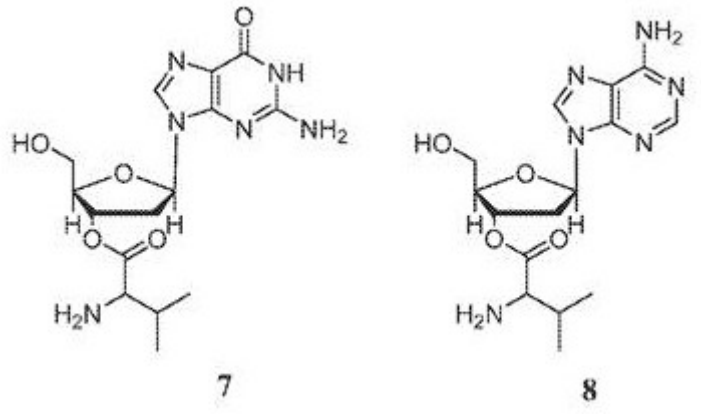
其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱。

[0068] 在又一个更特别的实施方案中,所述前药选自下述化合物中的一种:



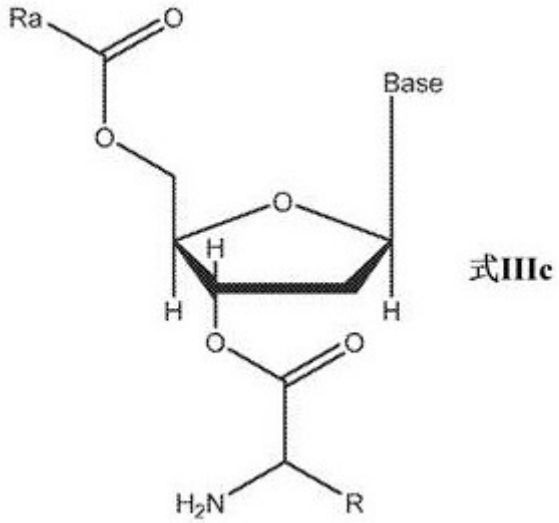
5 6

在又一特别的实施方案中,所述前药选自下述化合物中的一种:



7 8

在又一实施方案中,所述前药是式IIIc的化合物:



式IIIc

其中Base是指任选取代的杂环碱或具有被保护的氨基的任选取代的杂环碱；

Ra是直链、支链或环状的烷基，和R是氨基酸的侧链。

[0069] 在一个特别的实施方案中，Ra 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基 和R是$CH(CH_3)_2$。

[0070] II. 使用方法

本发明提供了一种在有需要的对象中治疗特征在于失衡的核苷酸池的疾病或病症的方法，包括向对象施用治疗有效量的至少一种本文所述的前药。

[0071] 在一个实施方案中，上文所述的前药可用于本方法中。

[0072] 所述前药可以以其本身(即单独地)施用或以药物组合物的形式施用。包含一种或多种用于施用的前药的药物组合物可以包含治疗有效量的所述前药和药学上可接受的载体。短语“药学上可接受的”是指这样的分子实体和组合物：当其施用给人类时是在生理上可耐受的并且通常不产生变态反应或类似的不适反应例如胃不适、眩晕等，并经联邦或州政府的监管机构批准或列在用于动物、且更特别用于人类的《美国药典》或其他普遍认可的《药典》中。“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这样的药物载体可以是无菌液体，如在水和油中的盐溶液，所述油包括石油、动物、植物或合成来源的那些，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当所述药物组合物静脉内施用时，盐溶液是优选的载体。盐溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体，特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，组合物还可包含少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0073] 在一个特别的实施方案中，所公开的方法可以用于治疗线粒体DNA(mtDNA)耗竭综合征(MDS)。每个有核细胞都包含数百个线粒体，它们是受双重基因组控制的独特细胞器。线粒体包含它们自己的DNA、mtDNA，但大多数线粒体蛋白都是由核基因编码的，包括复制、转录和修复mtDNA所需的所有蛋白。

[0074] mtDNA的维持需要对mtDNA合成、对维持线粒体核苷酸池和对介导线粒体融合所必需的蛋白。合成mtDNA的酶需要线粒体内核苷酸的平衡供应。这些是通过线粒体核苷酸补救途径和经由特异性转运蛋白从细胞质中导入核苷酸来供应的。为了在mtDNA合成中正确发

挥作用，需要适当平衡这些酶的量。已知mtDNA合成所需的蛋白由核基因编码。当致病性变体破坏由这些基因编码的任何一种蛋白的功能时，mtDNA合成就会受损，导致mtDNA的量的缺陷(mtDNA耗竭)或mtDNA的性质的缺陷(多重mtDNA缺失)。迄今为止，已知多于20个核基因中的致病性变体与mtDNA维持缺陷有关。

[0075] 在一个实施方案中，mt DNA耗竭综合征是基于核DNA的mtDNA耗竭综合征。在一个特别的实施方案中，所述核DNA编码参与核苷酸代谢的蛋白。游离核苷酸浓度的失衡导致mtDNA复制受到干扰，并因此导致mtDNA拷贝数减少。

[0076] 在一个特别的实施方案中，本发明的方法用于治疗由脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)池失衡引起的疾病或病症。dTNP是DNA聚合酶用于在动物细胞中复制和修复核和线粒体DNA的前体。dNTP的浓度取决于合成、消耗和降解之间的平衡。

[0077] 准确的DNA合成需要足够量的每种dNTP和适当平衡的dNTP池。在S期期间，总细胞池大小在10-100皮摩尔每种dNTP /百万细胞的范围内，线粒体池占总数的最多10％。在静止或分化的细胞中，池在细胞质和线粒体中均降低约9/10。与基于DNA中4种氮碱基的大致等摩尔丰度可预期的相反，四种dNTP以不同的比例存在于池中，嘧啶类通常超过嘌呤类。即使单个细胞系衍生自相同的动物物种，它们也可能显示不同的池组成。一种dNTP浓度的增加通常会导致另一种dNTP的耗竭。

[0078] mtDNA耗竭综合征可能涉及特定的组织或器官，例如肌肉、肝脏、脑和/或胃肠道。在一个特别的实施方案中，mtDNA耗竭综合征是肌病性或肝脑综合征。

[0079] 以失衡的核苷酸池为特征的示例性病症包括但不限于TK2缺乏症、与RRM2B(编码p53R2，核糖核苷酸还原酶RNR的p53可诱导小亚基)相关的缺乏症和TYMP(编码胸苷磷酸化酶，TP)中的突变，其引起线粒体神经胃肠道脑肌病变(MNGIE)。破坏线粒体dNTP池的其他核基因包括但不限于SUCLA2、SUCLG1和MPV17。由于DGUOK中的常染色体隐性突变与dGMP和dAMP的缺乏，脱氧鸟苷激酶(dGK)的平行缺陷引起通常表现为儿童早期发作的肝脑疾病的mtDNA耗竭(Mandel等，2001)。与这些基因有关的疾病也能用本文的方法治疗。

[0080] 在一个特别的实施方案中，所述病症是胸苷激酶2(TK2)缺乏症。TK2是一种线粒体酶，其参与补救线粒体DNA(mtDNA)复制所需的脱氧核糖核苷酸。TK2催化脱氧嘧啶补救途径的第一步和限速步骤。常染色体隐性TK2突变引起从婴儿发作到成人发作的一系列疾病，主要表现为肌病。

[0081] 由于MDS的其它形式和其它病症的机理得到了阐明，熟练的执业医师可确定用于治疗的合适脱氧核苷。

[0082] 例如，对于TK2缺乏症的患者，将施用dC和/或dT的前药。在另一个实施例中，对于具有DGUOK缺乏症的患者，将施用dG和/或dA的前药。

[0083] 在一个实施方案中，本方法进一步包括识别患有特征在于失衡的核苷酸池的疾病或病症的患者。在一个实施方案中，该疾病或病症是TK2缺乏症。可以对表现出TK2缺乏症的上文所讨论的表型(包括以一般性张力减退、近端肌无力、先前获得的运动技能丧失、进食不良和呼吸困难为特征的进行性肌肉疾病的最典型表现)的患者进行测试以明确地诊断疾病。

[0084] 应当使用已知引起mtDNA耗竭综合征的一组基因进行分子遗传测试(Chanprasert等人，2012)，也可用于识别患有以失衡的核苷酸池为特征的疾病或病症的患者。

[0085] TK2基因是已知其中的突变引起TK2相关的线粒体DNA耗竭综合征的唯一基因。该测试可包括对TK2的整个编码和外显子/内含子接合区进行的序列分析，以找到序列变体和缺失/重复。如果在序列分析中识别出复合杂合或纯合有害的突变，则TK2缺乏症的诊断得到证实，并且因此，对象将受益于脱氧核苷疗法。如果序列分析没有识别出两种复合杂合或纯合有害的突变，则应考虑缺失/重复分析，以确定和/或证实TK2缺乏症诊断。

[0086] 确定和/或证实TK2缺乏症诊断的进一步测试可以包括测试血清肌酸激酶(CK)浓度、肌电图、骨骼肌的组织病理学、线粒体DNA(mtDNA)含量(拷贝数)和骨骼肌中的电子转运链(ETC)活性。如果在这些测试中发现以下一项或多项，则TK2缺乏症得到确定和/或证实。与健康对照相比，升高的CK浓度可以表明TK2缺乏症。可以进行骨骼肌活检，然后进行骨骼肌的mtDNA含量分析。如果骨骼肌活检显示出纤维尺寸上的显著差异、可变的肌质泡、可变的增加的结缔组织和参差不齐的红纤维以及增加的琥珀酸脱氢酶(SDH)活性和低至没有细胞色素c氧化酶(COX)活性，并且mtDNA拷贝数严重减少(通常小于年龄和组织匹配的健康对照的20％)，则可确定和/或证实TK2缺乏症的诊断 (Chanprasert等人，2012)。

[0087] 此外，TK2缺乏症以常染色体隐性方式遗传。因此，可以在出生后尽可能早地测试患病患者的同胞以诊断所述疾病。

[0088] 可以经由任何途径施用，包括但不限于鞘内、肠胃外、粘膜和经皮。

[0089] 在一个实施方案中，施用是口服的。示例性的口服剂型包括但不限于胶囊、片剂、粉剂、颗粒、溶液、糖浆、混悬剂(在非水性或水性液体中)或乳剂。片剂或硬明胶胶囊可以包含乳糖、淀粉或其衍生物、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁、硬脂酸或其盐。软明胶胶囊可以包含植物油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇。溶液和糖浆可以包含水、多元醇和糖。可以将本文所述的前药添加到患者将食用的任何形式的液体中，包括但不限于奶、牛和人二者的乳汁、婴儿配方食品和水。前药可以涂覆有或混合有延迟在胃肠道中崩解和/或吸收的材料。因此，可以实现经许多小时的持续释放。

[0090] 在另一个实施方案中，施用是鞘内的。鞘内施用涉及将药物注射入椎管，更具体地是蛛网膜下腔，以使其到达脑脊髓液。此方法通常用于脊椎麻醉、化学疗法和止痛药。鞘内施用可以通过腰椎穿刺(推注)或通过药盒导管系统(推注或输注)来进行。最通常将导管插入腰椎椎板之间，且尖端向上穿过鞘隙至所需水平(通常L3-L4)。鞘内制剂最常使用水和盐水作为赋形剂，但也使用过EDTA和脂质。

[0091] 在又一个实施方案中，施用是肠胃外的，包括静脉内。适合于肠胃外施用的药物组合物包括水性和非水性无菌可注射溶液或混悬剂，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使组合物与对象的血液基本上等渗的溶质。可存在于这样的组合物中的其他组分包括水、醇类、多元醇、甘油和植物油。适于肠胃外施用的组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中，如密封的安瓿瓶和小瓶，并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下保存，仅需要在临使用前添加无菌载体。临时注射溶液和混悬剂可以由无菌粉剂、颗粒和片剂来制备。可用于提供本发明的肠胃外剂型的合适的媒介物是本领域技术人员熟知的。实例包括：注射用水USP；水性媒介物，如氯化钠注射液、林格氏注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液和乳酸化林格氏注射液；水混溶性媒介物，如乙醇、聚乙二醇和聚丙二醇；和非水性媒介物，如玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯甲酸苄酯。另外，由于一些患者可能在治疗开始时就在接受肠内营养，因此可以通过膳食饲管(gastronomy feeding

tube)或其他肠内营养手段来施用前药。

[0092] 适用于经鼻和经肺施用的药物组合物可以包含固体载体,如粉剂,其可以通过快速吸入通过鼻施用。经鼻施用的组合物可以包含液体载体,如喷雾剂或滴剂。替代地,可以通过深度吸入或通过吹口安装实现直接吸入到肺中。这些组合物可以包含活性成分的水溶液或油溶液。吸入用组合物可以提供在特别适合的装置中,包括但不限于加压喷雾器、雾化器或吹入器,其可以被构造为提供预定剂量的活性成分。

[0093] 适用于直肠施用的药物组合物可以以栓剂或灌肠剂的形式提供。适用于阴道施用的药物组合物可以以子宫托、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂的形式提供。

[0094] 适用于经皮施用的药物组合物可以作为分立的贴剂来提供,旨在与接受者的表皮经长时间保持紧密接触。

[0095] 所述至少一种前药或包含其的组合物的施用量可以为约25 mg/kg/天至约1,000 mg/kg/天。进一步优选的剂量范围为约200 mg/kg/天至约800 mg/kg/天。进一步优选的剂量范围为约100 mg/kg/天至约600 mg/kg/天,如例如约250 mg/kg/天至约500 mg/kg/天,约300 mg/kg/天至约500 mg/kg/天或约400 mg/kg/天至约500 mg/kg/天。

[0096] 在一个实施方案中,该剂量是标准核苷(dT、dC、dG、dA)的约20%等摩尔至约100%等摩尔,例如约20%至约80%、约20%至约50%、约50%至约80%或约50%至约100%。在一个特别的实施方案中,所述剂量是标准核苷的约20%等摩尔。在另一个特别的实施方案中,所述剂量是标准核苷的约50%等摩尔。在又一实施方案中,所述剂量是标准核苷的约100%等摩尔。

[0097] 所述至少一种前药或包含其的组合物的施用可以为一天一次、一天两次、一天三次、一天四次、一天五次、直至一天六次,优选以规律的间隔。如果静脉内或鞘内施用,剂量也可以降低。这样的施用的优选剂量范围为约50 mg/kg/天至约500 mg/kg/天。

[0098] 在其中组合物包含多于一种前药的实施方案中,前药的比例可以变化。例如,如果要施用两种前药,它们可以为50/50的比例,或以约5/95、10/90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、55/45、60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10和95/5的比例。

[0099] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括在增加剂量之前监测对象的病况改善。可以通过观察对象的肌肉力量和控制、行动能力以及身高和体重的变化来监测对象对治疗性施用的响应。如果在施用后这些参数中的一个或多个增加,则可以继续治疗。如果这些参数中的一个或多个保持不变或降低,则可以增加剂量。

[0100] 在另一实施方案中,所述方法进一步包括在降低剂量之前监测对象的不良反应。示例性的不良反应包括但不限于腹泻、腹胀和其他胃肠道表现。

[0101] 本发明的前药也可以与其他药剂共同施用。这样的药剂将包括用于治疗MDS的特定形式的症状的治疗剂。特别地,对于TK2缺乏症,其他药剂包括普遍存在的核苷分解代谢酶的抑制剂,包括但不限于酶抑制剂,如四氢尿苷(胞苷脱氨酶的抑制剂)和immucillin H(嘌呤核苷磷酸化酶的抑制剂)和三氟胸苷(tipiracil)(胸苷磷酸化酶的抑制剂)。这样的抑制剂是已知的并且用于治疗某些癌症。

实施例

[0102] 实施例1：TK2缺乏症的小鼠模型

本文所述的前药的有效性经由小鼠模型获得。先前已经报道过纯合的Tk2 H126N敲入突变体(*Tk2*$^{-/-}$)小鼠，其表现出与人类婴幼儿脑肌病变惊人相似的表型(Akman等人，2008)。在出生后第10天与第13天之间，Tk2$^{-/-}$小鼠迅速发展为致命性脑肌病变，其特征为步行减少(decreased ambulation)、步态不稳、粗大震颤、生长迟缓，并且迅速进展为在14至16日龄时的早亡。小鼠模型的分子及生化分析表明，所述疾病的发病机理是由于酶活性的丧失和随后发生的dNTP池失衡，伴随脑中dTTP水平降低以及肝中dTTP和dCTP两者水平降低，这继而产生mtDNA耗竭和含有mtDNA编码的亚基的呼吸链酶的缺陷，在脑和脊髓中最显著。

[0103] 通过每日口服管饲法给Tk2 H126N敲入小鼠(Tk2$^{-/-}$)和年龄匹配的对照 (Tk2^{+})以50μl的小型宠物用Esbilac配方奶(Pet-Ag)施用前药。3和4的50/50混合物以580 mg/kg/天给药。5和6的50/50混合物以120 mg/kg/天至430 mg/kg/天给药。

[0104] 所有治疗从出生后第4至第29天进行。在21日龄时，将小鼠与母亲分开，并通过口服施用继续治疗。称重突变体和对照Tk2^{+} 小鼠，并密切观察以进行比较。

[0105] 每天密切注意小鼠并称重(以前已经观察到，不能增重是所述疾病的首发征兆)。

[0106] 前药混合物以与标准核苷等效方式延长了tk2-/-小鼠的存活，并且在体重方面具有非统计学上显著的改善。

[0107] 实施例2：dGK缺乏患者来源的成纤维细胞

在dGK缺乏患者来源的成纤维细胞中测试前药，以确定其对mtDNA拷贝数的影响。使用dGK缺乏的成纤维细胞的一个优点是，在诱导静止后无需添加DNA破坏剂，它们就自发地进行mtDNA耗竭。先前已经表明，用dGuo(50μM)补充细胞培养基足以防止该耗竭。将细胞培养到融合。通过将培养基中的FBS降低至0.1％诱导静止。三天后(第0天)，我们向细胞培养基中补充了50μM的dGuo(脱氧鸟苷)或本发明的前药。定期添加新鲜培养基，将细胞维持在相同条件下达18天。在整个实验中的不同时间点(第4、9和18天)评估mtDNA拷贝数。结果表示为实验重复的平均值+SD，并且绘制为相对于平行培养的三个未处理的健康对照获得的平均值的mtDNA/nDNA比率。

[0108] 在相似条件下平行测试了等摩尔浓度的dGuo和其他可用的dG前药(50μM)。结果显示，在50μM下，7和8的50/50混合物防止了mtDNA耗竭。