



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105188373 B

(45)授权公告日 2017.09.22

(21)申请号 201480024389.1

(22)申请日 2014.05.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105188373 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(30)优先权数据

61/825,009 2013.05.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.10.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/038526 2014.05.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/189806 EN 2014.11.27

(73)专利权人 艾杜罗生物科技公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 T·W·小杜本斯盖 D·B·坎恩

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

(51)Int.Cl.

C07H 21/02(2006.01)

A61K 31/7084(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 20120164107 A1,2012.06.28,

WO 2005039535 A1,2005.05.06,

US 20080286296 A1,2008.11.20,

WO 2011003025 A1,2011.01.06,

审查员 王伟民

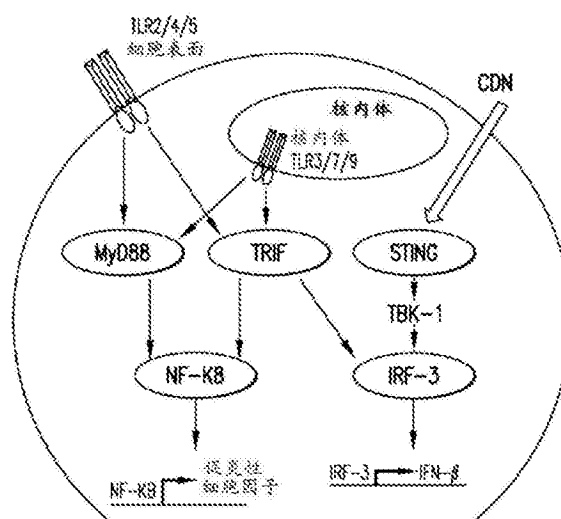
权利要求书2页 说明书18页 附图11页

(54)发明名称

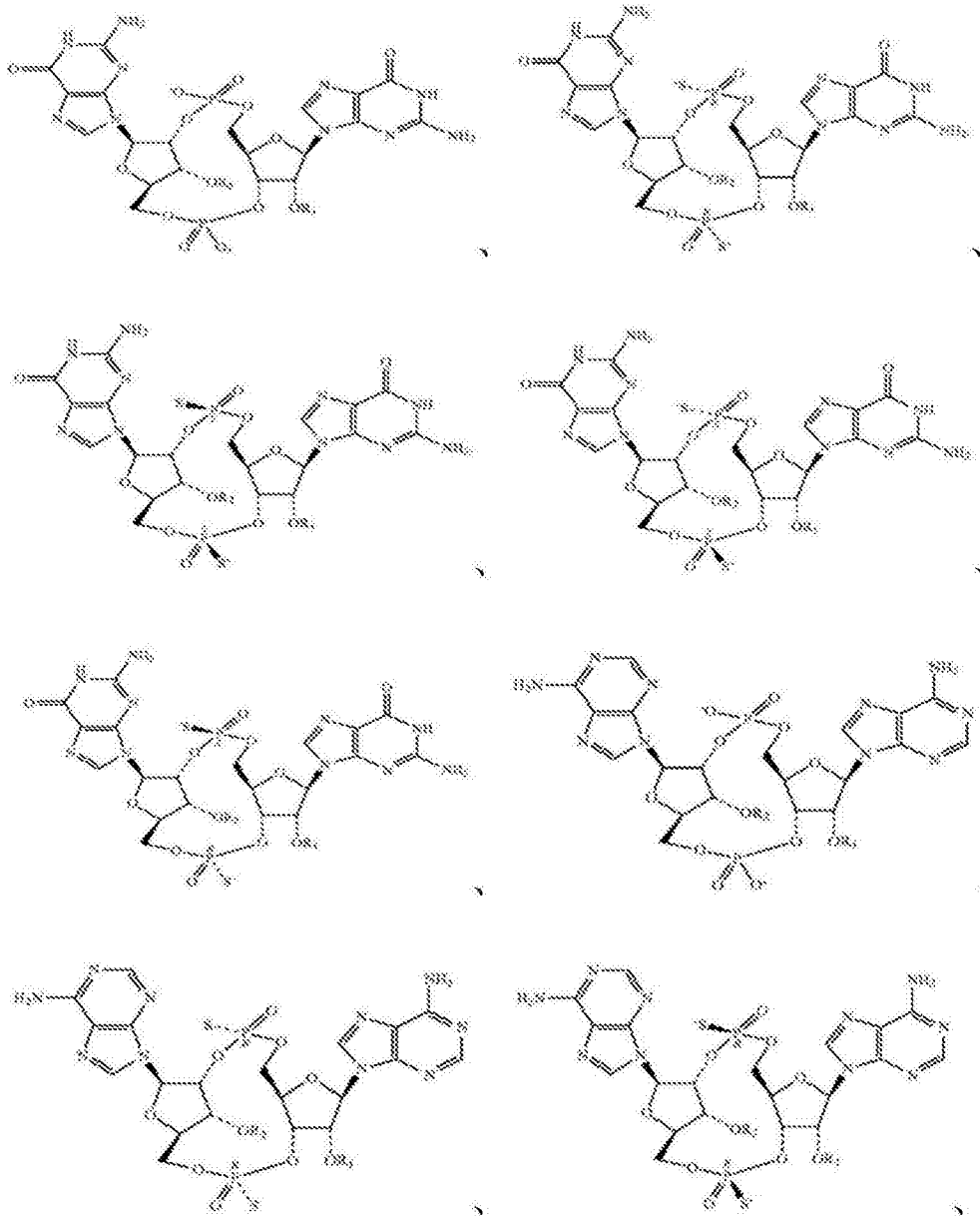
抑制“干扰素基因刺激蛋白”依赖性信号传导的组合物和方法

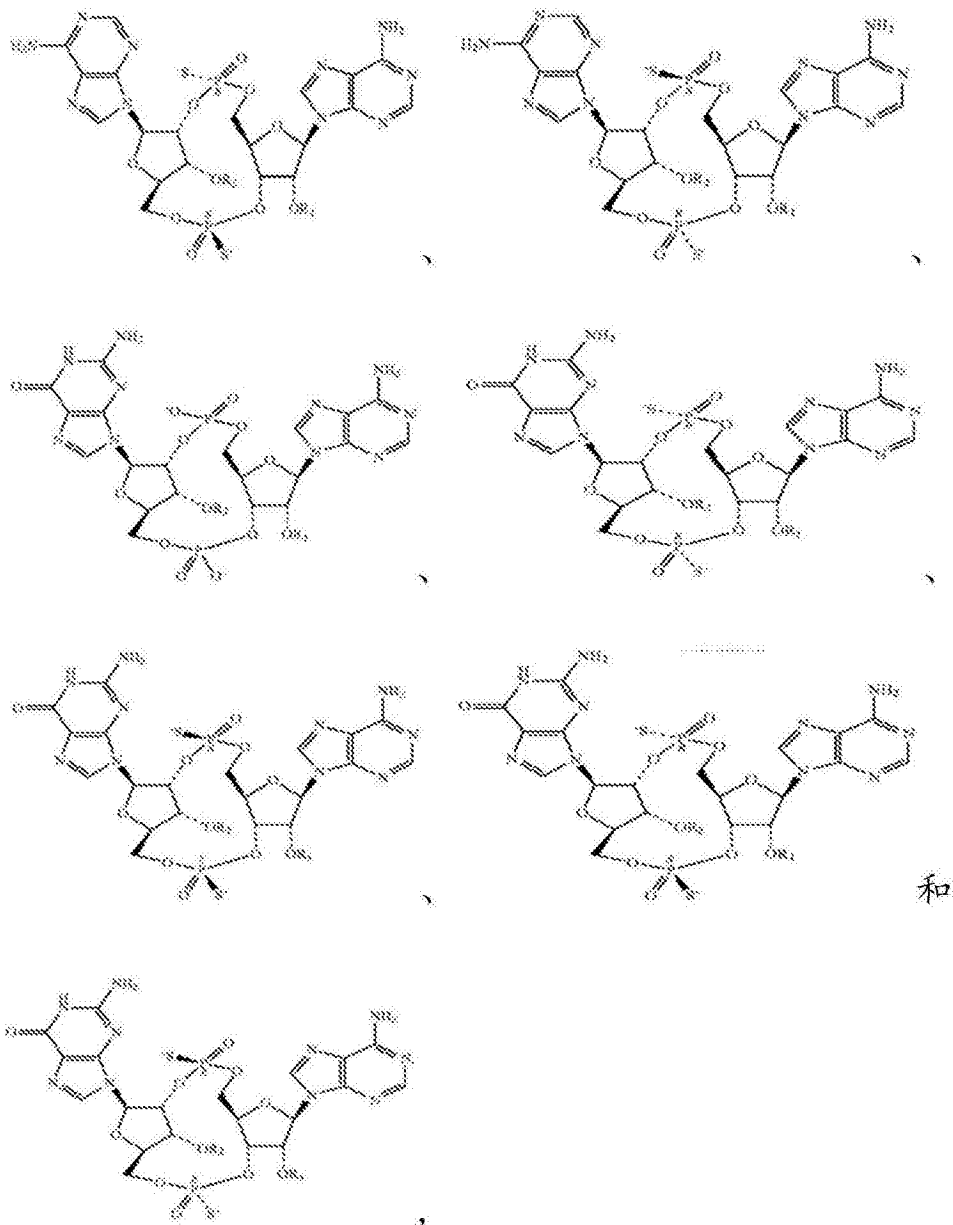
(57)摘要

本发明提供抑制在最近发现称为STING(干扰素基因刺激蛋白)的胞质受体处的信号传导的环二核苷酸(CDN)化合物。具体来说,本发明的CDN是以组合物的形式提供,所述组合物包含抑制STING依赖性TBK1激活和所导致的I型干扰素产生的一种或多种环嘌呤二核苷酸。



1. 一种组合物,其包含选自由以下组成的组的环二核苷酸:





其中R₁是H,并且R₂是炔丙基,或其中R₁是炔丙基,并且R₂是H。

2. 根据权利要求1所述的组合物在制造用于抑制需要其的个体中的STING依赖性I型干扰素产生的药物中的用途,其中所述用途包括:

将所述组合物按足以抑制STING依赖性I型干扰素产生的量施用给所述个体。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述施用是肠胃外。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述施用为皮下、肌肉或真皮内。

抑制“干扰素基因刺激蛋白”依赖性信号传导的组合物和方法

[0001] 本申请要求2013年5月18日提交的美国临时申请61/825,009和2013年11月8日提交的美国临时申请61/902,125的优先权,这两个申请中的每个在此以引用的方式整体并入。

[0002] 发明背景

[0003] 以下发明背景讨论仅用于辅助读者理解本发明而并非承认描述或构成本申请的现有技术。

[0004] 人免疫系统一般可分为两个部分,称为“先天免疫”和“获得性免疫”。免疫系统的先天部分经由许多可溶性因子,包括补体系统和趋化因子/细胞因子系统;和许多特化细胞类型,包括肥大细胞、巨噬细胞、树突细胞(DC)和天然杀伤细胞主要负责初次炎症反应。相反,获得性免疫部分涉及延迟且持续较长的抗体反应连同在针对抗原的免疫记忆中起关键作用的CD8⁺和CD4⁺细胞反应。免疫系统的第三部分可被鉴定为涉及 $\gamma\delta$ T细胞和具有有限T细胞受体库的T细胞,如NKT细胞和MAIT细胞。

[0005] 为了对抗原进行有效免疫反应,抗原呈递细胞(APC)须在适合的MHC情况下处理抗原并将其展示给T细胞,这随后将产生具有细胞毒性的辅助T细胞的T细胞刺激。在抗原呈递后,在APC和T细胞上的协同刺激分子须发生成功相互作用,否则激活将被中止。GM-CSF和IL-12在许多肿瘤模型中用作有效促炎性分子。例如,GM-CSF诱导骨髓样前体细胞增殖并分化为树突细胞(DC),尽管其它信号是激活其成熟为T细胞激活所需的有效抗原呈递细胞所必要的。有效免疫疗法的障碍包括对可限制适当量和适当功能的细胞毒性CD8T细胞诱导的靶抗原耐受、所生成的T细胞对恶性细胞部位运输不佳和诱导T细胞反应不持久。

[0006] 吞噬肿瘤细胞碎片的DC加工主要组织相容性复合体(MHC)呈递所用的材料、上调协同刺激分子的表达并迁移至区域淋巴结以刺激肿瘤特异性淋巴细胞。这个途径导致对肿瘤相关抗原反应的CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖和激活。实际上,这些细胞可频繁地在患者的血液、淋巴样组织和恶性病变中检测到。

[0007] 对免疫逃避潜在机制的新见解,连同通过直接或间接与免疫检查点抑制剂或其它疗法组合加强治疗性疫苗的效能的组合治疗方案已用作开发诱导有效抗肿瘤免疫性的疫苗的基础。CDN环-二-AMP(由单核细胞增生李斯特氏菌(*listeria monocytogene*)产生)和其类似物环-二-GMP(由嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)产生)被宿主细胞识别为PAMP(病原体相关分子模式),其结合至称为STING的PRR(病原体识别受体)。STING是宿主哺乳动物细胞的细胞质中的衔接蛋白,其激活TANK结合激酶(TBK1)-IRF3信号传导轴,从而导致诱导有力激活先天免疫的IFN- β 和其它IRF-3依赖性基因产物。现已了解STING是宿主胞质监督途径的组分,其感测细胞内病原体感染并响应地诱导IFN- β 产生,从而导致出现由抗原特异性CD4和CD8T细胞以及病原体特异性抗体组成的适应性保护性病原体特异性免疫反应。环嘌呤二核苷酸的实例详细地描述于例如美国专利第7,709,458号和第7,592,326号;W02007/054279;和Yan等人,Bioorg.Med.Chem Lett.18:5631(2008)中,这些文献中的每个在此以引用的方式并入。

[0008] 仍需要改良的免疫策略用组合物和方法来治疗可能对于传统治疗方法而言难以

解决的疾病诸如癌症。

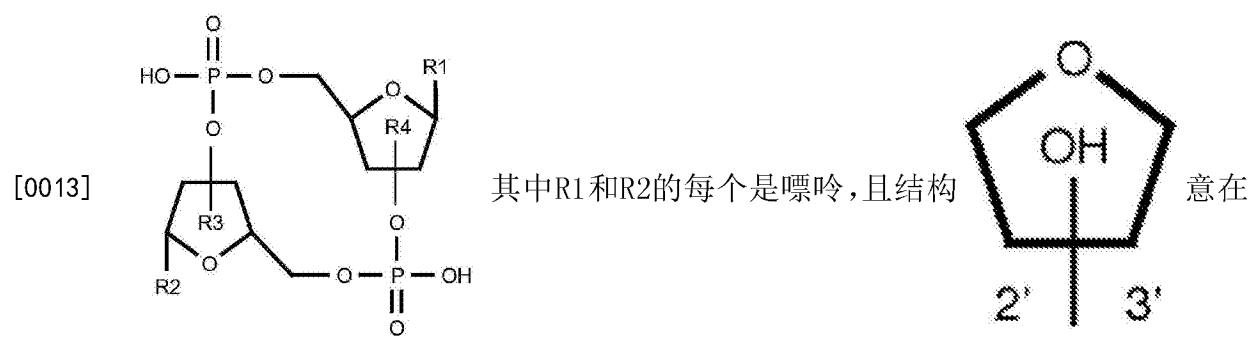
发明概要

[0009] 本发明的目的是提供用于癌症治疗的组合疗法。

[0010] 在第一方面,本发明提供组合物,其包含:

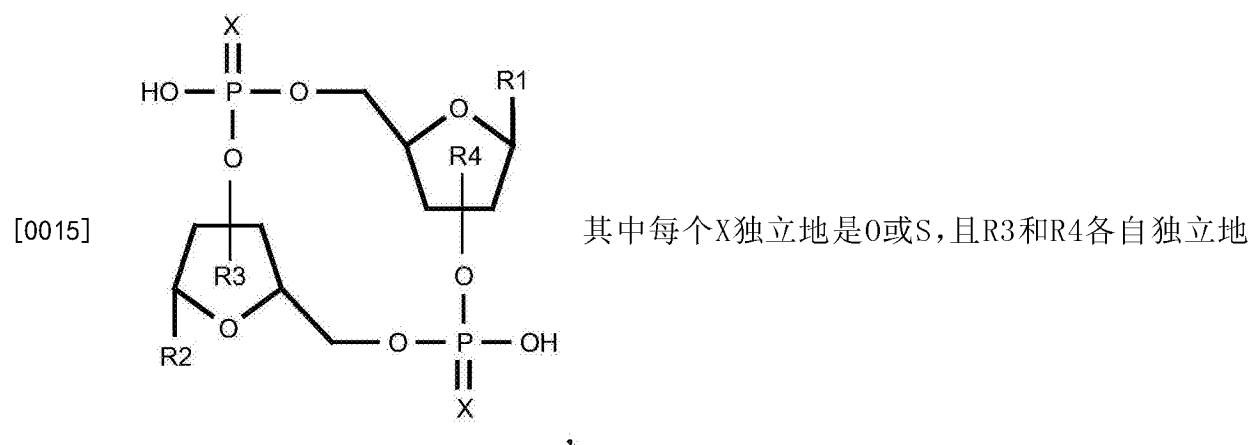
[0011] 抑制干扰素基因刺激蛋白(“STING”)依赖性I型干扰素产生的一种或多种环嘌呤二核苷酸(“CDN”)。如下文所描述,许多CDN可用于本发明中。优选的环嘌呤二核苷酸包括,但不限制于c-di-AMP、c-di-GMP、c-di-IMP、c-AMP-GMP、c-AMP-IMP、c-GMP-IMP和其类似物中的一种或多种。这个列表并不以在限制。

[0012] 根据本发明的环嘌呤二核苷酸的一般结构如下:



反映磷酸酯键可以针对核糖的2' 或3' 位置,且不参与环键的2' 或3' 位置中的另一个是-OH。因此,本发明涵盖2', 5', 2', 5' CDN、2', 5', 3', 5' CDN和3', 5', 3', 5' CDN。举例来说,具有3' - 5' 键的c-di-GMP是指上述分子,其中R1和R2的每个是鸟嘌呤且每个磷酸酯键是3' 至5' 的。

[0014] 出于本发明的目的,这个一般结构被进一步修饰以引入赋予抑制STING依赖性信号传导,且从而抑制STING依赖性I型干扰素产生的能力的取代基。举例来说,本发明提供包含以下化合物的组合物:



是H或具有1至18个碳和0至3个杂原子的任选取代的直链烷基、具有1-9个碳的任选取代的烯基、具有1-9个碳的任选取代的炔基,或任选取代的芳基,其中取代当存在时可独立地选自以下组成的组:C₁₋₆烷基直链或支链、苄基、卤素、三卤甲基、C₁₋₆烷氧基、-NO₂、-NH₂、-OH、=O、-COOR' 其中R' 是H或低级烷基、-CH₂OH和-CONH₂,其中R3和R4不都是H。

[0016] 在优选实施方案中,R3和R4中的一个或两个独立地是具有1至18个碳的未取代直

链烷基、具有1-9个碳的未取代烯基、具有1-9个碳的未取代炔基或未取代芳基。在某些实施方案中,R3和R4中的一个或两个是取代或未取代的烯丙基、炔丙基、高烯丙基、高炔丙基、甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、环丙基甲基或苄基。在某些实施方案中,R3和R4中的一个但非全部提供前药离去基团,诸如通过细胞酯酶移除的脂族酯。

[0017] 在某些实施方案中,每个X是S。在优选实施方案中,当每个X是S时,所述组合物包含一个或多个大体上纯的Sp,Sp、Rp,Rp、Sp,Rp或Rp,Sp立体异构体。

[0018] 在某些实施方案中,R1和R2中的每个独立地选自以下组成的组:腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷和黄嘌呤或其类似物。优选地,R1和R2中的每个独立地是腺嘌呤或鸟嘌呤。

[0019] 如下文所描述,根据本发明的环嘌呤二核苷酸组合物相比于具有3'-5'键的c-di-GMP可抑制STING-依赖性I型干扰素产生至少2倍,且更优选5倍或10倍,或更大。

[0020] 本发明的组合物可通过各种的肠胃外和非肠胃外途经按含有药学上可接受的载体、助剂和媒介物的制剂形式施用给有需要的个体。优选途经是肠胃外施用,且包括但不限于皮下、静脉内、肌内、动脉内、真皮内、鞘内和硬膜外施用的一种或多种。特别优选的是通过皮下施用而施用。优选的药物组合物被配制成水性、脂质体或水包油乳液。示例性组合物描述在下文。

[0021] 在有关方面,本发明涉及抑制或减轻个体的免疫反应的方法,其包括将根据本发明的组合物施用给有需要的个体。在其它有关方面,本发明涉及抑制或减轻个体中的I型干扰素产生的方法,其包括将根据本发明的组合物施用给有需要的个体。可利用本发明组合物治疗的自体免疫疾病的实例包括但不限于,斑秃、自体免疫溶血性贫血、自体免疫性肝炎、皮炎、糖尿病(1型)、自体免疫幼年特发性关节炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯病(Graves' disease)、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)、特发性血小板减少性紫癜、狼疮、重症肌无力、一些形式的心肌炎、多发性硬化、天疱疮/类天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、硬皮病/全身性硬化、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、全身性红斑狼疮、一些形式的甲状腺炎、一些形式的葡萄膜炎、白癜风和伴随多血管炎的肉芽肿病(韦格纳氏,Wegener's)。

[0022] 在其它实施方案中,本文描述的方法可包括向哺乳动物施用有效量的本发明大体上纯的CDN用于治疗可从Th1向Th2免疫转移获得临床益处的病症。细胞介导免疫(CMI)与产生细胞因子IL-2、干扰素(IFN)- γ 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的TH1CD4+T淋巴细胞相关。相反,体液免疫与产生IL-4、IL-6和IL-10的TH2CD4+T淋巴细胞相关。向TH1反应的免疫偏离一般产生细胞毒性T细胞淋巴细胞(CTL)、天然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞和单核细胞激活。通常,Th1反应对于细胞内病原体(在宿主细胞内的病毒和细菌)和肿瘤更为有效,而Th2反应对于细胞外细菌、寄生虫包括蠕虫和毒素更为有效。据信I型干扰素(IFN-I)介导了内毒素血症和败血症的致死效应,并因此本发明的方法和组合物可用于败血症的治疗。此外,预期先天免疫的激活使1型和2型辅助T细胞(Th1/Th2)免疫系统平衡正常化并抑制导致免疫球蛋白(Ig)E依赖性过敏和过敏性哮喘的Th2型反应的过度反应。

[0023] 附图简述

[0024] 图1描绘环嘌呤二核苷酸("CDN")介导的信号传导。CDN(例如c-di-AMP或c-di-GMP)通过结合至胞质衔接蛋白STING(干扰素基因刺激蛋白),并诱导通过TBK-1/IRF-3途径的信号传导来诱导IFN- β 产生,导致DC通过结合至IFN受体和随后信号传导而自分泌和旁分

泌激活。

[0025] 图2描绘2'-O-炔丙基-环-A(2',5')pA(3',5')p(2'-O-炔丙基-ML-CDA)合成的合成方案。

[0026] 图3A描绘2'-O-炔丙基-ML-CDA(化合物8)的¹H NMR分析结果。

[0027] 图3B描绘2'-O-炔丙基-ML-CDA(化合物8)的³¹P NMR分析结果。

[0028] 图3C描绘2'-O-炔丙基-ML-CDA(化合物8)的COSY(2.5-6.5ppm-¹H轴)分析结果。

[0029] 图3D描绘2'-O-炔丙基-ML-CDA(化合物8)的HMBC(3.5-6.5ppm-¹H轴)分析结果。

[0030] 图3E描绘2'-O-炔丙基-ML-CDA(化合物8)的分析型HPLC(2-20%ACN/10mM TEAA缓冲液-20分钟)分析结果。

[0031] 图4描绘c-[G(2',5')pG(3',5')p]和二硫代核糖O取代的衍生物。

[0032] 图5描绘c-[A(2',5')pA(3',5')p]和二硫代核糖O取代的衍生物。

[0033] 图6描绘c-[G(2',5')pA(3',5')p]和二硫代核糖O取代的衍生物。

[0034] 图7描绘2'-O-炔丙基-环-[A(2',5')pA(3',5')p](2'-O-炔丙基-ML-CDA)对STING-依赖性I型干扰素激活的抑制。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明涉及抑制最近发现称为STING(干扰素基因刺激蛋白)的细胞质受体处的信号传导的新型环二核苷酸(CDN)化合物的用途。具体来说,本发明的CDN是以包含抑制STING依赖性TBK1激活和所导致的I型干扰素产生的一种或多种环嘌呤二核苷酸的组合物的形式提供。

[0037] CDN环-二-AMP(由单核细胞增生李斯特氏菌产生)和其类似物环-二-GMP(由嗜肺军团菌产生)被宿主细胞识别为PAMP(病原体相关分子模式),其结合至称为STING的PRR(病原体识别受体)。STING是宿主哺乳动物细胞细胞质中的衔接蛋白,其激活TANK结合激酶(TBK1)-IRF3信号传导轴,从而导致诱导有力激活先天免疫的IFN- γ 和其它IRF-3依赖性基因产物。现已了解STING是宿主胞质监督途径的组分,其感测细胞内病原体感染并响应地诱导IFN产生,从而导致出现由抗原特异性CD4和CD8T细胞以及病原体特异性抗体组成的适应性保护性病原体特异性免疫反应。

[0038] 在自体免疫疾病的情况下,这个途径的抑制剂可提供以前未被利用的新型治疗途径。

[0039] 定义

[0040] 如本文针对人、哺乳动物、哺乳动物受试者、动物、兽医学受试者、安慰剂受试者、研究受试者、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体所使用的“施用”是指(不限制于)使外源性配体、试剂、安慰剂、小分子、药制剂、治疗剂、诊断剂或组合物接触受试者、细胞、组织、器官或生物流体等。“施用”可指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究、安慰剂和实验方法。细胞治疗涵盖使试剂接触细胞,以及使试剂接触流体,其中所述流体与细胞接触。“施用”还涵盖通过试剂、诊断剂、结合组合物或通过另一个细胞进行的例如细胞体外和离体治疗。“一起施用”并非意指将两种或更多种试剂作为单一组合物施用。虽然本发明涵盖以单一组合物形式的施用,但此类试剂可作为单独的施用同时或在不同时间,且可通过相同或不同施用途递送给单一受试者。

[0041] 当其涉及配体和受体时,“激动剂”包括刺激所述受体的分子、分子组合、复合体或

试剂组合。例如,粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的激动剂可涵盖GM-CSF、GM-CSF的突变蛋白质或衍生物、GM-CSF的肽模拟物、模拟GM-CSF的生物功能的小分子或刺激GM-CSF受体的抗体。

[0042] 当其涉及配体和受体时,“拮抗剂”包括抑制、抵消、下调受体和/或使受体脱敏的分子、分子组合或复合体。“拮抗剂”涵盖抑制受体的固有活性的试剂。固有活性是在不存在配体/受体相互作用下展现的活性。“拮抗剂”还涵盖抑制或防止受体的受刺激(或受调控)活性的任何试剂。举例来说,GM-CSF受体的拮抗剂包括但不限于,结合至配体(GM-CSF)并防止其结合至受体的抗体,或结合至受体并防止配体结合至受体的抗体,或其中抗体按非活性构象锁定受体的抗体。

[0043] 就本发明CDN而言的“大体上纯化的”意指指定物质占存在于组合物中的CDN活性的至少50重量%,更常见占至少60重量%,通常占至少70重量%,更通常占至少75重量%,最通常占至少80重量%,通常占至少85重量%,更通常占至少90重量%,最通常占至少95重量%且习惯上占至少98重量%重量或更大。水、缓冲剂、盐、去污剂、还原剂、蛋白酶抑制剂、稳定剂(包括诸如白蛋白的添加蛋白)和赋形剂一般不用于纯度测定。

[0044] 当指代配体/受体、核酸/互补核酸、抗体/抗原或其它结合对(例如细胞因子对细胞因子受体)(在本文中各自一般称为“标靶生物分子”或“标靶”)时,“特异性”或“选择性”结合指示与标靶存在于异质蛋白群体和其它生物制剂中有关的结合反应。特异性结合可意指例如按所涵盖方法来源于抗体的抗原结合部位的结合化合物、核酸配体、抗体或结合组合物以相比于非标靶分子亲和力大通常至少25%,更通常至少50%,最通常至少100%(2倍),正常至少10倍,更正常至少20倍且最正常至少100倍的亲和力结合至其标靶。

[0045] “配体”是指结合至标靶生物分子的小分子、核酸、肽、多肽、糖、多糖、聚糖、糖蛋白、糖脂或其组合。虽然这些配体可以是受体的激动剂或拮抗剂,但配体还涵盖即不是激动剂也不是拮抗剂且不具有激动剂或拮抗剂性质的结合剂。配体对其同源标靶的特异性结合通常用“亲和力”表达。在优选实施方案中,本发明配体以介于约 10^4M^{-1} 与约 10^8M^{-1} 之间的亲和力结合。亲和力被计算为 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} 是解离速率常数, k_{on} 是结合速率常数且 K_d 是平衡常数)。

[0046] 可在平衡时通过测量各种浓度(c)的标记配体的结合比例(r)确定亲和力。利用斯卡查德方程(Scatchard equation): $r/c = K(n-r)$ 对数据作图:其中 r =平衡时结合配体摩尔数/受体摩尔数; c =平衡时的游离配体浓度; K =平衡结合常数;且 n =每个受体分子的配体结合位点数。通过图形分析,在Y轴上对 r/c 作图对比在X轴上作图 r ,从而产生斯卡查德图。本领域熟知通过斯卡查德分析的亲和力测量。参见例如van Erp等人,J.Immunoassay 12:425-43,1991;Nelson和Griswold,Comput.Methods Programs Biomed.27:65-8,1988。在替代方案中,可通过等温滴定量热法(ITC)测量亲和力。在常见ITC实验中,将配体溶液滴定至其同源标靶的溶液中。随着时间监测它们相互作用时释放的热(ΔH)。随着将连续量的配体滴定至ITC细胞,所吸收或释放的热量与结合量成正比。当系统达到饱和时,热信号减小直至仅观察到稀释热。随后从来自每次注射的热相对于细胞中配体与结合伴侣的比的图获得结合曲线。利用适当结合模型分析结合曲线以确定 K_B 、 n 和 ΔH 。注意 $K_B = 1/K_d$ 。

[0047] 如本文所使用的术语“受试者”是指人或非人生物体。因此,本文描述的方法和组合物适用于人和兽医学疾病。在某些实施方案中,受试者是“患者”,即针对疾病或疾患接受

医疗护理的活人。这包括正针对病理学迹象接受调查的无明确病态的人。优选是现已诊断出患有本发明组合物和方法所靶向的特定癌症的受试者。用本文所描述组合物治疗的优选癌症包括,但不限制于前列腺癌、肾癌、黑素瘤、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、结肠癌、头颈癌、肺癌和乳腺癌。

[0048] “治疗有效量”被定义为足以展现患者益处,即减轻、防止或改善正治疗疾患的症状的试剂或药物组合物的量。当试剂或药物组合物包含诊断剂时,“诊断有效量”被定义为足以产生信号、图像或其它诊断参数的量。药制剂的有效量将根据各种因素变化,如个体的易感程度、个体的年龄、性别和体重及个体的特异质反应。“有效量”涵盖,但不限制于,可改善、逆转、缓和、防止或诊断医学疾患或病症的症状或迹象或其致病过程的量。除非另外明确或随文说明,否则“有效量”不限制于足以改善疾患的最小量。

[0049] “治疗”(针对疾患或疾病)是获得有益或所需结果,包括且优选临床结果的方法。出于本发明的目的,关于疾病的有益或所需结果包括,但不限制于,以下一种或多种:防止疾病、改善与疾病相关的疾患、治愈疾病、缓解疾病的严重程度、延迟疾病恶化、减轻与疾病相关的一个或多个症状、提高罹患疾病个体的生活质量且/或延长存活。类似地,出于本发明的目的,关于疾患的有益或所需结果包括,但不限制于,以下一种或多种:防止疾患、改善疾患、治愈疾患、缓解疾患的严重程度、延迟疾患恶化、减轻与疾患相关的一个或多个症状、提高罹患疾患个体的生活质量且/或延长存活。例如,在将本文描述的组合物用于治疗癌症的实施方案中,有益或所需结果包括,但不限制于,以下一种或多种:减小(或破坏)瘤细胞或癌细胞增殖、减小癌症中存在的瘤细胞的转移、缩小肿瘤尺寸、减轻由癌症导致的症状、提高罹患癌症个体的生活质量、减小治疗疾病所需的其它药物的剂量、延迟癌症恶化且/或延长癌症患者的存活。根据本文,受试者的“治疗”可意指受试者需要治疗,例如,在受试者包含预期通过施用试剂减轻的病症的情况中。

[0050] 如本文所使用,术语“抗体”是指由一个或多个免疫球蛋白基因或其片段衍生、模制或大体编码的能够特异性结合抗原或表位的肽或多肽。参见例如Fundamental Immunology,第3版,W.E.Paul编辑,Raven Press,N.Y.(1993);Wilson(1994; J.Immunol.Methods 175:267-273;Yarmush(1992) J.Biochem.Biophys.Methods 25:85-97。术语抗体包括抗原结合部分,即保留结合抗原的能力的“抗原结合部位”(例如片段、子序列、互补性决定区(CDR)),包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含通过在铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989) Nature 341:544-546);和(vi) 单独的互补性决定区(CDR)。单链抗体还通过引用并入术语“抗体”中。

[0051] 环嘌呤二核苷酸

[0052] 原核细胞以及真核细胞将各种小分子用于细胞信号传导和细胞内及细胞间通信。已知环核苷酸,如cGMP、cAMP等在原核细胞和真核细胞中具有调节和引发活性。与真核细胞不同,原核细胞还将环嘌呤二核苷酸用作调节分子。在原核细胞中,两个GTP分子的缩合是通过酶二鸟苷酸环化酶(DGC)催化以得到c-diGMP,其代表细菌中的重要调节剂。

[0053] 最近研究表明环diGMP或其类似物还可通过在哺乳动物中用作佐剂而刺激或增强患者的免疫或炎性反应或可增强对疫苗的免疫反应。病原体衍生的DNA的细胞溶质检测要

求通过TANK结合激酶1 (TBK1) 和其下游转录因子IFN-调节因子3 (IRF3) 进行信号传导。被称为STING (IFN基因刺激蛋白; 还称为MITA、ERIS、MPYS和TMEM173) 的跨膜蛋白用作这些环嘌呤二核苷酸的信号传导受体, 从而导致TBK1-IRF3信号传导轴的刺激和STING依赖性I型干扰素反应。参见例如图1。Burdette等人在Nature 478:515-18, 2011中证实STING直接结合至环二鸟苷酸单磷酸, 但不结合至其它不相关核苷酸或核酸。

[0054] 用作获得本发明CDN的前体的环嘌呤二核苷酸详细描述于例如Gao等人, Cell (2013) 153:doi:10.1016/j.cell.2013.04.046; 美国专利第7,709,458号和第7,592,326号; WO2007/054279; 和Yan等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18:5631 (2008), 这些文献中的每个在此是以引用的方式并入。可利用标准有机化学技术修饰这些CDN以产生本发明的CDN。

[0055] 优选的嘌呤包括, 但不限制于, 腺嘌呤、鸟嘌呤、肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤、异鸟嘌呤等。本发明的CDN优选是硫逐磷酸酯类似物, 且最优选是其大体上纯的Sp, Sp, Rp, Rp, SpRp, 或Rp, Sp立体异构体。

[0056] 如结构中所指示, 每个核糖包含可被取代的2' 或3' 羟基。如下文所描述, 本发明的CDN可包含在这些2' 或3' 羟基中一个或两个 (不作为环键的一部分) 处的取代, 其提供不作为前药离去基团去除的嵌段部分。这种取代包括, 但不限制于, 0-甲基、0-乙基、0-丙基、0-异丙基、0-苄基、0-甲氧基乙基、0-氨基乙基、0-炔丙基、0-烯丙基等。这个列表不意在加以限制。如本文所使用, 术语“前药”是指所涵盖化合物的修饰, 其中修饰的化合物呈现较低药理学活性 (相比于修饰的化合物) 且其中修饰的化合物在体内通过酶促或非酶促反应逆转化 (例如, 在靶细胞或靶器官中) 为未修改形式。在某些实施方案中, 在一个核糖上的羟基包含前药离去基团。前药可修改药物的理化、生物药理学和药物代谢动力学性质。传统前药被归类为通过在体内发生转变以形成活性药物的药物。前药开发的原因一般是与母体药物相关的不良水溶性、化学不稳定、低经口生物利用率、缺少血脑屏障穿透性和高首过代谢。合适前药部分描述于例如“Prodrug and Targeted Delivery”, J. Rautico编, John Wiley & Sons, 2011中。

[0057] 优选环嘌呤二核苷酸是硫逐磷酸酯类似物, 本文称为“硫代磷酸酯”。硫逐磷酸酯是正常核苷酸的变体, 其中非桥接氧中的一个被硫替换。核苷酸间键结的硫化显著地减小内切酶和外切酶, 包括5' 至3' 和3' 至5' DNA POL 1外切酶、核酸酶S1和P1、核糖核酸酶、血清核酸酶和蛇毒磷酸二酯酶的作用。此外, 脂质二重层交联的潜力增大。

[0058] 固有手性的硫逐磷酸酯键。技术人员将明白这个结构的磷酸酯可各自以R或S形式存在。因此, 可能存在Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp和Rp, Sp形式。

[0059] 如上所述, 本发明的环嘌呤二核苷酸包含CDN的2' -O-和3' -O-取代形式, 和具体来说CDN硫代磷酸酯。可通过对核糖部分的2' -OH的取代提供额外稳定性和生物利用率。本文中适用的取代基包括但不限于卤素、羟基、烷基、烯基、炔基、酰基 (-C(O) R_{aa})、羧基 (-C(O) O-R_{aa})、脂族基团、脂环族基团、烷氧基、取代的氧基 (-O-R_{aa})、芳基、芳烷基、杂环基、杂芳基、杂芳基烷基、氨基 (-N(R_{bb}) (R_{cc}))、亚氨基 (=NR_{bb})、酰氨基 (-C(O) N(R_{bb}) (R_{cc}) 或 -N(R_{bb}) C(O) R_{aa})、叠氮基 (-N₃)、硝基 (-NO₂)、氰基 (-CN)、脲基 (carbamido) (-OC(O) N(R_{bb}) (R_{cc}) 或 -N(R_{bb}) C(O) OR_{aa})、脲基 (ureido) (-N(R_{bb}) C(O) -N(R_{bb}) (R_{cc}))、硫脲基 (-N(R_{bb}) C(S) N(R_{bb}) (R_{cc}))、胍基 (-N(R_{bb}) C(=NR_{bb}) N(R_{bb}) (R_{cc}))、脒基 (-C(=NR_{bb}) N(R_{bb}) (R_{cc}) 或 -N(R_{bb}) C(=NR_{bb}) (R_{aa}))、巯基 (-SR_{bb})、亚磺酰基 (-S(O) R_{bb})、磺酰基 (-S(O)₂ R_b) 和磺酰胺基 (-S(O)₂ N

(R_{bb}) (R_{cc}) 或 -N(R_{bb}) S(O)₂R_{bb})。其中每个 R_{aa}、R_{bb} 和 R_{cc} 独立地是 H、任选连接的化学官能基或其它取代基, 优选列表包括但不限于 H、烷基、烯基、炔基、脂族、烷氧基、酰基、芳基、芳烷基、杂芳基、脂环族、杂环和杂芳基烷基。在本文所描述化合物内的选择的取代基按递归度呈现。

[0060] 如本文所使用, 术语“烷基”是指含有最多二十四碳原子的饱和直链或支链烷基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、正己基、辛基、癸基、十二烷基等。烷基一般包含 1 至约 24 个碳原子, 更通常 1 至约 12 个碳原子, 更优选为 1 至约 6 个碳原子。如本文所使用, 术语“低级烷基”包含 1 至约 6 个碳原子。如本文所使用的烷基可任选包含一个或多个其它取代基。

[0061] 如本文所使用, 术语“烯基”是指含有至多二十四碳原子且具有至少一个碳碳双键的直链或支链烃链基。烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基、二烯诸如 1,3-丁二烯等。烯基通常包含 2 至约 24 个碳原子, 更通常 2 至约 12 个碳原子, 更优选为 2 至约 6 个碳原子。如本文所使用的烯基可任选包含一个或多个其它取代基。

[0062] 如本文所使用, 术语“炔基”是指含有至多二十四碳原子且具有至少一个碳碳三键的直链或支链烃基。炔基的实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、1-丁炔基等。炔基通常包含 2 至约 24 个碳原子, 更通常 2 至约 12 个碳原子, 更优选为 2 至约 6 个碳原子。如本文所使用的炔基可任选包含一个或多个其它取代基。

[0063] 如本文所使用, 术语“酰基”是指通过从有机酸移除羟基形成的基团且具有通式 -C(O)-X, 其中 X 通常是脂族、脂环族或芳族的。实例包括脂族羰基、芳族羰基、脂族磺酰基、芳族亚磺酰基、脂族亚磺酰基、芳族磷酸酯、脂族磷酸酯等。如本文所使用的酰基可任选包括其它取代基。

[0064] 术语“脂环族”是指其中环是脂族的环系统。环系统可包含一个或多个环, 其中至少一个环是脂族的。优选脂环族包括环中具有约 5 至约 9 个碳原子的环。如本文所使用的脂环族可任选包含其它取代基。

[0065] 如本文所使用, 术语“脂族”是指含有至多二十四碳原子的直链或支链烃基, 其中任何两个碳原子之间的饱和度为单键、双键或三键。脂族基团优选含有 1 至约 24 个碳原子, 更通常 1 至约 12 个碳原子, 更优选为 1 至约 6 个碳原子。脂族基团的直链或支链可被包括氮、氧、硫和磷的一个或多个杂原子中断。由杂原子中断的这种脂族基团包括但不限于聚烷氧基, 诸如聚烷二醇、聚胺和聚亚胺。如本文所使用的脂族基团可任选包括其它取代基。

[0066] 如本文所使用, 术语“烷氧基”是指烷基与氧原子之间形成的基团, 其中所述氧原子用于将所述烷氧基连接至母体分子。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、新戊氧基、正己氧基等。如本文所使用的烷氧基可任选包含其它取代基。

[0067] 如本文所使用, 术语“氨基烷基”是指氨基取代的 C₁-C_n 烷基。所述基团的烷基部分与母体分子形成共价键。氨基可位于任何位置且氨基烷基可在烷基和/或氨基部分由其它取代基取代。

[0068] 如本文所使用, 术语“芳烷基”和“芳基烷基”是指共价连接至 C₁-C_n 烷基的芳族基团。所得的芳烷基(芳基烷基)的烷基部分与母体分子形成共价键。实例包括但不限于苄基、苯乙基等。如本文所使用的芳烷基可任选包含连接至形成基团的烷基、芳基或两种基团

的其它取代基。

[0069] 如本文所使用,术语“芳基”和“芳族”是指具有一个或多个芳族环的单环或多环碳环系统。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、四氢萘基、茚满基、茚基等。优选芳基环系统在一个或多个环中具有约5至约20个碳原子。如本文所使用的芳基可任选包含其它取代基。

[0070] 如本文所使用,术语“卤代”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

[0071] 如本文所使用,术语“杂芳基”和“杂芳族”是指包含单环或多环芳族环、环系统或稠合环系统的基团,其中环中的至少一个是芳族且包含一个或多个杂原子。杂芳基还意在包括稠合环系统,包括其中稠环中的一个或多个不含杂原子的系统。杂芳基通常包含选自硫、氮或氧的一个环原子。杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、喹喔啉基等。杂芳基可直接或通过诸如脂族基团或杂原子的连接部分连接至母体分子。如本文所使用的杂芳基可任选包含其它取代基。

[0072] 如本文所使用,术语“杂芳基烷基”是指进一步包含共价连接C₁-C₁₂烷基的如前定义的杂芳基。所得的杂芳基烷基的烷基部分能够与母体分子形成共价键。实例包括但不限于吡啶基甲基、嘧啶基乙基、萘基丙基等。如本文所使用的杂芳基烷基可在杂芳基或烷基部分中的一个或两个上任选包含其它取代基。

[0073] 以下术语定义如下:

[0074] 烯丙基-CH₂CH=CH₂,

[0075] 炔丙基-CH₂C≡CH,

[0076] 高烯丙基-CH₂CH₂CH=CH₂,和

[0077] 高炔丙基-CH₂CH₂C≡CH。

[0078] 如上所述,优选的环嘌呤二核苷酸还包括CDN的前药形式,和具体来说CDN硫代磷酸酯。前药可修改药物的理化、生物药理学和药物代谢动力学性质。传统前药被归类为通过在体内发生转变以形成活性药物的药物。前药开发的原因通常是与母体药物相关的不良水溶性、化学不稳定、低经口生物利用率、缺少血脑屏障穿透性和高首过代谢。合适前药部分描述于例如“Prodrug and Targeted Delivery”,J.Rautico编,John Wiley&Sons,2011。

[0079] 如本文针对环嘌呤二核苷酸使用的术语“大体上纯的”是指相对于在上图所示手性中心处的其它可能立体异构体为至少75%纯的Rp,Rp或Rp,Sp形式。举例来说,“大体上纯的Rp,Rp c-di-GMP硫代磷酸酯”将就c-di-GMP硫代磷酸酯的Rp,Sp和Sp,Sp形式而言为至少75%纯。在优选实施方案中,大体上纯的环嘌呤二核苷酸为至少85%纯、至少90%纯、至少95%纯、至少97%纯和至少99%纯。虽然本发明的大体上纯的环嘌呤二核苷酸制剂为“立体化学纯”,但这并不意在指明在这些手性中心具有特定立体化学的制剂内的所有CDN在其它方面一致。例如,大体上纯的环嘌呤二核苷酸制剂可含有Rp,Rp c-di-GMP硫代磷酸酯与Rp,Rp c-di-AMP硫代磷酸酯的组合且仍然是大体上纯的环嘌呤二核苷酸制剂。这种制剂还可包含如下文所描述对患者治疗有利的其它组分,条件是制剂内的所有CDN在这些手性中心处具有特定立体化学。

[0080] 本文所描述的CDN组合物可单独或与药学上可接受的赋形剂组合,按足以修改适当的免疫反应的量施用给宿主。免疫反应可包括但不限于特异性免疫反应、非特异性免

疫反应、特异和非特异性免疫反应、先天反应、初次免疫反应、获得性免疫、二次免疫反应、记忆免疫反应、免疫细胞激活、免疫细胞增殖、免疫细胞分化和细胞因子表达。在某些实施方案中,CDN组合物可连同一种或多种其它组合物施用。CDN组合物可在其它治疗性或预防性组合物之前、之后且/或一起施用。与其它治疗剂共同施用的方法为本领域所熟知(Hardman等人(编著)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGrw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson(编著)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA;Chabner和Longo(编著)(2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA)。在某些实施方案中,所述一种或多种治疗剂选自抗TNF剂(例如依那西普(etanercept)、英夫利昔单抗(infliximab))、类固醇、咪唑硫嘌呤、环孢霉素、氨甲喋呤、阿巴西普(abatacept)、PDE4抑制剂(例如罗氟司特(roflumilast))等。

[0081] 递送剂

[0082] 脂质体是由一个(“单层”)或多个(“多层”)磷脂层形成的囊泡。因为磷脂砌块的两亲特性,脂质体通常包含提供亲水外面且包围亲水核心的亲水层。合并亲水/疏水组分的脂质体的多用性、其无毒属性、生物可降解性、生物相容性、辅助性、细胞免疫的诱导、持续释放性质和被巨噬细胞迅速摄取的性质使得其成为吸引人的抗原递送候选物。

[0083] 以引用的形式整体并入本文的W02010/104833描述了脂质体制剂,其包含:

[0084] a) 水性媒介物;

[0085] b) 脂质体,其包含

[0086] (i) 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(“DMPC”),

[0087] (ii) 二肉豆蔻酰磷脂酰甘油酯(“DMPG”)、二肉豆蔻酰三甲基铵丙烷(“DMTAP”)或DMPG和DMTAP两者,

[0088] 和

[0089] (iii) 至少一种固醇衍生物;和

[0090] c) 共价连接至所述至少一种固醇衍生物中的1%至100%的一种或多种免疫原性多肽或碳水化合物。

[0091] 含有或不含上述“免疫原性多肽或碳水化合物”的这种脂质体制剂(本文称为VesiVax® (Molecular Express,Inc.))可含有一种或多种其它组分,如肽聚糖、脂肽、脂多糖、单磷酸脂质A、脂磷壁酸、瑞喹莫德(resiquimod)、咪喹莫特(imiquimod)、鞭毛蛋白、含未甲基化CpG基序的寡核苷酸、β-半乳糖神经酰胺、胞壁酰二肽、全反式维甲酸、双链病毒RNA、热休克蛋白、十八烷基二甲基溴化铵、阳离子表面活性剂、toll样受体激动剂、二肉豆蔻酰三甲基铵丙烷和nod样受体激动剂。有利地,这些脂质体制剂可用于递送根据本发明的一种或多种环嘌呤二核苷酸。

[0092] 此外,虽然上文讨论的脂质体制剂将“类固醇衍生物”用作锚将免疫原性多肽或碳水化合物连接至脂质体,但所述类固醇可简单地以非缀合类固醇形式提供,如胆固醇。

[0093] 从脂质混合物制备脂质体的合适方法为本领域所熟知。参见例如Basu&Basu, Liposome Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 2002;Gregoriadis, Liposome Technology, 第3版, Informa HealthCare, 2006。优选方法包

括本文描述的挤出、均化和本文描述的超声处理。制备用于本发明的脂质体的示例性方法描述于W02010/104833中,其包括干燥脂质混合物,接着在水性媒介物中水合并超声处理以形成脂质体。

[0094] 在某些实施方案中,提供在特定平均尺寸范围内的脂质体。脂质体尺寸可经过选择,例如,通过具有预选择孔径的膜挤出包含脂质体的水性媒介物并收集流过膜的材料。在优选实施方案中,脂质体被选择以使直径大体上在50与500nm之间,更优选直径在50与200nm之间且最优选直径大体上在50与150nm之间。如本文中所使用的术语“大体上”在这种上下文中意指脂质体的至少75%、更优选80%且最优选至少90%在指定范围内。

[0095] 可用于本发明的其它脂质和脂质样佐剂包括水包油(o/w)乳剂(参见例如Muderhwa等人,J.Pharmaceut.Sci.88:1332-9,1999)、VesiVax® TLR(Molecular Express,Inc.)、洋地黄皂苷(参见例如美国专利5,698,432)和吡喃葡萄糖基脂质(参见例如美国专利申请20100310602)。

[0096] 纳米颗粒也表示适合大部分施用途经的药物递送系统。在近几年,已探索了用于制备纳米颗粒的各种不同天然和合成聚合物,其中聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)和其共聚物(PLGA)因其生物相容性和生物可降解性而受到充分研究。纳米颗粒和其它纳米载体用作几类药物如抗癌剂、抗高血压剂、免疫调节剂和激素;和大分子如核酸、蛋白质、肽和抗体的潜在载体。参见例如Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.21:387-422,2004; Nanomedicine:Nanotechnology,Biology and Medicine1:22-30,2005。

[0097] 药物组合物

[0098] 如本文所使用,术语“药学”是指预期用于治愈、治疗或防止疾病且通过美国食物与药物监管局(或其美国境外等效部门)的审批过程作为处方或柜台售卖药品的化学物质。关于这些组合物的配制和施用技术的详细信息可参见Remington,The Science and Practice of Pharmacy第21版(Mack Publishing Co.,Easton,PA)和Nielloud和Marti-Mestres,Pharmaceutical Emulsions and Suspensions第2版(Marcel Dekker,Inc,New York)。

[0099] 出于本公开的目的,药物组合物可通过各种不同方式施用,包括经口、肠胃外、经吸入喷雾、经局部或经直肠,以含有药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的制剂形式施用。如本文所使用的术语肠胃外包括但不限于利用各种不同输注技术的皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、真皮内、鞘内和硬膜外注射。如本文所使用,动脉内和静脉内注射包括通过导管施用。还涵盖经冠状动脉内支架和冠状动脉内储器施用。如本文所使用,术语经口包括,但不限制于经口消化或通过舌下或含服途经递送。经口施用包括流体饮品、能量棒以及药丸制剂。

[0100] 药物组合物可呈适合预期施用方法的任何形式。当供经口使用时,可制备例如片剂、锭剂、含片、水性或油性悬浮液、可分散粉末或颗粒、乳液、硬或软胶囊、糖浆或酏剂。预期供经口使用的组合物可根据药物组合物生产领域已知的任何方法制备且这种组合物可含有一种或多种试剂,包括甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以提供美味制剂。含有与无毒性药学上可接受的赋形剂(适合片剂生产)混合的药物化合物的片剂是可接受的。这些赋形剂可以是例如惰性稀释剂,如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,如玉米淀粉或藻酸;粘结剂,如淀粉、明胶或阿拉伯树胶;和润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑

石。片剂可未经包衣,或通过已知技术包衣,包括肠溶包衣、结肠包衣或微囊封以延迟在胃肠道中的崩解和吸附且/或提供在较长时间内的持续作用。例如,可单独或与蜡一起使用延时材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0101] 供经口使用的制剂还可提供为硬明胶胶囊,其中药物化合物与惰性固体稀释剂(例如磷酸钙或高岭土)混合,或作为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质(如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0102] 药物组合物可配制成为适合水性悬浮液生产的赋形剂混合的水性悬浮液。这种赋形剂包括助悬剂,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶,和分散剂或润湿剂,如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)、环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯),环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七烷基乙烯氧基鲸蜡醇)、环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇酐衍生的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯)。水性混悬液还可含有一种或多种防腐剂,如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯,一种或多种着色剂,一种或多种调味剂及一种或多种甜味剂,如蔗糖或糖精。

[0103] 油性悬浮液可通过将活性成分悬浮于植物油如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油或矿物油如液体石蜡中配制。经口悬浮液可含有增稠剂,如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂,如上文描述的那些甜味剂和调味剂以提供美味经口制剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂如抗坏血酸进行保藏。

[0104] 适合通过加水制备水性悬浮液的本发明可分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、助悬剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适分散剂或润湿剂和助悬剂已通过上文公开的那些试剂例举。还可存在其它赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0105] 本发明的药物组合物还可呈水包油乳液的形式。油相可以是植物油如橄榄油或花生油、矿物油如液体石蜡,或这些物质的混合物。合适乳化剂包括天然存在的树胶如阿拉伯树胶和黄蓍胶、天然存在的磷脂如大豆卵磷脂、从脂肪酸和己糖醇酐衍生的酯或偏酯如脱水山梨糖醇单油酸酯,和这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。乳液还可含有甜味剂和调味剂。

[0106] 糖浆和酏剂可用甜味剂如甘油、山梨糖醇或蔗糖配制。这些制剂还可含有镇痛剂、防腐剂、调味剂或着色剂。

[0107] 本公开的药物组合物可呈无菌可注射制剂的形式,如无菌可注射水性或油性悬浮液。这种悬浮液可根据已知技术利用上述那些合适分散剂或润湿剂和助悬剂配制。无菌可注射制剂还可以是于无毒性肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,如于1,3-丁烷-二醇中的溶液,或制备成冻干粉末。尤其可使用的可接受媒介物和溶剂为水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌不挥发性油可方便地用作溶剂或悬浮介质。出于这个目的,可采用任何温和的不挥发性油,包括合成单甘油酯或二甘油酯。此外,可类似地将脂肪酸如油酸用于可注射品的制备。

[0108] 可与载体材料组合以制造单一剂型的活性成分的量将视治疗的宿主和特定施用模式而变化。例如,预期经口施用给人的随时间释放制剂可含有与可在总组合物的约5至约95%变化的适当且便利量的载体材料化合的约20至500mg活性材料。优选制备提供可容易测定施用量的药物组合物。一般来说,全身施用的有效量为约0.1mg/kg至约100mg/kg且

取决于许多因素,包括例如受试者(例如哺乳动物,如人)的年龄和体重、要求治疗的准确疾患和其严重程度、施用的途经且最终将由主治医师或兽医判定。然而将理解正如本领域技术人员所理解,任何特定患者的具体剂量水平将取决于各种不同因素,包括所采用的具体化合物的活性、正治疗个体的年龄、体重、健康状况、性别和饮食;施用时间和途经;排泄速率;以前施用过的其它药物;和接受疗法的特定疾患的严重程度。

[0109] 如上所述,适合经口施用的本发明制剂可提供为离散单元,如各自含有预定量活性成分的胶囊、扁囊剂或片剂;粉末或颗粒;溶于水或非水性液体的溶液或悬浮液,或水包油液体乳液或油包水液体乳液。药物组合物还可作为大丸剂、药糖剂或糊剂施用。

[0110] 片剂可通过任选与一种或多种配合成分一起压缩或模塑制造。压缩片剂可通过在合适机器中将呈自由流动形式的活性成分如粉末或颗粒任选与粘合剂(例如聚维酮、明胶、羟丙基乙基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如淀粉乙醇酸钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂混合压缩来制备。模塑片剂可在合适机器中利用经惰性液体稀释剂润湿的粉末化化合物的混合物制造。片剂可任选经包衣或刻痕且可按提供所需释放特性的不同比例使用例如羟丙基甲基纤维素进行配制以提供其中活性成分的缓慢或受控释放。片剂可任选具有肠溶或结肠包衣以提供在除胃部以外的肠道部分中的释放。当这种化合物易发生酸解时,这对于使用式1化合物特别有利。

[0111] 适合在口中局部施用的制剂包括在调味基质(通常是蔗糖和阿拉伯树胶或黄蓍胶)中包含活性成分的含片;在惰性基质如明胶或甘油或蔗糖和阿拉伯胶中包含活性成分的糖锭;和在合适液体载体中包含活性成分的漱口水。

[0112] 用于经直肠施用的制剂可提供为具有合适基质(包括例如可可油或水杨酸盐)的栓剂。

[0113] 适合经阴道施用的制剂可提供为除了活性成分外还含有相关领域中已知的载体的阴道栓、卫生棉条、乳霜、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0114] 适合肠胃外施用的制剂包括可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者血液等渗的溶质的水性和非水性等渗无菌注射溶液;和可包含助悬剂和增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。制剂可存在于单剂或多剂密封容器中,例如安瓶和小瓶,且可储存在仅要求在使用前才添加无菌液体载体例如注射用水的冷冻干燥(冻干)条件中。注射溶液和悬浮液可由上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0115] 如本文所描述,药学上可接受的盐包括但不限于:乙酸盐、吡啶、铵盐、哌嗪、二乙胺、烟酰胺、甲酸盐、尿素、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、锌盐、锂盐、肉桂酸盐、甲胺基盐、甲磺酸盐、苦味酸盐、酒石酸盐、三乙基氨基盐、二甲基氨基盐和三(羟甲基)氨基甲烷盐。其它药学上可接受的盐为本领域技术人员已知。

[0116] 特定患者的有效量可视许多因素而变化,如待治疗疾患、患者的整体健康情况、施用途经和剂量和副作用的严重程度。已存在治疗和诊断方法的指导原则(参见例如Maynard等人(1996)A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice,Interpharm Press,Boca Raton,FL;Dent(2001)Good Laboratory and Good Clinical Practice,Urch Publ., London,UK)。

[0117] 有效量可在一次给药中给予,但不限制于一次给药。因此,施用可以是两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、

十七次、十八次、十九次、二十次或更多次施用药物组合物。当在本方法中存在多于一次药物组合物施用时,可将施用按一分钟、两分钟、三分钟、四分钟、五分钟、六分钟、七分钟、八分钟、九分钟、十分钟或更多分钟的时间间隔、约一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、七小时、八小时、九小时、十小时、十一小时、十二小时、十三小时、十四小时、十五小时、十六小时、十七小时、十八小时、十九小时、二十小时、二十一小时、二十二小时、二十三小时、二十四小时和以此类推的间隔分开。就小时而言,术语“约”意指加上或减去30分钟内的任何时间间隔。施用还可按一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、十一天、十二天、十三天、十四天、十五天、十六天、十七天、十八天、十九天、二十天和其组合的时间间隔分开。本发明不限制于按时间相等分隔的给药间隔,而涵盖不相等间隔的给药。

[0118] 例如本发明可使用一次/周、两次/周、三次/周、四次/周、五次/周、六次/周、七次/周、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次和类似的给药方案。给药方案涵盖持续例如一周、两周、三周、四周、五周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月和十二个月的总时间段的给药。

[0119] 提供以上给药方案的循环。循环可约例如每七天、每14天、每21天、每28天、每35天、每42天、每49天、每56天、每63天、每70天等重复。循环之间存在不给药间隔,其中所述间隔可以为约例如七天、14天、21天、28天、35天、42天、49天、56天、63天、70天等。在这个背景下,术语“约”意指加上或减去一天、加上或减去两天、加上或减去三天、加上或减去四天、加上或减去五天、加上或减去六天或加上或减去七天。

[0120] 与其它治疗剂共同施用的方法为本领域所熟知(Hardman等人(编著)(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill,New York,NY;Poole和Peterson(编著)(2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA;Chabner和Longo(编著)(2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,PA)。

[0121] 如上所述,本发明的组合物优选被配制成用于肠胃外或经肠内递送的药物组合物。用于施用给动物的常见药物组合物包含药学上可接受的媒介物如水溶液、无毒性赋形剂,包括盐、防腐剂、缓冲剂等。参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,Easton编著,Mack Publishing Co.,第1405至1412页和1461至1487页(1975);The National Formulary XIV,第14版,American Pharmaceutical Association,Washington,DC(1975)。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水性溶液、盐水溶液、肠胃外媒介物如氯化钠、林格氏右旋糖等。静脉内媒介物包括流体和营养补充物。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据本领域常规技能调节药物组合物的pH和各组分的准确浓度。

实施例

[0122] 以下实施例用于说明本发明。这些实施例不意在以任何方式限制本发明的范围。

[0123] 实施例1.一般方法

[0124] 购置适用于溶液相寡核苷酸合成的无水溶剂和试剂并在无水氩气或氮气下利用无水技术处理。在无水乙腈或吡啶中在无水氩气或氮气下进行amidite偶联反应和环化。用

于在无水吡啶中的所有反应的起始材料通过从吡啶浓缩(三次)干燥。利用Fluka 60A高纯度级或Merck级9385二氧化硅,使用甲醇/二氯甲烷梯度进行制备型硅胶快速色谱分析。在具有ProStar 300光二极管阵列检测器的Varian ProStar 210 HPLC系统上,在254nm下监测,使用Varian Microsorb 10微米C18 250×4.6mm或Varian 3微米C18 100×4.6mm柱和10mM TEAA和乙腈梯度进行分析型HPLC。在配备SPD-20A UV/Vis检测器的Shimadzu制备型LC20-AP HPLC系统上,在254nm下监测,在Varian Microsorb 60-8 C-18 41.6×250mm柱上,使用10mM TEAA和乙腈梯度以50ml/分钟的流速进行制备型HPLC。在3% (wt/wt) 的上样下利用C-18 Sep-Pak (Waters) 进行固相萃取。在具有PDA、MS和ELSD检测的单四级杆Shimadzu 2010EV仪器上利用Shimadzu LC20D分析型HPLC获得LC/MS (ESI/APCI)。从康涅狄格文耶鲁大学的WM Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory和加州大学伯克利分校(UC Berkeley)的QB3/Chemistry Mass Spect Lab获得高分辨率FT-ICR质谱。

[0125] 在45℃下在500MHz (针对¹H) 和202MHz (针对³¹P) 下操作的Varian INOVA-500 NMR质谱仪上,在d₆-DMSO中利用10μL D₂O (添加D₂O后延迟16小时) 获得¹H-³¹P、¹H-¹H COSY (2D NMR相关光谱法)、¹H-³¹P HMBC (异核多键相关光谱法) 光谱。将所获得的FID转移至PC并利用来自Acorn NMR Inc.的NUTS NMR处理软件加以处理。化学位移以DMSO溶剂作为参考,对于¹H为2.50ppm。根据关于NMR光谱1参考的IUPAC建议,利用“统一尺度”将0ppm的绝对¹H频率作为³¹P化学位移的参考。一些¹H和³¹P光谱是在于400MHz (针对¹H) 和162MHz (针对³¹P) 下运行的JEOL ECX-400 NMR光谱仪上获得的。梯度COSY光谱是在45.0℃下在于500MHz (针对¹H) 和202MHz (针对³¹P) 下运行的Varian INOVA-500 NMR光谱仪上获得。将所获得的FID转移至PC并利用来自Acorn NMR Inc.的NUTS NMR处理软件加以处理。化学位移以DMSO溶剂作为参考,对于¹H为2.50ppm。根据关于NMR光谱1参考的IUPAC建议,利用“统一尺度”将0ppm的绝对¹H频率作为³¹P化学位移的参考。梯度COSY光谱是在绝对值模式中利用直接维度中的2048个数据点和在间接维度中的256个时间点获得。两个维度均利用正弦钟形平方函数进行变迹。间接维度填零以给出2048×2048个点的最终矩阵尺寸和沿两个维度的3.91Hz/数据点的分辨率。

[0126] 在磷酸二酯键处指定区域选择性:¹H-¹H COSY,与¹H-³¹P HMBC实验组合用于提供磷酸二酯键的区域选择性为2', 5' -3', 5' 的直接证据 (参见例如图3C和图3D)。

[0127] 缩写和首字母。鸟嘌呤=G。异丁酰基鸟嘌呤=G^{ib}。4,4-二甲氧基三苯甲基=DMT。OCH₂CH₂CH₃=CEO。叔丁基二甲基硅烷基=TBS。腺嘌呤=A。苯甲酰腺嘌呤=A^{Bz}, 2'-O-肉豆蔻酰基-环-[G (2', 5') pG (3', 5') p]=C14-ML-CDG=10 (TEA盐)。如利用254nm下的UV检测的C18反相HPLC分析所示,所有CDN产物为>95%纯 (结构8的纯度参见图2E)。

[0128] 实施例2. 2'-O-炔丙基-环-A (2', 5') pA (3', 5') p (2'-O-炔丙基-ML-CDA, 结构8) 的合成,图2)。

[0129] 1) 3的制备。

[0130] 向1.7g (1.72毫摩尔) N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-3'-O-叔丁基二甲基硅烷基-2'-O-[(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基氨基酚]腺苷(1) 于7.5ml乙腈的溶液添加0.054ml (3毫摩尔) 水和0.35g (1.8毫摩尔) 三氟乙酸吡啶鎓。在室温下搅拌5分钟后,添加7.5ml叔丁胺并在室温下将反应物搅拌15分钟。减压去除溶剂以得到呈泡沫形式的2,随后将其与乙腈(3×15ml) 共蒸发,然后溶于18ml二氯甲烷中。向这个溶液添加于二氯甲烷中

的水(0.27ml,15毫摩尔)和18ml 6% (v/v) 二氯乙酸(13.2毫摩尔)。在室温下10分钟后,通过添加吡啶(2.1ml,26毫摩尔)猝灭反应,并浓缩成油,通过与12ml无水乙腈共蒸发三次干燥,最后一次留下体积为约4ml的3。

[0131] 2) 4的无水溶液的制备。

[0132] 将N⁶-苯甲酰基-5'-O-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-O-炔丙基-3'-O-[(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基氨基酚]腺苷(4,2g,2.2毫摩尔)溶于25ml无水乙腈中并通过与25ml无水乙腈共蒸发三次干燥,最后一次留下约6ml。添加十个3Å分子筛并将干燥溶液储存在氩气下直至使用。

[0133] 3) 2',5'-线性二聚体5的制备。

[0134] 经由注射器将于约6ml乙腈中的共沸干燥的4(2g,2.2毫摩尔)添加至3(1.72毫摩尔)于约4ml无水乙腈中的溶液。在室温下搅拌5分钟后,添加0.82ml(4.5毫摩尔)5.5M于癸烷中的叔丁基过氧化氢并在室温下将反应物搅拌30分钟。在冰浴中冷却反应物,并添加于0.75ml水中的0.38g NaHSO₃并在室温下搅拌5分钟。浓缩反应物并将残留油溶于24ml二氯甲烷中。添加水(0.27ml,15毫摩尔)和于二氯甲烷中的24ml 6% (v/v) 二氯乙酸(17.4毫摩尔),并在室温下将反应物搅拌10分钟。添加15ml吡啶以猝灭二氯乙酸,随后浓缩至约4ml。

[0135] 4) 5的环化和氧化以得到全面受保护的炔丙基-环二核苷酸6。

[0136] 将5溶于45ml无水吡啶中,浓缩至约30ml的体积。随后添加2-氯-5,5-二甲基-1,3,2-二氧磷杂环己烷-2-氧化物(DMOCP,1g,5.2毫摩尔)并在室温下将反应物搅拌10分钟。立即添加1ml水,接着添加I₂(0.5g,2毫摩尔),且随后在室温下将反应物搅拌5分钟。随后将反应混合物倾倒至含有0.3g NaHSO₃的210ml水中并在室温下搅拌5分钟。缓慢添加6g NaHCO₃并在室温下搅拌5分钟,随后倾倒至分液漏斗中并用250ml 1:1乙酸乙酯:二乙醚萃取。用60ml 1:1乙酸乙酯:二乙醚再次萃取水层。合并有机层并减压浓缩以得到约5.6g含有全面受保护炔丙基环二核苷酸6的油。

[0137] 6) 全面受保护炔丙基环二核苷酸6去保护为粗品7。

[0138] 将5.6g粗品6转移至厚壁玻璃压力管。添加30ml甲醇和30ml浓氨水并在55℃下于油浴中将管在搅拌下加热4小时,此时分析型HPLC显示去保护完成。将反应混合物冷却至接近环境温度,鼓入氩气流30分钟,并随后转移至大圆底烧瓶。减压去除大部分挥发物以得到4.7g残余物,用20ml 1:1 (v/v) 二氯甲烷/己烷滴定。减压去除任何剩余溶剂以得到4.5g含有7的固体。

[0139] 7) 粗品7的制备型HPLC纯化以得到纯7。

[0140] 将含有7的粗制固体溶于25ml CH₃CN/水(1:1)中。0.45微米PTFE过滤后,将4至5ml样品部分施加至C-18Dynamax柱(40×250mm)。用乙腈与10mM三乙基乙酸铵梯度(在50ml/分钟流速下20%至50%CH₃CN持续20分钟)进行洗脱。汇集制备型HPLC运行中含有纯7的级分,蒸发以去除大部分CH₃CN和水并与CH₃CN共蒸发几次以得到55mg纯7。

[0141] 8) 用三乙胺三氢氟酸盐对7的TBS基团去保护,用TEAB中和,用C-18 Sep-Pak进行固相萃取并冻干以得到呈双三乙基铵盐形式的纯8

[0142] 向55mg 7添加1.0ml纯三乙胺三氢氟酸盐。在室温下将混合物搅拌约3小时。随后将混合物转移至50℃的油浴再维持2小时,此时分析型HPLC确认反应完成。通过逐滴添加5ml冷却、经搅拌的1M三乙基碳酸氢铵中和样品。将约1至2ml TEA逐滴添加至经搅拌、冷却

的溶液直至达到pH试纸显示中性/弱碱性(约pH8)条件。在Waters C-18 Sep-Pak上对中性溶液脱盐并用CH₃CN/10mM三乙基乙酸铵水溶液(15:85)洗脱产物。减压蒸发CH₃CN并将溶液冻结并冻干。从水再进行一轮冻干得到9mg(13微摩尔)呈双三乙基铵盐形式的2'-O-炔丙基-ML-CDA(8)。¹H NMR(500MHz, 45℃, DMSO-D₆+15μL D₂O) δ8.68(s, 1H), 8.31(s, 1H), 8.15(s, 1H), 8.14(s, 1H), 6.10(d, J=8.0, 1H), 5.99(d, J=6.0, 1H), 5.06-5.04(m, 1H), 4.98-4.94(m, 1H), 4.53(qt, J=16.0, 2.5, 2H), 4.39(d, J=4.0, 1H), 4.27-4.26(m, 1H), 4.14-4.13(m, 1H), 4.05-3.90(m, 3H), 3.74(d, J=12.0, 1H), 3.21(t, J=2.5, 1H), 3.03(q, J=7.0, 12H), 1.14(t, J=7.5, 19H); ³¹P NMR(200MHz, 45℃, DMSO-D₆+15μL D₂O) δ-1.48, -1.82(图3A-3D); HRMS(FT-ICR) m/z: C₂₃H₂₅N₁₀O₁₂P₂的[M-H]⁻理论值为695.1134; 实测值为695.1118。

[0143] 图4至图6描绘可通过与本文所描述的那些方法类似的方法制备的替代化合物。

[0144] 实施例3. STING依赖性反应的抑制

[0145] 为了评价拮抗剂2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)能否抑制Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)在人细胞中的I型干扰素的STING依赖性诱导, 将4x10⁵个THP1-BlueTM ISG细胞(被在包括五种IFN-刺激反应元件的启动子控制下表达碱性磷酸酶的IRF可诱导分泌胚胎碱性磷酸酶受体基因(Invivogen)感染的人单核细胞系)与50μM Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-RR-CDA)、10μM或50μM拮抗剂2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)、50μM Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)与10μM或50μM 2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)两者, 或与10μM 2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)预孵育30分钟后与50μM Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)孵育。30分钟后, 洗涤细胞并涂铺在96孔培养皿中的含有10%FBS的RPMI培养基中, 并在37℃下与5%CO₂孵育。在16小时孵育后收集来自每个样品的细胞培养物上清液, 并将20μL细胞培养物上清液添加至180μL QUANTI-Blue试剂(Invivogen)并孵育5分钟以评价I型干扰素蛋白水平。用Versa Max动力学分光光度计(Molecular Diagnostics)测定655nm吸光度读数。

[0146] 如图7A所示, 与50μM Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)一起添加10μM或50μM拮抗剂2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)按依剂量依赖性方式显著抑制Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)对I型IFN的诱导。图7B示出与10μM 2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)预孵育抑制了后续添加50μM Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)对I型干扰素的诱导。已知环二核苷酸诸如Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)会经由STING诱导I型IFN。因此, 通过2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)减少Rp, Rp二硫代环[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML RR-CDA)-诱导的I型IFN产生证实2'-O-炔丙基-环-[A(2', 5') pA(3', 5') p](ML-炔丙基-CDA)是人STING的拮抗剂。

[0147] 对STING的apo与环二核苷酸结合形式的结构研究已发现STING形成呈游离和结合状态的对称v型二聚体, 其中环二核苷酸结合在由二聚体界面所形成口袋中(Gao P.等人, (2013). Cell 154, 748-762和Burdette和Vance, (2013) Nature Immunology 14, 19-26中综述)。STING在配体结合时发生从apo形式的较“开放”构象向“封闭”构象的巨大构象转换, 其中四链反平行β折叠盖形成在配体结合上。

[0148] 此处所示出的结果证实2'-O-炔丙基-环-[A(2',5')pA(3',5')p](ML-炔丙基-CDA)可结合在由两个STING二聚体的界面所形成的同一结合口袋中。2'-O-炔丙基-环-[A(2',5')pA(3',5')p](ML-炔丙基-CDA)结合在口袋内可防止激活性环二核苷酸的结合。在2'-O-炔丙基-环-[A(2',5')pA(3',5')p](ML-炔丙基-CDA)上从停靠在STING结合口袋中的拮抗剂分子伸出的炔丙基阻止反平行 β 折叠盖形成于配体结合口袋上,从而防止STING转变为信号传导竞争构象。总的来说,这些结果表明2'-O-炔丙基-环-[A(2',5')pA(3',5')p](ML-炔丙基-CDA)能够抑制人STING的活性。

[0149] 本领域技术人员容易明白本发明特别适于进行目标并获得所提及的结果和优点,以及其中固有的那些。本文提供的实施例表示优选实施方案,具有示例性,且不意在对本发明的范围加以限制。

[0150] 应理解本发明的应用并不限于以下描述中阐述的或在附图中示出的组件的构造与布置的细节。本发明能够提供除描述实施方案之外的实施方案且按各种方式实践并实施。此外,应理解本文以及摘要中所采用的措辞和术语是出于描述的目的且不应视为限制。

[0151] 因此,本领域技术人员将明白本公开所基于的概念可轻易用作设计其它结构、方法和系统以进行本发明几个目的的基础。因此重要的是认为权利要求包括这些等效构造,条件是它们不脱离本发明的精神和范围。

[0152] 虽然已充分详细地描述并例举了本发明以供本领域技术人员加以制造并利用,但在不脱离本发明精神和范围的情况下各种替代、修改和改良应是显而易见的。本文提供的实施例表示优选实施方案,具有示例性,且不意在对本发明的范围加以限制。其中的修改和其它用途将为本领域技术人员所明白。这些修改涵盖于本发明精神内且由权利要求范围限定。

[0153] 本领域技术人员将容易明白可在不脱离本发明范围和精神下对本文公开的本发明进行不同取代和修改。

[0154] 说明书中引述的所有专利和公开表明了本发明所属领域的一般技术人员的水平。所有专利和公开是以引用的方式并入本文,引用程度如同每个单独的公开专门且单独地表明以引用的方式并入。

[0155] 本文说明性描述的本发明适合在不使用本文未明确公开的任何元素、一种或多种限制下实践。因此,例如,在本文的每个情况中,术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的任何一个可用其它两个术语中的任何一个替换。所采用的术语和表达被用作描述且非限制性数据,而且这些术语和表达的使用不意在排除所示和所描述特征或其部分的等效内容,但应该认识到在所要求的本发明范围内可存在各种修改。因此,应理解虽然已通过优选实施方案和任选特征明确公开本发明,但本领域技术人员可采取本文所公开概念的修改和变化,且这些修改和变化被视为属于由随附权利要求限定的本发明范围内。

[0156] 其它实施方案将在以下权利要求内陈述。

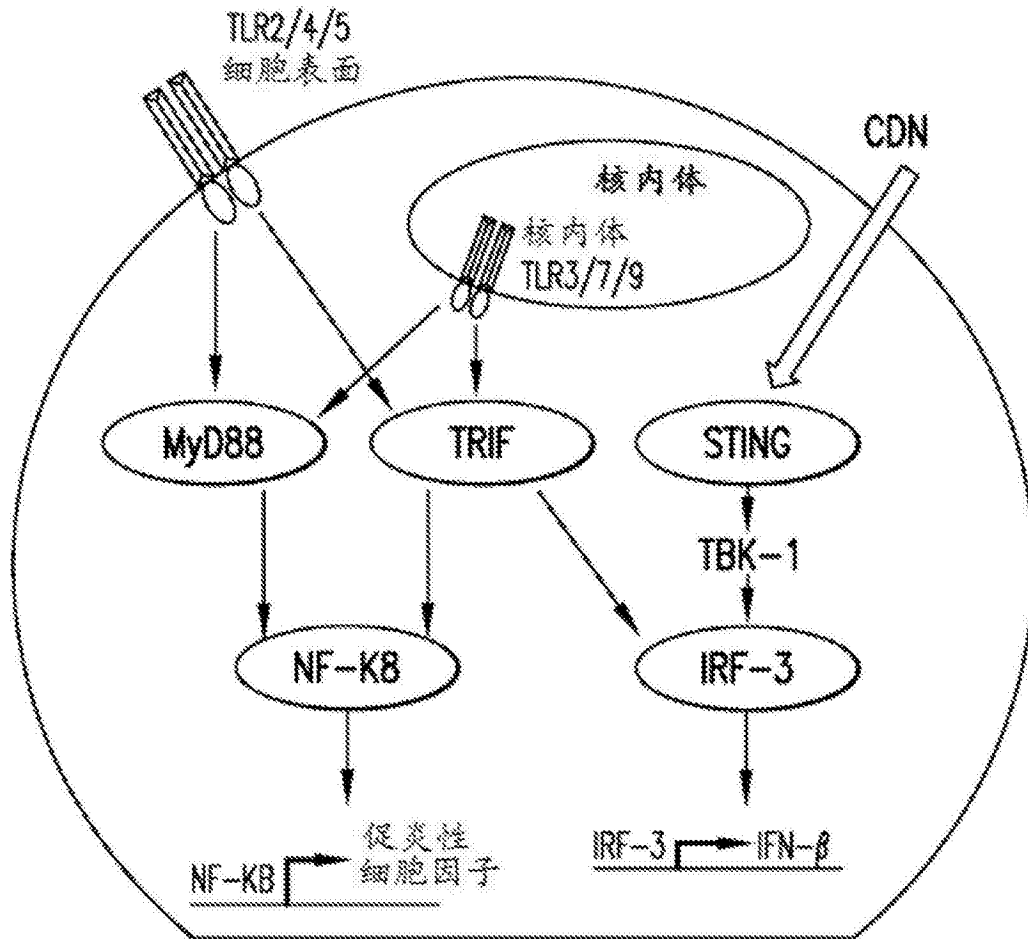


图1

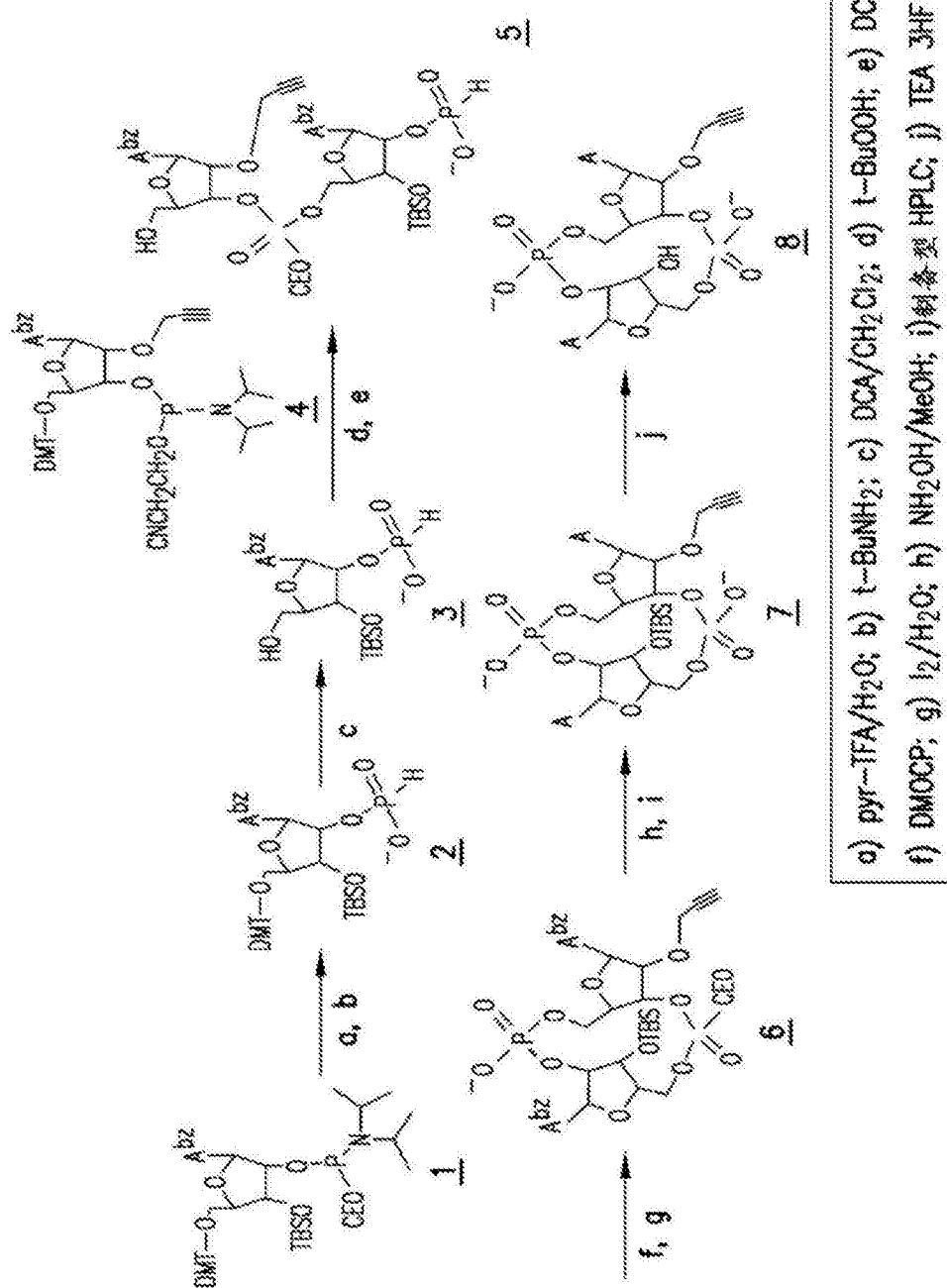


图2

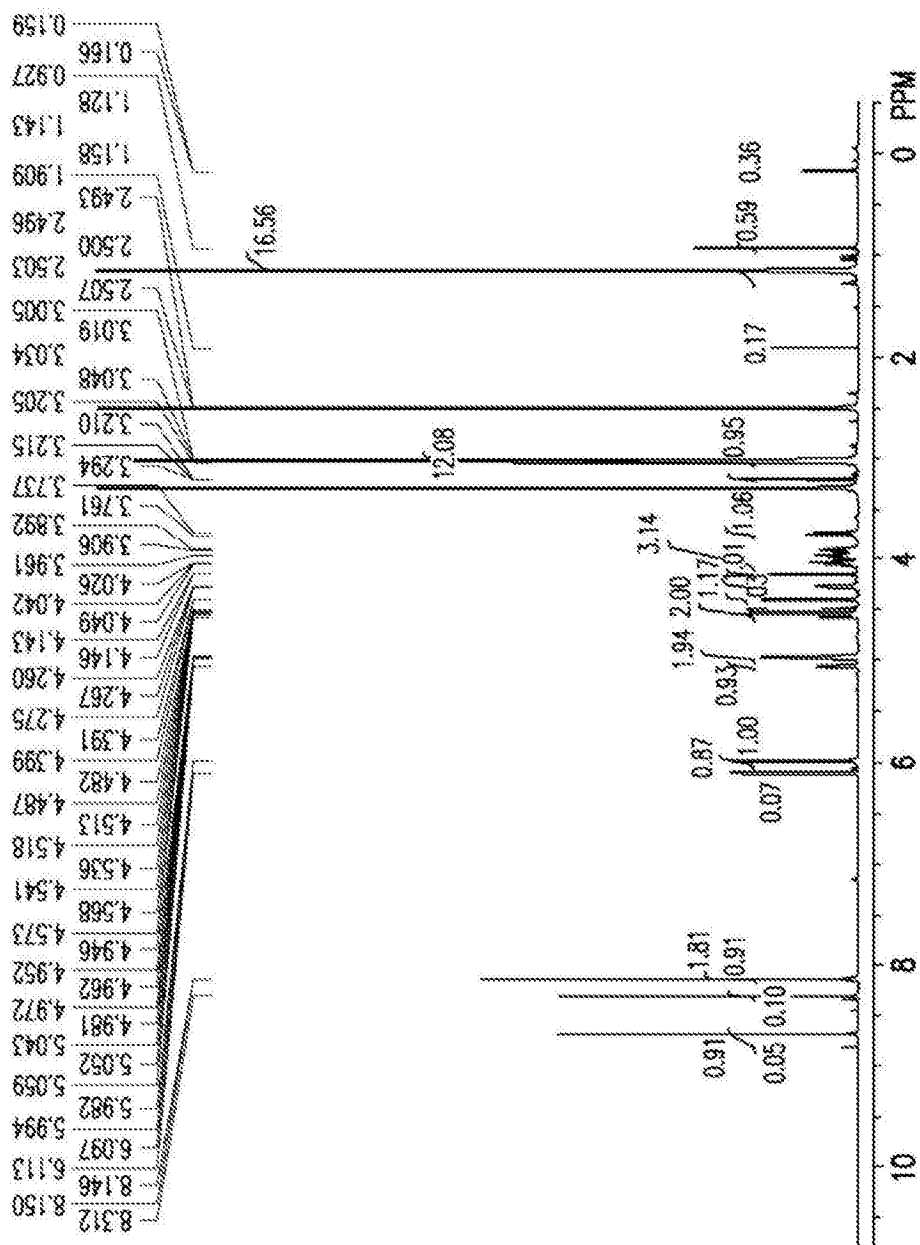


图3A

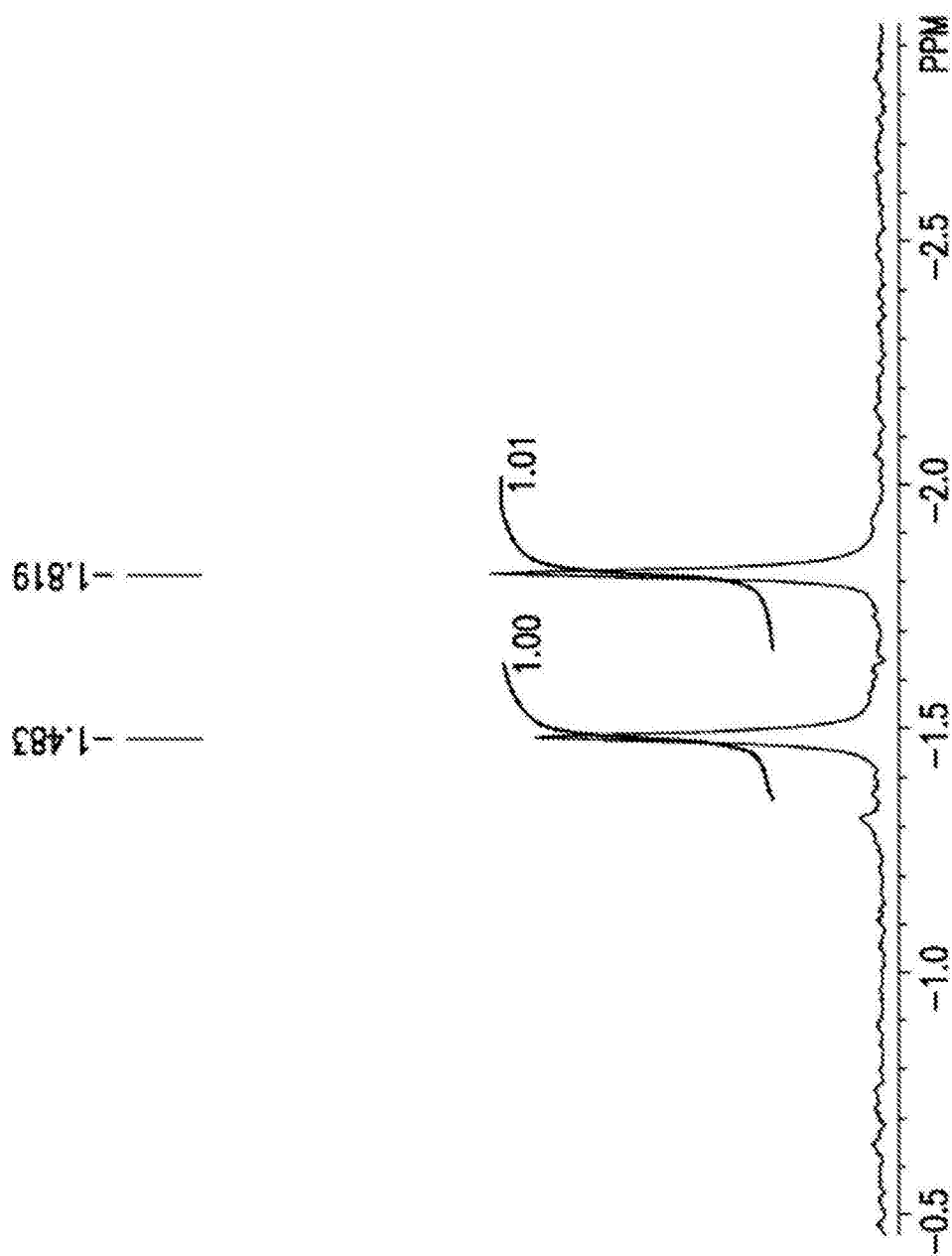


图3B

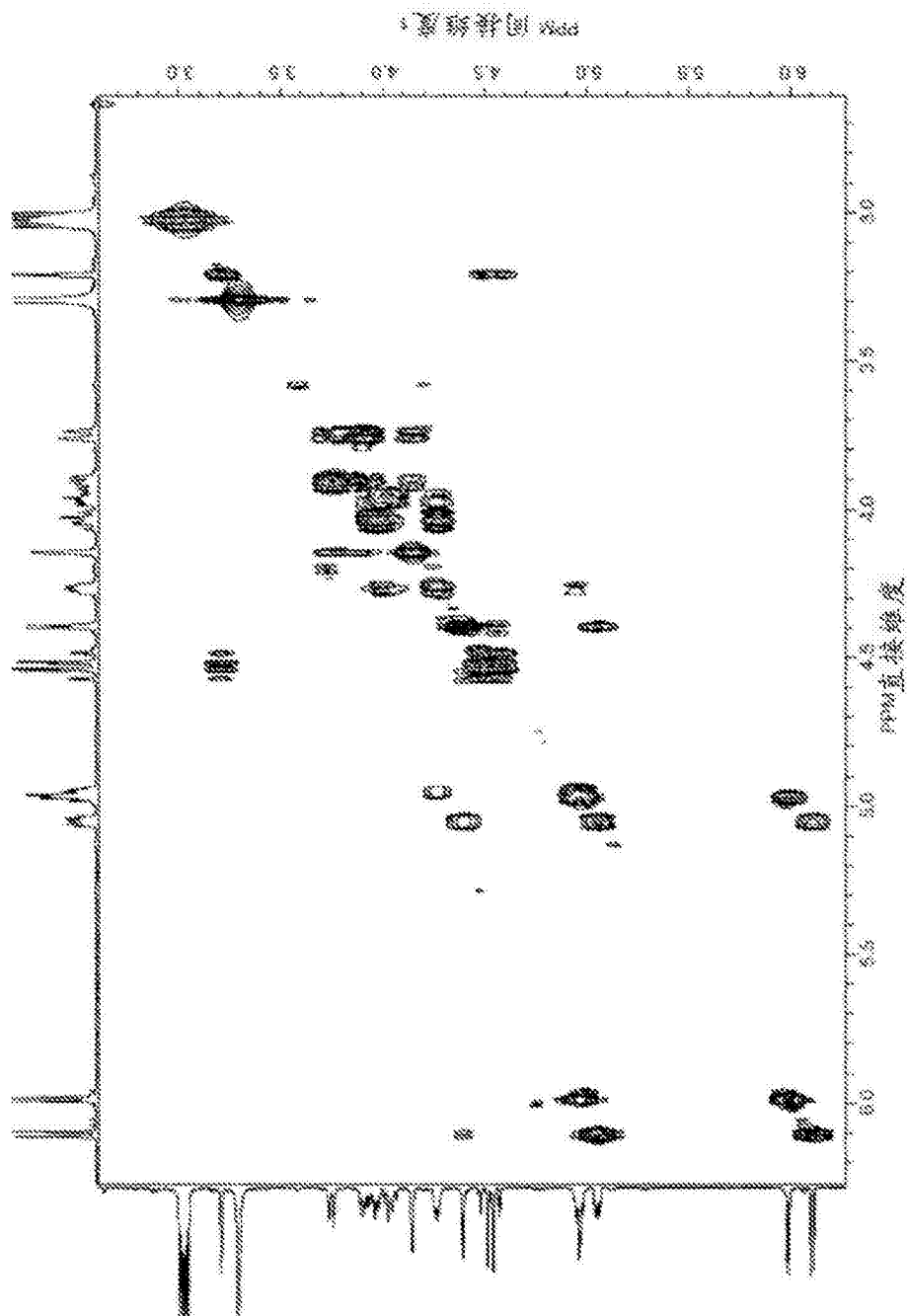


图3C

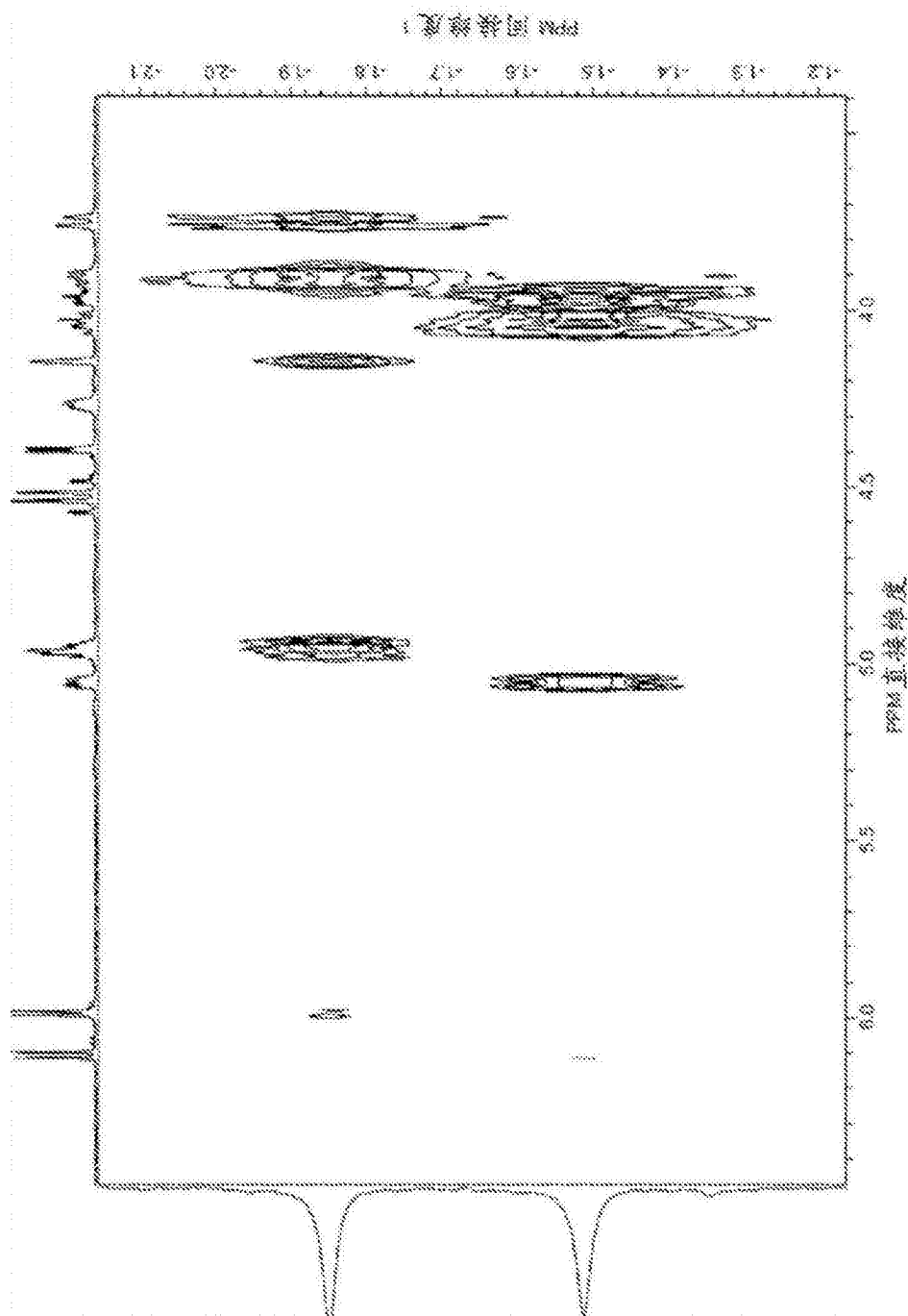


图3D

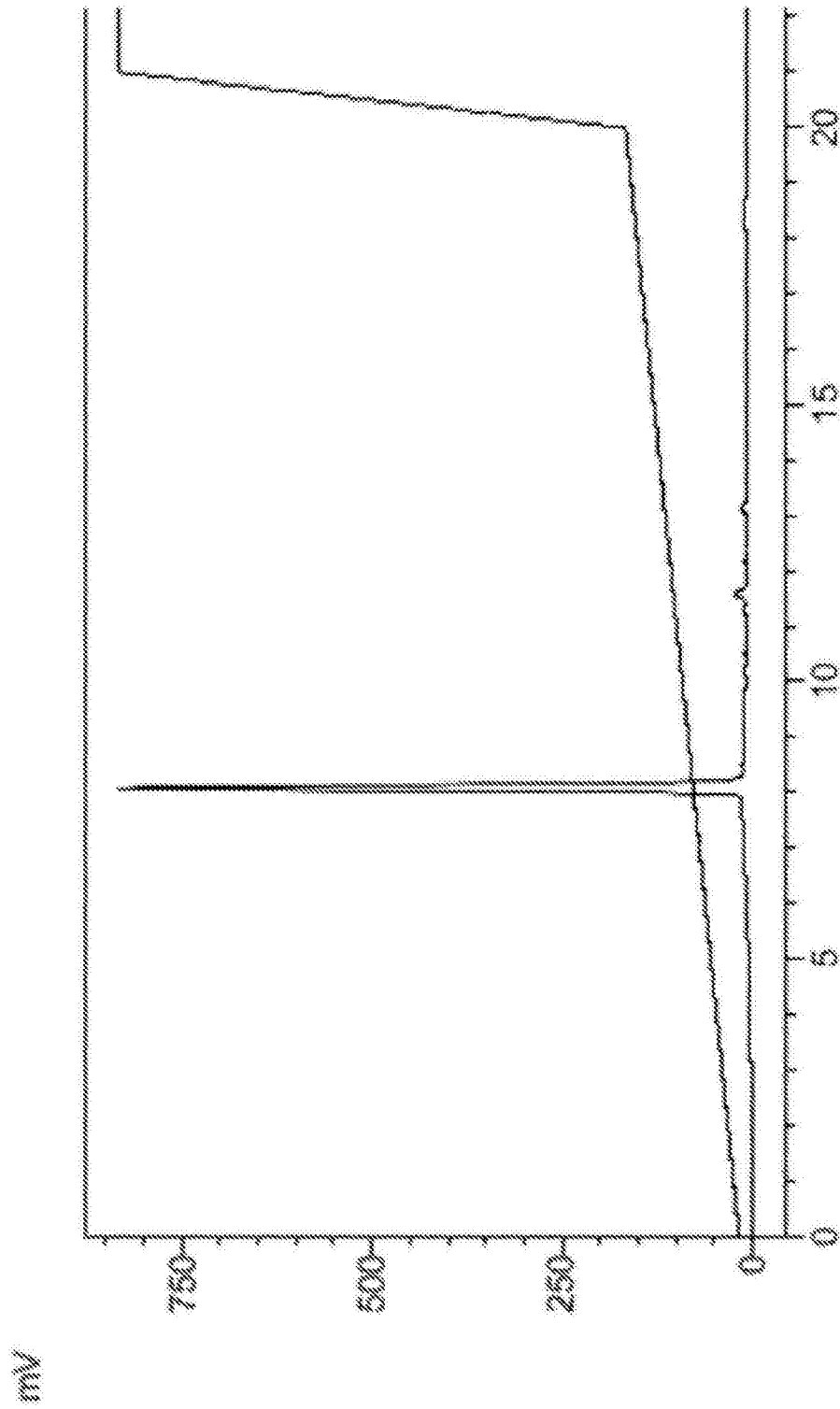


图3E

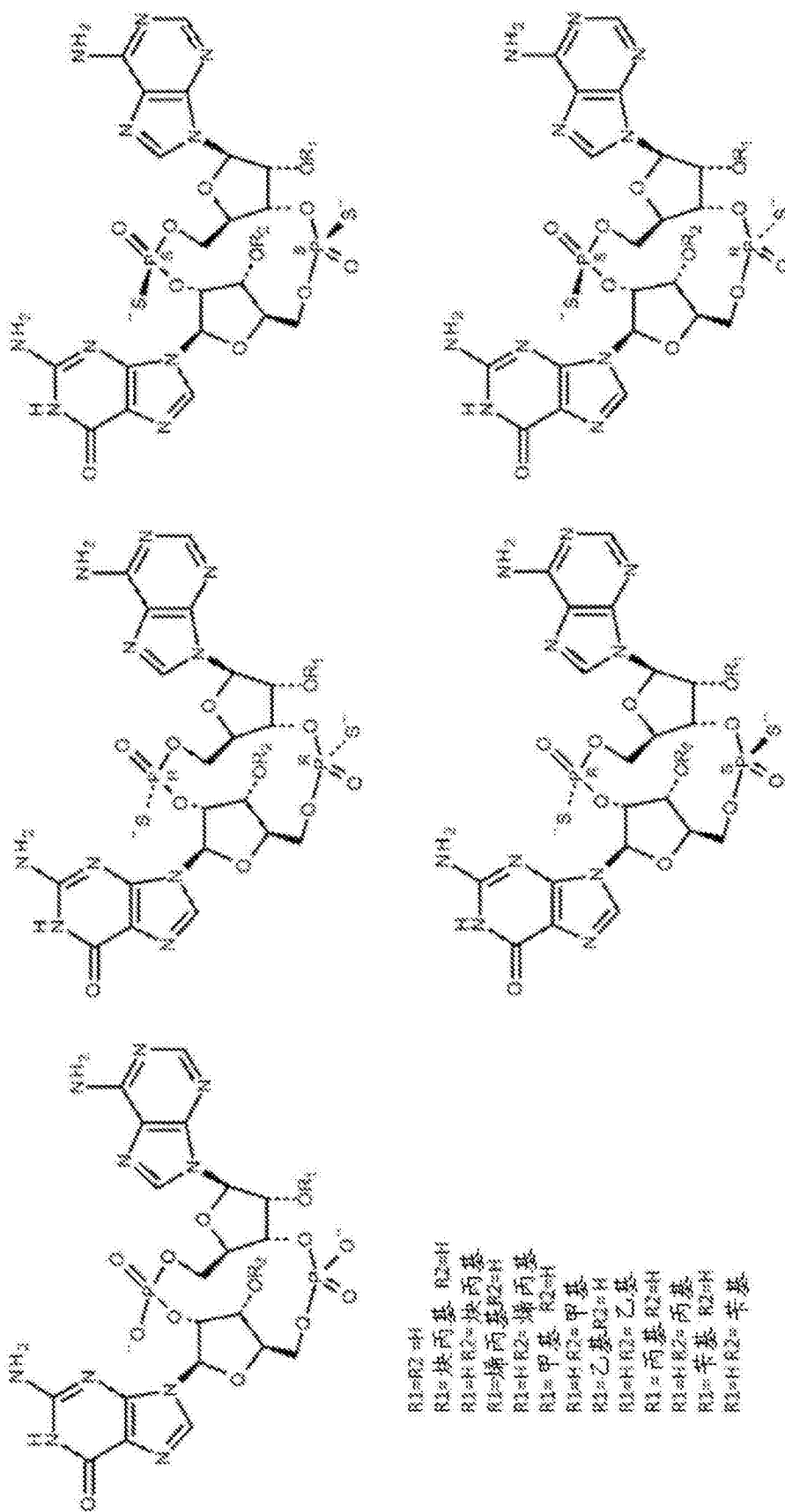


图6

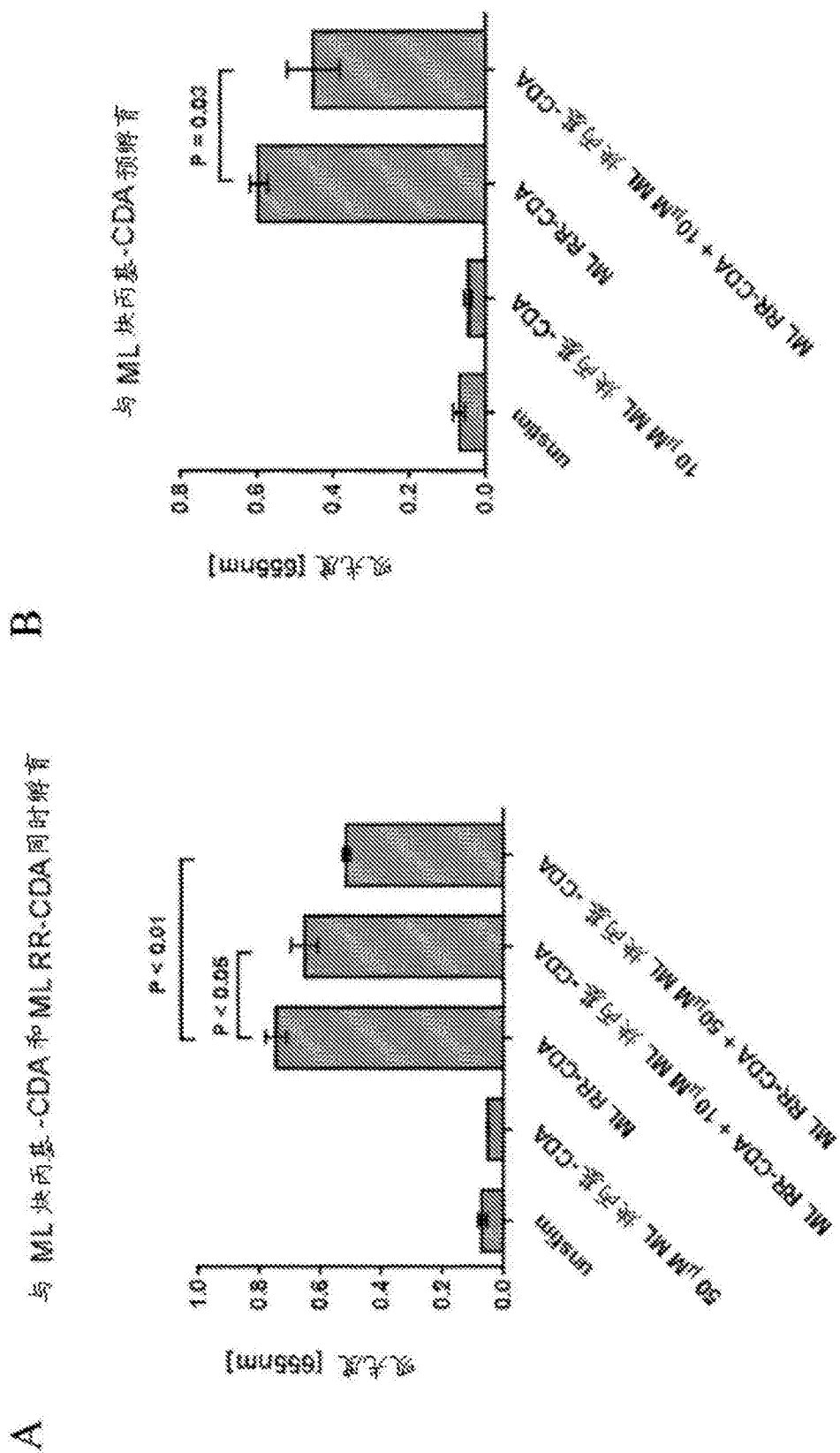


图7