



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112752837 A

(43) 申请公布日 2021.05.04

(21) 申请号 201980050463.X

(22) 申请日 2019.06.26

(30) 优先权数据

1810486.9 2018.06.26 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2019/051803 2019.06.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/002911 EN 2020.01.02

(71) 申请人 帝国理工学院创新有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 马修·富希特

阿米娅·乌里兹·瓦尔特

休·J·M·布雷迪

(74) 专利代理机构 北京骥驰知识产权代理有限公司 11422

代理人 唐晓峰

(51) Int.Cl.

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 5/0789 (2006.01)

A61K 31/33 (2006.01)

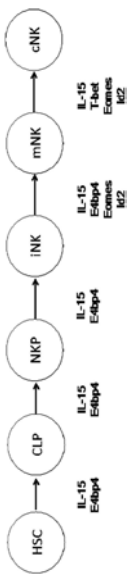
权利要求书12页 说明书81页
序列表14页 附图8页

(54) 发明名称

天然杀伤细胞

(57) 摘要

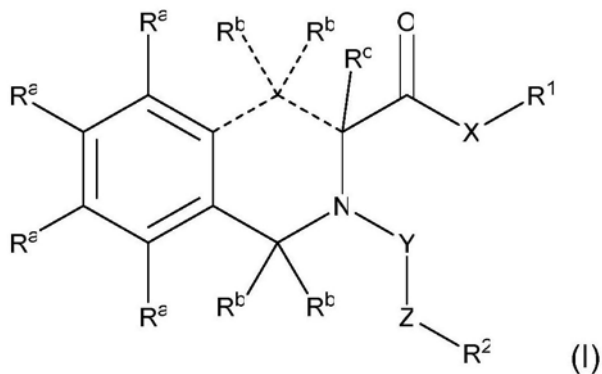
本发明涉及天然杀伤(NK)细胞群,其制备方法及其治疗应用。更具体地,本发明涉及通过增加与NK细胞产生相关的特定转录因子的表达来扩增NK细胞。



1. 一种用于扩增NK细胞群的离体方法,包括步骤:

- a) 培养从个体获得的包含造血祖细胞 (HPC) 的样品;
- b) 使所述样品与抑制REV-ERB作用的化合物接触;和
- c) 在体外扩增所述细胞以产生NK细胞群;

其中所述化合物具有式 (I):



其中:-----表示均存在或不存在的键;

R^1 选自 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

R^2 选自5-10元杂环基环和 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

X选自 $-O-$ 和 $-NR'-$ 或不存在;

Y选自 $-C(O)-$ 或 $-CR'_2-$;

Z选自 $-O-$ 和 $-NR'-$ 或不存在;

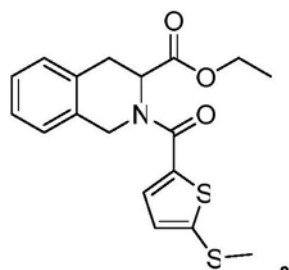
每个 R^a 独立地选自H, C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素;

每个 R^b 独立地选自H, C_{1-4} 烷基和 $-OR'$;

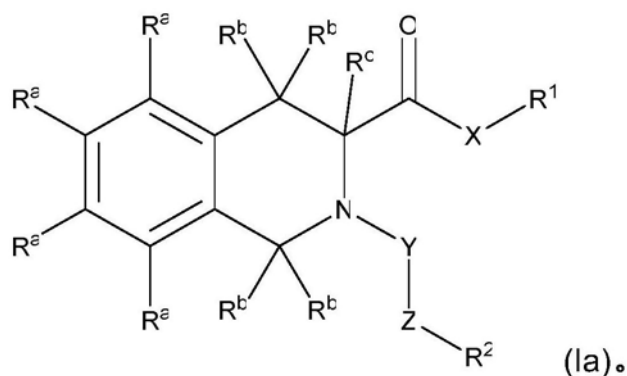
R^c 选自H和 C_{1-4} 烷基;和

每个 R' 独立地选自H, C_{1-4} 烷基和 $-Ph$;

或其药学上可接受的盐,条件是所述化合物不是:



2. 根据权利要求1所述的方法,其中-----代表均存在的键,并且所述化合物是根据式Ia的闭环结构:



3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中 R^1 未被取代,且因此优选地选自 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 烯基,更优选地, R^1 选自 C_{1-6} 烷基,甚至更优选地选自 C_{1-4} 烷基,例如甲基、乙基和丙基。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中:

R^2 选自:

(i) 任选取代的5-10元杂环基环,优选任选取代的5-10元杂芳基环,并且5-10元杂芳基环优选为任选取代的5、6或9元杂芳基环,其中任选地5、6或9元杂芳基环选自任选取代的:呋喃基,噻吩基,噁唑基,异噁唑基,异噻唑基,噻唑基,吡唑基,咪唑基,吡咯基和三唑基,吡啶基,哒嗪基,嘧啶基和吡嗪基,吡啶基,异吡啶基,吡啶基,苯并咪唑基,氮杂吡啶基,苯并呋喃基,异苯并呋喃基,苯并异噁唑基和苯并噁唑基;和

(ii) 任选取代的苯基,优选取代的苯基;和/或

R^2 未被取代或被一个或两个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'_2C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代,优选 R^2 为未取代或被一个或两个独立地选自 $-Me$, $-OMe$, $-CN$, $-NO_2$, $-F$, $-Cl$, $-I$ 和 $-SMe$ 的基团取代。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中:

a) X 为 $-O-$;

b) Y 为 $-C(O)-$;

c) Z 为 $-O-$ 或不存在,优选 Z 不存在;

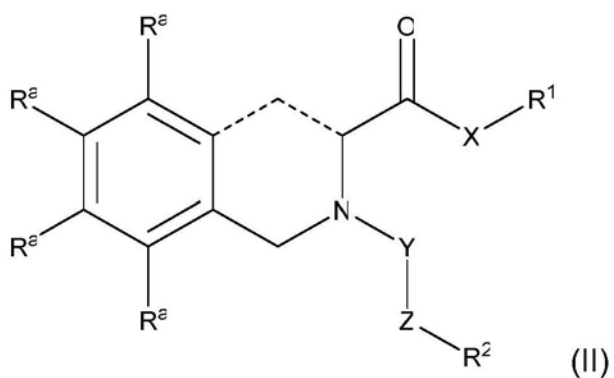
d) 每个 R^a 独立地选自 H , C_{1-4} 烷基和 $-OR'$, 优选选自 H 和 C_{1-4} 烷基,并且更优选地,每个 R^a 为 H ;

e) 每个 R^b 独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基,优选每个 R^b 为 H ;

f) R^c 为 H ;和/或

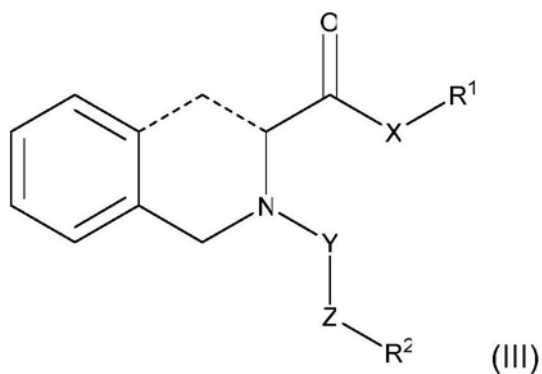
g) 每个 R' 独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基,优选选自 H 、甲基和乙基,更优选选自甲基和乙基。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中 R^b 和 R^c 均为 H ,使得所述化合物具有式(II):



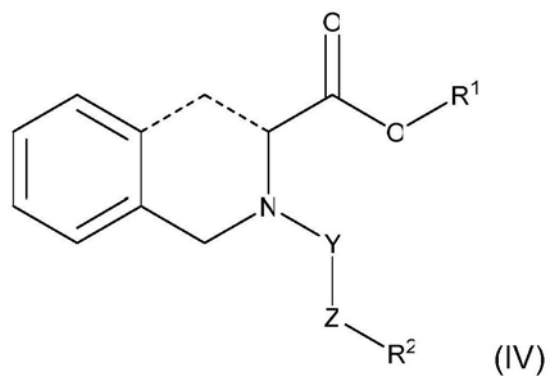
其中 R^1 , R^2 , R^a , X, Y和Z在权利要求1-5中定义。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中 R^a 均为H, 使得所述化合物具有式(III):



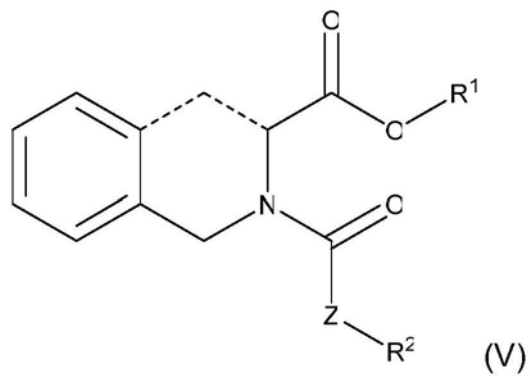
其中 R^1 , R^2 , X, Y和Z在权利要求1至5中定义;

优选地, X是-O-, 使得所述化合物具有式(IV):



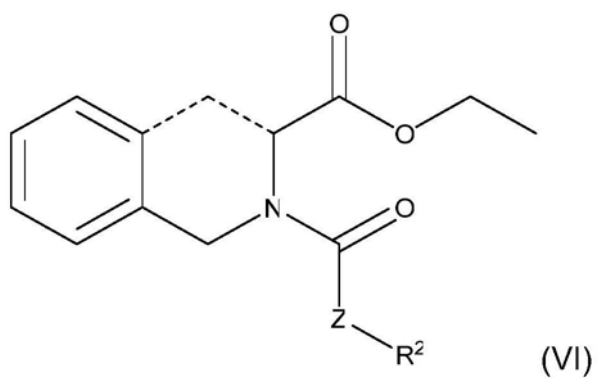
其中 R^1 , R^2 , Y和Z如权利要求1至5所定义;

更优选地, Y是-C(O)-, 使得所述化合物具有式(V):



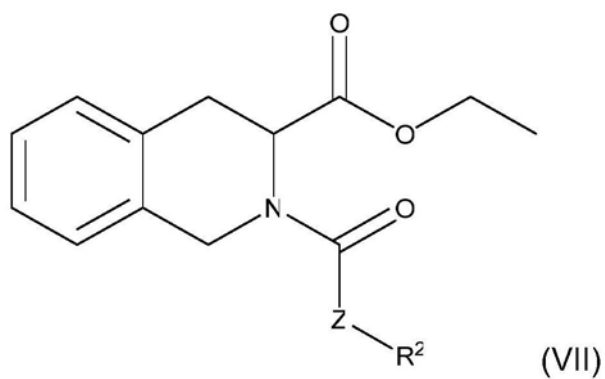
其中 R^1 , R^2 和Z如权利要求1至5所定义；

仍然更优选地, R^1 是乙基, 使得所述化合物具有式(VI)：



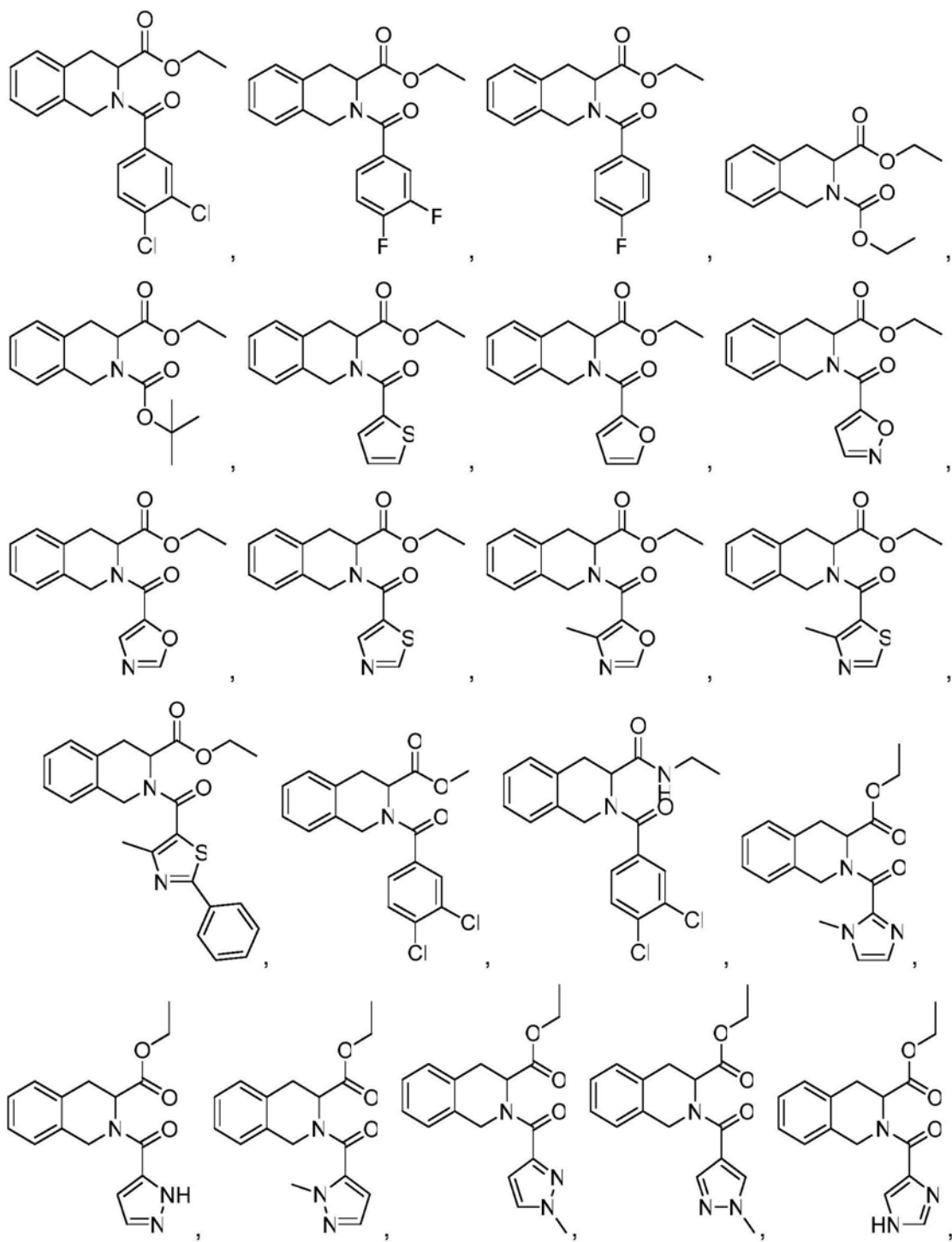
其中 R^2 和Z如权利要求1至5所定义；

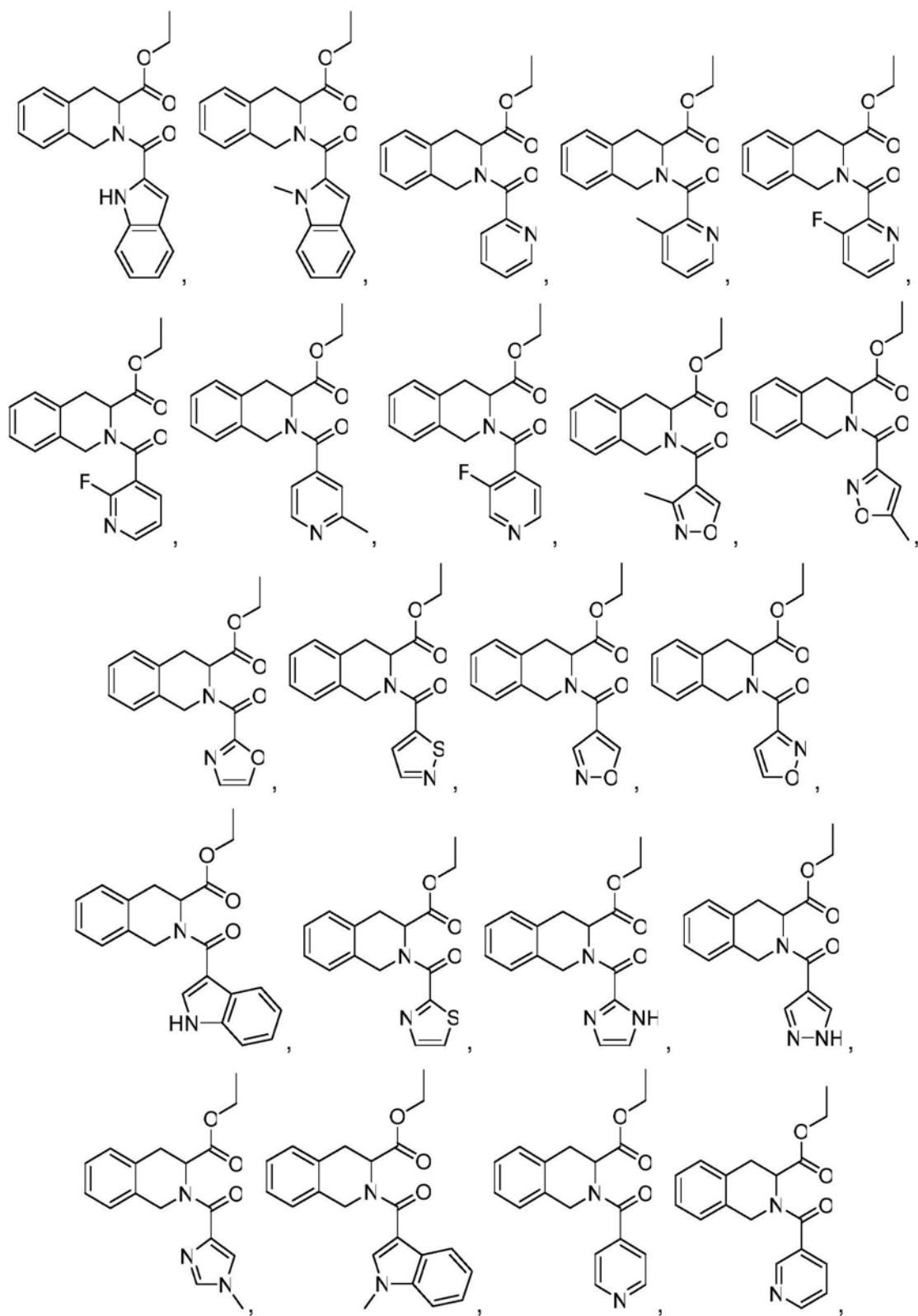
仍然更优选地, 所述化合物为具有式(VII)的闭环结构：

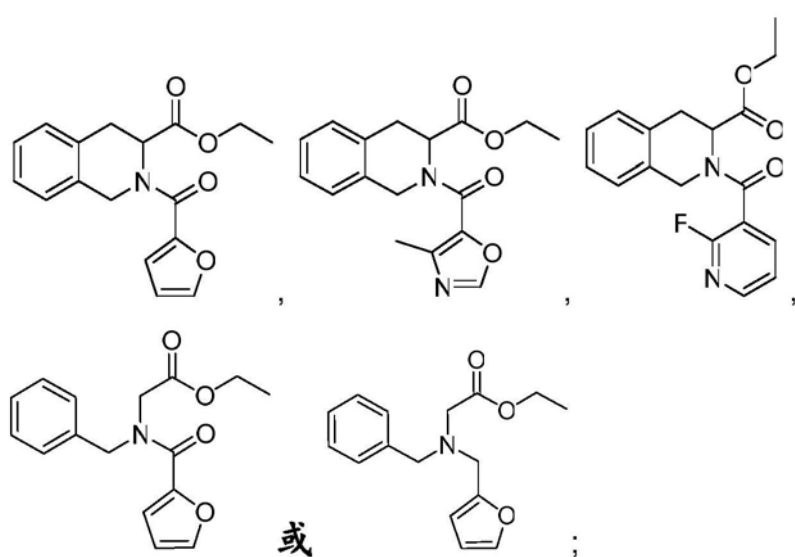
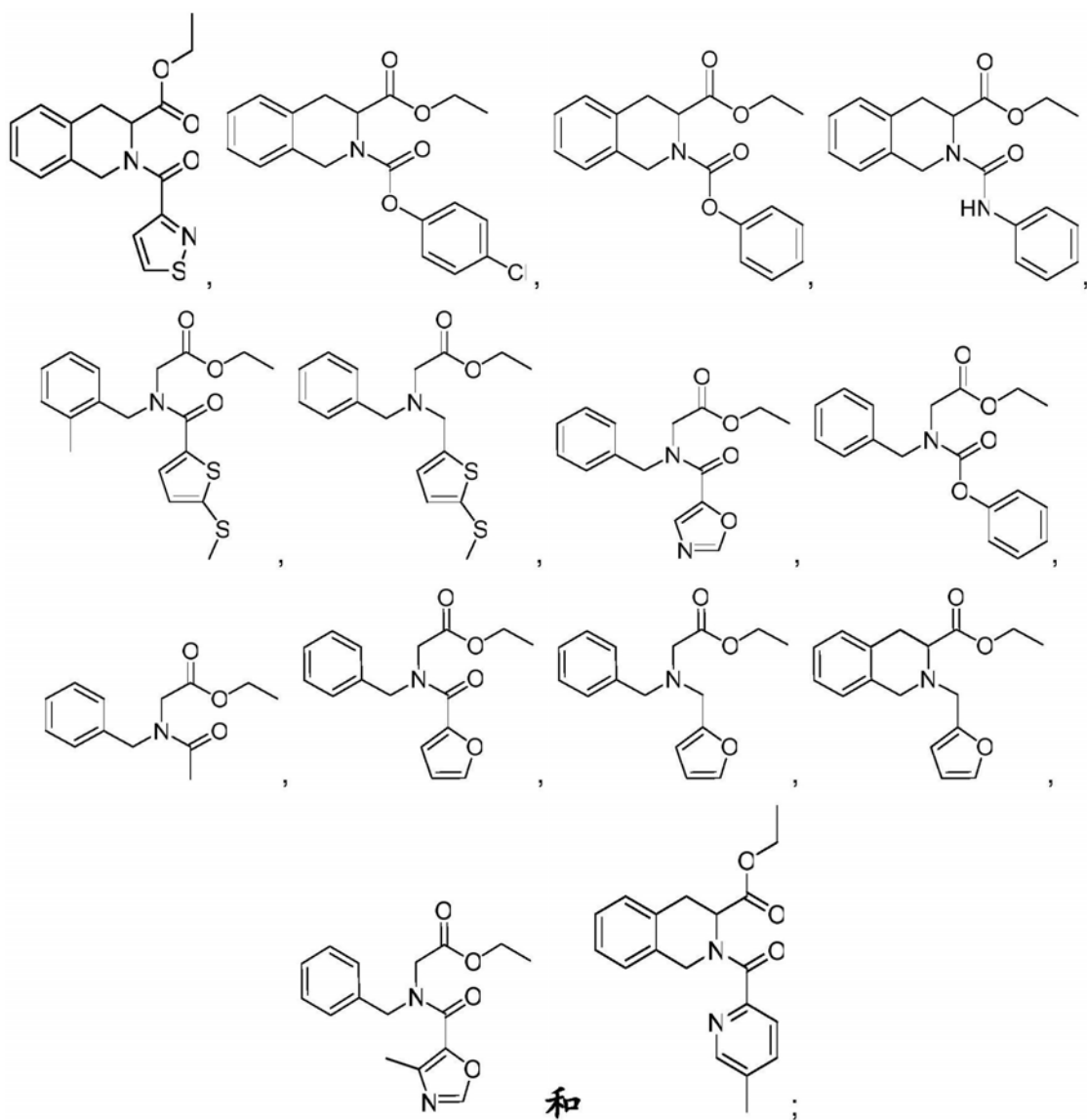


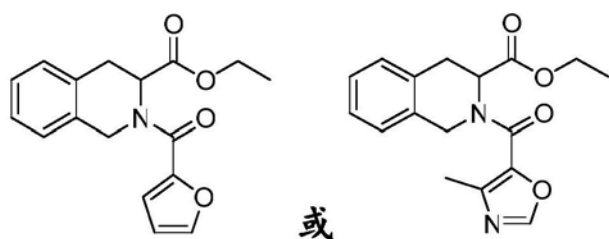
其中 R^2 和Z如权利要求1至5所定义。

8. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述化合物具有选自以下的式：









9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述化合物通过降低REV-ERB活性来增加E4bp4表达。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述化合物降低REV-ERB- α 和/或REV-ERB- β ,优选地REV-ERB- β ,并且更优选地REV-ERB- α 和REV-ERB- β 的活性。

11. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述化合物是REV-ERB拮抗剂,优选为REV-ERB- α 和REV-ERB- β 的拮抗剂。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其进一步包括在Notch配体存在下培养所述HPC的步骤,其中任选地,在其中培养所述HPC的所述容器用所述Notch配体包被。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中:

- a) 所述Notch配体是 δ 样配体4 (DLL4) 或其保留了DLL4功能的片段;和/或
- b) 所述Notch配体在分离所述HPC后4天或之后存在。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中:

- a) 在所述Notch配体存在下培养的步骤之后,在IL-15存在下培养细胞;和/或
- b) 在所述Notch配体与IL-7, Flt3L和/或干细胞因子(SCF)结合,优选所述Notch配体与IL-7, Flt3L和SCF结合的存在下培养所述HPC,

其中任选地在所述Notch配体存在下在细胞中培养的步骤和在IL-15存在下培养的步骤中的一个或两个是在没有基质支持细胞的情况下进行的,并且优选地,其中两个步骤是在没有基质支持细胞的情况下进行。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括使所述HPC与导致E4bp4的翻译后修饰的改变的化合物接触的步骤,从而引起E4bp4活性的增加;和

其中任选地,E4bp4的翻译后修饰的改变是E4bp4的SUMO化和/或磷酸化的减少,并且优选导致E4bp4的翻译后修饰的改变的化合物:

- a) 在E4bp4的残基K10, K116, K219, K337和/或K394中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少SUMO化;和/或
- b) 在E4bp4的残基S286, S301和/或S454中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少磷酸化。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述HPC样品得自骨髓,脐带血和/或外周血。

17. 通过权利要求1至16中任一项的方法获得的扩增的NK细胞群,其中至少85%的所述NK细胞是CD56⁺和CD45⁺。

18. 一种组合物,其包含权利要求17所述的扩增的NK细胞群和药学上可接受的载体,稀释剂和/或赋形剂。

19. 一种通过增加患者体内天然杀伤(NK)细胞的产生而抑制REV-ERB活性作用的化合物,用于治疗方法,其中所述化合物如权利要求1至11中任一项所定义。

20. 包含抑制REV-ERB作用的化合物和Notch配体作为组合制剂的产品,用于通过增加患者体内天然杀伤(NK)细胞的产生而同时、单独或顺序用于治疗方法,其中所述化合物如权利要求1至11中任一项所定义,并且任选地所述Notch配体为 δ 样配体4(DLL4)或其保留DLL4功能的片段。

21. 根据权利要求19所用的化合物或根据权利要求20所用的产品,其中所述治疗方法是:

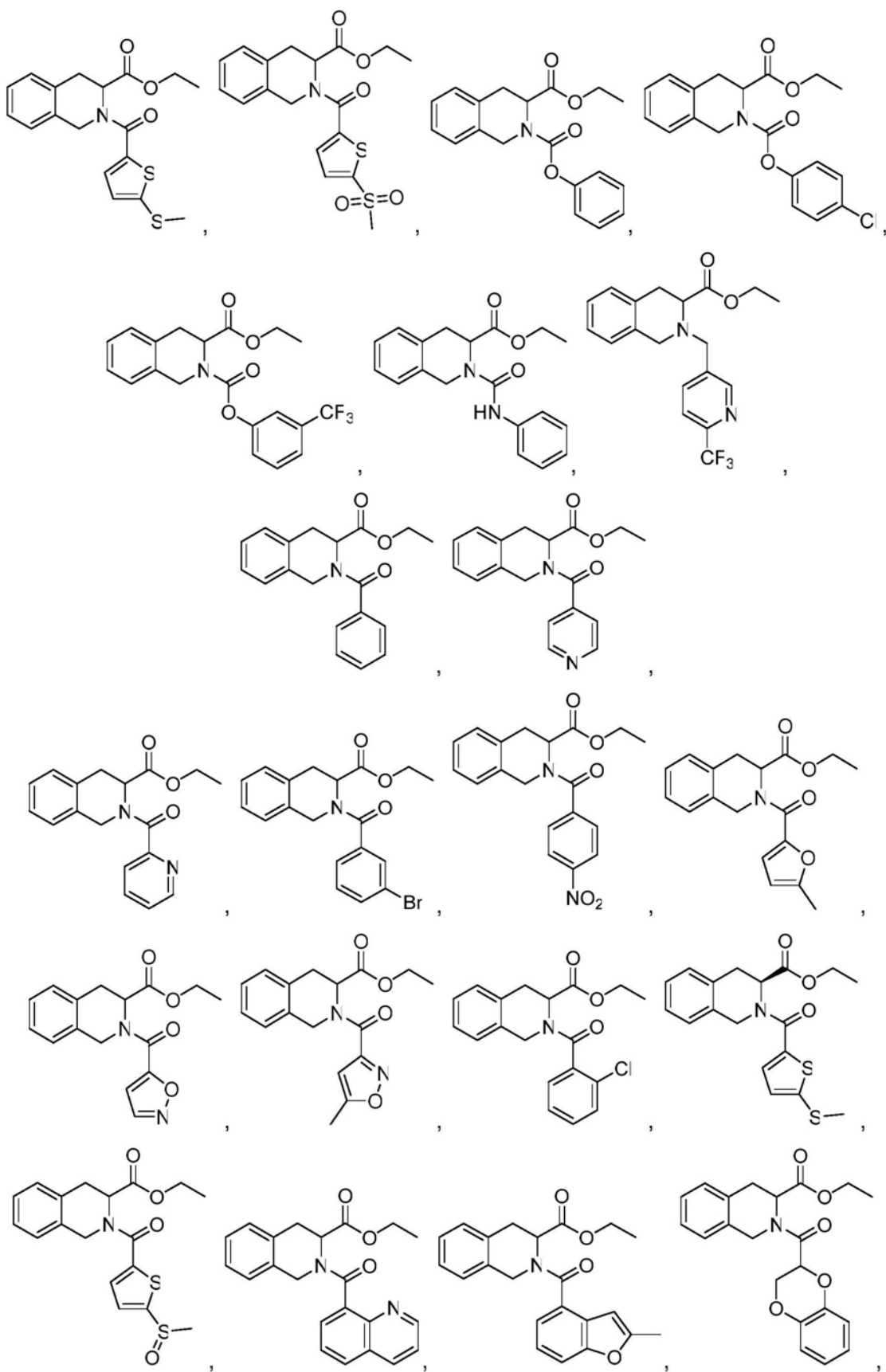
a) 治疗选自癌症、传染病(急性或慢性)、自身免疫疾病或与女性不育或妊娠有关的疾病或病症的疾病或病症的方法;或

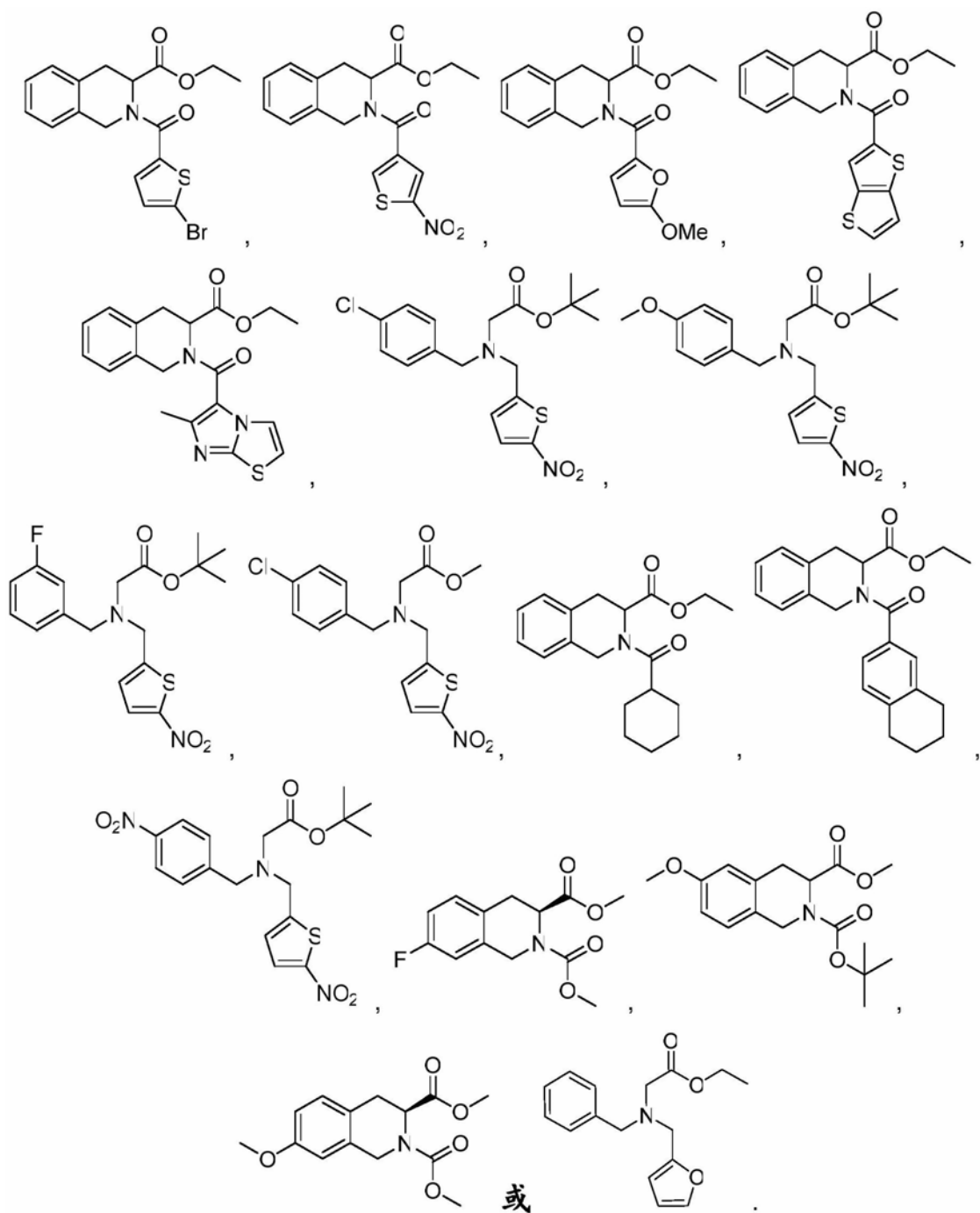
b) 治疗病毒感染、细菌感染、原生生物感染、真菌感染和/或蠕虫感染的方法。

22. 通过增加需要治疗的患者的NK细胞数量的治疗方法,包括给予所述患者治疗有效量的抑制如权利要求1至11中任一项所定义的REV-ERB作用的化合物和任选的Notch配体,其中优选地所述Notch配体是 δ 样配体4(DLL4)或其保留DLL4功能的片段。

23. 根据权利要求19或21中任一项所用的化合物、权利要求20或21所用的产品或权利要求22的治疗方法,其与抗体介导的免疫疗法结合使用,其中任选地,在给予抗体介导的免疫治疗之前,同时或之后给予所述化合物或产品。

24. 如权利要求1至11中任一项所定义的式(I)化合物,条件是所述化合物不是:





天然杀伤细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及扩增的天然杀伤(NK)细胞群,其制备方法及其治疗应用。更具体地,本发明涉及通过增加与NK细胞产生相关的特定转录因子的表达来扩增NK细胞。

[0002] 发明背景

[0003] 人们对天然杀伤(NK)细胞的兴趣一直在增加,因为其对癌细胞、病原体感染细胞和其他受损细胞具有细胞毒性。NK细胞是先天性淋巴细胞(ILC),特别是大颗粒细胞毒性淋巴细胞,其桥接免疫应答的先天性和适应性臂。其占外周血中循环淋巴细胞的10-15%。NK细胞在免疫系统内也具有最高水平的细胞毒活性。因此,改变的NK细胞功能或数量会影响免疫系统对抗感染和癌症的功能。例如,日本的一项大规模研究表明,40岁以上人群中NK细胞水平的降低与癌症发病率显著增加有关。

[0004] 与B细胞和T细胞类似,这些NK细胞源自共同淋巴祖细胞(CLP),其又来自造血干细胞(HSC)。然而,NK细胞与B细胞和T细胞不同,因为其缺乏特异性细胞表面抗原受体。因此,NK细胞可以在没有事先致敏的情况下杀死癌细胞和病原体感染细胞,使其成为先天性免疫应答的一部分。其还通过直接影响适应性免疫应答在肿瘤免疫监视中发挥关键作用。

[0005] NK细胞的活化触发其释放含有颗粒酶的穿孔素和细胞质颗粒。穿孔素在 Ca^{2+} 存在下聚合以在靶细胞上形成孔。颗粒酶可以使这些孔进入靶细胞,导致DNA片段化和细胞凋亡。NK细胞也可以分泌细胞因子,其引发免疫的适应性臂中的其他免疫细胞的作用。

[0006] 由于NK细胞在针对病原体感染细胞和癌细胞的免疫应答中的重要性,多项临床试验已经测试了NK细胞在过继转移方案中的功效。在过继转移中,从供体血液中分离的NK细胞在体外扩增并在输入受体之前成熟为健康和功能性NK细胞。然而,为了有效,必须筛选NK细胞供体的KIR基因型,其中供体必须与受体具有适当的KIR等位基因多态性以允许识别靶细胞而进行破坏。无论如何,研究发现扩增产物的临床成功率低于预期,杀死癌细胞或感染细胞的能力较低。因此,当前的过继转移方案存在重大障碍。

[0007] 另一种治疗方法是增加内源性NK细胞的数量。一种方法是给予NK细胞发育所必需的细胞因子。预计给予IL-2和IL-15可增强NK细胞的发育。IL-2促进NK细胞的增殖和细胞毒性,而IL-15促进NK细胞的发育和扩增。然而,在体内研究中,发现细胞因子仅刺激NK细胞的最小扩增,即使在非常高的剂量下也具有降低的半衰期。此外,由于免疫应答的不适当活化和NK细胞凋亡的诱导,给予的细胞因子常常导致全身毒性。

[0008] 因此,使用常规方法和技术,难以产生大量NK细胞,并且产生具有高细胞毒性的全功能NK细胞甚至更难。目前没有可选择性增加NK细胞数量的药物。因此,需要开发NK细胞产生的新方法;既能离体产生又能在体内产生大量功能性NK细胞用于治疗和研究用途。

[0009] 发明概述

[0010] 天然杀伤(NK)细胞在免疫系统中起关键作用,其可以破坏癌细胞、病原体感染细胞或受损细胞。预计提高NK细胞的数量或功能会增加这些细胞的杀伤。现有疗法如NK细胞过继转移和内源性NK细胞的细胞因子增强在其功效方面不是非常成功。

[0011] NK细胞从骨髓中的HSC分化并分布在淋巴组织和非淋巴组织中,包括淋巴结、脾、

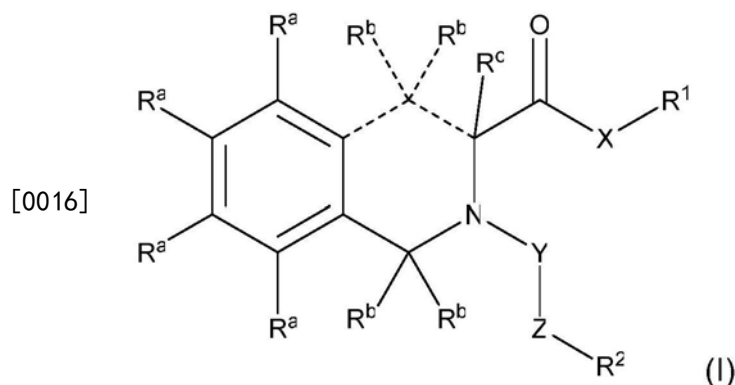
外周血、肺和肝。需要特定的细胞因子和转录因子来促进HSC发育成NK细胞。每种细胞因子和转录因子必须以精确的时间和浓度存在,以推动从HSC分化成NK细胞。然而,仍然不完全了解控制NK细胞成熟的细胞因子和转录因子的精确等级。

[0012] 特别地,本发明人专注于也称为Nfi13的E4结合蛋白4(E4bp4)。E4bp4的上调是增加NK细胞产生的一种很有前途的策略,因为E4bp4在HSC中的过度表达可极大地提高体外NK细胞的产生。但是,转录因子由于其结构和功能而难以药物治疗。例如,它们通常缺乏酶促活性或辅因子结合位点。本发明人先前已经表明,抑制REV-ERB的作用可增加NK细胞的产生。特别地,发明人证明了使用REV-ERB拮抗剂SR8278抑制REV-ERB的作用可增加E4bp4表达,这反过来又增加NK细胞的产生。REV-ERB的许多合成配体在本领域中已经产生。然而,在筛选时,这些配体中的绝大多数已被鉴定为激动剂(已鉴定出300多种)。拮抗剂配体SR8278的药理特性使其不适合在临床环境中使用。此外,关于SR8278的作用机理的信息的缺乏以及围绕该分子的合适的结构-活性关系的缺乏阻碍了其他拮抗化合物的发现。

[0013] 本发明人现在已经生成了化合物库,并且已经证明与SR8278相比,几种此类化合物具有改善的REV-ERB抑制活性。因此,这些化合物具有改善NK细胞离体扩增的潜力,并具有改善的药理特性,使其更适合用于临床应用。所述化合物还可以表现出有利的药理特性,例如良好的代谢稳定性和低毒性。

[0014] 因此,本发明提供了一种用于扩增NK细胞群的离体方法,包括步骤:a)培养从个体获得的包含造血祖细胞(HPC)的样品;b)使所述样品与抑制REV-ERB作用的化合物接触;和c)在体外扩增所述细胞以产生NK细胞群;

[0015] 其中化合物具有式(I):



[0017] 其中:-----表示均存在或不存在的键;

[0018] R^1 选自 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

[0019] R^2 选自5-10元杂环基环和 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

[0020] X选自-O-和 $-NR'$ -或不存在;

[0021] Y选自 $-C(O)-$ 或 $-CR'_2-$;

[0022] Z选自-O-和 $-NR'$ -或不存在;

[0023] 每个 R^a 独立地选自H, C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)$

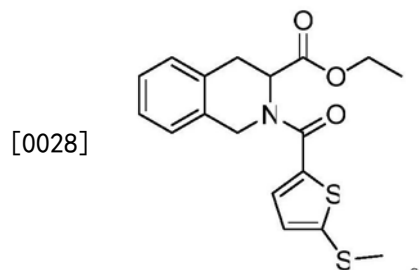
$_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素;

[0024] 每个 R^b 独立地选自 H , C_{1-4} 烷基和 $-OR'$;

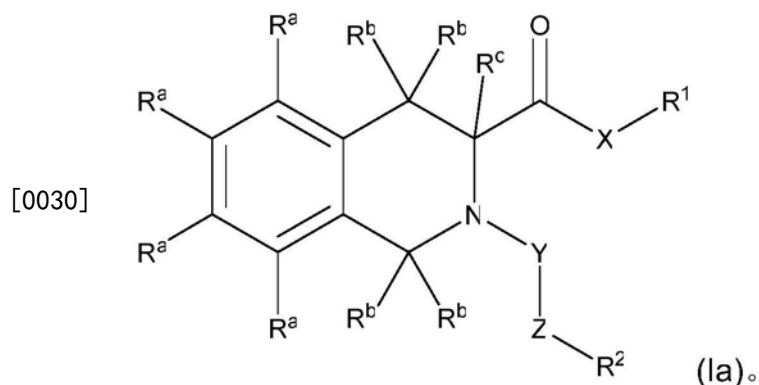
[0025] R^c 选自 H 和 C_{1-4} 烷基;和

[0026] 每个 R' 独立地选自 H , C_{1-4} 烷基和 $-Ph$;

[0027] 或其药学上可接受的盐,条件是该化合物不是:



[0029] 在一些实施方案中,-----表示均存在的键并且该化合物是根据式Ia的闭环结构:



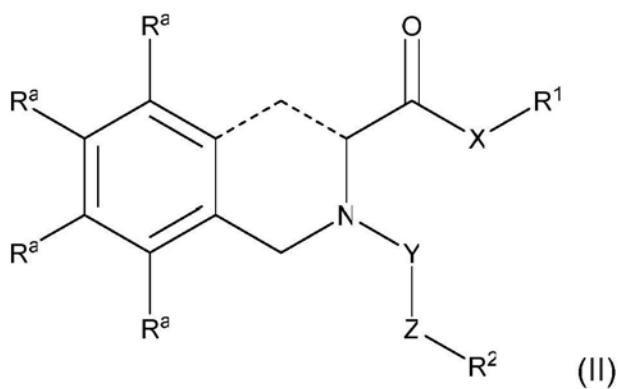
[0031] R^1 可以未被取代,且因此优选地选自 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 烯基,更优选地, R^1 选自 C_{1-6} 烷基,甚至更优选地选自 C_{1-4} 烷基,例如甲基、乙基和丙基。

[0032] R^2 可以选自:(i)任选取代的5-10元杂环基环,优选任选取代的5-10元杂芳基环,并且5-10元杂芳基环优选为任选取代的5、6或9元杂芳基环,其中任选地5、6或9元杂芳基环选自任选取代的:呋喃基,噻吩基,噁唑基,异噁唑基,异噻唑基,噻唑基,吡唑基,咪唑基,吡咯基和三唑基,吡啶基,哒嗪基,嘧啶基和吡嗪基,吡啶基,异吡啶基,吡唑基,苯并咪唑基,氮杂吡啶基,苯并呋喃基,异苯并呋喃基,苯并异噻唑基和苯并噁唑基;和(ii)任选取代的苯基,优选取代的苯基;和/或 R^2 可以未被取代或被一个或两个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代,优选 R^2 为未取代或被一个或两个独立地选自 $-Me$, $-OMe$, $-CN$, $-NO_2$, $-F$, $-Cl$, $-I$ 和 $-SMe$ 的基团取代。

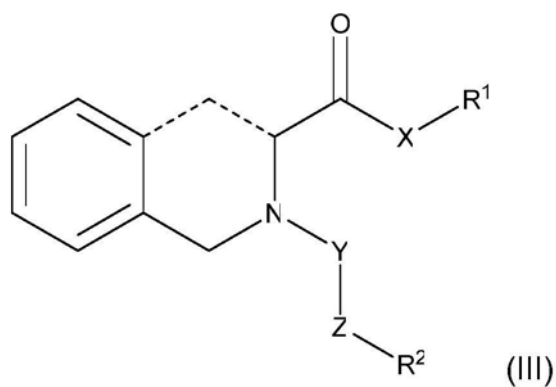
[0033] X 可为 $-O-$; Y 可为 $-C(O)-$; Z 可为 $-O-$ 或不存在,优选 Z 不存在;每个 R^a 可独立地选自 H , C_{1-4} 烷基和 $-OR'$,优选选自 H 和 C_{1-4} 烷基,并且更优选地,每个 R^a 为 H ;每个 R^b 可独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基,优选每个 R^b 为 H ; R^c 可为 H ;和/或每个 R' 可独立地选自 H 和 C_{1-4} 烷基,优选选自 H 、甲基和乙基,更优选选自甲基和乙基。

[0034] 在一些优选的实施方案中, R^b 和 R^c 均为 H ,使得该化合物具有式(II):

[0035]

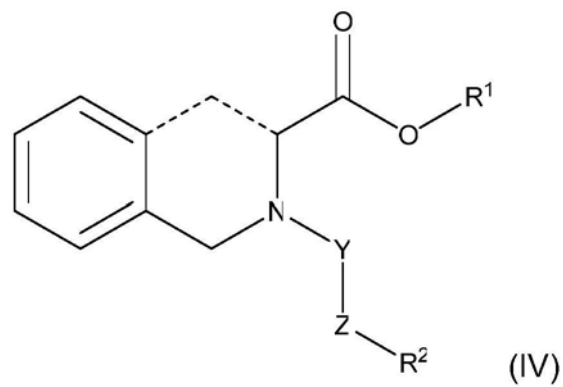
[0036] 其中 R^1 , R^2 , R^a , X, Y和Z为本文中所定义的。[0037] 在一些优选的实施方案中, R^a 也都为H, 使得该化合物具有式 (III) :

[0038]

[0039] 其中 R^1 , R^2 , X, Y和Z为本文中所定义的;

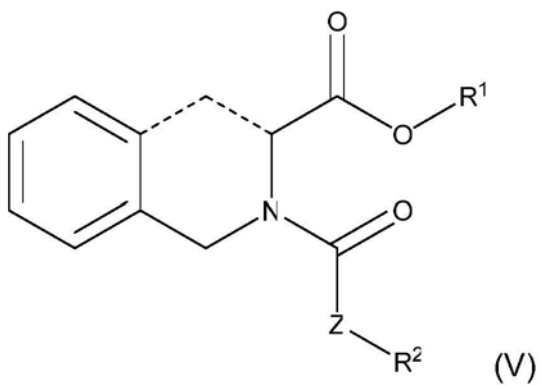
[0040] 优选地, X为O, 使得该化合物具有式 (IV) :

[0041]

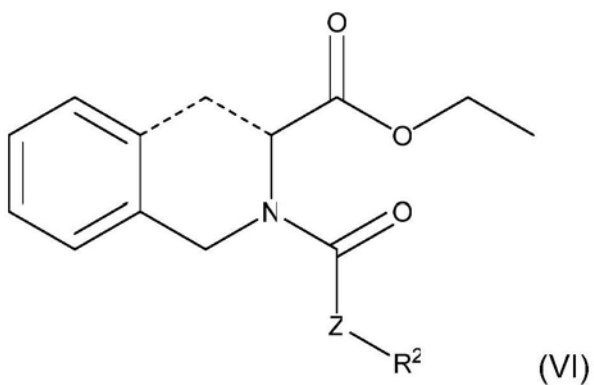
[0042] 其中 R^1 , R^2 , Y和Z如本文所定义;

[0043] 更优选地, Y为C(O), 使得该化合物具有式 (V) :

[0044]

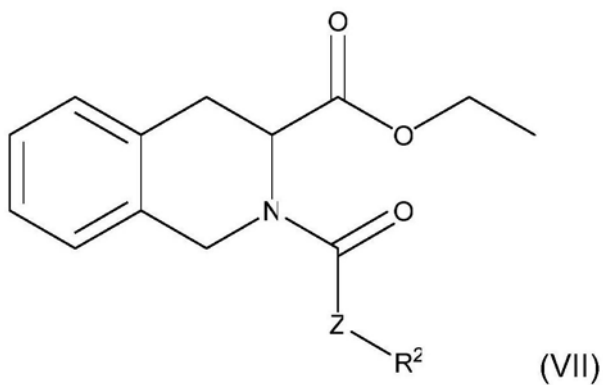
[0045] 其中R¹, R²和Z如本文所定义;[0046] 仍然更优选地, R¹是乙基, 使得该化合物具有式 (VI):

[0047]

[0048] 其中R²和Z如本文所定义;

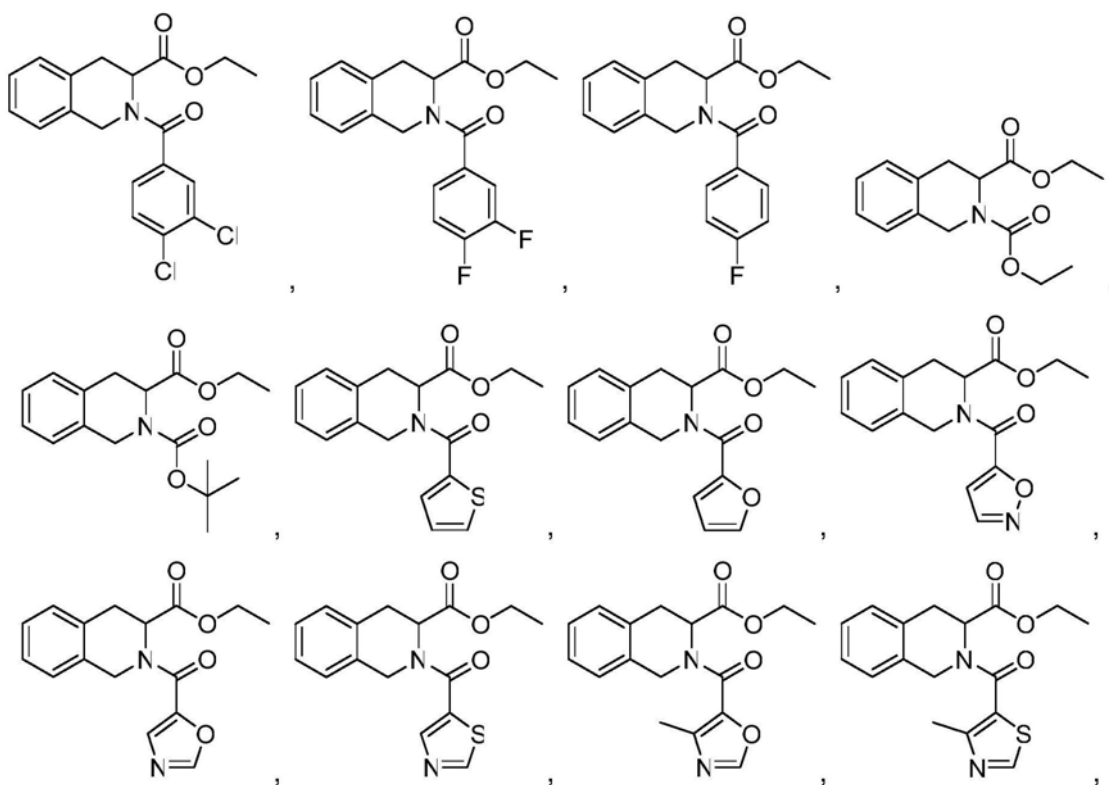
[0049] 仍更优选地, 该化合物为具有式 (VII) 的闭环结构:

[0050]

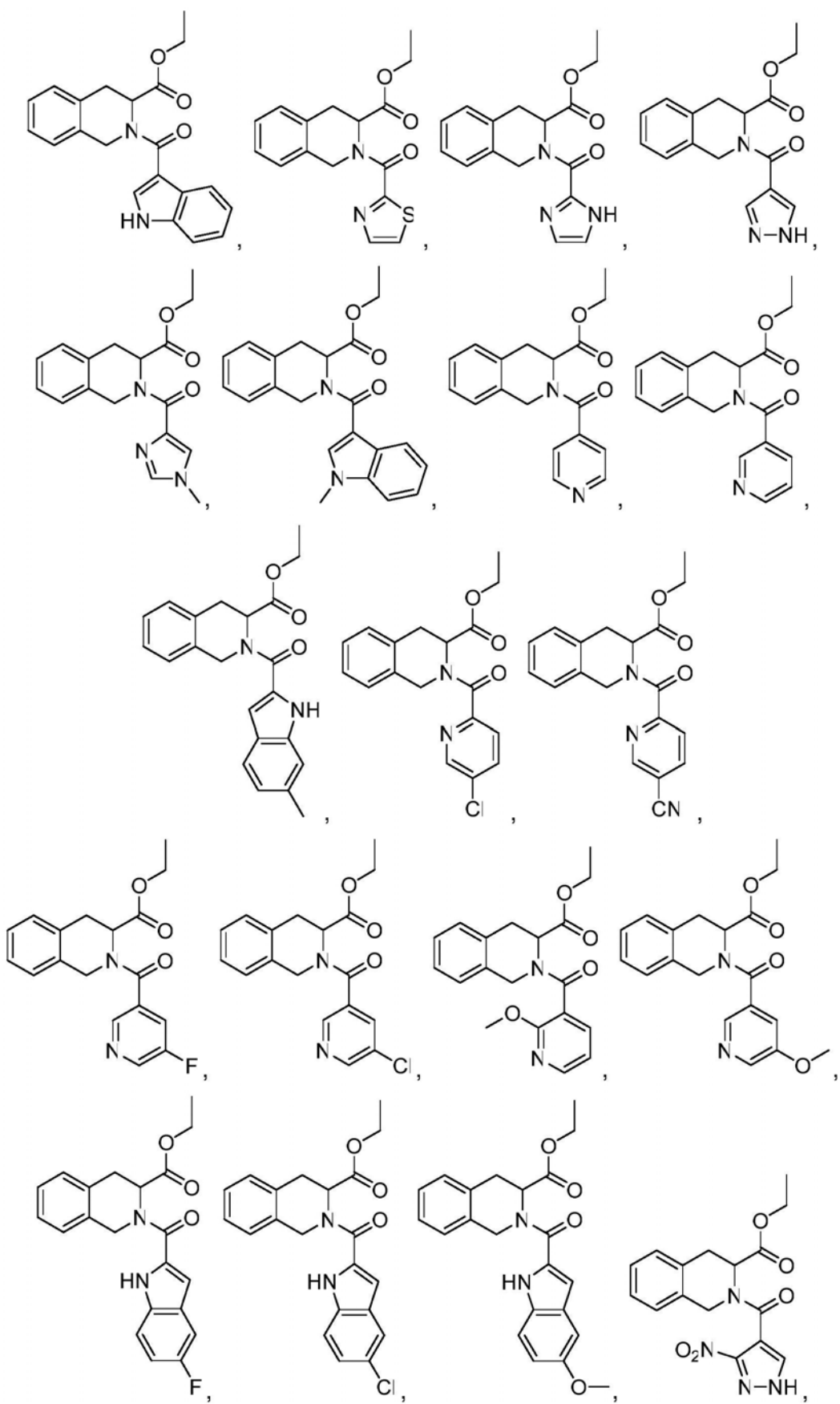
[0051] 其中R²和Z如本文所定义。

[0052] 在本发明方法的一些实施方案中, 该化合物具有选自以下的式:

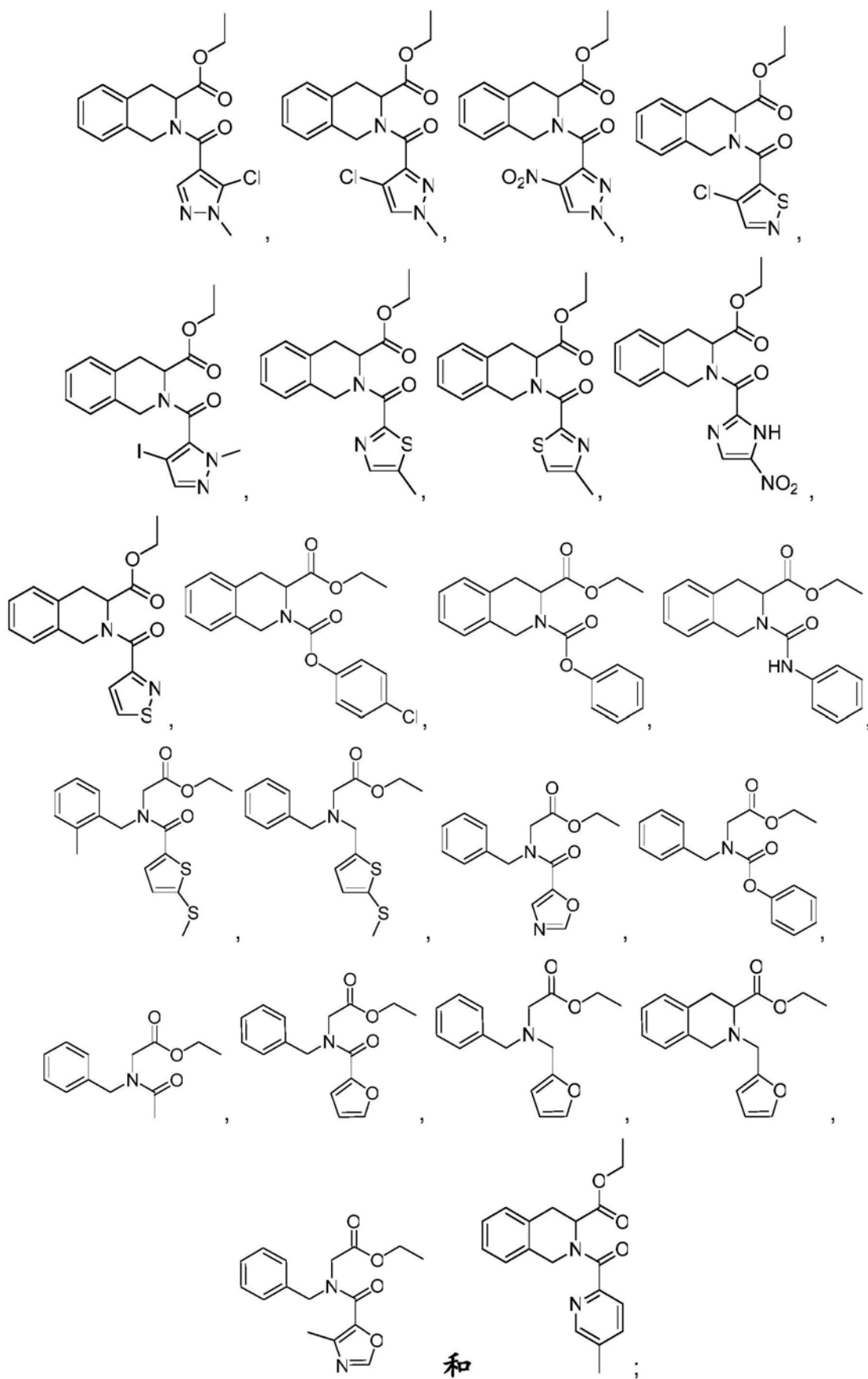
[0053]



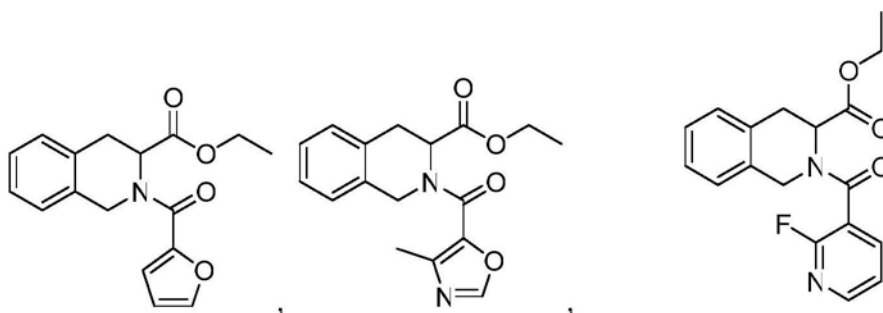
[0055]



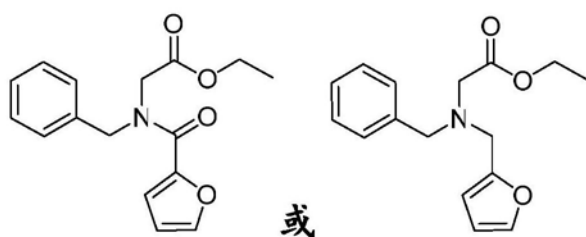
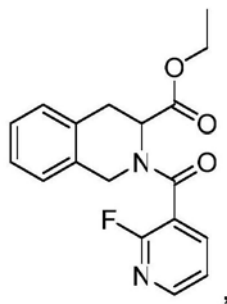
[0056]



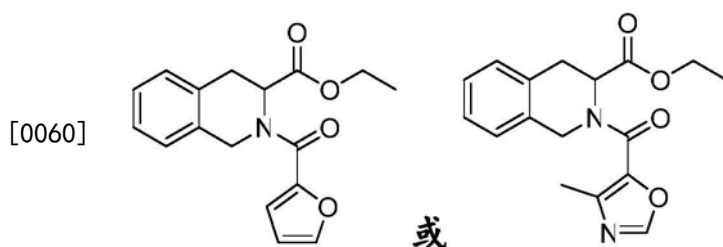
[0057] 其中该化合物优选具有下式：



[0058]



[0059] 其中该化合物更优选具有下式：



[0061] 通常,所述化合物通过降低REV-ERB活性来增加E4bp4表达。在本发明方法的一些实施方案中,所述化合物降低REV-ERB- α 和/或REV-ERB- β 的活性,优选降低REV-ERB- β 的活性,更优选降低REV-ERB- α 和REV-ERB- β 的活性。在一些优选的实施方案中,所述化合物是REV-ERB拮抗剂,优选为REV-ERB- α 和REV-ERB- β 的拮抗剂。

[0062] 根据本发明,所述方法可以进一步包括在Notch配体存在下培养HPC的步骤,其中任选地,在其中培养HPC的容器用Notch配体包被。在一些实施方案中,(a) Notch配体是 δ 样配体4 (DLL4) 或其保留DLL4功能的片段;和/或 (b) 在分离所述HPC后4天或之后存在Notch配体。在Notch配体存在下培养的步骤后,可在IL-15存在下培养细胞;和/或HPC可在Notch配体与IL-7, Flt3L和/或干细胞因子 (SCF) 结合的存在下,优选在Notch配体与IL-7, Flt3L和SCF结合的存在下培养;其中任选地在Notch配体存在下在细胞中培养的步骤和在IL-15存在下在细胞中培养的步骤中的一个或两个在无基质支持细胞存在下进行,并且优选地,其中两个步骤是在无基质支持细胞存在下进行。

[0063] 根据本发明,该方法可以进一步包括使HPC与导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物接触的步骤,从而引起E4bp4活性的增加;其中任选地,E4bp4的翻译后修饰改变是E4bp4

的SUMO化和/或磷酸化的减少,并且优选地,导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物:(a)在E4bp4的残基K10,K116,K219,K337和/或K394中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少SUMO化;和/或(b)在E4bp4的残基S286,S301和/或S454中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少磷酸化。

[0064] HPC样品可得自骨髓、脐带血和/或外周血。

[0065] 本发明进一步提供通过本发明的方法获得的扩增的NK细胞群,其中至少85%的NK细胞是CD56+和CD45+。

[0066] 本发明进一步提供一种组合物,其包含本发明的扩增的NK细胞群和药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。

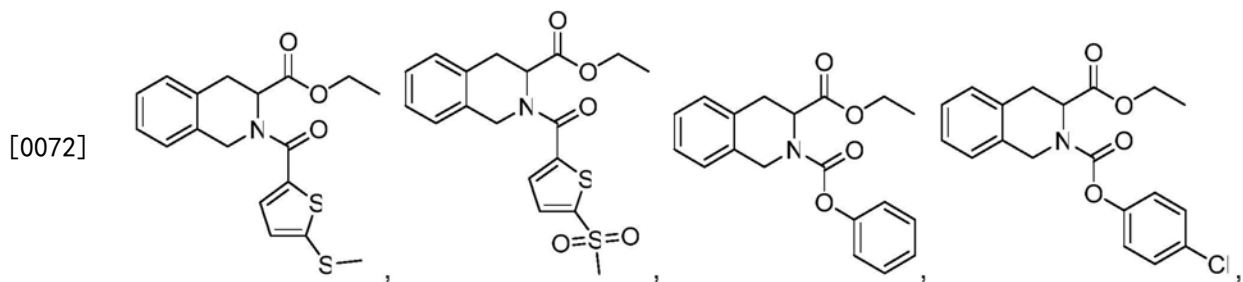
[0067] 本发明还提供一种抑制REV-ERB活性作用的化合物,该化合物通过增加患者体内天然杀伤(NK)细胞的产生而用在治疗方法中,其中所述化合物是本文所定义的本发明化合物。

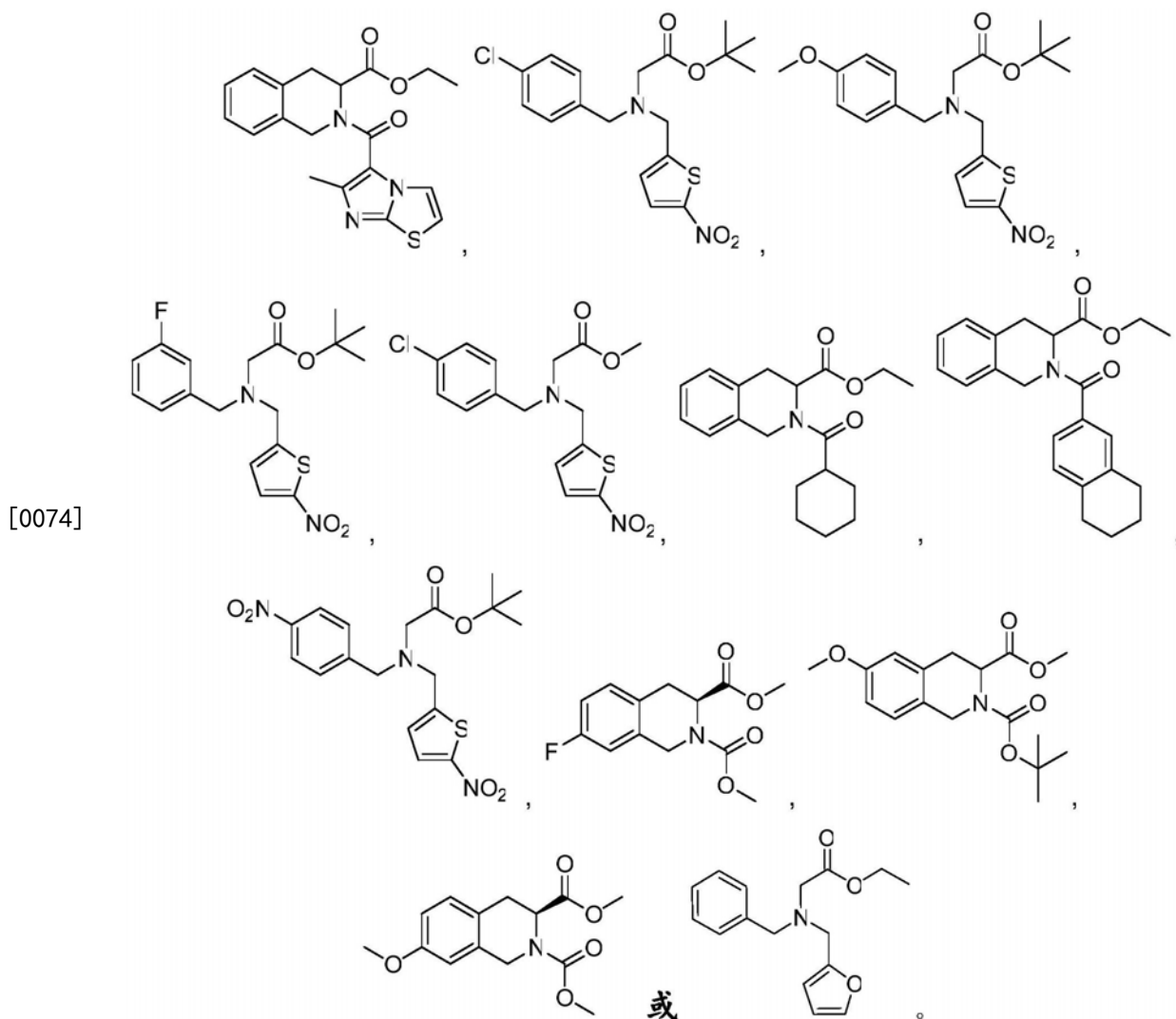
[0068] 本发明进一步提供含有抑制REV-ERB作用的化合物和Notch配体的产品作为组合制剂,通过增加患者体内天然杀伤(NK)细胞的生产,用于同时、分别或相继用在治疗方法中,其中所述化合物是本文的化合物,和任选地所述Notch配体是δ样配体4(DLL4),或保留DLL4功能的片段。根据本发明,所述治疗方法可以是:(a)治疗选自癌症、传染病(急性或慢性)、自身免疫疾病或与女性不育或妊娠有关的疾病或病症的疾病或病症的方法;或(b)治疗病毒感染、细菌感染、原生生物感染、真菌感染和/或蠕虫感染的方法。

[0069] 本发明进一步提供一种通过增加有需要的患者中NK细胞的数量数的治疗方法,包括给予所述患者治疗有效量的根据本发明的抑制REV-ERB作用的化合物,以及任选地Notch配体,其中Notch配体优选为δ样配体4(DLL4)或其保留DLL4的功能的片段。

[0070] 可将本发明使用的化合物或产品或本发明的治疗方法与抗体介导的免疫疗法组合使用,其中任选地,所述化合物或产品用于在给予抗体介导的免疫疗法之前,同时或之后给予。

[0071] 本发明还提供了本文所定义的式(I)的化合物,条件是该化合物不是:





测试化合物。化合物72、4、7和11显示出显著的拮抗活性,增加了Bmal-luc的表达,而化合物AG2是激动剂,降低了Bmal-luc的信号。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

[0081] 图5:其他新生成的化合物对REV-ERB α 活性的影响。使用10ng Renilla, 100ng Bmal-luc, 10ng REV-ERB α 和280ng BSM进行双重荧光素酶药物筛选的结果。以10 μ M的浓度测试化合物。化合物71至73、4、7和11显示出显著的拮抗活性,增加了Bmal-luc的表达,而化合物AG2是激动剂,降低了Bmal-luc的信号。(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$)

[0082] 图6:新产生的化合物对REV-ERB β 活性的影响。使用10ng Renilla, 100ng Bmal-luc, 10ng REV-ERB β 和280ng BSM进行双重荧光素酶药物筛选的结果。以10 μ M的浓度测试化合物。化合物4显示出显著的拮抗活性,增加了Bmal-luc的表达,而化合物AG2是激动剂,降低了Bmal-luc的信号。(*, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$)

[0083] 图7:其他新生成的化合物对REV-ERB α 活性的影响。使用10ng Renilla, 100ng Bmal-luc, 10ng REV-ERB α 和280ng BSM进行双重荧光素酶药物筛选的结果。以10 μ M的浓度测试化合物。化合物4、7、11、27和28显示出显著的拮抗活性,增加了Bmal-luc的表达,而化合物AG5是激动剂,降低了Bmal-luc的信号。(*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$)

[0084] 图8:另外新产生的化合物对REV-ERB β 活性的影响。使用10ng Renilla, 100ng Bmal-luc, 10ng REV-ERB β 和280ng BSM进行双重荧光素酶药物筛选的结果。以10 μ M的浓度测试化合物。化合物18和19显示拮抗活性,增加了Bmal-luc的表达,而化合物AG2是激动剂,降低了Bmal-luc的信号。(***, $p < 0.0001$)

[0085] 图9:NK细胞发育测定结果,其显示每种测定条件下NK细胞的总数。与SR8278和激动剂化合物AG2相比,化合物7的NK细胞的数量显著增加,化合物11也观察到了增加。(*, $p < 0.05$)

[0086] 图10:NK细胞发育测定结果,其显示每种测定条件下NK细胞的总数。与SR8278和激动剂化合物AG2相比,化合物7、11和72的NK细胞的数量显著增加。(**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)

[0087] 发明详述

[0088] 定义

[0089] 如本文所用,单数形式的“一个”,“一种”和“该”包括复数指称,除非上下文另外明确指出。

[0090] 术语包含包括“包含”(开放定义)和“由...组成”(封闭定义)。换句话说,如果实施方案、描述、方面或公开内容包含所述特征,则本发明也包括由所述特征组成的所述实施方案、描述、方面或公开内容。

[0091] 术语“化学上可行的”是指在不违反通常理解的有机结构规则的情况下的键合结构或化合物;例如,在权利要求的定义内的结构,其在某些情况下将含有自然界中不存在的五价碳原子,这将被理解为不在权利要求内。在其所有实施方案中,本文公开的结构旨在仅包括“化学上可行的”结构,并且任何列举的化学上不可行的结构,例如在显示具有可变原子或基团的结构中,均不旨在本文中公开并且不构成本发明的一部分。

[0092] 如本文所用,化学结构的“类似物”是指与母体结构保持基本相似性的化学结构,尽管它可以不易于从母体结构合成而得到。易于从母体化学结构合成得到的相关化学结构

称为“衍生物”。

[0093] 当取代基被指定为具有特定同一性的一个或多个原子，“或键”时，构型是指，当取代基为“键”时，与指定取代基紧邻的基团以化学上可行的键合构型彼此直接连接。

[0094] 除非特别指出特定的立体化学或异构形式，否则结构的所有手性、非对映异构、外消旋形式都是预期的。本发明中使用的化合物可以在任何或所有不对称原子上包括富集或拆分的光学异构体，如从图中显而易见的那样，以任何富集程度。外消旋混合物和非对映异构体混合物，以及各个旋光异构体都可以被分离或合成，从而基本不含其对映异构体或非对映异构体配偶体，且这些都在本发明的范围内。

[0095] 如本文所用，术语“稳定的化合物”和“稳定的结构”旨在表示一种足够坚固的化合物，其足以从反应混合物中分离到有用的纯度，并配制成有效的治疗剂。本文仅考虑稳定的化合物。

[0096] 使用化学基团的标准缩写，例如本领域公知的；例如，Me=甲基，Et=乙基，i-Pr=异丙基，Bu=丁基，t-Bu=叔丁基，Ph=苯基，Bn=苄基，Ac=乙酰基，Bz=苯甲酰基等。

[0097] 当列举一个基团，其中该基团可以在一个结构中以一个以上的取向存在，从而导致一个以上的分子结构，例如甲酰胺基C(=O)NR时，应理解该基团可以任何可能的取向存在，例如XC(=O)N(R)-Y或X-N(R)C(=O)-Y，除非上下文清楚地限制该基团的取向在分子结构内。

[0098] 烃基是仅由碳和氢组成的基团，尽管该基团可以被取代一次或多次，如本文所定义。烃基包括直链和支链基团。式(I)的化合物通常具有具有1-6个碳原子，特别是1-4个碳原子或1-3个碳原子的烃基。如本文所用，术语“烃基”包括芳族和非芳族基团。优选的烃基包括烷基、烯基和炔基，其在下文进一步描述。

[0099] 烷基包括具有1至约20个碳原子，通常为1至12个碳，1至8个碳原子，1至6个碳原子的直链和支链烷基和环烷基。直链烷基的实例包括具有1至8个碳原子的烷基，例如甲基，乙基，正丙基，正丁基，正戊基，正己基，正庚基和正辛基。支链烷基的实例包括但不限于异丙基，异丁基，仲丁基，叔丁基，新戊基，异戊基和2,2-二甲基丙基。如本文所用，术语“烷基”包括正烷基、异烷基和前异烷基以及烷基的其他支链形式。代表性的取代烷基可以被取代一次或多次，如本文所定义。

[0100] 环烷基为环状烷基，例如但不限于环丙基，环丁基，环戊基，环己基，环庚基和环辛基。在一些实施方案中，环烷基可具有3至约8-12个环成员，而在其他实施方案中，环碳原子数为3至4、5、6或7。环烷基还包括多环环烷基，例如，但不限于，降冰片基，金刚烷基，冰片基，蒾基，异蒾基和carenyl，以及稠合环，例如但不限于十氢萘基等。环烷基还包括被如上定义的直链或支链烷基取代的环。如本文所定义，代表性的取代的环烷基基团可以被单取代或取代一次以上。

[0101] 烯基为烷基，例如，如上所述，但其包含至少一个碳-碳双键。因此，烯基包括直链和支链烯基和非芳族环烯基。烯基优选但非必需地通过形成双键一部分的碳与分子的其余部分键合。如本文所定义，代表性的取代的烯基基团可以被单取代或取代一次以上。

[0102] 炔基为烷基，例如，如上所述，但其包含至少一个碳-碳三键。因此，炔基包括直链和支链炔基。炔基优选但非必需地通过形成三键的一部分的碳与分子的其余部分键合。如本文所定义，代表性的取代的炔基基团可以被单取代或取代一次以上。

[0103] 杂环基团/环或术语“杂环基”包括含有3个或更多个环成员的芳族和非芳族环化合物,其中一个或多个是杂原子,例如但不限于N,O和S。因此,杂环基可以是环杂烷基,或杂芳基,或者如果是多环的,则可以是其任何组合。在一些实施方案中,杂环基包括3至约20个环成员,而在式(I)的化合物中,杂环基环通常具有5至10个环成员。杂环基环可以是具有一个杂原子的5元环,具有两个杂原子的6元环,等等。碳原子数加上杂原子数之和等于环原子总数。杂环基环还可包含一个或多个双键。杂芳基环是杂环基的实施方案。短语“杂环基”包括稠合的环物质,包括那些包含稠合的芳族和非芳族基团的环。例如,二氧戊环基环和苯并二氧戊环基环系(亚甲基二氧苯基环系)均为本文含义内的杂环基。该短语还包括含有本文所述杂原子的多环系。杂环基可以是未取代的,或可以被取代,如上所述。

[0104] 杂芳基是含有5个或更多个环成员的芳族环化合物,其中一个或多个是杂原子,例如但不限于N,O和S;例如,杂芳基环可具有5至约8-12个环成员。在式(I)的化合物中,杂芳基环通常具有5至约10个环成员。杂芳基是具有芳族电子结构的各种杂环基。同样地,杂芳基可以是具有一个杂原子的5-环,具有两个杂原子的6-环,等等。碳原子数加上杂原子数之和等于环原子总数。杂芳基包括但不限于诸如吡咯基,吡唑基,三唑基,四唑基,噁唑基,异噁唑基,噻唑基,吡啶基,噻吩基,苯并噻吩基,苯并呋喃基,吲哚基,氮杂吲哚基,吲唑基,苯并噻唑基,苯并咪唑基,苯并咪唑基,苯并咪唑基,苯并咪唑基,苯并咪唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,苯并噻唑基,咪唑并吡啶基,异噁唑并吡啶基,噻吩基,嘌呤基,黄嘌呤基,腺嘌呤基,鸟嘌呤基,喹啉基,异喹啉基,四氢喹啉基,喹喔啉基和喹唑啉基。杂芳基可以是未取代的,或可以被如上所述的基团取代。代表性的取代的杂芳基可以被诸如上述那些基团取代一次或多次。

[0105] 卤素是指氟,氯,溴或碘。

[0106] 如本领域众所周知,“盐”包括离子形式的有机化合物,例如羧酸,磺酸或胺,与抗衡离子结合。例如,其阴离子形式的酸可与阳离子例如金属阳离子,例如钠,钾等;与铵盐如 NH_4^+ 或各种胺的阳离子,包括四烷基铵盐例如四甲基铵,或其他阳离子如三甲基铯等形成盐。“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”盐是由已被批准用于人类消费且通常无毒的离子形成的盐,例如氯化物盐或钠盐。“两性离子”是内盐,例如可以在具有至少两个可电离基团的分子中形成,一个形成阴离子,另一个形成阳离子,它们互相平衡。例如,诸如甘氨酸的氨基酸可以两性离子形式存在。“两性离子”是本文含义内的盐。本发明的化合物可以采取盐的形式。术语“盐”包括本发明化合物的游离酸或游离碱的加成盐。盐可以是“药学上可接受的盐”。术语“药学上可接受的盐”是指在药物应用中具有有效用的范围内具有毒性特征的盐。

[0107] 然而,药学上不可接受的盐可以具有诸如高结晶度的性质,其在本发明的实践中具有效用,例如在本发明化合物的合成、纯化或配制过程中的效用。

[0108] 合适的药学上可接受的酸加成盐可以由无机酸或有机酸制备。无机酸的实例包括盐酸,氢溴酸,氢碘酸,硝酸,碳酸,硫酸和磷酸。合适的有机酸可以选自脂族,脂环族,芳族,芳脂族,杂环,羧酸和磺酸类的有机酸,其实例包括甲酸,乙酸,丙酸,琥珀酸,乙醇酸,葡萄糖酸,乳酸,苹果酸,酒石酸,柠檬酸,抗坏血酸,葡萄糖醛酸,马来酸,富马酸,丙酮酸,天冬氨酸,谷氨酸,苯甲酸,邻氨基苯甲酸,4-羟基苯甲酸,苯乙酸,扁桃酸,扑酸,甲磺酸,乙磺酸,

苯磺酸,泛酸,三氟甲磺酸,2-羟基乙磺酸,对甲苯磺酸,磺胺酸,环己基氨基磺酸,硬脂酸,藻酸, β -羟基丁酸,水杨酸,半乳糖二酸和半乳糖醛酸。药学上不可接受的酸加成盐的实例包括例如高氯酸盐和四氟硼酸盐。

[0109] 本发明化合物的合适的药学上可接受的碱加成盐包括例如金属盐,包括碱金属盐,碱土金属盐和过渡金属盐,例如钙,镁,钾,钠和锌盐。药学上可接受的碱加成盐还包括由碱性胺例如N,N-二苄基乙二胺,氯普鲁卡因,胆碱,二乙醇胺,乙二胺,葡甲胺(N-甲基葡糖胺)和普鲁卡因制成的有机盐。药学上不可接受的碱加成盐的实例包括锂盐和氰酸盐。尽管药学上不可接受的盐通常不能用作药物,但是此类盐可以用作例如式(I)的化合物合成中的中间体,例如用于通过重结晶纯化。所有这些盐可以通过常规方法由相应的式(I)的化合物通过使例如合适的酸或碱与式(I)的化合物反应来制备。术语“药学上可接受的盐”是指无毒的无机或有机酸和/或碱加成盐,参见,例如,Lit等人,Salt Selection for Basic Drugs (1986),Int J.Pharm.,33,201-217,通过引用并入本文。

[0110] “水合物”是存在于具有水分子的组合物中的化合物。该组合物可以包含化学计量的水,例如一水合物或二水合物,或可以包含随机量的水。如本文所用,术语“水合物”是指固体形式,即水溶液中的化合物,虽然其可以被水合,但不是本文所用术语的水合物。

[0111] “溶剂化物”是相似的组合物,除了水以外的溶剂代替水。例如,甲醇或乙醇可以形成“醇盐”,其也可以是化学计量的或非化学计量的。本文所用术语“溶剂化物”是指固体形式,即在溶剂中的溶液中的化合物,虽然其可以被溶剂化,但不是本文所用术语的溶剂化物。

[0112] 如本领域众所周知的,“前药”是可以给予患者的物质,其中该物质通过患者体内生物化学物质(例如酶)的作用在体内转化为活性药物成分。前药的实例包括羧酸基团的酯,其可以被人和其他哺乳动物的血流中发现的内源性酯酶水解。选择和制备合适的前药衍生物的常规方法描述于例如“Design of Prodrugs”,ed.H.Bundgaard,Elsevier,1985。

[0113] 另外,在根据马库什基团描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,由此本发明也根据马库什基团的任何单个成员或成员的子组进行描述。例如,如果将X描述为选自溴,氯和碘,则对X为溴的权利要求和对X为溴和氯的权利要求进行充分描述。此外,在根据马库什基团描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,由此本发明也根据马库什基团的成员的单个成员或成员的子组的任何组合进行描述。因此,例如,如果X被描述为选自溴,氯和碘,而Y被描述为选自甲基,乙基和丙基,则对X为溴,Y为甲基的权利要求进行充分描述。

[0114] 如果必须是整数的变量值,例如,烷基中的碳原子数或环上的取代基数,描述为一个范围,例如0-4,则意味着该值可以是0到4之间(含0和4)的任何整数,即0、1、2、3或4。

[0115] 在各种实施方案中,例如在本发明方法中使用的化合物或化合物组可以是以上列出的实施方案的任何组合和/或子组合中的任何一种。

[0116] 在各种实施方案中,提供了如任何实施例中或示例性化合物中所示的化合物。

[0117] 附加条件可适用于任何公开的类别或实施方案,其中任何一个或多个其他上述公开的实施方案或种类可从此类类别或实施方案中排除。

[0118] 天然杀伤细胞

[0119] 天然杀伤(NK)细胞在免疫系统内具有最高水平的细胞毒活性。NK细胞与B细胞和T

细胞相似,但缺乏特异性细胞表面抗原受体。相反,NK细胞具有识别基序的活化和抑制受体。

[0120] NK细胞在血液和外周淋巴器官如淋巴结和脾脏中循环。其可被细胞因子或遇到靶细胞活化。靶细胞的识别和消除基于抑制和活化信号之间的平衡。活化信号由与配体结合的活化受体(NKG₂D,NKp₄₆,NKp₃₀)产生,配体不仅存在于癌细胞、病原体感染细胞和受损细胞上,而且还存在于健康细胞上。另一方面,当NK细胞上的抑制性受体(KIR,CD₉₄/NKG₂A)与通常存在于所有健康细胞上的主要组织相容性复合体(MHC) I类分子结合时,产生抑制信号。靶细胞上的MHC I类分子不存在或极度下调,使其成为理想的NK细胞靶标。这使得NK细胞能够区分靶细胞和健康细胞。为了使NK细胞识别并杀死靶细胞,总体活化信号必须大于抑制信号。

[0121] NK细胞识别并杀死癌细胞、病原体感染细胞和受损细胞,而无需事先致敏,使其成为先天性免疫应答的一部分。例如,NK细胞提供对病毒感染的早期应答,在T细胞杀死感染细胞之前发生。NK细胞可以在几分钟内杀死靶细胞。NK细胞还分泌细胞因子并使免疫系统的其他部分“武器化”。例如,NK细胞促进T细胞效应子功能并增强抗体导向细胞的细胞毒性(ADCC)。

[0122] NK细胞通过图1所示的途径从造血干细胞(HSC)分化。更详细地,NK细胞从HSC发育成共同淋巴祖细胞(CLP)、前身NK祖细胞(前身NKP)细胞、NK祖细胞(NKP)细胞、未成熟NK(iNK)细胞、成熟NK(mNK)细胞并最后成为常规NK(cNK)细胞,其在血流中循环。尽管该术语源自小鼠中的NK细胞发育,但是相应的途径也发生在人NK细胞发育中。例如,在发育成成熟NK细胞(阶段4和5)之前,HSC通过前体的多个阶段(阶段1,2和3)发育。为了一致性,本文使用参考HSC、CLP、前身NKP、NKP、iNK、mNK、cNK和NK细胞。

[0123] 然而,在本发明的上下文中,这些术语可与人类命名法的阶段1-5互换。在图1中的途径图下方是NK细胞发育必需的细胞因子和转录因子。IL-15是NK细胞发育所需的主要细胞因子之一。其他外部因素,例如特定的基质细胞,也是NK细胞发育和成熟所必需的。根据本发明,造血祖细胞(HPC)是包含多潜能祖细胞,例如HSC、CLP以及NKP的异源群体。HPC被称为谱系阴性细胞,因为其尚未致力于发育途径。因此,在本发明的上下文中,HSC、CLP细胞和NKP细胞都是HPC,并且对HPC的提及是对任何HSC、CLP细胞和/或CLP细胞或其任何组合的提及,除非本文明确说明。

[0124] 由于NK细胞在免疫应答中的重要性,多项临床试验已经测试了NK细胞在过继转移方案中的功效。通常这是同种异体转移,NK细胞从健康供体中分离并扩增。然而,靶细胞上MHC I类分子的下调是部分的,来自供体和受体的KIR基因型可以是相似的。因此,即使来自不同个体的NK细胞输入受体,如果其KIR识别MHC I类分子,也可以不使靶细胞附着。因此,必须筛选NK细胞供体的KIR基因型,其中供体对受体必须具有适当的KIR等位基因多态性以允许识别靶细胞以进行破坏。此外,发现扩增产物的临床成功率低于预期,杀死癌细胞或感染细胞的能力较低。

[0125] 可以根据其标记物表达,其功能/活性或其组合来定义NK细胞。这些定义在本领域是标准的,并且已知可以评估标记物表达和/或NK细胞活性的方法。因此,本领域技术人员将能够使用标准方法和定义容易地将细胞分类为NK细胞。

[0126] 例如,mNK和cNK细胞可以通过其表面标记物CD16(Fc γ RIII)和/或CD56(通常是人

类中的CD16和CD56)和一些小鼠品系中的NK1.1或NK1.2的表达来识别。NKp46是mNK和cNK细胞的另一种标记物,并且在人和几种小鼠品系中表达。因此,NKp46可用作NK细胞的标记物,其具有或不具有CD16和/或CD56(在人中)或具有或不具有NK1.1或NK1.2(在小鼠中)。可用于鉴定/定义根据本发明的NK细胞的标记物的其他实例包括Ly49、天然细胞毒性受体(NCR)、CD94、NKG2、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),和/或白细胞抑制受体(ILT或LIR),或其任何组合,包括与CD16和/或CD56(在人中)或NK1.1/NK1.2(在小鼠中)的组合。在一些优选的实施方案中,根据本发明的成熟NK细胞(即mNK和cNK细胞)是CD56⁺和CD45⁺,并且也可以是CD16⁺。如本文所用,术语成熟人NK细胞包括CD56^{bright}(阶段4)和CD56^{dim}(阶段5)的NK细胞,两者都是CD56⁺。成熟NK细胞还可以通过不存在标记物(例如CD34)和淋巴细胞标记物CD3和/或CD19来定义。因此,本发明的成熟NK细胞可以是CD56⁺、CD45⁺、CD16⁺、CD3⁻和/或CD19⁻、或其任何组合,例如CD56⁺、CD45⁺、CD16⁺、CD3⁻和CD19⁻。

[0127] 另外或或者,NK可以通过其活性来识别/根据其活性来定义。例如,NK细胞可以通过其细胞质内溶细胞颗粒的存在,通过其分泌抗微生物分子如 α -防御素的能力和/或其分泌细胞因子如TNF- α , IL-10, IFN- γ 和TFG- β 的能力来鉴定/定义。

[0128] 除非本文另有说明,否则提及的NK细胞包括iNK、mNK和cNK细胞。通常HSC、CLP细胞和NKP将如此提及。

[0129] 扩增的NK细胞群

[0130] 如本文所公开的,本发明提供了产生扩增的NK细胞群的方法(在本文中可互换地称为扩增的NK细胞群或NK细胞群)。本文关于本发明的NK细胞的任何公开内容也可以应用于本发明的扩增的NK细胞群。

[0131] 因此,本发明提供了扩增的NK细胞群。通常,本发明的扩增的NK细胞群包含iNK细胞、mNK细胞和/或cNK细胞、或其组合。所述群可包含HPC,例如HSC、CLP细胞和/或NKP、或其组合,尽管此类细胞的数量通常相对于NK细胞的数量较低,因为这些HPC中的大多数已分化成NK细胞。所述群可包含其他免疫细胞和/或非免疫细胞。同样,任何此类细胞的数量通常相对于该群中存在的NK细胞的数量较低。

[0132] 作为非限制性实例,至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多,至多100%本发明的扩增的NK细胞群的细胞可以是NK细胞。通常,至少80%、优选至少90%、更优选至少95%本发明的扩增的NK细胞群的细胞是NK细胞。

[0133] 在一些实施方案中,至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多,至多100%本发明的扩增的NK细胞群的细胞是成熟的NK细胞(即mNK细胞和/或cNK细胞)。优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选至少95%、甚至更优选至少98%或更多本发明的扩增的NK细胞群的细胞是成熟的NK细胞。

[0134] HPC(包括HSC、CLP细胞和/或NKP)的数量可小于扩增的NK细胞群的细胞的40%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于14%、小于13%、小于12%、小于11%、小于10%、小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%。通常,HPC(包括HSC、CLP细胞和/或NKP)的数量小于扩增的NK细胞群的细胞的20%,优选小于10%,更优选小于5%,甚至更优选小于2%或更少。

[0135] 其他免疫细胞和/或非免疫细胞的数量可小于扩增的NK细胞群的细胞的40%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于14%、小于13%、小于12%、小于11%、小于10%、小于9%、小于8%、小于7%、小于6%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%。通常,其他免疫细胞和/或非免疫细胞的数量小于扩增的NK细胞群的细胞的20%、优选小于10%、更优选小于5%、甚至更优选小于2%或更少。

[0136] 如本文所述,与通过常规过继转移方法制备的NK细胞群相比,通过本发明方法制备的扩增的NK细胞群具有若干优点。特别地,与常规方法相比,本发明的方法能够产生具有更多NK细胞的扩增细胞群。此外,与通过常规方法获得的细胞群相比,其中大量NK细胞“耗尽”,本发明细胞群中更大比例的NK细胞是功能性的,优选是全功能性的。

[0137] 如本文所用,在NK细胞的情况下,术语“耗尽”是指NK细胞或扩增的NK细胞群丧失其至少一些效应子功能,例如细胞毒性功能、细胞因子产生和/或ADCC。因此,耗尽的NK细胞或扩增的NK细胞群可以表现出存活受损、细胞毒性功能受损、细胞因子产生改变或受损和/或ADCC受损。例如,耗尽的NK细胞或耗尽的NK细胞群的效应子功能之一可以减少至少50%。例如,细胞因子分泌减少至少50%,ADCC减少至少50%和/或细胞毒活性减少至少50%。可以相对于本文所定义的任何适当对照来量化这些值。可以使用任何适当的技术来确定效应子功能,并因此对其进行量化和减少。合适的技术是本领域已知的。或者和/或另外,耗尽的NK细胞的标记物表达可改变,例如一种或多种抑制性受体的表达增加(如本文所述)和/或一种或多种活化性受体的表达降低(如本文所述)。在一些实施方案中,NKG2A和/或Tim3的表达增加可用作NK细胞耗尽的标记物。同样,这些标记物的表达可以相对于本文所定义的任何适当对照进行定量。

[0138] 相反,在NK细胞的情况下,术语“功能性”和“全功能性”是指当对给定的免疫挑战应答时,NK细胞或扩增的NK细胞群具有所有预期的效应子功能。因此,(全)功能性NK细胞或扩增的NK细胞群通常具有细胞毒性功能、细胞因子产生和/或ADCC,如当NK细胞应答免疫挑战被活化时在体内观察到的,并且与使用常规方法产生的NK细胞相比,通常表现出增强的存活率。或者和/或另外,

[0139] (全)功能性NK细胞的标记物表达可改变,例如一种或多种活化性受体的表达增加(如本文所述)和/或一种或多种抑制性受体的表达减少(如本文所述)。作为非限制性实例,功能性(成熟)人NK细胞可以是CD56+和/或CD45+,优选CD56+和CD45+。

[0140] 作为非限制性实例,在与‘靶细胞’共同孵育的NK细胞中可以使用脱粒测定法来确定NK细胞的细胞毒性。脱粒测定法包括分析NK细胞群内CD107a的表达。CD107a的量与细胞因子分泌和NK细胞介导的靶细胞裂解相关。还可以分析NK细胞的干扰素- γ (IFN- γ)的表达,其是功能性NK细胞被活化时分泌的主要细胞因子。与对照相比,功能性NK细胞应表达相似或更高的CD107a以及IFN- γ 。

[0141] 可以将通过本发明的方法制备的扩增的NK细胞群中NK细胞的数量/功能的任何增加与从如本文所述的对照方法获得的NK细胞群的NK细胞的数量/功能进行比较。对照方法可以是本领域已知的用于产生NK细胞群的任何标准方法。例如,对照方法可以使用常规的过继转移技术,而不是使用根据本发明的REV-ERB抑制剂的方法。通过此对照/标准方法产生的NK细胞和NK细胞群可用作本文所述的对照细胞和细胞群。

[0142] 由于与常规制备的NK细胞群相比,本发明的扩增的NK细胞群包含显著更少的耗尽

的NK细胞,反而包含更高比例的全功能性NK细胞,这有利地允许使用更少数量的细胞来治疗患者。

[0143] 如本文所述,与常规方法相比,本发明的方法产生具有更高比例的(全)功能性NK细胞的扩增的NK细胞群,常规方法产生具有大量“耗尽的”NK细胞的细胞群。通常,在本发明的扩增的NK细胞群中,至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多,至多100%的本发明的扩增的NK细胞群的NK细胞是(全)功能性的。根据本文的任何定义(例如标记物和/或效应子功能定义),通常至少80%、优选至少90%、更优选至少95%、甚至更优选至少98%或更多的本发明的扩增的NK细胞群的NK细胞是全功能性的。

[0144] 本发明的扩增的NK细胞群可以通过本文所公开的任何方法产生。通常,本发明的扩增的NK细胞群通过本文所公开的离体方法产生。

[0145] E4bp4

[0146] E4bp4(也称为Nfil3)是基本的亮氨酸拉链蛋白转录因子,其参与调节IL-3表达,并参与协调生物钟。人E4bp4基因的基因组DNA序列在SEQ ID NO:1(Genbank登录号X64318,版本X64318.1)中给出。如图1所示,E4bp4在CLP中表达,并且对于从血液干细胞祖细胞产生NK细胞至关重要。缺失E4bp4基因的小鼠不具有功能性NK细胞,但具有正常数量的T和B细胞。相反,体外HSC中E4bp4的过表达增加了NK细胞的产生。因此,E4bp4是一种谱系承诺因子,控制着来自HSC的NKP的发育(图1)。E4bp4在NK细胞中的关键功能特异于发育途径的早期阶段,因为外周mNK细胞中E4bp4的特异性消除不影响NK细胞的数量或对巨细胞病毒感染的应答。此外,E4bp4调节NK细胞发育中必需的其他转录因子,例如Id2和Eomes。

[0147] 尽管已经表明IL-7和IL-15调节E4bp4表达,但关于外在或内在刺激如何影响E4bp4通常知之甚少。由于其结构和功能,转录因子如E4bp4可以难以靶向。例如,其通常缺乏酶活性或辅因子结合位点。本发明人先前已经证明,使用抑制REV-ERB活性的化合物可以增加E4bp4的表达(参见PCT/GB2018/050542,特别是实施例,其通过引用整体并入本文)。此外,本发明人已经证明使用REV-ERB抑制剂来增加E4bp4表达导致NK细胞的数量增加。不希望受理论束缚,REV-ERB与卟啉血红素结合,并且正是这种特征被认为使REV-ERB成为可用药物控制的靶标(见下文)。总之,本发明人已经表明,通过靶向REV-ERB并抑制其活性,可以增加E4bp4表达并因此增加NK细胞的数量。因此,本发明涉及抑制REV-ERB作用的化合物,以及其在增加E4bp4表达和因此增加NK细胞的数量中的用途。

[0148] E4bp4表达的增加

[0149] 因此,本发明提供了用于产生扩增的NK细胞群的离体方法,以及用于在有此需要的患者中增加NK细胞的数量治疗方法和应用。如本文所公开的,所述方法和应用涉及使用抑制REV-ERB作用的化合物。通常,所述化合物通过增加E4bp4表达起作用。

[0150] 可以相对于对照测量E4bp4表达的增加。因此,可以将HPC样品、扩增的NK细胞群或从根据本发明待治疗的患者获得的样品中E4bp4的表达与对照中E4bp4的表达进行比较。表达可以根据基因和/或蛋白质表达进行定量,并且可以与对照(例如管家基因或蛋白质)的表达进行比较。可以对HPC、扩增的NK细胞群的样品中或从根据本发明待治疗的患者获得的样品中的E4bp4基因、mRNA转录物和/或蛋白质的实际量,例如E4bp4基因、mRNA转录物和/或蛋白质的质量、摩尔量、浓度或摩尔浓度,或每个细胞中mRNA分子的数量进行评估并与来自

对照的相应值进行比较。或者,可以将HPC、扩增的NK细胞群的样品中或从根据本发明待治疗的患者获得的样品中的E4bp4基因和/或蛋白质的表达与没有定量一种或多种基因和/或蛋白质的质量、摩尔量、浓度或摩尔浓度的对照的那些进行比较。

[0151] 通常,对照是等效群或样品,其中E4bp4表达没有增加。作为非限制性实例,在用抑制REV-ERB活性的化合物治疗患者以增加E4bp4表达的情况下,合适的对照将是未给予化合物的不同个体或在给予化合物之前的同一个体。用于离体扩增NK细胞的常规方法,包括已知方法,可以认为是根据本发明的对照方法。

[0152] 在本发明的上下文中,提及的增加E4bp4表达可以理解为表示与对照相比E4bp4的表达增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少150%、至少200%。通常,与对照相比,E4bp4表达增加至少50%、优选至少70%,更优选至少80%、甚至更优选至少90%或更多。

[0153] 提及的增加E4bp4表达可以理解为表示相对于对照E4bp4的表达增加至少1.5倍、至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍或更多。通常,与对照相比,E4bp4基因表达增加至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍或更多。通常,与对照相比,E4bp4蛋白表达增加至少2倍、至少3倍、优选至少5倍、更优选至少6倍或更多。

[0154] 根据本发明的E4bp4基因和/或蛋白质的表达可以通过定量和/或定性分析来确定。通常,基因表达可以用mRNA水平表示。

[0155] 根据本发明的E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平包括E4bp4mRNA转录物和/或蛋白质的质量,E4bp4基因、mRNA转录物和/或蛋白质的摩尔量,E4bp4基因和/或蛋白质的浓度,和E4bp4基因和/或蛋白质的摩尔浓度。该表达水平可以以任何适当的单位给出。例如,E4bp4基因和/或蛋白质的浓度可以以pg/ml、ng/ml或μg/ml给出。

[0156] 可以直接或间接测量根据本发明的E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平。

[0157] 可以使用任何合适的技术测定根据本发明的E4bp4基因和/或蛋白质相对于对照的相对表达。合适的标准技术是本领域已知的,例如蛋白印迹法,酶联免疫吸附测定(ELISA)和RT-qPCR。

[0158] 与对照相比,E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平可以增加至少6小时、至少12小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少72小时、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周。优选地,E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平增加至少12至72小时。通常,这是相对于抑制REV-ERB活性的化合物的最后一次给予来评估的。

[0159] 与对照相比,E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平可以增加至少1代、至少2代、至少3代、至少4代、至少5代、至少10代、至少20代、至少30代、至少40代或更多代培养物中NK细胞前体的传代。E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平可以无限地改变。

[0160] REV-ERB

[0161] REV-ERB蛋白是细胞内转录因子核受体家族的成员。人REV-ERBα基因(Nr1d1)的

mRNA序列在SEQ ID NO:3 (Genbank登录号NM_021724, 版本NM_021724.4) 中给出。人REV-ERB β 基因 (Nr1d2) 的mRNA序列在SEQ ID NO:5 (Genbank登录号AB307693, 版本AB307693.1) 中给出。REV-ERB调节生物钟, 并且还参与软骨破坏的调节。

[0162] 本发明人先前已经证明, 抑制REV-ERB活性足以引起E4bp4表达的显著增加, 并且这反过来引起NK细胞的扩增, 导致NK细胞的数量增加 (参见PCT/GB2018/050542, 特别是实施例, 其通过引用整体并入本文)。抑制REV-ERB活性可以引起NK细胞的数量增加, 并且通常所得NK细胞是如本文所定义的 (全) 功能性的。REV-ERB抑制效应以E4bp4依赖性方式介导。不希望受理论束缚, 据信抑制REV-ERB活性导致E4bp4表达增加 (E4bp4表达通常被REV-ERB抑制), 并且E4bp4用于刺激NK细胞的产生 (如图1所示)。特别地, 本发明人先前已经证明小分子SR8278能够结合REV-ERB的卟啉血红素基团, 导致REV-ERB活性的抑制和NK细胞的数量增加。

[0163] 但是, SR8278的药理特性使其不适用于临床环境。此外, 关于SR8278的作用机理的信息的缺乏以及围绕该分子的合适的结构-活性关系的缺乏已经阻碍了其他具有REV-ERB抑制活性的化合物的发现。确实, 尽管在本领域中已经产生了许多用于REV-ERB的合成配体, 但其中绝大多数已被鉴定为激动剂, 其中已鉴定出超过300种REV-ERB激动剂。本发明人已经产生了新化合物库, 并且已经证明与一种已知的REV-ERB抑制剂SR8278相比, 此类化合物具有提高的REV-ERB抑制活性。

[0164] 因此, 本发明涉及此类改进的REV-ERB拮抗剂, 即对REV-ERB作用的抑制活性提高的化合物, 以及此类化合物在增加E4bp4表达并因此增加NK细胞的数量中的用途。

[0165] 抑制REV-ERB活性

[0166] 本发明涉及抑制REV-ERB作用的化合物, 即抑制REV-ERB活性的化合物的用途。可以通过任何适当的方法抑制REV-ERB活性。合适的标准技术是本领域已知的。抑制可以通过任何合适的机制进行, 这取决于所用化合物的性质 (见下文), 例如, 对REV-ERB的任何直接或间接相互作用或抑制的空间干扰。在本发明的上下文中, REV-ERB抑制剂 (在本文中可互换地称为REV-ERB拮抗剂) 是抑制、降低、制止或消除REV-ERB作用 (无论是部分还是完全) 的任何化合物。

[0167] 可以相对于对照测量REV-ERB活性的降低。因此, 可以将NK前体或祖细胞、扩增的NK细胞群的样品中或从根据本发明待治疗的个体/患者获得的样品中REV-ERB的活性与对照中REV-ERB的活性进行比较。活性可以用任何合适的术语, 例如REV-ERB与E4bp4基因的结合, 或根据本文所定义的E4bp4表达来量化。可以使用任何适当的技术或方法来定量REV-ERB活性。合适的技术是本领域已知的, 例如用于定量报告基因表达的荧光素酶测定法。

[0168] 通常, 对照是其中未添加REV-ERB抑制性化合物的等效群或样品, 例如从未给予化合物的不同个体获得的样品, 或在给予化合物之前的同一个体。用于离体扩增NK细胞的常规方法, 包括已知方法, 可以认为是根据本发明的对照方法。

[0169] 在本发明的上下文中, 提及抑制REV-ERB活性可以理解为表示与对照相比, REV-ERB的活性降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至多总 (100%) 抑制REV-ERB活性。与对照相比, REV-ERB活性通常降低至少50%、优选至少70%、更优选至少80%、更优选至少90%、甚至更优选

至少95%或更多。

[0170] REV-ERB的活性可以通过定量和/或定性分析来确定,并且可以直接或间接测量。

[0171] REV-ERB相对于对照的活性可以使用任何适当的技术来确定。合适的标准技术是本领域已知的,例如通过定量E4bp4表达和/或荧光素酶测定。

[0172] 与对照相比,REV-ERB的活性可以被抑制至少6小时、至少12小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少72小时、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周。优选地,REV-ERB的活性降低至少12-72小时。通常,这是相对于抑制REV-ERB活性的化合物的最后一次给予来评估的。

[0173] 与对照相比,REV-ERB的活性可以被抑制至少1代、至少2代、至少3代、至少4代、至少5代、至少10代、至少20代、至少30代、至少40代或更多代细胞传代(体内或离体培养或体外培养)。可以抑制REV-ERB的活性和/或可以无限地改变E4bp4基因和/或蛋白质的表达水平。

[0174] 在本发明的上下文中,任何提及的抑制REV-ERB活性可以理解为是指抑制REV-ERB α 和/或REV-ERB β 的活性。在优选的实施方案中,REV-ERB α 和REV-ERB β 活性受到抑制。因此,本发明涉及抑制REV-ERB活性的化合物,包括抑制REV-ERB α 活性的化合物(即REV-ERB α 抑制剂,也称为REV-ERB α 拮抗剂)和/或抑制REV-ERB β 活性的化合物(即REV-ERB β 抑制剂,也称为REV-ERB β 拮抗剂)。在优选的实施方案中,本发明涉及抑制REV-ERB α 和REV-ERB β 活性的化合物(即REV-ERB α 和REV-ERB β 抑制剂,也称为REV-ERB α 和REV-ERB β 拮抗剂)。

[0175] REV-ERB拮抗剂/抑制剂

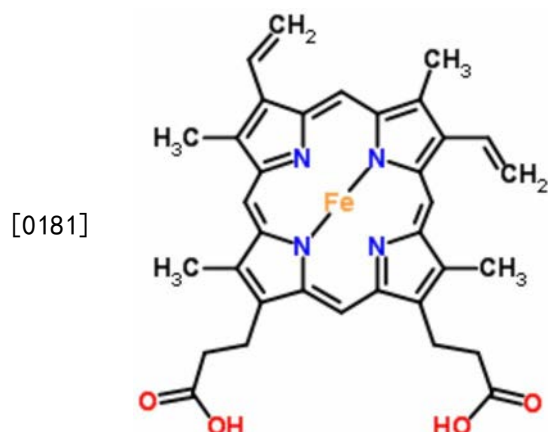
[0176] 本发明的REV-ERB抑制性化合物可以对REV-ERB具有特异性。具体而言,应理解该化合物与REV-ERB α 和/或REV-ERB β 结合,与任何其他分子,特别是任何其他蛋白质没有显著的交叉反应性。例如,对REV-ERB α 和/或REV-ERB β 特异的调节剂将不显示与人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶的显著交叉反应性。可以通过任何合适的方法评估交叉反应性。如果抑制剂与另一分子的结合强度为与REV-ERB α 和/或REV-ERB β 结合强度的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或100%,则REV-ERB α 和/或REV-ERB β 抑制剂与REV-ERB α 和/或REV-ERB β 以外的分子的交叉反应性可被认为是显著的。对REV-ERB α 和/或REV-ERB β 特异的抑制剂可以以低于其与REV-ERB α 和/或REV-ERB β 结合的强度的90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%与另一分子结合,例如人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶。优选地,抑制剂以低于其结合REV-ERB α 和/或REV-ERB β 的强度的20%、低于15%、低于10%或低于5%,低于2%或低于1%与另一分子结合。

[0177] 本发明的REV-ERB抑制性化合物可具有脱靶效应。脱靶效应是针对除REV-ERB之外的靶标的活性。通常,如果针对非REV-ERB靶标的活性与针对REV-ERB的活性相比不显著,则本发明包括具有脱靶效应的化合物。脱靶效应是否显著可取决于化合物的预期用途。作为非限制性实例,可以对中枢神经系统发挥脱靶效应的化合物对于本文所公开的离体方法中使用的化合物不是显著的,但可以对于本文所公开的体内治疗适应症是显著的(取决于脱靶效应的程度)。可以使用本领域已知的标准方法容易地评估任何潜在的脱靶效应的存在和程度。

[0178] 小分子

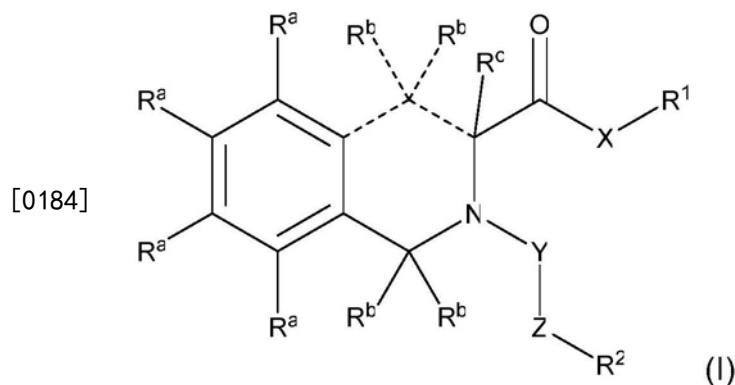
[0179] 如本文所述,用于抑制REV-ERB活性的本发明化合物是小分子。如本文所定义,小分子是低分子量化合物,通常是有机化合物。通常,小分子的最大分子量为900Da,可以快速扩散穿过细胞膜。在一些实施方案中,小分子的最大分子量是500Da。通常,小分子的大小为1nm。

[0180] 根据本发明,小分子可以通过与REV-ERB的卟啉血红素部分结合而对REV-ERB活性发挥抑制作用。因此,在一些优选的实施方案中,根据本发明的抑制REV-ERB作用的化合物是与REV-ERB的卟啉血红素部分结合的化合物,因此抑制REV-ERB的活性。或者,小分子可以通过不同的机制,例如,通过结合REV-ERB的非血红素部分起作用。本领域已知用于产生小分子的标准技术,其可以容易地测试如本文所述的REV-ERB抑制活性。



[0182] 卟啉血红素的结构

[0183] 发明人基于SR8278的骨架,特别是通过改变酰胺取代基和/或乙酯基,已经产生了抑制REV-ERB活性(在本文中可互换地称为抑制REV-ERB的作用)的新化合物。因此,用于本发明的化合物具有式(I):



[0185] 其中:-----表示均存在或不存在的键;

[0186] R^1 选自 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

[0187] R^2 选自5-10元杂环基环和 C_{1-6} 烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-SR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-NR'_2$, $-NR'C(O)R'$, $-C(O)NR'_2$, $-CN$, $-NO_2$, $-Ph$, $-CF_3$ 和卤素的基团取代;

[0188] X选自-O-和-NR'-,或不存在;

[0189] Y选自-C(O)-或-CR'₂-;

[0190] Z选自-O-和-NR'-,或不存在;

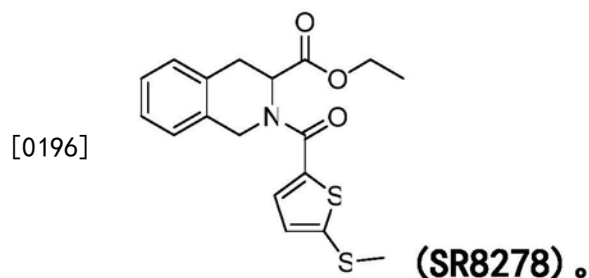
[0191] 每个R^a独立地选自H, C₁₋₄烷基, -OR', -OC(O)R', -C(O)OR', -SR', -S(O)R', -S(O)₂R', -NR'₂, -NR'C(O)R', -C(O)NR'₂, -CN, -NO₂, -Ph, -CF₃和卤素;

[0192] 每个R^b独立地选自H, C₁₋₄烷基和-OR';

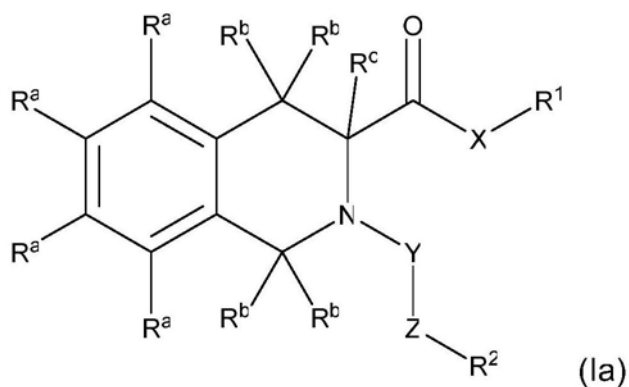
[0193] R^c选自H和C₁₋₄烷基;和

[0194] 每个R'独立地选自H, C₁₋₄烷基和-Ph;

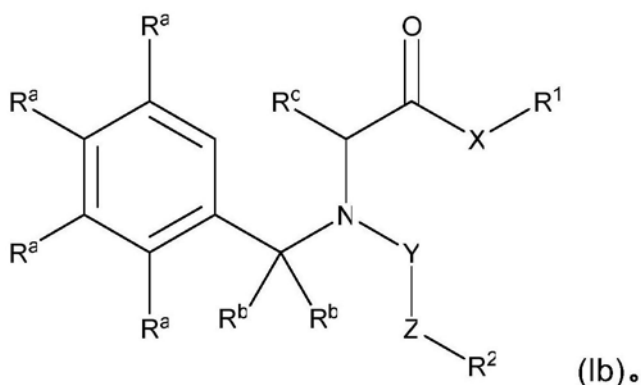
[0195] 或其药学上可接受的盐,条件是该化合物不是:



[0197] 如上所述,-----表示均存在或不存在的键。因此,本发明涉及式(Ia)的闭环结构和式(Ib)的开环结构:



[0198]



[0199] 优选地,-----表示均存在的键,并且该化合物是式(Ia)的闭环结构。

[0200] 在式(Ia)化合物中, R¹选自C₁₋₆烷基,并且任选地被一个或多个独立地选自C₁₋₄烷基, -OR', -OC(O)R', -C(O)OR', -SR', -S(O)R', -S(O)₂R', -NR'₂, -NR'C(O)R', -C(O)NR'₂, -CN, -NO₂, -Ph, -CF₃和卤素的基团取代。R¹优选未被取代,且因此优选选自C₁₋₆烷基,优选C₁₋₆

烷基和 C_{1-6} 烯基。更优选地， R^1 选自 C_{1-6} 烷基，优选选自 C_{1-4} 烷基，例如甲基、乙基和丙基。特别优选乙基。

[0201] 在式 (Ia) 化合物中， R^2 选自5-10元杂环基环和 C_{1-6} 烷基，并且任选地被取代。优选地， R^2 选自任选取代的5-10元杂环基环。

[0202] R^2 的5-10元杂环基环优选包含1-4个，更优选1或2个杂原子。杂原子优选选自氧，氮和硫。应当理解，杂环基环可包含多个相同的杂原子，例如，两个氮原子，或杂原子的混合物，例如氮原子和氧原子。

[0203] R^2 优选选自5-10元杂芳基环，更优选选自5、6或9元杂芳基环。5元杂芳基环的非限制性实例包括呋喃基，噻吩基，噁唑基，异噁唑基，异噻唑基，噻唑基，吡唑基，咪唑基，吡咯基和三唑基。6元杂芳基环的非限制性实例包括吡啶基，哒嗪基，嘧啶基和吡嗪基。9元杂芳基环的非限制性实例包括吡啶基，异吡啶基，吡唑基，苯并咪唑基，氮杂吡啶基，苯并呋喃基，异苯并呋喃基，苯并异噁唑基和苯并噁唑基。特别优选任选取代的5元杂芳基环。

[0204] 当 R^2 为任选取代的 C_{1-6} 烷基时，其优选选自任选取代的苯基和任选取代的 C_{1-6} 烷基。

[0205] 当 R^2 为任选取代的苯基时，该苯基优选被取代。

[0206] 当 R^2 为任选取代的 C_{1-6} 烷基时，该烷基优选是未取代的，并且因此 R^2 优选选自 C_{2-4} 烷基，例如乙基，丙基（例如-iPr）和丁基（例如-tBu）。

[0207] R^2 任选地被一个或多个独立地选自 C_{1-4} 烷基（优选 C_{1-4} 烷基），-OR'，-OC(O)R'，-C(O)OR'，-SR'，-S(O)R'，-S(O)₂R'，-NR'₂，-NR'C(O)R'，-C(O)NR'₂，-CN，-NO₂，-Ph，-CF₃和卤素的基团取代。优选地， R^2 是未取代的或被这些基团中的一个或两个取代。 R^2 的特别优选的取代基包括-Me，-OMe，-CN，-NO₂，-F，-Cl，-I和SMe。

[0208] 在式 (I) 的化合物中，X选自-O-和-NR'-或不存在。X优选为-O-。

[0209] 在式 (I) 的化合物中，Y选自-C(O)-和-CR'₂-。Y优选为-C(O)-。

[0210] 在式 (I) 的化合物中，Z选自-O-和-NR'-或不存在。优选地，Z选自-O-或不存在。当 R^2 为烷基时，Z优选选自-O-和-NR'-，且优选为-O-。当 R^2 是杂环基环时，Z优选不存在。

[0211] 在式 (I) 的化合物中，每个 R^a 独立地选自H， C_{1-4} 烷基（优选 C_{1-4} 烷基），-OR'，-OC(O)R'，-C(O)OR'，-SR'，-S(O)R'，-S(O)₂R'，-NR'₂，-NR'C(O)R'，-C(O)NR'₂，-CN，-NO₂，-Ph，-CF₃和卤素。优选地，每个 R^a 独立地选自H， C_{1-4} 烷基和-OR'，更优选选自H和 C_{1-4} 烷基。更优选地，每个 R^a 优选为H。

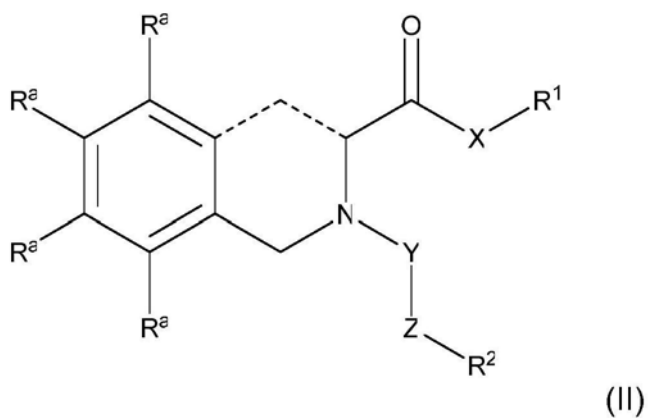
[0212] 在式 (I) 的化合物中，每个 R^b 独立地选自H， C_{1-4} 烷基（优选 C_{1-4} 烷基）和-OR'。优选地，每个 R^b 独立地选自H和 C_{1-4} 烷基，更优选为H。

[0213] 在式 (I) 的化合物中， R^c 选自H和 C_{1-4} 烷基（优选 C_{1-4} 烷基）。优选地， R^c 为H。

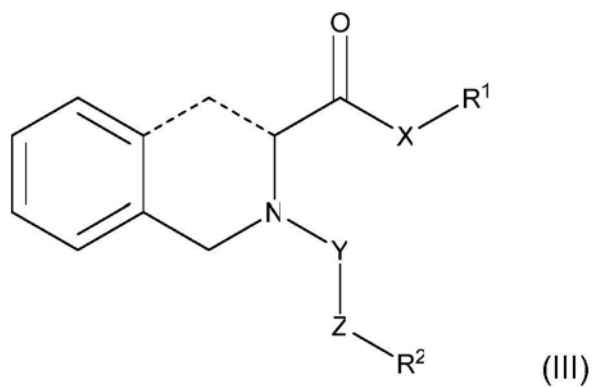
[0214] 在式 (I) 的化合物中，每个R'独立地选自H和 C_{1-4} 烷基（优选 C_{1-4} 烷基）和-Ph。优选地，每个R'独立地选自H和 C_{1-4} 烷基，更优选选自H，甲基和乙基，并且更优选选自甲基和乙基。

[0215] 在优选的实施方案中， R^b 和 R^c 均为H，因此本发明中使用的化合物具有式 (II)：

[0216]

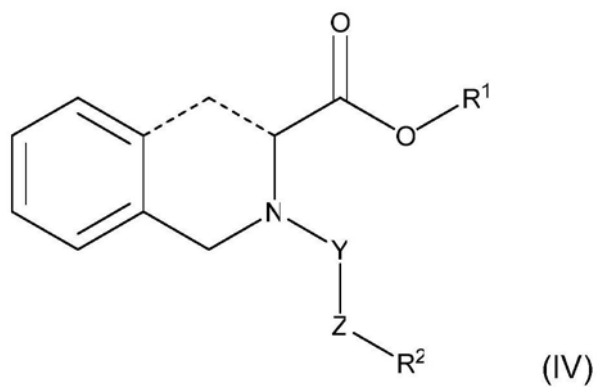
[0217] 其中 R^1 , R^2 , R^a 和X,Y和Z如先前定义。[0218] 在另外的优选实施方案中, R^a 也均为H,因此本发明中使用的化合物具有式(III):

[0219]

[0220] 其中 R^1 , R^2 , X,Y和Z如先前定义。

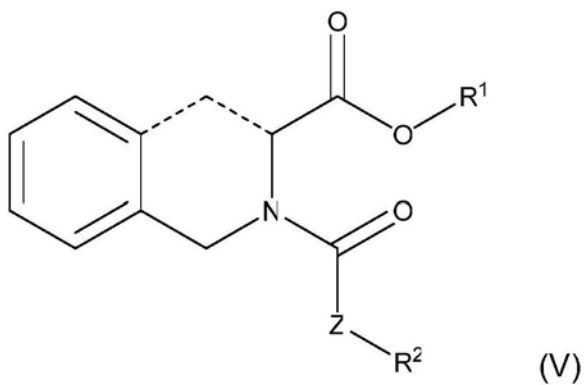
[0221] 在进一步优选的实施方案中,X为-O-,并且本发明中使用的化合物具有式(IV):

[0222]

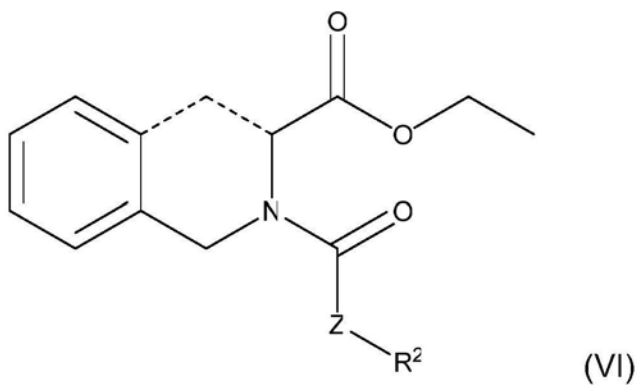
[0223] 其中 R^1 , R^2 , Y和Z如先前定义。

[0224] 在另外的优选实施方案中,Y为-C(O)-,并且本发明中使用的化合物具有式(V):

[0225]

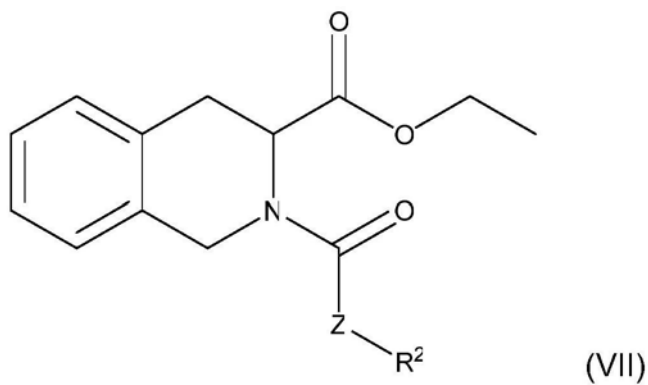
[0226] 其中R¹, R²和Z如先前定义。[0227] 仍进一步优选其中R¹为乙基的化合物, 其具有式 (VI) :

[0228]

[0229] 其中R²和Z如先前定义。

[0230] 例如, 该化合物可以是闭环结构并具有式 (VII) :

[0231]

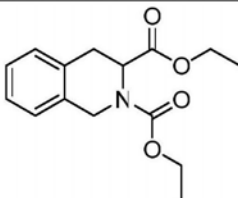
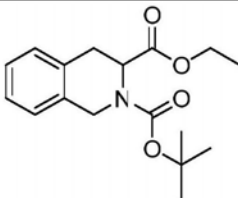
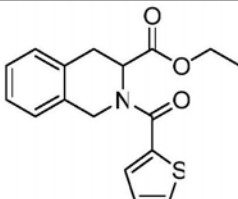
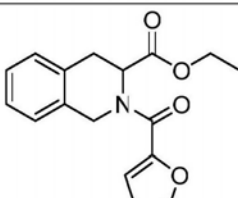
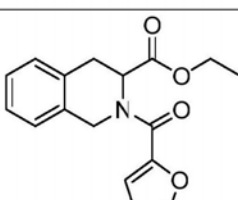
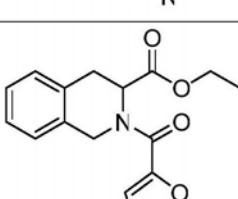
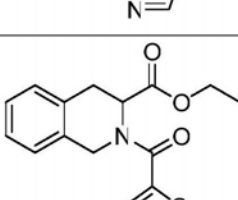
[0232] 其中R²和Z如先前定义。

[0233] 本发明化合物的具体实例列于下表1中:

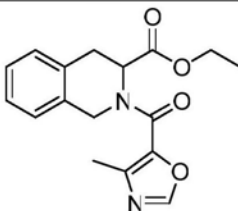
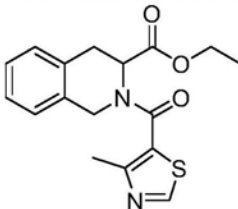
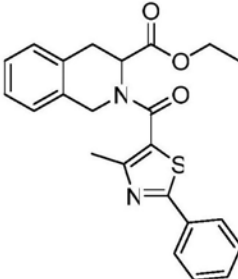
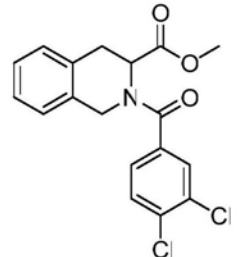
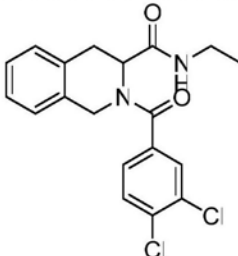
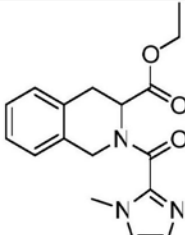
[0234]

化合物	结构
1	
2	
3	

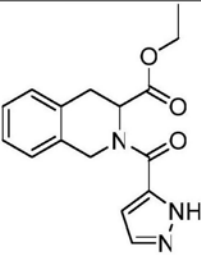
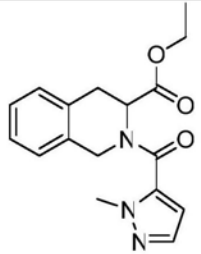
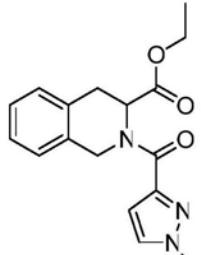
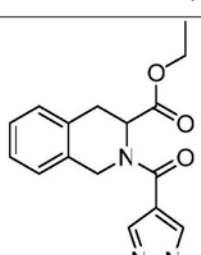
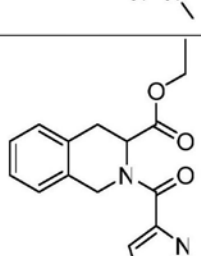
[0235]

4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

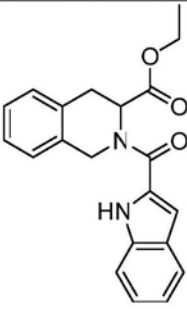
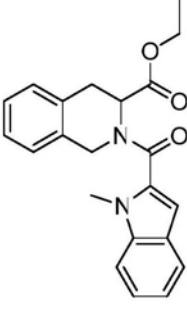
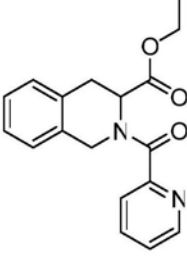
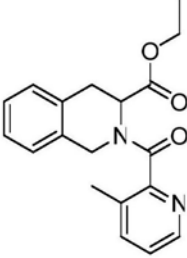
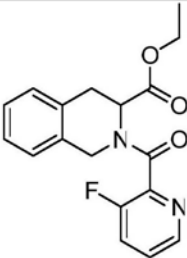
[0236]

11	
12	
13	
14	
15	
16	

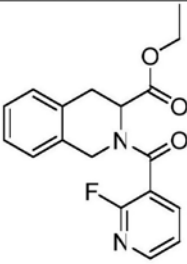
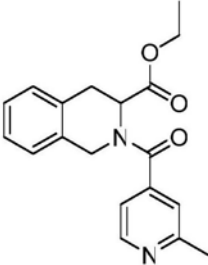
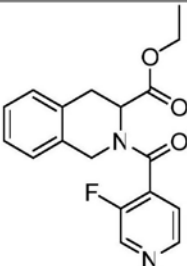
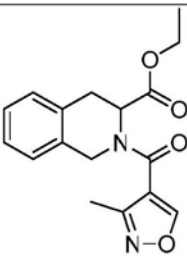
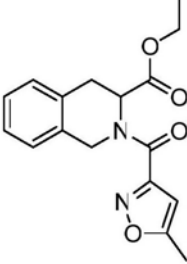
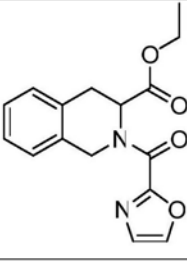
[0237]

17	
18	
19	
20	
21	

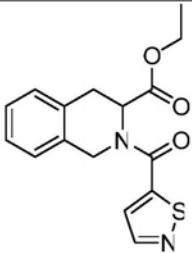
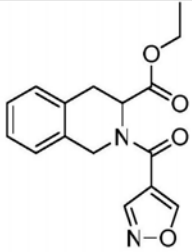
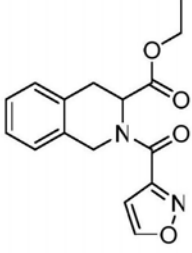
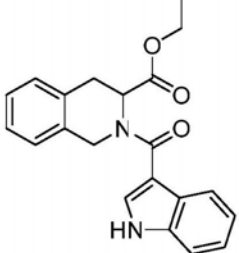
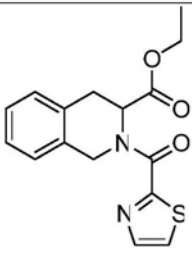
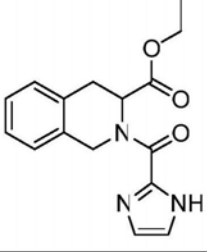
[0238]

22	
23	
24	
25	
26	

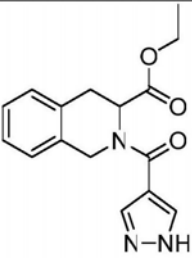
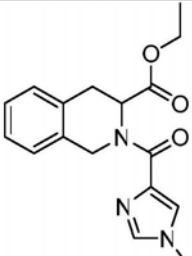
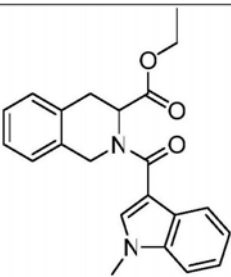
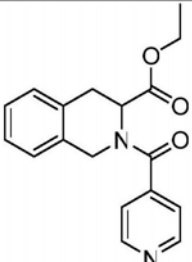
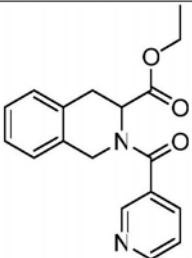
[0239]

27	
28	
29	
30	
31	
32	

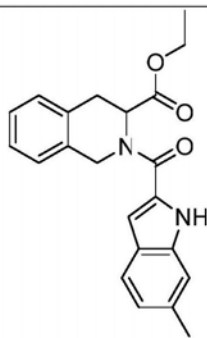
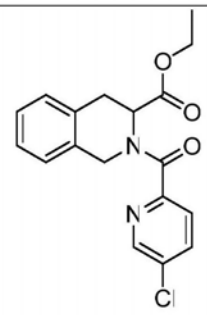
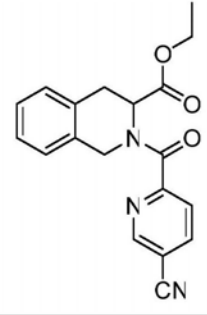
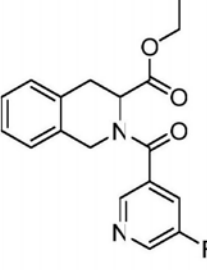
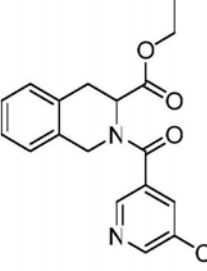
[0240]

33	
34	
35	
36	
37	
38	

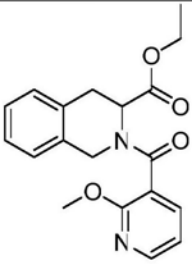
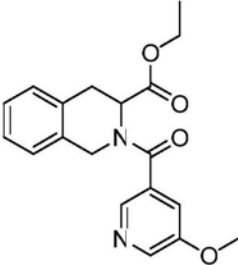
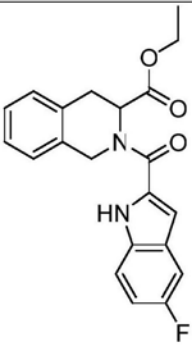
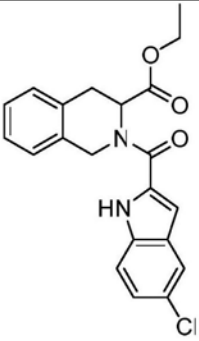
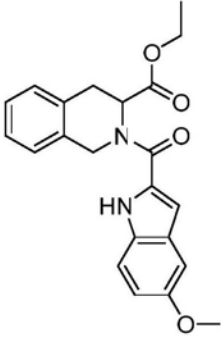
[0241]

39	
40	
41	
42	
43	

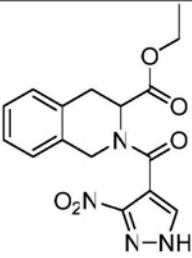
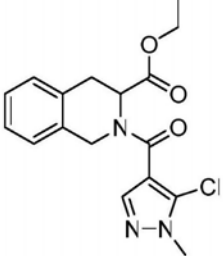
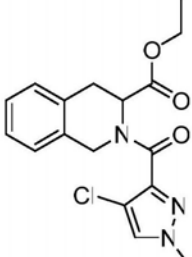
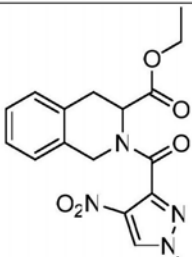
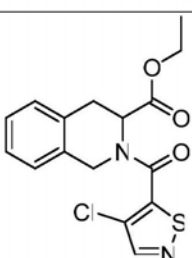
[0242]

44	
45	
46	
47	
48	

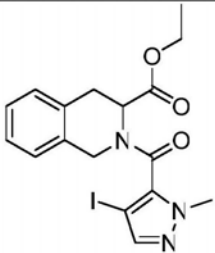
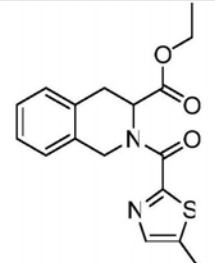
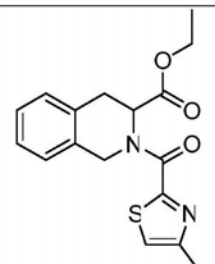
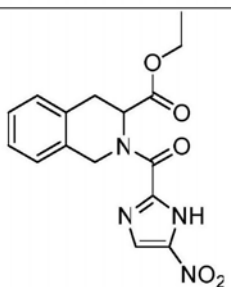
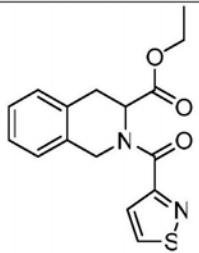
[0243]

49	
50	
51	
52	
53	

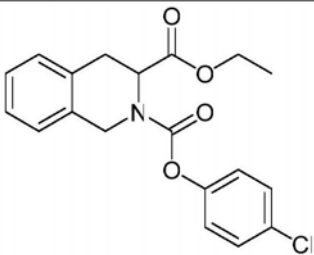
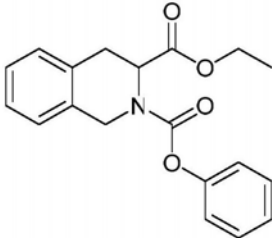
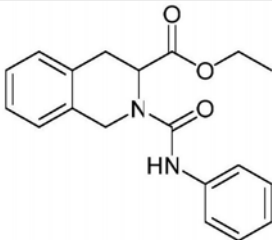
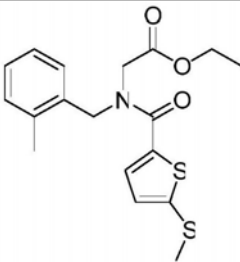
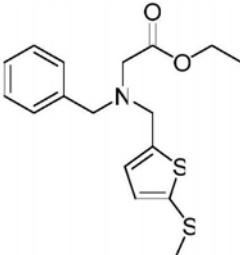
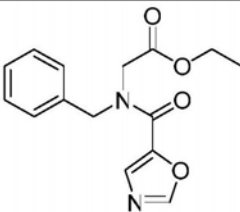
[0244]

54	 <chem>CCOC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2CN1C(=O)C3=CC=C(C=C3)N=C4C(=N4)[N+](=O)[O-]</chem>
55	 <chem>CCOC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2CN1C(=O)C3=CC=C(C=C3)N=C4C(=N4)Cl</chem>
56	 <chem>CCOC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2CN1C(=O)C3=CC=C(C=C3)N=C4C(=N4)Cl</chem>
57	 <chem>CCOC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2CN1C(=O)C3=CC=C(C=C3)N=C4C(=N4)[N+](=O)[O-]</chem>
58	 <chem>CCOC(=O)C1=CC2=CC=CC=C2CN1C(=O)C3=CC=C(C=C3)S=C4C(=N4)Cl</chem>

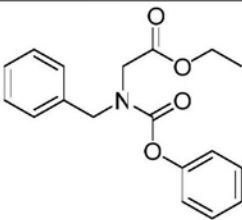
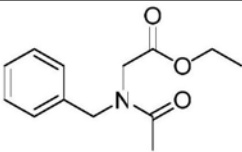
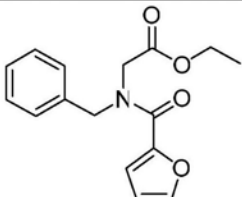
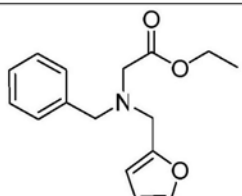
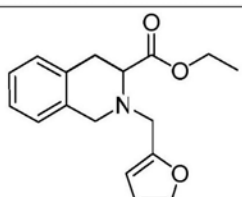
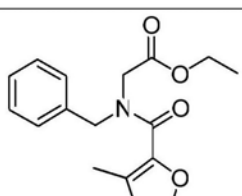
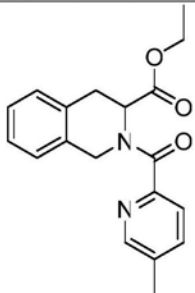
[0245]

59	
60	
61	
62	
63	

[0246]

64	
65	
66	
67	
68	
69	

[0247]

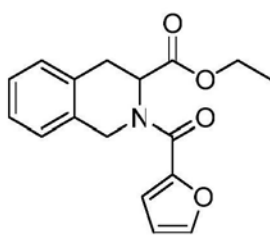
70	
71	
72	
73	
74	
75	
76	

[0248] 表1:本发明的示例性化合物

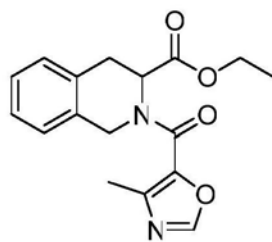
[0249] 化合物7、11、27、72和73是优选的。

[0250] 化合物7和11是特别优选的:

[0251]



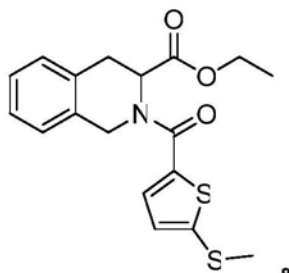
(化合物 7)



(化合物 11)。

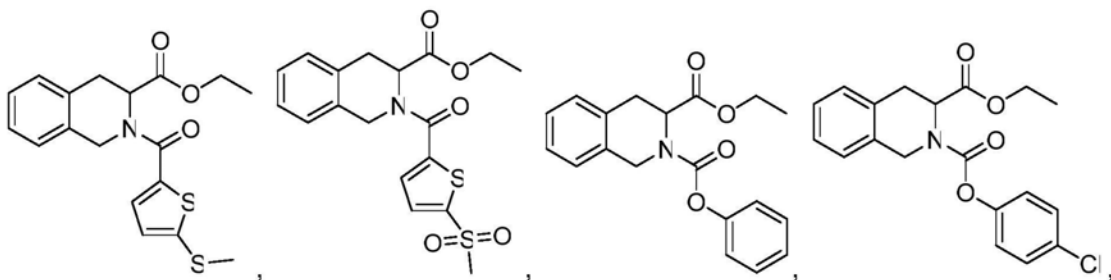
[0252] 式 (I) 的化合物不是 SR8278, 即不是:

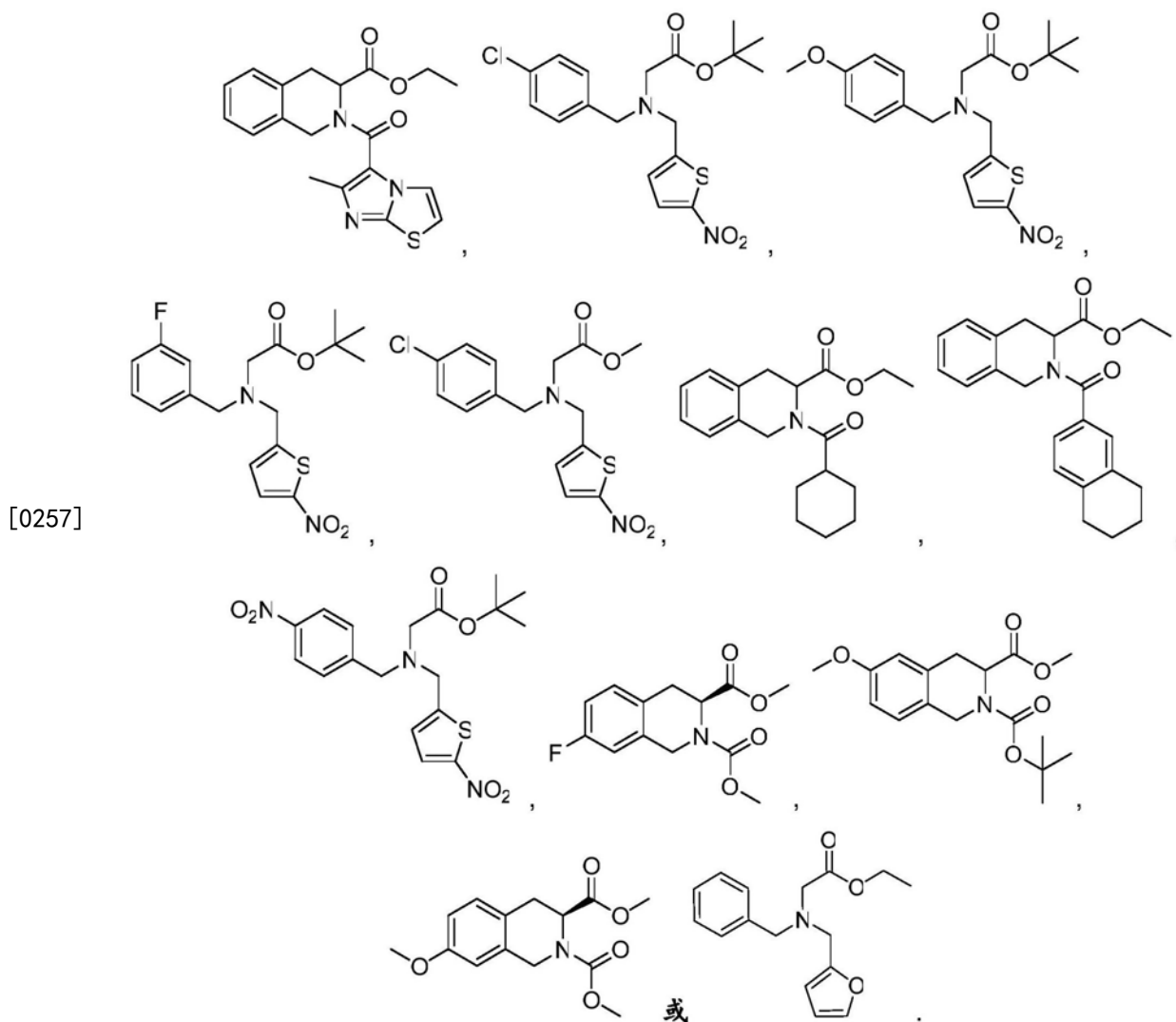
[0253]



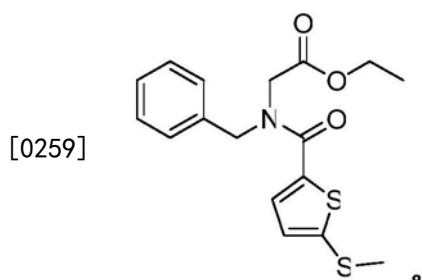
[0254] 在一些实施方案中, 式 (I) 的化合物也未在 W0 2013/033310 或 W0 2015/103527 中公开。例如, 关于本发明的化合物本身, 式 (I) 的化合物不选自:

[0255]



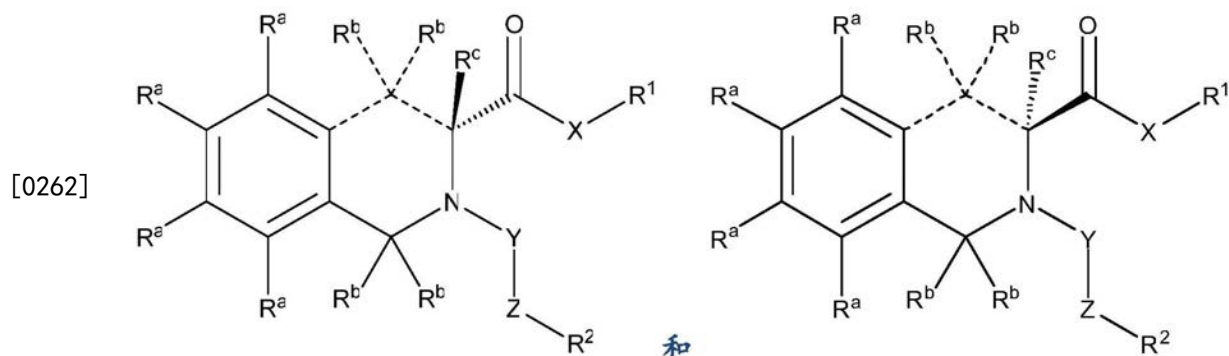


[0258] 在一些实施方案中,并且关于本发明的化合物本身,式(I)的化合物不是:

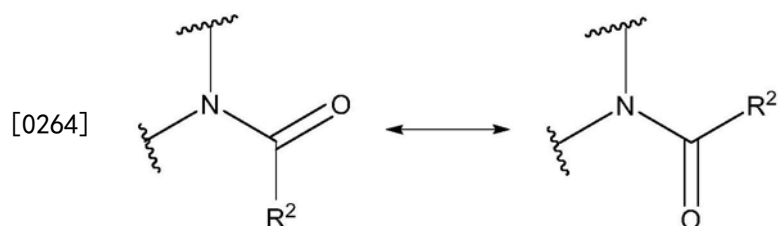


[0260] 尽管以上鉴定的化合物本身不是本发明的产物。然而,这些化合物可用于本文所述的方法和医疗用途/治疗适应症。

[0261] 应当理解,当本发明的化合物包含一个或多个手性中心时,该化合物可以纯对映体或非对映体形式或作为外消旋混合物存在和分离。因此,本发明包括本发明化合物的任何可能的对映异构体,非对映异构体,外消旋体或其混合物。因此,式(I)的化合物可以外消旋混合物形式使用,或作为单一对映体使用,即:



[0263] 式(I)的化合物可以具有旋转异构体形式,或者可以不具有旋转活性。旋转异构体形式包括慢速旋转形式和快速旋转形式。在一些优选的实施方案中,优选式(I)化合物的快速旋转形式。例如,



[0265] 式(I)的化合物或其盐可表现出互变异构现象,由此两种能够通过两个原子之间交换氢原子而易于相互转化的化合物,与其中之一形成共价键。由于互变异构化合物彼此处于动态平衡状态,因此其可以被视为同一化合物的不同异构形式。应当理解,本说明书中的式图只能表示可能的互变异构形式中的一种。然而,还应理解,本发明包括任何互变异构形式,并且不仅限于在式图中使用的任何一种互变异构形式。本说明书中的式图仅可表示可能的互变异构形式中的一种,并且应理解,本说明书包括所绘制的化合物的所有可能的互变异构形式,而不仅仅是本文中方便地以图形方式显示的那些形式。因此,根据本发明的式(I)化合物包括互变异构体(包括酮-烯醇和酰胺-亚胺酸形式)。

[0266] 因此,本文描述为一个互变异构体的结构旨在还包括另一互变异构体。

[0267] 化合物可以以前药的形式使用,所述前药可以在体内转化为式(I)的化合物,并且可以如本文定义部分所定义的盐,水合物和溶剂化物形式使用。

[0268] 与SR8278相比,本发明的化合物通常具有提高的REV-ERB抑制活性。该抑制活性可以通过任何适当的手段,例如本领域已知的常规手段和/或本文所述的方法来测量。在本发明的上下文中,提及具有提高的REV-ERB抑制活性的化合物可以理解为是指,与使用对照REV-ERB抑制化合物(例如SR8278)获得的REV-ERB活性降低相比,该化合物使REV-ERB活性降低至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少100%,至少150%,至少200%。与使用对照REV-ERB抑制化合物(例如SR8278)获得的REV-ERB活性降低相比,通常REV-ERB活性降低至少40%,至少50%,优选至少70%,更优选至少80%,甚至更优选至少90%或更多。

[0269] 提及具有提高的REV-ERB抑制活性的化合物可以理解为是指,相对于对照REV-ERB抑制化合物(例如SR8278),所述化合物在抑制REV-ERB活性方面有效至少1.5倍,至少2倍,至少2.1倍,至少2.2倍,至少2.3-,至少2.4倍,至少2.5倍,至少2.6倍,至少2.7倍,至少2.8倍,至少2.9倍,至少3倍,至少4倍,至少5倍,至少6倍,至少7倍,至少8倍,至少9倍,至少10倍

或更多。换句话说,改进的REV-ERB拮抗剂对REV-ERB的抑制作用比对照REV-ERB抑制化合物(例如SR8278)对REV-ERB活性的抑制高至少1.5倍,至少2倍,至少2.1倍,至少2.2倍,至少2.3倍,至少2.4倍,至少2.5倍,至少2.6倍,至少2.7倍,至少2.8倍,至少2.9倍,至少3倍,至少4倍或至少5倍或更多。通常,相对于对照REV-ERB抑制化合物(例如SR8278),改进的REV-ERB抑制化合物在抑制REV-ERB活性方面有效至少1.5倍,至少2倍或更多。

[0270] 本发明的小分子可以以靶向嵌合体的蛋白水解的形式(也称为PROTAC或PROTAC试剂)使用。PROTAC是异双功能的小分子,可同时结合靶蛋白和泛素连接酶,从而实现靶标的泛素化和降解。更详细地,PROTAC试剂通常包含靶蛋白的配体(在本发明的情况下为REV-ERB)和E3连接酶识别域的配体。通过使用这种PROTAC,将E3连接酶征募至PROTAC结合的REV-ERB,诱导泛素从E3连接酶复合物转移至靶蛋白(在本发明的情况下为REV-ERB)。一旦PROTAC诱导靶标的泛素化程度足够高,它就会被蛋白酶体识别并降解。

[0271] 作为非限制性实例,PROTAC试剂可以经由连接子将E3-连接酶的配体与本文所述的小分子抑制剂缀合来生产。在一个优选的实施方案中,PROTAC试剂包含E3 RING Cullin连接酶von-Hippel Lindau蛋白(VHL)或小脑的配体-CRL4 E3 RING Cullin连接酶复合物的一部分,其经由连接子连接至本发明的小分子抑制剂。

[0272] 变体序列

[0273] 至少80%的序列同一性包括至少82%、至少84%、至少86%、至少88%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、和100%的序列同一性(与本文所提出的每个序列和/或本文所提出的每个SEQ ID NO)。

[0274] 可以使用多种序列比对方法中的任何一种来确定百分比同一性,包括但不限于全局方法、局部方法和混合方法,例如分段逼近法。确定百分比同一性的方案是在本领域技术人员的范围内的常规程序。全局方法从分子的开始到结束对齐序列,并通过将各残基对的总得分相加并通过施加空位罚分来确定最佳比对。非限制性方法包括例如CLUSTAL W,参见例如Julie D.Thompson等人,CLUSTAL W:Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting,Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice,22(22)Nucleic Acids Research 4673-4680(1994);和iterative refinement,参见例如,Osamu Gotoh,Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein.Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments,264(4)J.Mol.Biol.823-838(1996)。局部方法通过鉴定所有输入序列共有的一个或多个保守基序来比对序列。非限制性方法包括例如Match-box,参见例如Eric Depiereux and Ernest Feytmans,Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences,8(5)CABIOS 501-509(1992);Gibbs sampling,参见例如C.E.Lawrence et al.,Detecting Subtle Sequence Signals:A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment,262(5131)Science 208-214(1993);Align-M,参见例如Ivo Van Walle et al.,Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences,20(9)Bioinformatics:1428-1435(2004)。因此,百分比序列同一性通过常规方法来确定。参见例如Altschul et al.,Bull.Math.Bio.48:603-16,

1986 and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19, 1992。

[0275] 上文提供的特定序列的变体也可以通过列举变体序列和上文提供的特定参考序列之间不同的核苷酸或氨基酸的数目来定义。因此,在一个实施方案中,所述序列可包含(或由以下组成)核苷酸序列,其在不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个核苷酸位置,例如,在不超过1个核苷酸位置与上文提供的特定序列不同。保守取代是优选的。

[0276] 本发明的变体核酸分子和肽通常仍保留本发明相应分子的活性。因此,例如,本发明的变体REV-ERB分子保留野生型REV-ERB抑制E4bp4表达的能力。变体分子可以保留相应野生型序列的活性的至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至多且包括100%。这同样适用于本发明所述的任何其他变体。

[0277] 可以标记(labelled/tagged)本发明的化合物。可以使用任何适当的标签。合适的标签在本领域中是已知的。

[0278] Notch配体

[0279] Notch信号传导途径主要与促进T细胞发育和抑制伴随B细胞发育有关。哺乳动物有四种类型的Notch受体-Notch1、Notch2、Notch3和Notch4,它们都是单向异二聚跨膜蛋白。哺乳动物有两种类型的典型Notch配体-Delta型和Jagged型,统称为DSL配体。存在三个δ样配体(DLL)、DLL1、DLL3和DLL4以及两个锯齿状(JAG)配体JAG1和JAG2。DLL和JAG配体通常包含以下结构域:Notch配体(MNKL)结构域的N末端的模块和Delta/锯齿状/Lag-2(DSL)结构域,以及许多EGF重复序列。DLL3包含六个EGF重复序列。DLL1和DLL4包含8个EGF重复序列。JAG1和JAG2包含16个EGF重复序列。还有许多非经典配体,其可以是膜结合的或分泌的。

[0280] 除非本文明确说明,否则本文提及的Notch配体是指任何Notch配体,例如Notch1、Notch2、Notch3和/或Notch4的配体,优选至少Notch1的配体。人Notch1的蛋白质序列在SEQ ID NO:10中给出(GenBank登录号CR 457221,版本CR457221.1)。通常,本发明中使用的Notch配体是典型的Notch配体。在一些优选的实施方案中,Notch配体是DLL,更优选DLL4。人DLL4的蛋白质序列在SEQ. ID NO:8中给出(GenBank登录号AF253468,版本AF253468.1)。

[0281] 本文提及的Notch配体也包括其片段,条件是该片段保留其衍生的Notch配体的Notch结合和活化活性。本发明人先前已经描述了适用于本发明的Notch配体的片段(参见PCT/GB2018/050818,其通过引用整体并入本文,特别是第15和16页和实施例)。Notch配体片段的优选实例包括Notch配体(N-EGF1)和Notch配体(N-EGF2),例如DLL4(N-EGF1)和DLL4(N-EGF2)。

[0282] 或者或另外,Notch配体,其片段或模拟Notch配体(例如DLL4)的效应(例如功能/活性)的分子可包含修饰,例如改变(通常增加)其Notch受体的配体/片段/模拟物的亲和力的氨基酸突变。用于鉴定此类修饰的技术在本领域中是已知的。例如,可以使用酵母表面展示来鉴定增加Notch配体/片段/模拟物的亲和力的氨基酸。同样,本发明人先前已经描述了此类修饰(参见PCT/GB2018/050818,其通过引用整体并入本文,特别是第16页)。在一些优选的实施方案中,本发明的DLL4配体,其片段或模拟物包含氨基酸取代,G28S,F107L和L206P,更优选G28S,F107L,N118I,I143F,H194Y,L206P和/或K215E。

[0283] 作为进一步的非限制性实例,DLL4的功能性片段包含至少全长DLL4的残基65-114和179-219,优选保持正确的构象以允许与Notch配体相互作用。

[0284] 此外,本发明包括使用模拟Notch配体的效应(例如活性/功能)的分子(本文也称

为模拟物)。例如,本发明包括使用模拟所需Notch配体(如DLL4)效应的肽、钉合肽、拟肽和模拟肽。在与天然肽相关的稳定性和生物利用度方面,模拟肽可能比肽具有优势。模拟肽可以具有设计用于生物学功能的亲本肽的主链或侧链修饰。模拟肽类的实例包括但不限于拟肽和 β -肽,以及掺入D-氨基酸的肽。

[0285] 产生合成肽和模拟肽(例如拟肽)的方法是本领域已知的,经典和非经典Notch配体的序列也是已知的。因此,对于本领域技术人员来说,使用已知技术并基于已知的Notch配体序列产生合适的分子来模拟所需Notch配体的效应是常规的。作为非限制性实例,模拟肽可以设计为与Notch(例如Notch1)的关键残基相互作用,已知其参与与DLL4,例如Notch(Notch1)的残基415(E415)、418(L418)、420(A420)、421(N421)、422(P422)、424(E424)、425(H425)、436(F436)、447(P447)、448(R448)、540(E450)、452(D452)、469(D469)、477(I477)、480(P480)中的一个或多个,或其任何组合的结合。

[0286] 本发明的方法可以包括使用能够增加NK细胞产生的任何Notch配体或其片段或模拟其效应的分子,特别是本文所公开的可以与抑制REV-ERB活性的本发明化合物协同作用的分子,或导致E4bp4的翻译后修饰,并因此导致E4bp4活性增加的如本文所公开的化合物。

[0287] 本发明人之前已经证明了E4bp4在体内直接与Notch1基因的调节区结合,因此可以增强Notch的转录调节,并且Notch1表达E4bp4^{-/-}小鼠显著降低。由此,本发明人发现即使在无关键转录因子E4bp4存在下,Notch配体短期暴露于鼠HSC和非常早期的祖细胞也可促进NK细胞发育。此外,本发明人已经证明了Notch配体 δ 样配体4(DLL4)在刺激NK细胞的扩增方面特别有效。

[0288] 因此,本发明涉及通过将HPC暴露于Notch配体并结合使用如本文所述的抑制REV-ERB作用的化合物来扩增NK细胞。在本发明的离体或体外方法中,这可包括在Notch配体存在下培养HPC的步骤。对于体内方法,这可包括将化合物与Notch配体一起给药。在优选的实施方案中,Notch配体是DLL4,或其保留DLL4功能的片段或变体。

[0289] 本文描述了与REV-ERB抑制剂有关的变体序列。该公开内容尤其适用于Notch配体及其片段/模拟物的变体。本发明的变体Notch配体/片段/模拟物通常至少保留本发明的相应Notch配体/片段/模拟物的活性。因此,例如,本发明的变体DLL4配体或其片段保留了相应的DLL4分子与Notch1结合和/或增强NK细胞产生的能力。在一些实施方案中,变体DLL4配体/片段/模拟物具有比相应的未修饰的DLL4配体/片段/模拟物更高的活性。本发明人先前已经描述了此类变体(参见PCT/GB2018/050818,其通过引用整体并入本文,特别是第17和18页)。作为非限制性实例,Notch配体/片段/模拟物/其变体(例如,DLL4配体/片段/模拟物/其变体)与Notch1结合的 K_D 值为小于1 μ M、小于900nM、小于800nM、小于700nM、小于600nM、小于500nM、小于400nM、小于300nM、小于200nM、小于100nM、小于90nM、小于80nM、小于70nM、小于60nM、小于50nM或更小,优选小于500nM、小于400nM、小于300nM或更小。在一些实施方案中,相对于相应的未修饰的Notch配体/片段/模拟物,变体Notch配体/片段/模拟物(例如,变体DLL4配体/片段/模拟物)可以增加NK细胞的数量,或引起NK细胞的产生增加至少1.5倍,至少1.6倍,至少1.7倍,至少1.8倍,至少1.9倍,至少2倍,至少2.1倍,至少2.2倍,至少2.3倍,至少2.4倍,至少2.5倍,至少3倍或更多倍。与相应的未修饰的DLL4配体/片段/模拟物相比,变体Notch配体/片段/模拟物(例如变体DLL4配体/片段/模拟物)可使NK细胞的数量增加至少10%,至少20%,至少30%,至少40%,至少50%,至少60,至少70%,至少

80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少100%，至少150%，至少200%，至少300%或更多。

[0290] 可以标记(labelled/tagged)本发明的Notch配体/片段/模拟物。可以使用任何适当的标签。合适的标签是本领域已知的。

[0291] E4bp4的翻译后修饰

[0292] 本发明人先前已经表明E4bp4的翻译后修饰可以增加E4bp4活性(参见PCT/GB2018/050818,其通过引用整体并入本文,特别是第33至36页和实施例1至5)。此外,通过翻译后修饰的改变增加E4bp4活性导致NK细胞的数量增加(如本文所定义)。

[0293] 因此,本发明的方法可进一步包括使包含从个体/患者获得的样品的造血祖细胞(HPC)与导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物接触,从而引起E4bp4活性的增加的步骤。因此,如本文所述改变E4bp4的翻译后修饰的化合物可与抑制REV-ERB活性的本发明方法和化合物组合使用。如本文所述,该组合可进一步与使用Notch配体(例如DLL4)组合使用。

[0294] 类似地,因此,根据本发明,改变或影响E4bp4的翻译后修饰的化合物可用于增加患者中NK细胞的产生,其中所述化合物增加E4bp4活性,或用于通过在有需要的患者中增加NK细胞的数量进行治疗,以及本文公开的与通过降低REV-ERB活性而增加E4bp4表达有关的适应症,以及任选地本文公开的与通过在Notch配体存在下培养HPC来增加NK细胞的数量有关的适应症。

[0295] 本文关于增加NK细胞的数量方法、在抑制REV-ERB作用和/或Notch配体的化合物的情况下扩增NK细胞的方法、通过该方法产生的扩增的NK细胞群和涉及该化合物和群的治疗适应症的任何公开内容尤其适用于增加E4bp4活性以增加NK细胞的数量公开方法。作为非限制性实例,饲养细胞层、生长因子和/或其他培养条件以及待治疗的疾病在翻译后修饰方面可以与本文所公开的用于REV-ERB抑制和/或Notch配体方面的相同。REV-ERB抑制剂化合物,Notch配体和/或E4bp4翻译后修饰剂可以同时、单独或顺序使用。当将改变E4bp4的翻译后修饰的化合物与抑制REV-ERB作用的化合物组合使用时,通常使样品在与翻译后修饰剂接触之前与REV-ERB抑制化合物接触。如果还使用Notch配体,则通常在REV-ERB抑制化合物和Notch配体之后使用E4bp4翻译后修饰剂;优选地,REV-ERB抑制化合物与Notch配体一起使用,或更优选地,在Notch配体之前使用REV-ERB抑制化合物(如本文所述)。

[0296] 翻译后修饰的类型

[0297] 所述方法包括任何翻译后修饰的改变,其导致E4bp4活性的增加。翻译后修饰的非限制性实例包括磷酸化、SUMO化、添加疏水基团(例如豆蔻酰化、棕榈酰化)、添加辅因子、添加小化学基团(例如酰化、烷基化、酰胺化、糖基化)、糖化、氨基甲酰化、羧化、化学修饰(例如脱酰胺)和/或结构变化。通常,根据本发明的翻译后修饰的改变导致野生型(未修饰的)E4bp4内的一个或多个磷酸化位点处的磷酸化减少和/或野生型(未修饰的)E4bp4内的一个或多个SUMO化位点处的SUMO化减少,或其组合。如发明人先前所示(参见PCT/GB2018/050818,其全部内容通过引用合并于此,特别是第33至36页和实施例1-5),野生型(未修饰的)E4bp4通常在残基K10、K116、K219、K337和/或K394中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处进行SUMO化。通常,野生型(未修饰的)E4bp4至少在残基K219(或相应的残基)处进行SUMO化。或者或另外,野生型(未修饰的)E4bp4通常在残基S286、S301和S353、或与其对应的残基或其任何组合处进行磷酸化。因此,在一些优选的实施方案中,改变E4bp4的翻

译后修饰的化合物减少、抑制或消除残基K219(或其对应残基)处的SUMO化,和/或减少、抑制或消除残基S286、S301和S353(或其对应残基)或其任何组合处的磷酸化。因此,根据本发明,化合物可用于(a)减少E4bp4的残基K10、K116、K219、K337和/或K394中的一个或多个、或其对应残基、或其任何组合处的SUMO化;和/或减少残基S286、S301和/或S454中的一个或多个、或其对应残基、或其任何组合处的磷酸化。

[0298] 根据本发明,可以使用能够改变或影响E4bp4的翻译后修饰的任何化合物,其中所述改变增加E4bp4的活性。在一些实施方案中,所述化合物抑制、减少或消除在野生型(未修饰的)E4bp4中发生的磷酸化和/或SUMO化。任何合适的激酶抑制剂可用于抑制、减少或消除E4bp4的磷酸化。合适的激酶抑制剂是本领域已知的,并且其选择对于本领域技术人员来说是常规的。例如,基于对磷酸化E4bp4的激酶的当前理解,可能合适的是使用磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK1)和/或酪蛋白激酶1epsilon(CK1epsilon)的抑制剂。合适的激酶抑制剂的非限制性实例包括4-(4-(2,3-二氢苯并[1,4]二氧杂环己-6-基)-5-吡啶-2-基-1H-咪唑-2-基)苯甲酰胺(D4476)和4,5,6,7-四溴-2-氮杂苯并咪唑,4,5,6,7-四溴苯并三唑(TBB)。

[0299] E4bp4活性的增加

[0300] E4bp4活性的增加可以相对于对照来测量(例如,由于E4bp4的翻译后修饰所引起的)。因此,可以将NK前体或祖细胞、扩增的NK细胞群的样品中或从根据本发明待治疗的个体/患者获得的样品中的E4bp4活性与对照中E4bp4的活性进行比较。活性可以以任何适当的术语,例如E4bp4的任何下游靶标的表达的增加来量化。可以使用任何适当的技术或方法来量化E4bp4活性。合适的技术是本领域已知的,例如用于定量报告基因表达的荧光素酶测定法。

[0301] 通常,对照是未经本发明处理的等同的群或样品。例如,在其中化合物用于改变或影响E4bp4的翻译后修饰的情况下,相应的对照可以是其中未添加化合物以改变或影响E4bp4的翻译后修饰的群或样品。作为另一实例,在其中化合物用于抑制REV-ERB的作用的情况下,相应的对照可以是其中未添加化合物以抑制REV-ERB的作用的群或样品。作为另一实例,在其中化合物用于抑制REV-ERB的作用并且化合物用于改变或影响E4bp4的翻译后修饰的情况下,相应的对照可以是其中未添加化合物以抑制REV-ERB的作用或改变或影响E4bp4的翻译后修饰的群或样品。

[0302] 对照可以是根据本发明治疗的不同个体或在治疗之前的同一个体获得的样品。用于NK细胞离体扩增的常规方法,包括已知方法,可以认为是根据本发明的对照方法。

[0303] 在本发明的上下文中,提及增加E4bp4活性可以理解为是指相对于对照,E4bp4的活性增加至少1.5倍、至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍或更多。通常,与对照相比,E4bp4活性增加至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍或更多。可以间接测量E4bp4活性,测定NK细胞的数量增加。因此,相对于对照,NK细胞的数量可以增加至少1.5倍、至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍或更多。通常,与对照相比,NK细胞

的数量增加至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍或更多。

[0304] E4bp4的活性可以通过定量和/或定性分析来确定,并且可以直接或间接测量。E4bp4相对于对照的活性可以使用任何适当的技术来确定。合适的标准技术是本领域已知的。

[0305] 与对照相比,E4bp4的活性可以增加至少6小时、至少12小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少72小时、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周。优选地,E4bp4的活性增加至少12-72小时。通常,这是相对于最后一次给予翻译后修饰E4bp4的化合物来评估的。

[0306] 与对照相比,E4bp4的活性可以增加至少1代、至少2代、至少3代、至少4代、至少5代、至少10代,至少20代,至少30代,至少40代或更多代培养的细胞传代。E4bp4的活性可以无限增加。

[0307] 扩增NK细胞的方法

[0308] 本发明涉及扩增NK细胞群的方法。所述方法可以是体外、体内或离体的。所述方法包括含有具有抑制REV-ERB作用的化合物的HPC(如本文所述)并使所述细胞扩增以产生NK细胞群。本发明的方法允许NK细胞快速扩增,减少其培养所需的时间,并因此减少耗尽的风险,当输入患者时增强NK细胞的细胞毒性。

[0309] 当所述方法在体内进行时,所述方法是如本文所述的治疗方法。在此类实施方案中,本文关于本发明的治疗适应症和应用的所有公开内容都适用于所述方法。

[0310] 通常,本发明的方法是离体的。因此,本发明提供了一种用于扩增NK细胞群的离体方法,其包括以下步骤:(a)培养从个体获得的包含NK前体细胞的样品;(b)使所述样品与抑制REV-ERB作用的化合物接触;和(c)在体外扩增所述细胞以产生NK细胞群。该化合物可以是本文所述的本发明的任何REV-ERB抑制化合物。通常,如本文所述,所述化合物通过降低REV-ERB活性来增加E4bp4表达。在一个优选的实施方案中,该化合物具有如本文定义的式(II),更优选该化合物具有如本文定义的式(III),甚至更优选该化合物具有如本文定义的式(IV),甚至更优选,该化合物具有如本文所定义的式(V)。本文描述了可用于本发明方法的具体化合物的实例,其中化合物7和11是特别优选的。

[0311] 额外的外部刺激,例如生长因子和/或细胞因子,可用于进一步增强NK细胞的产生。合适的外部刺激的非限制性实例包括IL-7,IL-15,F1t3L,干细胞因子(SCF),血小板生成素(TPO),IL-3和/或IL-6,或其任何组合。在一些优选的实施方案中,使用IL-7,F1t3L和/或SCF或其任何组合。更优选使用IL-7,F1t3L和SCF。

[0312] 作为非限制性实例,IL-7可以以约1ng/ml-约100ng/ml、约1ng/ml-约50ng/ml、约1ng/ml-约25ng/ml、约1ng/ml-约10ng/ml或更低的浓度使用。在一些实施方案中,IL-7以约50ng/ml、约25ng/ml、约20ng/ml、约15ng/ml、约10ng/ml或约5ng/ml,优选约10ng/ml的浓度使用。作为非限制性实例,F1t3L可以以约1ng/ml-约100ng/ml、约1ng/ml-约50ng/ml、约1ng/ml-约25ng/ml、约1ng/ml-约10ng/ml或更低的浓度使用。在一些实施方案中,F1t3L以约50ng/ml、约25ng/ml、约20ng/ml、约15ng/ml、约10ng/ml或约5ng/ml,优选约10ng/ml的浓度使用。作为非限制性实例,SCF可以以约1ng/ml-约200ng/ml、约1ng/ml-约150ng/ml、约1ng/ml-约100ng/ml、约1ng/ml-约50ng/ml或更低的浓度使用。在一些实施方案中,SCF以约

150ng/ml、约125ng/ml、约120ng/ml、约110ng/ml、约100ng/ml、约90ng/ml、约80ng/ml或约75ng/ml,优选约100ng/ml的浓度使用。

[0313] 作为非限制性实例,IL-15可以以约1ng/ml至约100ng/ml,约1ng/ml至约50ng/ml,约1ng/ml至约40ng/ml,约1ng/ml至约30ng/ml,约1ng/ml至约20ng/ml,约1ng/ml至约10ng/ml或更小的浓度使用。在一些实施方案中,IL-15以约50ng/ml,约40ng/ml,约35ng/ml,约30ng/ml,约25ng/ml,约20ng/ml或约10ng/ml的浓度使用,优选约30ng/ml。

[0314] 或者或另外,HPC可以在合适的支持物/基质细胞或细胞层上或与之一一起培养。可以使用任何合适的基质细胞,包括但不限于OP9基质细胞和/或EL08-1D2基质细胞。

[0315] 在一些实施方案中,离体方法包括单阶段,其中通常在基本上恒定的培养条件下,对获自患者的样品中的HPC进行培养,与本发明的化合物接触并扩增以形成NK细胞群。通常,这涉及将HPC与诸如IL-3,IL-7,SCF,F1t3L和/或IL-15的因子,优选所有这些因子一起孵育。优选地,HPC也在基质细胞/细胞层例如EL08-1D2基质细胞上或与之一一起培养。

[0316] 在一些实施方案中,离体方法包括两阶段。首先是淋巴产生阶段,其中培养获自患者的样品中的HPC。通常,这涉及将HPC与淋巴产生相关的细胞因子和生长因子(例如F1t3L、IL-7和/或SCF)一起孵育。该阶段可持续至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、或更多天。在一些优选的实施方案中,该阶段持续2天。离体方法的第二阶段是NK细胞扩增阶段。通常,这涉及在与NK细胞发育相关的细胞因子和生长因子(例如IL-15)中培养细胞,并且可以包括将培养的HSC转移至合适的基质(支持)细胞层,例如OP9基质细胞。通常在该第二阶段期间,优选在该第二阶段开始时添加本发明的化合物。第二阶段持续离体培养期的剩余时间(如上所定义)。在该第二阶段期间,可以根据需要频繁地更换培养基,以促进NK细胞的扩增。该第二阶段可以持续至少一天,至少两天,至少三天,至少四天,至少五天,至少六天,至少七天,至少八天,至少九天,至少十天,至少十一天,至少十二天,至少十三天,至少十四天或更多天。在一些优选的实施方案中,该阶段持续至少一周。

[0317] 包含HPC的样品可以离体培养至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天、至少18天或更长时间。通常将所述样品培养至少9天以产生扩增的NK细胞群。此培养期是离体方法的总培养期,即如果有两阶段,则此培养期为总计(第1阶段加第2阶段)。在图2A中列出了用于产生NK细胞的HPC的示例培养方案。

[0318] 本发明的REV-ERB抑制化合物可以在分离样品中的HPC的一周内、6天内、5天内、4天内、3天内、2天内,1天内加入到包含HPC的样品中,或在分离NK细胞前体的当天加入到包含HPC的样品中。通常,这是从患者获得样品的同一天。优选地,在分离样品中的HPC的两天内,甚至更优选在分离HPC后的第二天,将本发明的化合物加入样品中。在一些实施方案中,在多个时间点,例如在更换培养基时,添加化合物。作为非限制性实例,本发明的化合物可以在分离HPC之后两天加入,然后在HPC分离后第五天再次加入。本公开内容适用于本发明的所有方法,例如,本文所述的“一阶段和两阶段”方法,和/或本文所述的也使用Notch配体和/或改变E4bp4翻译后修饰的化合物的方法。

[0319] 可以使用任何合适浓度的本发明化合物,只要其如本文所述抑制REV-ERB的作用并且具有扩增NK细胞群的效用。作为非限制性实例,在本发明的任何方面,本发明的化合物可以约2至约20 μ M,约2至约15 μ M,约5至约15 μ M,约5至约14 μ M,约4至约13 μ M,约5至约12 μ M,

约5至约11 μ M或优选约5至约10 μ M的最终浓度使用。

[0320] 本发明人先前已经证明,结合使用Notch配体(例如DLL4)和抑制REV-ERB可产生有效的手段来增强NK细胞的产生,从而允许比目前的方法更快地产生大量适合体内治疗用途的功能性NK细胞。

[0321] 因此,本发明提供了一种用于扩增NK细胞群的离体方法,其包括以下步骤:(a)将从个体/患者获得的包含HPC的样品与抑制REV-ERB作用的化合物一起培养(如本文所述);(b)在Notch配体(例如DLL4)存在下培养所述细胞;(c)在体外扩增所述细胞以产生NK细胞群。步骤(a)和(b)可以同时或以任何顺序进行。例如,可以首先进行步骤(a),然后进行步骤(b),使得细胞首先暴露于REV-ERB抑制化合物,然后在Notch配体的存在下培养。或者,可以首先进行步骤(b),然后进行步骤(a),使得首先在Notch配体存在下,然后在REV-ERB抑制化合物存在下培养细胞。或者,步骤(a)和(b)可以同时进行,使得细胞在REV-ERB抑制化合物和Notch配体的存在下同时培养。

[0322] 在一些优选的实施方案中,可以首先进行步骤(a),然后进行步骤(b),使得首先在REV-ERB抑制化合物的存在下然后在Notch配体的存在下培养细胞。因此,在那些实施方案中,本发明提供了用于扩增NK细胞群的离体方法,其包括以下步骤:(a)将从个体/患者获得的包含HPC的样品与抑制REV-ERB作用的化合物一起培养(如本文所述);(b)在Notch配体(例如DLL4)存在下培养所述细胞;(c)在体外扩增所述细胞以产生NK细胞群。

[0323] 通常,Notch配体是本文所述的Notch配体。优选地,Notch配体是DLL4或其保留DLL4功能的片段,如本文所述。

[0324] Notch配体(例如DLL4)可以存在于溶液中(例如在培养基中)或用于包被培养HPC的容器。优选Notch配体(例如DLL4)用于包被培养HPC的容器。作为非限制性实例,在使用Notch配体的本发明的任何方面中,Notch配体(例如DLL4)可以约1 μ g/ml至约100 μ g/ml,约1 μ g/ml至约50 μ g/ml,约1 μ g/ml至约25 μ g/ml,约1 μ g/ml至约10 μ g/ml或更低的浓度使用。在一些实施方案中,Notch配体(例如DLL4)以约50 μ g/ml,约25 μ g/ml,约20 μ g/ml,约15 μ g/ml,约10 μ g/ml或约5 μ g的浓度使用,优选约10 μ g/ml。可以使用另外的底物和/或连接子来促进Notch配体(例如DLL4)附着于培养容器表面。此类底物的例子是本领域已知的,例如聚-L-赖氨酸。

[0325] 如上所述,HPC可以在存在或不存在基质支持细胞或饲养细胞或其群的情况下培养。在使用Notch配体的一些优选的实施方案中,细胞在不存在基质支持细胞或其群的情况下培养。

[0326] 在一些实施方案中,离体方法包括单阶段,其中通常在基本恒定的培养条件下培养获自个体/患者的样品中的HPC,使其与本发明的化合物和Notch配体接触,并扩增以形成NK细胞群(即该方法的步骤(a)和(b)同时进行)。通常,这涉及将HPC与诸如IL-3,IL-7,SCF,F1t3L和/或IL-15的因子,优选所有这些因子一起孵育。HPC可以在存在或不存在基质细胞/细胞层,例如EL08-1D2基质细胞的情况下培养。

[0327] 在一些实施方案中,离体方法包括两阶段(类似于图2所示的方案)。首先是淋巴产生阶段,其中培养获自个体/患者的样品中的HPC。通常,这涉及将HPC与淋巴产生相关的细胞因子和生长因子(例如F1t3L、IL-7和/或SCF)一起孵育。该阶段可持续至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、或更多天。在一些优选的实施方案中,该阶段持续2天。

[0328] 接下来是NK细胞扩增阶段。通常,这涉及在与NK细胞发育相关的细胞因子和生长因子(例如IL-15)中培养细胞,并且可以包括将培养的HSC转移至合适的基质(支持)细胞层,例如OP9基质细胞。第二阶段持续离体培养期的剩余时间(如本文所定义)。在该第二阶段期间,可以根据需要频繁地更换培养基,以促进NK细胞的扩增。替换之前在培养基中存在的任何REV-ERB抑制化合物,Notch配体和/或改变E4bp4的翻译后修饰的化合物都可以以相同或不同的浓度再次与新鲜培养基一起给药。作为非限制性实例,如果在分离HPC后两天加入本发明的化合物,并且在分离HPC后的第5天改变培养基,则可以在分离后第5天再次将化合物与新鲜的培养基一起给药。

[0329] 在一些实施方案中,本发明的REV-ERB抑制化合物在第1阶段(淋巴产生)中添加,而Notch配体在第二阶段(NK细胞扩增)中添加。在其他实施方案中,在第1阶段(淋巴产生)中添加Notch配体,并且在第二阶段(NK细胞扩增)中添加REV-ERB抑制化合物。在其他实施方案中,在第一阶段(淋巴产生)中加入REV-ERB抑制化合物和Notch配体。在进一步的实施方案中,在第二阶段(NK细胞扩增阶段)中加入REV-ERB抑制化合物和Notch配体。如果在同一阶段(第1阶段或第2阶段)加入REV-ERB抑制化合物和Notch配体,则该阶段可以进一步划分,以使:(i)在Notch配体之前加入REV-ERB抑制化合物;或(ii)在REV-ERB抑制化合物之前加入Notch配体。或者,可以在同一阶段同时加入Notch配体和REV-ERB抑制化合物。图2B示出了本发明的REV-ERB抑制化合物和Notch配体组合方面的不同方法方案的一些实施方案。图2B中所包括的给药时间是非限制性的;可以使用任何合适的给药时间,例如本文所述的时间。在一些优选的实施方案中,REV-ERB抑制剂在第1阶段中(例如在第0天或第2天)添加,而在以后(例如分别在第2或第4天)添加Notch配体。

[0330] 通常,在第一阶段期间加入REV-ERB抑制化合物,并且在第二阶段期间,优选在该第二阶段的开始,加入Notch配体。

[0331] 包含HPC的样品可以离体培养至少5天,至少6天,至少7天,至少8天,至少9天,至少10天,至少11天,至少12天,至少13天,至少14天,至少15天,至少16天,至少17天,至少18天或更多天。通常,将所述样品培养至少9天以产生扩增的NK细胞群体。此培养期是离体方法的总培养期,即,如果有两阶段,则此培养期为总计(第1阶段加第2阶段)。

[0332] 本发明的REV-ERB抑制化合物可以在分离样品中的HPC的一周内、6天内、5天内、4天内、3天内、2天内、1天内加入到包含HPC的样品中,或在分离NK细胞前体的当天加入到包含HPC的样品中。通常,这是从患者获得样品的同一天。优选地,在分离样品中的HPC的两天内,例如在分离HPC的当天,将本发明的化合物加入样品中。最优选地,在分离HPC之后两天,将本发明的REV-ERB抑制化合物加入样品中。在一些实施方案中,在多个时间点,例如在更换培养基时,添加化合物。作为非限制性实例,可以在分离HPC之后两天添加本发明的化合物,然后在分离HPC后第五天再次添加本发明的化合物。

[0333] 本发明的Notch配体可以在分离样品中的HPC的一周内、6天内、5天内、4天内、3天内、2天内、1天内加入到包含HPC的样品中,或在分离NK细胞前体的当天加入到包含HPC的样品中。通常,这是从患者获得样品的同一天。优选地,在分离样品中的HPC的4天内,例如在分离HPC之后的第2天,将本发明的Notch配体加入样品中。最优选地,在分离HPC之后两或四天,将本发明的Notch配体加入样品中。因此,通常在分离HPC后4天或之后,存在Notch配体。

[0334] 本发明的优选实施方案包括(i)在分离HPC的当天将REV-ERB抑制化合物和Notch

配体加入样品中；(ii) 在分离HPC的当天将REV-ERB抑制化合物加入样品中，并且在分离HPC的第二天将Notch配体加入样品中；(iii) 在分离HPC后的第二天将REV-ERB抑制化合物加入样品中，并在分离HPC后的第四天将Notch配体加入样品中；其中选项(iii)是特别优选的。如发明人先前所证明的，这些特定条件使REV-ERB抑制和Notch配体之间的协同作用最大化，并因此使NK细胞的扩增最大化。

[0335] 另外，细胞可以在与Notch配体结合的额外外部刺激（如本文所述）的存在下进行培养。作为非限制性实例，Notch配体可与IL-15一起使用。例如，可以首先将细胞暴露于Notch配体，然后暴露于IL-15。或者，细胞可首先在IL-15存在下然后在Notch配体存在下进行培养。或者，细胞可以在Notch配体和IL-15存在下同时进行培养。优选地，细胞首先在Notch配体存在下进行培养，然后在IL-15存在下进行培养。

[0336] HPC可以在Notch配体（例如DLL4）存在下培养至少6小时，至少12小时，至少24小时，至少30小时，至少36小时，至少42小时，至少48小时，至少54小时，至少60小时，至少72小时，至少4天，至少5天，至少6天，至少1周。通常持续72小时到1周。细胞可以在IL-15存在下培养至少6小时，至少12小时，至少24小时，至少30小时，至少36小时，至少42小时，至少48小时，至少54小时，至少60小时，至少72小时，至少4天，至少5天，至少6天，至少1周，至少2周，至少3周或更长时间，直到产生所需数量的NK细胞。例如，在IL-15中的培养步骤的持续时间可以是1周或更长时间，7至9天或约2周。

[0337] 或者，可以根据细胞传代的次数来测量这些持续时间。例如，至少一代，至少两代，至少三代，至少四代，至少五代，至少十代，至少20代，至少30代，至少40代或更多的细胞传代（体内或离体或体外培养）。

[0338] 暴露于Notch配体和IL-15的持续时间是独立的，并且Notch培养的任何持续时间都可以与IL-15培养的任何持续时间结合使用。在一些优选的实施方案中，Notch暴露/培养的持续时间为72小时至1周，而IL-15暴露/培养的持续时间为1周（或更长时间）。

[0339] 通常，IL-7，Flt3L和/或SCF与Notch配体一起使用。在一些优选的实施方案中，在IL-7，Flt3L和SCF以及Notch配体的存在下培养HPC。

[0340] 本发明的方法（包括和不包括使HPC与Notch配体接触的步骤两者）可以进一步包括使HPC与导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物接触的步骤，从而引起E4bp4活性增加，如本文所述。任选地，如本文所述，E4bp4的翻译后修饰的改变是E4bp4的SUMO化和/或磷酸化的降低。在一些优选的实施方案中，导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物：在E4bp4的残基K10，K116，K219，K337和/或K394中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少SUMO化；和/或在E4bp4的残基S286，S301和/或S454中的一个或多个或与其对应的残基或其任何组合处减少磷酸化。

[0341] 可以使用任何合适浓度的本发明化合物，只要其如本文所述增加E4bp4的活性并且具有扩增NK细胞群的效用。作为非限制性实例，在本发明的任何方面，导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物可以以约0.1至约20 μ M，约0.1至约15 μ M，约0.5至约15 μ M，约0.5至约14 μ M，约0.5至约12 μ M，约0.5至约11 μ M或约0.5至约10 μ M，例如约5至约10 μ M的最终浓度使用。在一些优选的实施方案中，导致E4bp4的翻译后修饰改变的化合物可以以约0.5至约5 μ M，更优选约0.5至约2 μ M，甚至更优选约0.5至约1 μ M的最终浓度使用。

[0342] 如本文所述，REV-ERB抑制剂化合物，Notch配体和/或改变E4bp4翻译后修饰的化

合物可以同时、单独或顺序使用。

[0343] REV-ERB抑制剂化合物,Notch配体和/或改变E4bp4翻译后修饰的化合物中的每一种都可以独立用作单一治疗或应用,或用于多种治疗或应用(在本文所述的体外,离体或体内方法中)。对于多种应用,可以使用至少两种,至少三种个,至少四种,至少五种,至少六种,至少七种,至少八种,至少九种或更多种应用。根据本发明的方法或治疗,可以在任何适当的时间点进行多种应用。作为非限制性实例,本发明的REV-ERB抑制化合物,Notch配体和/或改变E4bp4翻译后修饰的化合物可以分别独立地每天两次,每天一次,每隔一天一次,每三天一次或每周一次应用。通常,当更换培养基时,本发明的REV-ERB抑制化合物,Notch配体和/或改变E4bp4翻译后修饰的化合物可以根据需要独立地应用。

[0344] 本发明的方法可以进一步包括调节(增加或降低)HPC中一种或多种另外的基因和/或蛋白质的表达和/或活性,以增强NK细胞的扩增。该调节可以由本发明的化合物引发,包括与用于抑制REV-ERB活性的本发明相同的化合物。或者,可以使用一种或多种另外的化合物来调节一种或多种另外的基因和/或蛋白质的表达和/或活性。所述调节可以直接或间接发生。间接调节包括由抑制REV-ERB活性的本发明化合物引起的下游效应。

[0345] 在本发明的所有方法中,包含从个体/患者获得的HPC的样品可以是骨髓、脐带血和/或外周血获得的样品。因此,样品可以是脐带或外周血样品,或骨髓样品或活组织检查。样品可以从用本发明方法产生的NK细胞群治疗的个体(即患者)获得。或者,样品得自健康个体。

[0346] 根据本发明,包含HPC的样品是来自个体的任何样品,其包含足够数量的HPC(如本文所述),使得扩增的NK细胞群可通过使该样品与根据本发明的化合物接触而获得。通常,样品包含HSC。优选地,该样品富含HSC,例如本文所述的脐带或外周血样品或骨髓样品或活组织检查。

[0347] 本发明的方法可以导致NK细胞的数量相对于对照增加至少1.5倍、至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍或更多倍。通常,NK细胞的数量与对照相比增加至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少2.6倍、至少2.7倍、至少2.8倍、至少2.9倍、至少3倍或更多倍。

[0348] 本发明的方法可以加速表型成熟NK细胞的产生。换句话说,本发明的方法可以减少获得成熟NK细胞群所花费的时间。该方法的运行时间的减少比本领域已知的用于NK细胞扩增的常规方法更有优势。作为非限制性实例,用于扩增NK细胞的当前临床程序可花费超过两周的时间来产生包含约20%成熟NK细胞的NK细胞群。相反,本发明的方法可以在10天或更短的时间内,优选在一周或更短的时间内获得相等的细胞群。本发明的方法可以获得至少40%成熟NK细胞的群,优选至少45%、至少46%、至少47%、至少48%或至少49%的成熟NK细胞,甚至更优选在三周或更短、20天或更短、19天或更短、18天或更短、17天或更短、16天或更短、15天或更短、两周或更短、13天或更短、或12天或更短时间内获得至少50%成熟NK细胞。优选地,本发明的方法可以在两周或更短时间内获得至少45%成熟NK细胞的群。

[0349] 通常,本发明的任何离体方法包括纯化扩增的NK细胞群的最后步骤。这确保了如本文所述的用于治疗性给药的纯种群。扩增的NK细胞群的纯化可以通过任何适当的方法进行。标准细胞纯化方法是本领域已知的,例如细胞分选,包括荧光活化细胞分选(FACS)和磁

性活化细胞分选 (MACS)。

[0350] 在本发明的一些方法中,包括但不限于涉及Notch配体和REV-ERB抑制化化合物的组合的方法,最终细胞群中NK细胞的百分比可能非常高(通常大于85%,优选大于90%,更优选大于95%,并且可能接近100%)。在这种情况下,可以任选地省略最后的纯化步骤。

[0351] 治疗适应症

[0352] 本发明提供了一种REV-ERB拮抗剂,其通过增加患者中NK细胞的产生而用于治疗方法。

[0353] 用于所述治疗方法的REV-ERB拮抗剂可以是本文所述的任何REV-ERB拮抗剂。通常,用于所述方法的REV-ERB拮抗剂通过降低REV-ERB活性来增加E4bp4表达。

[0354] 通常,所述治疗方法包括将抑制REV-ERB的作用的化合物(如本文所述)给予患者或受试者。

[0355] 本发明还提供了含有抑制REV-ERB作用的化合物和Notch配体的产品,作为组合制剂同时、单独或相继用于通过增加患者体内NK细胞的产生的治疗方法中。

[0356] 用于所述治疗方法的Notch配体可以是如本文所述的任何Notch配体。在一些优选的实施方案中,所述Notch配体是DLL4或其保留DLL4功能的片段。本发明的任何REV-ERB拮抗剂和任何Notch配体都可以组合使用。

[0357] 通常,与所述REV-ERB拮抗剂和Notch配体产品有关的治疗方法包括将所述产品(如本文所述)给予患者或受试者。Notch配体和REV-ERB拮抗剂可以同时、单独或顺序给药。对于单独或顺序给药,可以先给予Notch配体,然后再给予REV-ERB拮抗剂,反之亦然。

[0358] 顺序给药可以意味着两种产品一个接一个地立即给药,或者第二种产品在第一种产品给药后1分钟内、2分钟内、3分钟内、4分钟内、5分钟内、10分钟内、15分钟内、20分钟内、25分钟内、30分钟内、45分钟内、1小时内、或更长时间内给药。

[0359] 单独给药可以意味着第二种产品在第一种产品给药后1小时内、2小时内、3小时内、6小时内、12小时内、24小时内、2天内、3天内、4天内、5天内、6天内、7天内或更长时间内给药。

[0360] 如本文所用,术语“增加NK细胞的数量”和“增加NK细胞的产生”可以理解为是指本发明的化合物引起患者中NK细胞的数量显著增加。可以相对于对照测量NK细胞数量的这种增加(如本文在增加E4bp4表达和抑制REV-ERB活性的上下文中所述)。

[0361] 提及的增加NK细胞的数量和/或增加NK细胞产生可以根据相对于对照的倍数增加来量化。通常,本发明的化合物可以增加NK细胞的数量,或者使NK细胞的产生相对于对照增加至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2倍、至少2.1倍、至少2.2倍、至少2.3倍、至少2.4倍、至少2.5倍、至少3倍或更多倍。

[0362] 或者,提及的增加NK细胞的数量和/或增加NK细胞产生可以理解为表示NK细胞的数量与对照相比增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少100%、至少150%、至少200%、至少300%或更多。通常,NK细胞的数量与对照相比增加至少50%、优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少90%或更多。

[0363] 在一些实施方案中,NK细胞的数量增加和/或NK细胞产生的增加可以根据样品或患者中NK细胞的绝对数量,例如NK细胞的百分比,例如NK细胞在循环淋巴细胞群中的百

分比来定义。例如,本发明的化合物可引起NK数量的增加,导致NK细胞的百分比为至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或更多。

[0364] NK细胞的数量可以通过定量和/或定性分析来确定,并且可以直接或间接测量。可以使用任何适当的技术确定相对于对照的NK细胞的数量。合适的标准技术,例如流式细胞术、FACS和MACS,是本领域已知的。

[0365] NK细胞的数量与对照相比可以增加至少6小时、至少12小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少72小时、至少4天、至少5天、至少6天、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月或更长时间。通常,这是相对于最后一次给予抑制REV-ERB活性的化合物和/或Notch配体来评估的。

[0366] NK细胞的数量可以根据来自患者的样品或培养样品(来自本发明的离体方法)中的NK细胞的总数来定量。

[0367] 在本发明的治疗用途和方法的上下文中,“受试者”或“患者”(该类术语在本文中可互换使用)是将受益于NK细胞的数量增加的任何动物患者。典型的动物患者是哺乳动物,例如灵长类动物。优选地,所述患者是人。

[0368] 因此,本发明提供了通过增加有需要的患者中NK细胞的数量进行治疗的方法,包括给予所述患者治疗有效量的抑制REV-ERB作用的化合物(如本文所述)和Notch配体(如本文所述)。还提供了通过增加有需要的患者中NK细胞的数量进行治疗的方法,包括给予所述患者治疗有效量的抑制REV-ERB作用的化合物(如本文所述)和Notch配体(如本文所述)。

[0369] 另外,本发明提供了抑制REV-ERB作用的化合物在药物制备中的用途。所述药物可增加患者体内NK细胞的数量。另外,本发明提供了抑制REV-ERB作用的化合物和Notch配体在药物制备中的用途。所述药物可增加患者体内NK细胞的数量。

[0370] 本发明的治疗用途或方法可包括将治疗有效量的本发明化合物或产品单独或与其他治疗剂组合给予受试者。

[0371] 如本文所用,术语“治疗”(treatment/treating)包括治疗或预防(preventative/prophylactic)措施。

[0372] 本发明的化合物也可用作预防性疗法。如本文所用,术语“预防”包括预防与可通过增加NK细胞的数量和/或降低该症状的严重性或强度来治疗的疾病或病症相关的症状的发作。术语“预防”包括诱导或提供针对此类疾病或病症(特别是如本文所述的感染性疾病)的保护性免疫。免疫可以使用任何适当的技术来量化,其实例是本领域已知的。

[0373] 可以将本发明的化合物或产品给予已经患有可以通过增加NK细胞的数量来治疗的疾病或病症的患者。例如,所述患者可以怀疑患有如本文所述的传染病或癌症,并且可以显示或不显示所述疾病或病症的症状。当给予此患者时,本发明的化合物或产品可以治愈、延迟、减轻一种或多种症状的严重程度、或改善一种或多种症状,和/或延长受试者超过在没有这种治疗的情况下预期的存活时间。

[0374] 或者,本发明的化合物或产品可以给予最终可能感染特定传染病,或者患上如本文所述疾病或病症的患者,以便治愈、延迟、减轻一种或多种症状的严重程度、或改善一种或多种症状,和/或延长受试者超过在没有这种治疗的情况下预期的存活时间,或者,在传染病的情况下有助于防止该患者传播所述疾病。

[0375] 本发明的治疗和预防性治疗适用于不同年龄的各种不同受试者。在人类的情况下，治疗适用于儿童（例如婴儿、5岁以下儿童、大龄儿童或青少年）和成人。在其他动物受试者（例如哺乳动物如灵长类动物）的情况下，该治疗适用于未成熟受试者和成熟/成人受试者。

[0376] 本发明涉及通过增加患者中NK细胞的数量来有益治疗的任何疾病或病症的治疗。此类疾病和病症包括癌症、传染病（急性和慢性）、自身免疫疾病和与女性不育或妊娠有关的疾病或病症。可根据本发明治疗的传染病包括病毒感染和其他病原体，包括细菌、原生生物、真菌或蠕虫病原体的感染。通常，该病原体是细胞内病原体，其在其生命周期中具有至少一个胞内期。特别关注的感染包括病毒感染和从公共卫生角度来看特别重要的人畜共患感染。可根据本发明治疗的癌症包括膀胱癌、血癌、白血病、骨癌、肠癌、脑肿瘤、乳腺癌、肾癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌和子宫癌。可根据本发明治疗的自身免疫疾病包括系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化和肥胖诱导的胰岛素抵抗。如本文所用，术语与女性不育或妊娠有关的疾病或病症包括但不限于胎儿生长受限、早产、子宫血管重塑和先兆子痫的缺陷。

[0377] 本发明的化合物或产品可以与一种或多种另外的治疗剂或治疗组合使用，其通常可以选自对待治疗的疾病或病症的常规治疗。作为非限制性实例，如果本发明的化合物或产品用于治疗癌症，例如肺癌，则所述化合物或产物可与肺癌的常规治疗组合使用，例如放射治疗、化疗或手术。当与一种或多种另外的治疗剂或治疗组合使用时，本发明的化合物或产品可以在给予一种或多种另外的治疗剂或治疗之前、同时或之后给予。

[0378] 在一些优选的实施方案中，本发明的化合物或产品与抗体介导的免疫疗法组合使用。抗体介导的免疫疗法涉及向患者给予抗体以靶向疾病特异性抗原。此类抗体可用于增加NK细胞的特异性并杀灭NK细胞的活性，NK细胞表达IgG抗体Fc区域的受体。此类Fc受体的活化导致NK细胞活化，导致活化的NK细胞分泌细胞因子并释放细胞毒颗粒，导致表达疾病抗原的细胞裂解。此组合治疗特别优选用于治疗癌症（使用针对肿瘤特异性抗原的抗体）。用于免疫疗法的任何抗体可以与本发明的化合物组合使用。此类抗体的非限制性实例包括抗CD20 mAb（非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞淋巴瘤）、抗神经节苷脂D2（抗GD2）mAb（神经母细胞瘤、黑色素瘤）、抗人表皮生长因子（抗-HER2）mAb（乳腺癌和胃癌）、抗表皮生长因子受体（抗EGFR）mAb（结肠直肠癌和头颈癌）。

[0379] 在其他方面，本发明提供了扩增的NK细胞群（如本文所述）在本文所述的治疗用途或方法中的用途。本文关于本发明化合物或产品的治疗适应症的任何和所有公开内容可同等且独立地应用于本发明的扩增的NK细胞群的治疗应用。作为非限制性实例，本发明提供了扩增的NK细胞群（如本文所述）用于治疗方法，例如治疗癌症、传染病、自身免疫性疾病或与女性不育或怀孕有关的疾病或病症。作为另一个非限制性实例，本发明提供了通过增加有需要的患者中NK细胞的数量进行治疗的方法，包括给予所述患者治疗有效量的扩增的NK细胞群。

[0380] 药物组合物和制剂

[0381] 本文所述的“化合物”和“产品”可包含在本文中的“治疗性/预防性组合物”、“制剂”或“药物”中。

[0382] 除药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂外，本发明的化合物或扩增的NK细胞

群(如上所定义)还可以组合或给予。或者或另外,本发明的化合物或扩增的NK细胞群可进一步与盐、赋形剂、稀释剂、佐剂、免疫调节剂和/或抗微生物化合物中的一种或多种组合。

[0383] 式(I)的化合物可以是盐的形式,特别是药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与无机酸(例如盐酸或磷酸)或与有机酸(例如乙酸、草酸、酒石酸、马来酸等)形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱,例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因,等等。

[0384] 免疫原性组合物、治疗性制剂、药物和预防性制剂的给药通常通过常规途径,例如静脉内、皮下、腹膜内、或粘膜途径。给药可以通过肠胃外注射,例如皮下、皮内或肌肉内注射。例如,包含本发明的抗体或扩增的NK细胞群的制剂可以特别适于静脉内、肌肉内、皮内或皮下给药。小分子REV-ERB抑制剂的给药可以是注射,例如静脉内、肌肉内、皮内或皮下注射,或通过口服给药(分子量小于500Da的小分子,通常表现出口服生物利用度)。

[0385] 因此,本发明的免疫原性组合物、治疗性制剂、药物和预防性制剂可以制备成注射剂,可以是液体溶液或悬浮液。也可制备适于在注射前溶解或悬浮于液体中的固体形式。该制剂也可以被乳化,或将肽包封在脂质体或微胶囊中。

[0386] 活性免疫原性成分(例如本发明的化合物或扩增的NK细胞群)通常与赋形剂混合,赋形剂是药学上可接受的并且与活性成分相容。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要,疫苗可含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、和/或增强疫苗有效性的佐剂。

[0387] 通常,载体是药学上可接受的载体。药学上可接受的载体的非限制性实例包括水、盐水和磷酸盐缓冲盐水。然而,在一些实施方案中,当组合物包含本发明的化合物时,其可以是冻干形式,在这种情况下,其可以包括稳定剂,例如BSA。在一些实施方案中,可能需要用防腐剂(例如硫柳汞或叠氮化钠)配制组合物,以促进长期储存。

[0388] 可能有效的其他佐剂的实例包括但不限于:弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA)、皂苷、皂苷的纯化提取物级分如Quil A、皂苷的衍生物如QS-21、基于皂苷的脂质颗粒如ISCOM/ISCOMATRIX、大肠杆菌热不稳定毒素(LT)突变体如LTK63和/或LTK72、氢氧化铝、N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称为去甲-MDP)、N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE)和RIBI,其含有从细菌、单磷酸脂质A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架中提取的三种组分(MPL+TDM+CWS)于2%角鲨烯/吐温80乳液,Novartis开发的MF59制剂,以及GSK Biologicals(Rixensart,Belgium)开发的AS02、AS01、AS03和AS04辅助制剂。

[0389] 缓冲剂的实例包括但不限于琥珀酸钠(pH6.5)和磷酸盐缓冲盐水(PBS;pH6.5和7.5)。

[0390] 适用于其他给药方式的其他制剂包括栓剂,和(在一些情况下)适合于作为气雾剂分布的口服制剂或制剂。对于栓剂,传统的粘合剂和载体可包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;此类栓剂可以由含有0.5%-10%,优选1%-2%的活性成分的混合物形成。

[0391] 口服制剂包括通常使用的赋形剂,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物呈溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式。

[0392] 给予本发明化合物或产品的剂量范围是产生所需治疗效果的剂量范围。应当理解,所需的剂量范围取决于化合物的确切性质、给药途径、制剂性质、患者年龄、患者病症的性质、程度或严重程度,禁忌症(如果有的话),以及主治医师的判断。可以使用标准经验惯例调整这些剂量水平的变化以进行优化。类似地,用于本发明方法特别是离体方法的本发明化合物或产品的剂量可由本领域技术人员容易地确定,并且是产生所需NK细胞的数量增加和/或引发所需NK细胞扩增以产生扩增的NK细胞群的任何剂量。作为非限制性实例,根据本发明的化合物7或11的剂量可产生约2-约20 μ M、约2-约15 μ M、约5-约15 μ M、约5-约14 μ M、约4-约13 μ M、约5-约12 μ M、约5-约11 μ M、或优选约5-约10 μ M的最终浓度。

[0393] 本发明还提供了扩增的NK细胞群(如本文所述)在药物制剂中的用途。本文关于本发明化合物的制剂的任何和所有公开内容都可同等且独立地应用于本发明的扩增的NK细胞群的治疗应用。

[0394] 序列表

[0395] SEQ ID NO:1-E4bp4基因序列(X64318.1)

```
1 gcccccttct ttctcctcgt cggcccgaga gcaggaacac gataacgaag gaggcccaac
61 ttcatlcaat aaggagcctg acggatttat cccagacggt agaacaaaag gaagaatat
121 gatggatttt aaaccagagt ttttaaagag ctgagaata cggggaaatt aattgttct
181 cctacacaca tagatagggt aagggtgttt ctgatgcagc tgagaaaaat gcagaccgtc
241 aaaaaggagc aggcgtctct tgatgccagt agcaatgtgg acaagatgat ggtccttaat
301 tctgctttaa cggaagtgtc agaagactcc acaacagggt aggacgtgct tctcagtga
361 ggaagtgtgg ggaagaacaa atcttctgca tgtcggagga aacgggaatt cattcctgat
[0396] 421 gaaaagaaag atgctatgta ttgggaaaaa aggcggaaaa ataataagc tgccaaaaga
481 tctcgtgaga agcgtcgact gaatgacctg gtttagaga acaaactaat tgcactggga
541 gaagaaaacg ccactttaa agctgagctg ctttactaa aattaaagt ttggtttaatt
601 agtccacag catatgctca agagattcag aaactcagta attctacagc tgtgtacttt
661 caagattacc agacttcaa atccaatgtg agttcatttg tggacgagca cgaaccctcg
721 atgggtgcaa gtagttgtat ttctgtcatt aaacactctc cacaagctc gctgtccgat
781 gtttcagaag tgtcctcagt agaacacacg caggagagct ctgtgcaggg aagctgcaga
```

841 agtctgaaa acaagttcca gattatcaag caagagccga tggattaga gagctacaca
901 agggagccaa gagatgaccg aggtctttac acagcgtcca tctatcaaaa ctatatggg
961 aattctttct ctgggtactc acactctccc ccactactgc aagtcaaccg atcctccagc
1021 aactccccga gaacgtcgga aactgatgat ggtgtggtag gaaagtcac tgatggagaa
1081 gacgagcaac aggtcccaaa gggcccccac cattctccag ttgaactcaa gcatgtgcat
1141 gcaactgtgg ttaaagttcc agaagtgaat tcctctgcct tgccacacaa gctccggatc
1201 aaagccaaag ccatgcagat caaagtagaa gcctttgata atgaattga ggccacgcaa
1261 aaactttcct cacctattga catgacatct aaaagacatt tcgaactcga aaagcatagt
1321 gcccgaagta tggtagattc ttctcttact cctttctcag tgcaagtgac taacattcaa
[0397] 1381 gattggtctc tcaaatcgga gcactggcat caaaaagaac tgagtggcaa aactcagaat
1441 agttcaaaa ctggagtgtg tgaatgaaa gacagtggct acaaagtttc tgaccagag
1501 aactgtatt tgaagcaggg gatagcaaac ttatctgcag aggtgtctc actcaagaga
1561 cttatagcca cacaaccaat ctctgctca gactctgggt aaattactac tgagtaagag
1621 ctgggcattt agaaagatgt catttgaat agagcagtcc atttgtatt atgctgaatt
1681 ttcactggac ctgtgatgtc attcactgt gatgtgcaca tgtgtctgt ttggtgtctt
1741 tttgtgcaca gattatgatg aagattagat tgtgttatca ctctgcctgt gtatagtcag
1801 atagtcatat gcgtaaggct gtatatatta agnttttatt ttgtgttc tattataaag
1861 tgtgtaagtt accagtttca ataaaggatt ggtgacaaac acagaaaaaa aaaaaaaaaa
1921 aaa

[0398] SEQ ID NO:2-E4bp4氨基酸序列 (X64318.1)

[0399] MQLRKMQTVKKEQASLDASSNVDKMMVLNSALTEVSEDSTTGEDVLLSEGSVGKNKSSACRRKREFIP
DEKKDAMYWEKRRKNNEAAKRSREKRRRLNDLVLENKLIALGEENATLKAELLSLKLKFLISSTAYAQEIQLSNS
TAVYFQDYQTSKSNVSSFVDEHEPSMVSSSCISVIKHSPQSSLSDVSEVSSVEHTQESSVQGSCRSPENKFQIIKQ
EPMELESYTREPRDDRGSYTASIYQNYMGNSFSGYSHSPPLLQVNRSSNSPRTSETDDGVVGKSSDGEDEQQVPK
GPIHSPVELKHVHATVVKVPEVNSSALPHKLRIKAKAMQIKVEAFDNEFEATQKLSSPIDMTSKRHFLEKHSAPS
MVHSSLTPFSVQVTNIQDWSLKSEHWHQKELSGKTQNSFKTGVVEMKDSGYKVSDPENLYLKQGIANLSAEVVS
LKRL IATQPISASDSG

[0400] SEQ ID NO:3-REV-ERB α 基因序列 (NM_021724.4)

[0401]

1 gggcacgagg cgctccctgg gatcacatgg tacctgctcc agtgccgcgt gcggcccggg
61 aaccctgggc tgctggcgcc tgcgcagagc cctctgtccc agggaaaggc tcgggcaaaa
121 ggcggtgag attggcagag tgaaatatta ctgccgaggg aacgtagcag ggcacacgtc
181 tcgcctcttt gcgactcggg gccccgtttc tccccatcac ctacttactt cctgggtgca
241 acctctcttc ctctgggact ttgcaccgg gagctccaga ttgccaccc cgcagcgctg
301 cggagccggc aggagaggc acccgtaca ctgcagagac cgcacctcc ttgtacctt
361 ctagccagaa ctactgcagg ctgattcccc ctacacactc tctctgtct tccatgcaa
421 agcagaactc cgttgctca acgtccaacc cttctgcagg gctgcagtcc ggccacccca
481 agacctgtct gcagggtgct tcggatcctg atcgtgagtc gcgggggtcca ctccccgcc
541 ttagccagtg cccagggggc aacagcggcg atcgcaacct ctagtgtgag tcaagggtcca
601 gtttgatga ccgctctcag ctggtgaaga catgacgacc ctggactcca acaacaacac
661 aggtggcgtc atcacctaca ttggctccag tggctcctcc ccaagccgca ccagccctga
721 atccctctat agtgacaact ccaatggcag ctccagtcc ctgacccaag gctgtccac
781 ctacttccca ccatccccc ctggctccct caccacagac ccggctcgct ccttggggag
841 cattccacc agcctgagtg atgacggctc ccctcttcc tcatcttct cgtcgtcatc
901 ctctctctcc ttctataatg ggagcccccc tgggagtcta caagtggcca tggaggacag
961 cagccgagtg tccccagca agagcaccag caacatcacc aagctgaatg gcatggtgtt
1021 actgtgtaaa gtgtgtggg acgttgctc gggcttccac tacggtgtgc acgcctgca
1081 gggctgcaag ggcttttcc gtcggagcat ccagcagaac atccagtaca aaagggtgtt
1141 gaagaatgag aattgtcca tcgtccgcat caatcgcaac cgctgccagc aatgtcgctt
1201 caagaagtgt ctctctgtgg gcatgtctcg agacgctgtg cgtttgggc gcatcccaa
1261 acgagagaag cagcggatgc ttgtgagat gcagagtgcc atgaacctgg ccaacaacca
1321 gttgagcagc cagtggccgc tggagacttc acccaccag caccacccc caggcccat
1381 gggcccctcg ccaccccctg ctccggctcc ctaccccctg gtgggcttct ccagtttcc
1441 acaacagctg acgcctccca gatcccaaag ccctgagccc acagtggagg atgtgatc
1501 ccaggtggcc cgggcccac gagagatctt cacctacgcc catgacaagc tgggcagctc
1561 acctggcaac ttcaatgcca accatgcatc aggtagccct ccagccacca cccacatcg
1621 ctgggaaaat cagggtgccc cacctgcccc caatgacaac aacacctgg ctgccagcg
1681 tcataacgag gccctaaatg gtctgcgcca ggctccctcc tctacccctc ccacctggcc
1741 tctggccct gcacaccaca gctgccacca gtccaacagc aacgggcacc gtctatgccc

1801 caccacgtg tatgcagccc cagaaggcaa ggcacctgcc aacagtcccc ggcagggcaa
1861 ctcaaagaat gttctgctgg catgtctat gaacatgtac ccgcatggac gcagtgggcg
1921 aacggtgcag gagatctggg aggattctc catgagcttc acgcccgtg tgcgggaggt
1981 ggtagagttt gccaaacaca tcccgggctt ccgtgacctt tctcagcatg accaagtcac
2041 cctgcttaag gctggcacct ttgaggtgct gatggtgcgc ttgcttcgt tgtcaacgt
2101 gaaggaccag acagtgatgt tctaagccg caccacctac agcctgcagg agcttggtgc
2161 catgggcatg ggagacctgc tcagtccat gttcgacttc agcgagaagc tcaactccct
2221 ggcgcttacc gaggaggagc tgggcctctt caccgcggtg gtgcttgtct ctgcagaccg
[0402] 2281 ctggggcatg gagaattccg ctccggtgga gcagctccag gagacgctgc tgcgggctct
2341 tggggtctg gtgctgaaga accggccctt ggagacttcc cgcttcacca agctgctgct
2401 caagctgccg gacctgcgga cctgaacaa catgcattcc gagaagctgc tgccttccg
2461 ggtggacgcc cagtacccg cccggccggc ctctgccgc tggcccttg tacagaatcg
2521 aactctgcac ttctcttcc ttacgagac gaaaaggaaa agcaaaccag aatcttatt
2581 atattgttat aaaatattcc aagatgagcc tctggcccc tgagccttct tgtaaatacc
2641 tgcctccctc cccatcacc gaactcccc tctccccta tttaaaccac tctgtctcc
2701 ccacaaccct cccctggccc tctgattgt tctgttctg tctcaaatcc aatagttcac
2761 agctgagctg gctcaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa

[0403] SEQ ID NO:4-REV-ERB α 氨基酸序列(NM_021724.4)

[0404] MTTLDNNNTGGVITYIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPTGSLTQDPARSFG
SIPPSLSDDGSPSSSSSSSSSSSYNGSPGSLQVAMEDSSRVSPSKSTSNITKLNGMVLLCKVCGDVASGFHYGV
HACEGCKGFFRRSIQQNIQYKRCLKNENCSIVRINRNRCCQCRFKKCLSVGMSRDAVRFRIPKREKQRMLAEMQSA
MNLANNQLSSQCPLETSPTQHPTPGPMGPSPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPRSPSPEPTVEDVISQVARAHREIF
TYAHDKLGSSPGNFNANHASGSPATTPHRWENQGCPPAPNDNNTLAAQRHNEALNGLRQAPSSYPPTWPPGPAHHS
CHQSNSNGHRLCPHVYAAPEGKAPANSRQGNNSKNVLLACPMNMPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVREVVEFA
KHIPGFRDLSQHDQVTLLKAGTFEVL MVRFASLFNVKDQTMFLSRTTYSLQELGAMMGDLLSAMFDFSEKLNLSLA
LTEEELGLFTAVVLVSADRSKMENSASVEQLQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLKLPDLRTLNNMHSEKLLS
FRVDAQ

[0405] SEQ ID NO:5-REV-ERB β 基因序列(AB307693.1)

1 atggaggtga atgcaggagg tgtgattgcc tatatcagtt cttccagctc agcctcaagc

[0406] 61 cctgcctctt gtcacagtga gggttctgag aatagttcc agtctcctc ctctctgtt

121 ccattcttc caaatagctc taattctgat accaatggta atcccaagaa tggatgctc

181 gccaatattg aaggcatctt gaagaatgat cgaatagatt gttctatgaa aacaagcaaa
241 tcgagtgcac ctgggatgac aaaaaatcat agtgggtgta caaaatttag tggcatggtt
301 ctactgtgta aagtctgtgg ggatgtggcg tcaggattcc actatggagt tcatgcttgc
361 gaaggctgta agggtttctt tcggagaagt attcaacaaa acatccagta caagaagtgc
421 ctgaagaatg aaaactgttc tataatgaga atgaatagga acagatgtca gcaatgtcgc
481 ttcaaaaagt gtctgtctgt tggaatgtca agagatgctg ttcggtttgg tcgtattcct
541 aagcgtgaaa aacagaggat gctaattgaa atgcaaagtg caatgaagac catgatgaac
601 agccagtcca gtggctactt gcaaaatgac acattagtag aacatcatga acagacagcc
661 ttgccagccc aggaacagct gcgacccaag ccccaactgg agcaagaaaa catcaaaagc
721 tcttctctc catcttctga tttgcaaag gaagaagtga ttggcatggg gaccagagct
781 cacaaggata ccttatgta taatcaagag cagcaagaaa actcagctga gagcatgcag
841 cccagagag gagaacggat tccaagaac atggagcaat ataatttaa tcatgatcat
901 tgcggcaatg ggcttagcag ccattttccc tgtagtgaga gccagcagca tctcaatgga
961 cagttcaaa ggaggaatat aatgcattac ccanatggcc atgccattg tattgcaaat
1021 ggacattgta tgaacttct caatgcttat actcaaagag tatgtgatag agttccgata
1081 gatggatttt ctcaaatga gaacaagaat agttacctgt gcaacactgg aggaagaatg
1141 catctggtt gtccaatgag taagtctcca tatgtggatc ctcataaatc aggacatgaa
1201 atctgggaag aatttctgat gagcttact ccagcagtga aagaagtgg ggaatttga
1261 aagcgtattc ctgggttcag agatctctc cagcatgacc aggtcaacct tttaaaggct
1321 gggactttg aggttttaat ggtacgggtc gcatcattat ttgatgcaa ggaacgtact
1381 gtcaccttt taagtggaaa gaaatatagt gtggatgatt tacactcaat gggagcaggg
1441 gatctgctaa actctatgt tgaatttagt gagaagctaa atgccctcca acttagtgat
1501 gaagagatga gttgtttac agctgttgc ctggtatctg cagatcgatc tggaatagaa
1561 aacgtcaact ctgtggaggc ttgcaggaa actctcattc gtgcactaag gaccttaata
1621 atgaaaaacc atccaatga ggcctctatt ttacaaaac tgcttctaaa gttgccagat
1681 ctctgatctt taaacaacat gcactctgag gagctcttgg ctttaaagt tcacccttaa

[0408] SEQ ID NO:6-REV-ERB β 氨基酸序列 (AB307693.1)

[0409] MEVNAGGVIAYISSSSASSPASCHSEGSSENSFQSSSSVPSSPNSSNSTNGNPKNGDLANIEGILKN
DRIDCSMKTSKSSAPGMTKNHSGVTKFSGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKKCLKNENC
SIMRMNRNRCQQCRFKKCLSVGMSRDAVRFGRIPKREKQRMLIEMQSAMKTMNSQFSGHLQNDTLVEHHEQTALPA
QEQLRPKPQLEQENIKSSSPSSDFAKEEVIGMVTRAHKDTFMYNQEQQENSAESMQPQRGERIPKNMEQYNLNHDH
CGNGLSSHFPCESESQQHLNGQFKGRNIMHYPXGHAICIANGHCMNFSNAYTQRVCDRVPIDGFSQENENKNSYLCNTG
GRMHLVCPMSKSPYVDPHKSHEIWEFEFSMSFTPAVKEVVEFAKRIPGFRDLSQHDQVNLLKAGTFEVLVVR

[0410] ASLFDKERTVTFLSGKKYSVDDLHSMGAGDLLNSMFSEKLNALQLSDEEMSLFTAVVLVSADRSI
ENVNSVEALQETLIRALRTLIMKNHPNEASIFTKLLKLPDLRSLNMHSEELLAFKVH

[0411] SEQ ID NO:7- δ 样配体4基因序列 (AF253468.1)

1 atggcgagcag cgtcccggag cgcctctggc tggcgctac tgctgctggt ggcactttgg
61 cagcagcgcg cggccggctc cggcgtctc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag
121 cgcggcgtac tggccagtgg gcggccttc gagcccggct gccggacttt cttccgctc
181 tgccttaagc acttcaggc ggtcgtctc cccggaccct gcacttcgg gaccgtctcc
241 acgccggtat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc
301 aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta cctctcgtc catcatcga
361 gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc
421 agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa
481 accagcacc tcacaaggct gcgtactct taccgggtca tctgcagtga caactactat
541 ggagacaact gctccgcct gtgaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc
601 cagccagatg gcaactgtc ctgctgccc ggttgactg ggaatattg ccaacagcct
661 atctgtctt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc
721 tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc
781 cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgtt
841 tgtgaccaag atctcaacta ctgcaccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc
[0412] 901 tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtgcc caggctacac tgggtggagc
961 tgtgagctgg agtcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag
1021 gaccaggagg atggctacca ctgctgtgt cctccgggt actatggcct gcatttgaa
1081 cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcctaatg ggggtcctg ccgggagcgc
1141 aaccaggggg ccaactatgc ttgtaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcag
1201 aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagt cctgaaccga
1261 ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac
1321 gtcagcgact gtgcccgtaa ccctgcgcc cagggtggca ctgcatga cctggagaat
1381 gggctcatgt gcacctgcc tgcggcttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc
1441 atcgatgcct gtgctcgag tccctgttc aacagggcca cctgtacac cgacctctc
1501 acagacacct ttgttgcaa ctgccctat ggcttggg gcagccgtg cgagtcccc
1561 gtgggcttc cgccagctt ccctgggtg gccgtctgc tgggtgtgg gctggcagt
1621 ctgctgtac tgctgggcat ggtggcagt gctgtcggc agctgcggct tcgacggccg
1681 gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact tcagaagga caacctgatt
1741 cctgccgcc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtga ctgtggcctg
1801 gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattg actataatct ggccccagg
1861 cccctggggc gggggacat gccaggaaag ttccccaca gtgacaagag ctaggagag
[0413] 1921 aaggcgccac tgcggttaca cagtgaagc ccagagtgc ggatatcagc gatatgctc
1981 ccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatcagc aggagaggaa tgaatgtgc
2041 attgccacgg aggtataa

[0414] SEQ ID NO:8- δ 样配体4氨基酸配体(AF253468.1)

[0415] MAAASRSASGWALLLLVALWQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPGCRTFFRVCLKHFQAVV

SPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLI IEAWHAPGDDLREALPPDALISKIAIQ
GSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNYYGDNCSRLCKKRNDFHGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICL
SGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATC
SNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDNPNCRNGGSKDQEDGYHCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNNGSC
RERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGSPSRMCRCRPGFTGTCELVSDCARNPCAHHGT
CHDLENGLMCTCPAGFSGRRCVRSIDACASSPCFNRTATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFVPVGLPPSFPWVA
VSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLIPAAQLKNTNQKKELEVDCGLDKSNCCKQ
QNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPKSDKSLGEKAPLRLHSEKPECRISAIACSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

[0416] SEQ ID NO:9-人Notch1 cDNA序列(CR457221.1)

1 atgtcaaaca tgagatgtgt ggactgtggc acttgcctgg gtcacacacg gaggcacacct
61 acccttttct ggggaaagac actgcctggg ctgaccccgg tggcggcccc agcacctcag
121 cctgcacagt gtccccagg ttccgaagaa gatgctccag caacacagcc tgggccccag
181 ctgcgaggac cggaccccc gtgggctccc gtgtttgta ggagacttc cagagccggg
[0417] 241 cacattgagc tgtcaacgc cgtgggctgc gtcctttgt cctgtcccc cagccctggc
301 agggggcatg cggtcgggca ggggctggag ggaggcgggg gctgcccttg ggccaccct
361 cctagtttg gaggagcaga ttttgcaat accaagtata gcctatggca gaaaaaatgt
421 ctttaa

[0418] SEQ ID NO:10-人Notch1蛋白序列(CR457221.1)

[0419] MSNMRCVDCGTCLGHTRRHPTLFWGKTLPLTPVAAPAPQPAQCPPGSEEDAPATQPGPQLAGPDPPWA
PVFCRRLARAGHIELCNAVGCVLWSCPRSPGRGHAVGQGLEGGGGCPWATPPSLGGADFCNTKYSLSWQKKCL

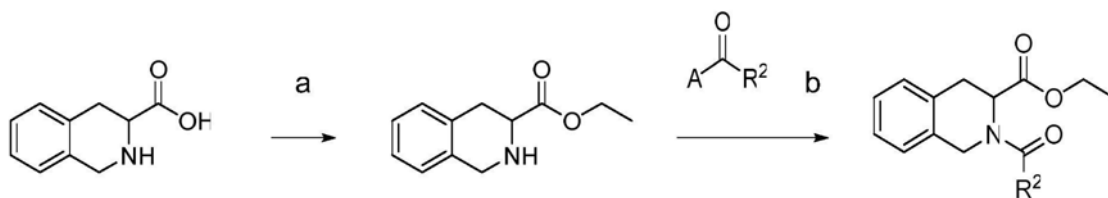
实施例

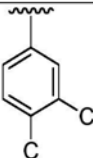
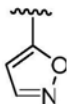
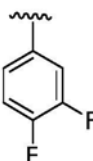
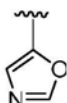
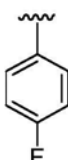
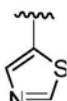
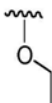
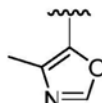
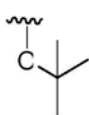
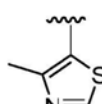
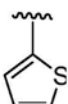
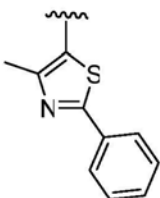
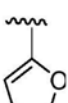
[0420] 通过以下实施例将进一步阐明本发明,这些实施例仅是本发明的示例,绝非限制性的。

[0421] 实施例1-设计新化合物

[0422] 在保持核SR8278骨架和酯取代基不变的情况下,我们首先设计了化合物1-3,其中噻吩环用取代的苯环替换。这些化合物的分析和表征推动了后续化合物的设计:具有烷氧基链的4-5,具有简单杂芳族5元环的6-10和具有受阻杂芳族5元环的11-13。这些化合物的合成及其特征在下文的相关章节中介绍。所有化合物均作为外消旋体进行了合成和研究(与关于SR8278及其衍生物的文献一致)。

[0423] 方案1:化合物1-13的一般合成:

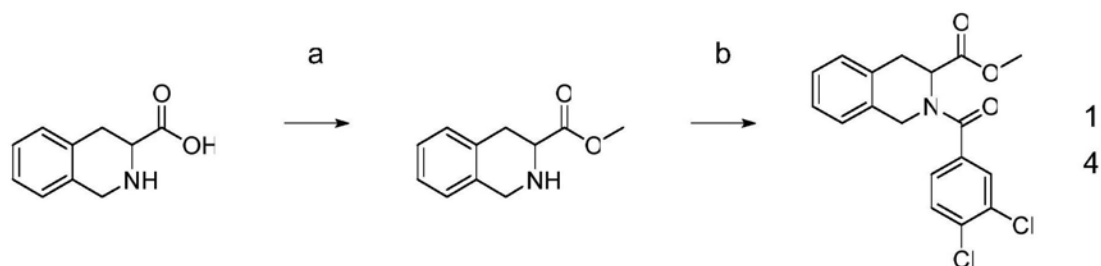


化合物		R ²	化合物		R ²
[0424]	1		8		
	2		9		
	3		10		
	4		11		
	5		12		
[0425]	6		13		
	7				

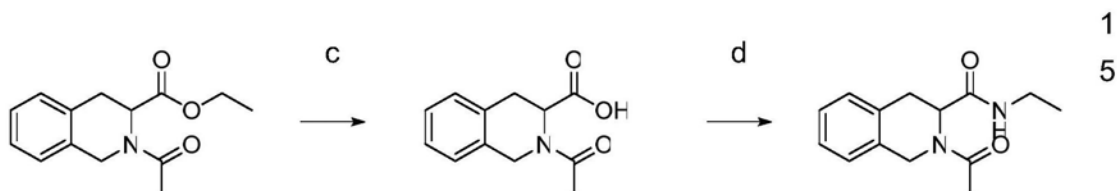
[0426] 反应条件：(a) 乙醇，浓硫酸，回流，过夜。(b) 对于A=C1, TEA, DCM, 室温，过夜；对于A=OH, EDC, HOBT, TEA, DMF, 室温，过夜。

[0427] 按照与制备1所描述的步骤类似的步骤，通过使用硫酸作为催化剂，在甲醇(MeOH)中将羧酸酯化，并使用TEA作为碱，使中间体16与3,4-二氯苯甲酰氯缩合，得到乙酯14。从1开始制备化合物15。如前所述，使用碱性条件进行了酯基的水解，并通过EDC/HOBt与乙醇胺偶联实现了酰胺基的引入。

[0428] 方案2：化合物14和15的合成



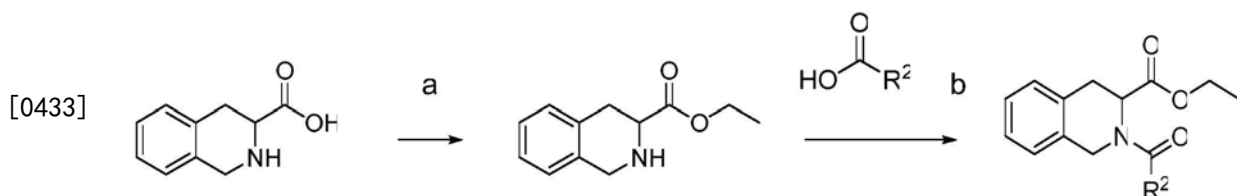
[0429]



[0430] 合成条件: (a) MeOH, H_2SO_4 , 回流过夜; (b) 3,4-二氯苯甲酰氯, TEA, DMC, 室温, 过夜; (c) NaOH 2.0M, MeOH: H_2O (80:20), 室温, 4小时; (d) 乙胺, EDC, HOBT, TEA, DMF, 室温, 过夜。

[0431] 根据方案3获得了化合物16至63和76。

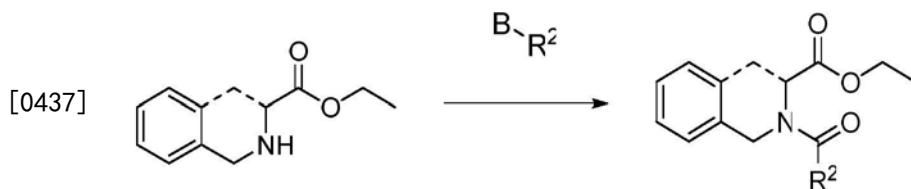
[0432] 方案3: 化合物16至63和76的合成:



[0434] 反应条件: (a) 乙醇, 浓硫酸, 回流, 16小时。 (b) Et_3N , DIPEA, THF, 室温, 16小时。

[0435] 根据方案4获得了化合物64至75。

[0436] 方案4: 化合物64至75的一般合成: .



[0438] 反应条件: 对于 $\text{B} = -\text{OC}(=\text{O})\text{Cl}$ 或 $-\text{NCO}$ (即对于64至66和70), DCM, TEA, 室温, 18小时; 对于 $\text{B} = -\text{COOH}$ (即对于67、69、71、72和75), EDC, HOBT, TEA, DMF, 室温, 18小时; 对于 $\text{B} = -\text{C}(=\text{O})\text{H}$ (即对于68、73和74), AcOH, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCE或DCM, 室温, 72小时。

[0439] 1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 中间体(Int.)

[0440] 在室温 (rt) 和 N_2 气氛下, 用浓硫酸 (1.00mL, 7.15mmol) 处理1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸 (1.00g, 4.68mmol) 于无水乙醇 (25mL) 中的溶液。将反应混合物在 **4Å** 分子筛的存在下回流搅拌18小时。真空除去溶剂, 并将残余物重悬于乙酸乙酯 (EtOAc) (30mL) 中, 并用饱和 NaHCO_3 (水溶液, $3 \times 15\text{mL}$) 和盐水 ($3 \times 15\text{mL}$) 洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并减压蒸发。粗产物通过色谱法 (正己烷与 EtOAc 之比, 3:1, R_f : 0.51) 纯化, 得到 Int., 为黄色油状物 (650mg, 67%)。 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 7.20-7.12 (m, 3H, Ar), 7.09-7.04 (m, 1H, Ar), 4.26 (q, J = 7.1, 2H, H_2), 4.17 (d, J = 16.2, 1H, H_{12i}), 4.11 (d, J = 16.2, 1H, H_{12ii}), 3.76 (dd, J = 10.2, 4.6, 1H, H_4), 3.12 (dd, J = 18.0, 16.2, 1H, H_{5i}), 2.98 (dd, J = 18.0, 16.2, 1H, H_{5ii}), 2.13 (s, 1H, NH), 1.33

(t, J=7.1, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ (CDCl_3) δ =173.21 (C_3), 135.90, 133.82, 129.34, 126.38, 126.26, 126.20, 60.68 (C_2), 55.55 (C_4), 46.97 (C_{12}), 31.50 (C_5), 14.57 (C_1); LC-MS (20-98% MeCN) 室温=1.73min; m/z 206.29 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]+\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 的计算值: 206.1181; 实测值: 206.1175。

[0441] 2-(3,4-二氯苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉3-甲酸乙酯, 化合物1。

[0442] 在0°和在N₂气氛下, 用TEA (0.20mL, 1.4mmol) 处理Int. (200mg, 0.964mmol) 于DCM (20mL) 中的溶液。向该混合物中逐滴加入3,4-二氯苯甲酰氯 (202mg, 0.964mmol) 于DCM (5mL) 中的溶液, 并使反应混合物升温至室温, 过夜。真空除去溶剂, 并将残余物重悬于乙酸乙酯 (EtOAc) (30mL) 中, 并用1.0M HCl (2×15mL), NaHCO₃ (3×15mL) 和盐水 (3×15mL) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤, 并减压蒸发。通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 5:1, R_f:0.40) 纯化粗产物, 得到1, 为白色固体 (225mg; 产率: 62%)。旋转异构体比率为5.4:4, 由室温下¹H NMR积分获得。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 旋转异构体A δ =7.81 (d, J=8.2, 1H, H18), 7.72 (s, 1H, H15), 7.47 (d, J=8.2, 1H, H19), 7.33-7.09 (m, 4H, H7-10), 5.12 (t, J=5.3, 1H, H4), 4.59 (d, J=15.6, 1H, H12i), 4.52 (d, J=15.6, 1H, H12ii), 4.06 (q, J=7.0, 2H, H2), 3.28 (m, 2H, H5), 1.11 (t, J=7.0, 3H, H1)。旋转异构体B δ =7.76 (d, J=8.2, 1H, H18), 7.67 (s, 1H, H15), 7.40 (d, J=8.2, 1H, H19), 7.33-7.09 (m, 4H, H7-10), 4.97 (d, J=17.7, 1H, H12i), 4.80 (br, 1H, H4), 4.46 (d, J=17.7, 1H, H12ii), 3.98 (q, J=7.0, 2H, H2), 3.18 (m, 2H, H5), 1.00 (t, J=7.0, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =170.27 (C_3), 170.09 (C_3), 168.56 (C_{13}), 167.76 (C_{13}), 136.38, 136.16, 133.11, 132.75, 132.49, 131.90, 131.61, 131.56, 131.10, 128.94, 128.62, 128.28, 127.81, 127.16, 126.77, 126.66, 126.54, 125.97, 61.20 (C_2), 60.75 (C_2), 56.21 (C_4), 52.72 (C_4), 47.45 (C_{12}), 43.09 (C_{12}), 30.66 (C_5), 30.18 (C_5), 13.95 (C_1), 13.83 (C_1); LC-MS (50-98% MeCN) 室温=7.49min; m/z 378.26 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]+\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ 的计算值: 378.0664; 实测值: 378.0677。

[0443] 2-(3,4-二氟苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉3-甲酸乙酯, 化合物2。

[0444] 根据对于化合物1所述的方法, 使用3,4-二氟苯甲酰氯 (0.30mL, 2.4mmol) 由Int. (500mg, 2.41mmol) 制备化合物2。通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 5:1, R_f:0.37) 纯化粗产物, 得到2, 为浅黄色油状物, 其随时间结晶 (547mg; 产率: 66%)。旋转异构体的比例为5:4, 由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 旋转异构体A δ =7.63-7.05 (m, 8H), 5.09 (t, J=5.3, 1H, H4), 4.58 (d, J=15.6, 1H, H12i), 4.51 (d, J=15.6, 1H, H12ii), 4.04 (q, J=6.9, 2H, H2), 3.25 (dd, J=15.8, 5.9, 2H, H5), 1.09 (t, J=7.0, 3H, H1)。旋转异构体B δ =7.63-7.05 (m, 8H), 4.95 (d, J=17.6, 1H, H12i), 4.78 (br, 1H, H4), 4.42 (d, J=17.7, 1H, H12ii), 3.96 (q, J=7.0, 2H, H2), 3.16 (m, 2H, H5), 0.97 (t, J=7.0, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =170.34 (C_3), 170.09 (C_3), 168.84 (C_{13}), 167.96 (C_{13}), 150.35 (C_{16}), 150.25 (C_{16}), 148.39 (C_{17}), 148.28 (C_{17}), 133.17, 133.00, 132.78, 131.88, 131.65, 129.36, 128.32, 127.84, 127.46, 127.16, 126.66, 126.56, 125.94, 124.42, 123.94, 118.15, 118.01, 116.76, 116.62, 116.41, 116.27, 61.19 (C_2), 60.73 (C_2), 56.24 (C_4), 52.78 (C_4), 47.56 (C_{12}), 43.12 (C_{12}), 30.63 (C_5), 30.21 (C_5), 13.95 (C_1), 13.81 (C_1)。LC-MS (50-98% MeCN) 室温=7.31min; m/z 346.22 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]+\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{F}_2$ 的计算值: 346.1255; 实测值: 346.1264。

[0445] 2-(4-氟苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物3。

[0446] 根据对于化合物1所述的方法,使用4-氟苯甲酰氯(0.19mL,1.6mmol)由Int.(330mg,1.59mmol)制备化合物3。粗产物通过色谱法(正己烷与EtOAc之比,3:1,Rf:0.21),随后将正己烷:EtOAc在Isolera(2-98%EtOAc)上缓慢梯度洗脱而纯化,得到随时间结晶的透明油状化合物3(315mg;产率:61%)。旋转异构体比率为5.4:4,由室温下¹H NMR积分获得。¹H-NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体比率A δ =7.64-7.03(m,8H,Ar),5.15(t,J=4.7,1H,H₄),4.62(d,J=16.0,1H,H_{12i}),4.54(d,J=16.0,1H,H_{12ii}),4.07(q,J=6.7,2H,H₂),3.28(dd,J=15.8,5.9,2H,H₅),1.12(t,J=6.7,3H,H₁)。旋转异构体比率B δ =7.64-7.03(m,8H,Ar),5.01(d,J=17.7,1H,H_{12i}),4.78(br,1H,H₄),4.48(d,J=17.7,1H,H_{12ii}),3.97(q,J=6.7,2H,H₂),3.18(m,2H,H₅),0.99(t,J=6.7,3H,H₁);¹³C/ppm((CD₃)₂SO) δ =170.47(C₃),170.23(C₃),170.14(C₁₃),169.19(C₁₃),133.25,132.86,131.84,129.53,129.11,128.30,127.88,127.14,126.66,125.87,115.76,115.59,61.14(C₂),60.68(C₂),56.33(C₄),52.70(C₄),47.67(C₁₂),43.13(C₁₂),30.75(C₅),30.19(C₅),13.96(C₁),13.82(C₁)。LC-MS(50-98%MeCN)室温=6.42min;m/z 328.21([M+H]⁺);HRMS(m/z):[M+H]⁺+C₁₉H₁₉N₃O₃F的计算值:328.1349;实测值:328.1349。

[0447] 3,4-二氢异喹啉-2,3(1H)-二甲酸二乙酯,化合物4。

[0448] 根据对于化合物1所述的步骤,使用氯甲酸乙酯(0.05mL,0.5mmol)由Int.(110mg,0.530mmol)制备化合物4。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比,3:2,Rf:0.36)纯化粗产物,得到4,为浅黄色油状物(235mg;产率:87%)。旋转异构体的比例为5:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体A δ =7.24-7.07(m,4H,H₇₋₁₀),5.13(dd,J=6.0,3.2,1H,H₄),4.77-4.73(d,J=16.0,2H,H_{12i}),4.57-4.53(d,J=16.0,2H,H_{12ii}),4.21(m,2H,H₁₄),4.07(m,2H,H₂),3.28-3.15(dd,J=38.0,16.0,2H,H₅),1.33(t,J=7.1,3H,H₁₅),1.11(m,3H,H₁)。旋转异构体B δ =7.24-7.07(m,4H,H₇₋₁₀),4.90(m,1H,H₄),4.78-4.74(d,J=16.0,2H,H_{12i}),4.60-4.56(d,J=16.0,2H,H_{12ii}),4.21(m,2H,H₁₄),4.07(m,2H,H₂),3.27-3.13(dd,J=38.0,16.0,2H,H₅),1.25(t,J=7.1,3H,H₁₅),1.11(m,3H,H₁);¹³C/ppm((CD₃)₂SO) δ =167.59(C₃),157.21(C₁₃),144.65,132.04,129.82,127.90,127.13,126.65,68.56,66.62,61.13,53.93(C₄),44.59(C₁₂),31.33(C₅),14.41(C₁₅),14.32(C₁)。LC-MS(20-98%MeCN)室温=10.35min;m/z 278.21([M+H]⁺);HRMS(m/z):[M+H]⁺+C₁₅H₂₀N₄O₄的计算值:278.1392;实测值:278.1396。

[0449] 3,4-二氢异喹啉-2,3(1H)-二甲酸2-叔丁基3-乙基酯,化合物5。

[0450] 使用二碳酸二叔丁酯(Boc酐)(252mg,1.15mmol)和TEA(0.20mL,1.5mmol),在干燥THF(20mL)中由Int(200mg,0.964mmol)制备化合物5。将反应混合物在室温在N₂气氛下搅拌过夜。真空除去溶剂,并将残余物重悬于乙酸乙酯(EtOAc)(30mL)中,并用饱和NaHCO₃(水溶液,3 $\times$ 15mL)和盐水(3 $\times$ 15mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并减压蒸发。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比,5:1,Rf:0.56)纯化粗产物,得到5,为透明油状物(233mg;产率:79%)。旋转异构体的比例为5:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体A δ =7.37-6.97(m,4H,Ar),4.72-4.64(t,J=4.7,1H,H₄),4.66-4.38(m,2H,H₁₂),4.06-4.01(m,2H,H₂),3.20-3.04(dd,J=48.0,15.1,1H,H_{5i}),3.3.21-3.03(dd,J=60.0,12.1,1H,H_{5ii}),1.39(s,9H,H₁₅),1.08(t,J=7.1,3H,H₁)。旋转异构体B δ =7.37-6.97(m,4H,Ar),4.91(t,J=4.7,1H,H₄),4.66-4.38(m,2H,H₁₂),4.01-3.95(q,J=8.0,4.0,2H,H₂),3.14(d,J=4.6,

2H, H5), 1.47 (s, 9H, H15), 1.06-1.01 (t, J=7.1, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =171.95 (C3), 171.48 (C3), 155.08 (C13), 154.52 (C13), 134.44, 133.44, 133.08, 132.40, 128.57, 128.08, 127.33, 127.10, 126.65, 126.55, 80.24 (C14), 80.04 (C14), 61.03 (C2), 54.50 (C4), 52.95 (C4), 44.76 (C12), 44.15 (C12), 31.44 (C5), 31.22 (C5), 28.52 (C15), 28.35 (C15), 14.50 (C1), 14.40 (C1). LC-MS (20-98% MeCN) 室温=7.59min; m/z 306.31 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₇H₂₄N₄O₄的计算值:306.1705;实测值:306.1707。

[0451] 2-(噻吩-2-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物6。

[0452] 根据对于化合物1所述的方法, 使用2-噻吩羰基氯 (0.13mL, 1.2mmol) 由Int. (230mg, 1.11mmol) 制备化合物6。粗产物通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 3:1, R_f:0.31), 随后通过反相Isolera纯化, 缓慢梯度洗脱H₂O:MeCN (2-98% MeCN) (271mg; 产率:77%) 获得6, 为黄色油状物 (145mg; 产率:-)。旋转异构体的比例为5:4, 由室温下¹H NMR积分得出。¹H NMR ((CD₃)₂SO) 降解非常快, 无法评估NMR; $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) 降解非常快, 无法评估NMR。LC-MS (20-98% MeCN) 室温=11.09min; m/z 316.19 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₇H₁₈N₃O₃S的计算值:316.1007;实测值:316.1016。

[0453] 2-(呋喃-2-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物7。

[0454] 用TEA (0.27mL, 1.9mmol), EDC偶联剂 (257mg, 1.34mmol) 和HOBt (181mg, 1.34mmol) 处理2-糠酸 (161mg, 1.44mmol) 于DMF (20mL) 中的溶液, 并在室温下搅拌5分钟。向这种混合物中, 加入Int. (200mg, 0.960mmol), 并将反应混合物在N₂气氛下搅拌过夜。加入60mL的dH₂O以淬灭反应, 并将产物用EtOAc (3x15mL) 萃取。将所有有机部分混合在一起, 并用5% LiCl (3x15mL) 洗涤, 以消除痕量DMF, NaHCO₃ (3x15mL) 和盐水 (3x15mL), 干燥 (MgSO₄), 过滤, 并在减压下蒸发。粗产物通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 3.5:1, R_f:0.22) 纯化, 得到7, 为浅黄色油状物 (266mg; 产率:93%)。由于室温下¹H NMR上的信号合并出现, 因此无法评估旋转异构体的比率。¹H NMR ((CD₃)₂SO) δ =8.16-7.77 (d, J=44.0, 1H, H15), 7.37-7.00 (m, 5H, H7-10, H16), 6.69 (d, J=22.3, 1H, H17), 5.44 (br, 0.35H, H4b), 5.13 (br, 0.65H, H4a), 5.11-5.07 (d, J=16.0, 0.6H, H12ai), 4.93-4.89 (d, J=16.0, 0.6H, H12aii), 4.83-4.79 (d, J=16.0, 0.4H, H12bi), 4.59-4.55 (d, J=16.0, 0.4H, H12bii), 4.00 (m, 2H, H2), 3.24 (br, 2H, H5), 1.02 (s, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =171.30 (C3), 170.92 (C3), 159.86 (C13), 159.67 (C13), 147.67, 147.05, 146.03, 145.66, 133.65, 133.20, 132.87, 132.76, 128.26, 127.53, 127.24, 126.89, 126.61, 117.35 (C17), 116.87 (C17), 112.06 (C16), 61.38 (C2), 61.09 (C2), 55.92 (C4), 53.49 (C4), 47.09 (C12), 44.46 (C12), 32.11 (C5), 30.99 (C5), 14.37 (C1); LC-MS (20-98% MeCN) 室温=4.16min; m/z 300.33 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₇H₁₈N₄O₄的计算值:300.1236;实测值:300.1247。

[0455] 2-(异噻唑-5-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物8。

[0456] 根据对于化合物1所述的方法, 使用5-羰基氯 (0.31mL, 1.5mmol) 由Int. (375mg, 1.82mmol) 制备化合物8。通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 1:1, R_f:0.73和正己烷与EtOAc之比, 3:1, R_f:0.24) 纯化粗产物, 得到8, 为浅黄色油状物 (395mg; 产率:69%)。旋转异构体的比率为4.7:4, 由室温下¹H NMR积分得出。¹H NMR ((CD₃)₂SO) 旋转异构体A δ =8.82 (d, J=32.9, 1H, H16), 7.34-7.21 (m, 4H, H7-10), 7.09 (d, J=71.4, 1H, H15), 5.20 (m, 1H, H4), 4.93-4.89 (d, J=15.7, 1H, H12i), 4.83-4.79 (d, J=15.7, 1H, H12ii), 4.02 (m, 2H, H2), 3.26 (m, 2H,

H5), 1.06 (t, J=7.1, 3H, H1)。旋转异构体B δ =8.82 (d, J=32.9, 1H, H16), 7.34-7.21 (m, 4H, H7-10), 7.09 (d, J=71.4, 1H, H15), 5.20 (m, 1H, H4), 4.84 (m, 1H, H12i), 4.65-4.61 (d, J=15.7, 1H, H12ii), 4.02 (m, 2H, H2), 3.26 (m, 2H, MRes Drug Discovery&Development 2017 H5), 0.99 (t, J=7.1, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =170.66 (C3), 170.32 (C3), 162.68 (C13), 162.20 (C13), 158.74 (C14), 158.30 (C14), 151.67 (C15), 151.54 (C15), 133.10, 132.53, 132.33, 128.39, 128.27, 127.77, 127.45, 127.34, 126.99, 126.64, 107.90 (C16), 107.56 (C16), 61.67 (C2), 61.32 (C2), 56.07 (C4), 53.67 (C4), 46.97 (C12), 44.51 (C12), 31.84 (C5), 30.80 (C5), 14.37 (C1), 14.26 (C1)。LC-MS (20-98%MeCN) 室温=10.03min; m/z 301.31 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₆H₁₆N₂O₄的计算值: 301.1188; 实测值: 301.1189。

[0457] 2-(噻唑-5-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物9。

[0458] 根据对于化合物7所述的EDC偶联方法, 使用1,3-噻唑-5-羧酸 (150mg, 1.32mmol) 由Int. (325mg, 1.58mmol) 制备化合物9。粗产物通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 1.5:1, R_f:0.42), 然后通过反相Isolera上缓慢梯度洗脱H₂O:MeCN (2-98%MeCN) 纯化, 得到9, 为透明油状物 (320mg; 产率:68%)。由于大多数信号合并出现, 因此很难评估旋转异构体的比率。一些峰分开出现并且指示比例为7.6:4, 由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) 旋转异构体A δ =8.67 (s, 1H, H15), 8.03 (s, 1H, H16), 7.32-7.21 (m, 4H, H7-10), 5.20 (t, J=5.3, 1H, H4), 5.04 (d, J=15.4, 1H, H12i), 4.92 (d, J=15.5, 1H, H12ii), 4.06-3.95 (m, 2H, H2), 3.23 (br, 2H, H5), 1.01 (br, 3H, H1)。旋转异构体B δ =8.59 (s, 1H, H15), 7.75 (s, 1H, H16), 7.32-7.21 (m, 4H, H7-10), 5.40 (br, 1H, H4), 4.83 (d, J=17.2, 1H, H12i), 4.59 (d, J=17.2, 1H, H12ii), 4.06-3.95 (m, 2H, H2), 3.27 (br, 2H, H5), 1.01 (br, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =170.99 (C3), 170.63 (C3), 158.75 (C13), 158.29 (C13), 154.28 (C15), 153.78 (C15), 144.89 (C14), 144.46 (C14), 133.19, 133.00, 132.74, 132.01, 131.36, 128.28, 127.60, 127.28, 126.94, 126.74, 61.57 (C2), 61.18 (C2), 55.82 (C4), 53.36 (C4), 46.81 (C12), 44.41 (C12), 31.96 (C5), 30.98 (C5), 14.53 (C1), 14.34 (C1)。LC-MS (20-98%MeCN) 室温=8.95min; m/z 301.31 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₆H₁₆N₂O₄的计算值: 301.1188; 实测值: 301.1201。

[0459] 2-(噻唑-5-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物10。

[0460] 根据对化合物7所述的EDC偶联方法, 使用1,3-噻唑-5-羧酸 (150mg, 1.16mmol) 由Int. (286mg, 1.39mmol) 制备化合物10。粗产物通过色谱法 (正己烷与EtOAc之比, 2:3, R_f:0.37) 纯化, 得到10, 为透明油状物 (125mg; 产率:35%)。由于室温下¹H NMR中峰合并出现, 因此无法评估旋转异构体的比率。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) δ =9.32 (s, 1H, H15), 8.56-8.06 (m, 1H, H16), 7.29-7.18 (m, 4H, H7-10), 5.19 (s, 1H, H4), 4.96 (m, 1.7H, H12a, H12bi), 4.53 (d, J=13.6, 0.3H, H12bii), 4.01 (q, J=8, 2H, H2), 3.24 (br, 2H, H5), 1.10 (br, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ =163.01 (C3), 162.10 (C3), 158.23 (C13), 157.49 (C13), 145.06 (C15), 143.68 (C15), 133.38, 133.05, 132.52, 129.36, 128.66, 128.27, 127.60, 127.24, 126.74, 125.77, 61.73 (C2), 61.19 (C2), 57.04 (C4), 53.86 (C4), 48.08 (C12), 44.45 (C12), 31.58 (C5), 31.02 (C5), 14.35 (C1)。LC-MS (20-98%MeCN) 室温=9.38min; m/z 317.23 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₆H₁₇N₂O₃S的计算值: 317.0960; 实测值: 317.0968。

[0461] 2-(4-甲基噻唑-5-羰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯, 化合物11。

[0462] 根据对于化合物7所述的EDC偶联方法,使用4-甲基噻唑-5-羧酸(150mg, 1.52mmol)由Int. (291mg, 1.42mmol)制备化合物11。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比, 1:1, Rf:0.20)纯化粗产物,得到11,为透明油状物(216mg;产率:58%)。由于大多数信号合并出现,因此很难评估旋转异构体的比率。一些峰分开出现并且指示比率为4.7:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) δ =8.53 (s, 0.55H, H15a), 8.42 (s, 0.45H, H15b), 7.23 (br, 4H, H7-10), 5.26 (br, 0.45H, H4b), 5.07 (br, 0.55H, H4a), 4.92 (d, J=16.0, 0.45H, H12bi), 4.80 (m, 1.1H, H12a), 4.56 (d, J=16.0, 0.45H, H12bii), 4.03 (br, 2H, H2), 3.25 (m, 2H, H5), 2.33 (s, 3H, H17), 1.08-0.99 (m, 3H, H1); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ =171.45 (C3), 170.74 (C3), 159.74 (C13), 158.01 (C13), 152.21 (C15), 151.92 (C15), 139.86, 139.39, 134.59, 134.08, 132.98, 132.44, 129.35, 128.65, 128.28, 127.89, 127.59, 127.23, 125.76, 61.23 (C2), 55.74 (C4), 53.53 (C4), 46.67 (C12), 44.38 (C12), 32.04 (C5), 30.74 (C5), 14.35 (C1), 13.18 (C17)。LC-MS (20-98% MeCN) 室温=9.55min; m/z 315.28 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₇H₁₉N₂O₄的计算值:315.1345;实测值:315.1352。

[0463] 2-(4-甲基噻唑-5-羧基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯,化合物12。

[0464] 根据对于化合物7所述的EDC偶联方法,使用4-甲基噻唑-5-羧酸(150mg, 1.04mmol)化合物12由Int. (257mg, 1.25mmol)制备化合物12。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比, 2:3, Rf:0.43)纯化粗产物,得到12,为透明油状物(196mg;产率:60%)。由于大多数信号合并出现,因此很难评估旋转异构体的比率。一些峰分开出现并且指示比率为7.2:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) =9.18 (s, 1H, H15), 7.22 (m, 4H, H7-10), 5.16 (br, MRes Drug Discovery&Development 2017 0.65H, H4a), 4.97 (d, J=15.5, 0.35H, H12bi), 4.84 (s, 0.35H, H4b), 4.56 (br, 1.65H, H12a+H12bii), 4.03 (br, 2H, H2), 3.22 (m, 2H, H5), 2.46 (br, 3H, H17), 1.11 (m, 3H, H1); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ =170.67 (C3), 163.66 (C13), 154.96, 152.47, 133.41, 132.09, 128.34, 127.72, 127.19, 126.49, 124.79, 61.39 (C2), 53.52 (C4), 47.43 (C12), 30.58 (C5), 16.25 (C17), 14.39 (C1)。LC-MS (20-98% MeCN) 室温=9.59min; m/z 330.94 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₁₇H₁₉N₂O₃S的计算值:331.1116;实测值:331.1130。

[0465] 2-(4-甲基-2-苯基噻唑-5-羧基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸乙酯,化合物13。

[0466] 根据对于化合物7所述的EDC偶联方法,使用4-甲基-2-苯基噻唑-5-羧酸(213mg, 0.974mmol)由Int. (240mg, 1.17mmol)制备化合物13。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比, 5:2, Rf:0.32)纯化粗产物,得到13,为橙色油状物(298mg;产率:75%)。由于室温下¹H NMR上的信号合并出现,因此无法评估旋转异构体的比率。¹H-NMR ((CD₃)₂SO) =7.97 (br, 2H, H17+H21), 7.53 (m, 3H, H18-20), 7.23 (m, 4H, H7-10), 5.15-5.54 (m, 3H, H4+H12), 4.06 (br, 2H, H2), 3.24 (m, 2H, H5), 2.48 (s, 3H, H23), 1.11 (br, 3H, H1); ¹³C/ppm ((CD₃)₂SO) δ =170.60 (C3), 167.22 (C15), 153.10 (C13), 132.83, 131.30, 129.82, 128.40, 127.19, 126.75, 61.47 (C2), 53.57 (C4), 47.60 (C12), 30.68 (C5), 16.59 (C23), 14.40 (C1)。LC-MS (20-98% MeCN) 室温=12.85min; m/z 407.44 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺+C₂₃H₂₃N₂O₃S的计算值:407.1429;实测值:407.1418。

[0467] 2-(3,4-二氯苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸甲酯,化合物14。

[0468] 按照针对Int.所述的方法,将1,2,3,4-四氢异喹啉羧酸(150mg, 0.702mmol)在甲

醇(10mL)中酯化后,由中间体制备化合物14。按照前述对于化合物1的方法,使用3,4-氯苯甲酰氯(98mg,0.47mmol),无需进一步纯化使用16(90mg,0.47mmol)。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比,2:1,Rf:0.54)纯化粗产物,得到14,为白色粉末(123mg;产率:73%)。旋转异构体的比率为5.4:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体A δ =7.8(d,J=8.2,1H,H18),7.71(s,1H,H14),7.47(d,J=8.1,1H,H17),7.28-7.10(m,4H,H6-9),5.17(t,J=8,1H,H3),4.56(dd,J=24.0,16.0,2H,H11),3.62(s,3H,H1),3.28(dd,J=16.0,6.1,2H,H4)。旋转异构体B δ =7.74(d,J=8.2,1H,H18),7.69(s,1H,H14),7.40(d,J=8.1,1H,H17),7.28-7.10(m,4H,H6-9),5.01(d,J=17.7,1H,H11i),4.84(br,1H,H3),4.42(d,J=17.7,1H,H11ii),3.53(s,3H,H1),3.22-3.12(m,2H,H4);¹³C/ppm((CD₃)₂SO) δ =171.32(C2),171.14(C2),169.03(C12),168.26(C12),136.76,136.58,133.47,133.28,133.16,132.26,132.08,131.56,129.46,129.17,128.81,128.36,127.67,127.15,126.45,56.64(C3),55.36(C3),53.05(C1),52.70(C1),47.88(C11),43.40(C11),30.95(C4),30.52(C4)。LC-MS(20-98%MeCN)室温=12.44min;m/z 364.28([M+H]⁺);HRMS(m/z):[M+H]⁺+C₁₈H₁₆N₃O₃的计算值:-364.0507;实测值:364.0499。

[0469] 2-(3,4-二氯苯甲酰基)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸,中间体17。

[0470] 在碱性条件下水解后,由化合物1(250mg,0.663mmol)制备中间体17。将1溶解在MeOH:H₂O(80:20)(15mL)中,并将2.0M NaOH(7.5mL)滴加到该混合物中。将反应混合物在室温搅拌5小时。真空除去溶剂,并将残余物重悬于水(30mL)中。用1.0M HCl将混合物酸化至pH 4,并将产物用EtOAc(3 $\times$ 15mL)萃取,并用盐水(3 $\times$ 15mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤,并在减压下蒸发溶剂。得到17,为白色固体(230mg;产率:100%),其无需进一步纯化即可使用。旋转异构体的比率为1:1,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体A δ =12.98(s,1H,OH),7.78(d,J=15.7,1H,H16),7.68(s,1H,H13),7.44(d,J=23.0,1H,H17),7.31-7.08(m,4H,H5-8),5.14(t,J=4.8,1H,H2),4.54(s,2H,H10),3.27-3.09(m,2H,H3)。旋转异构体B δ =12.98(s,1H,OH),7.76(d,J=15.7,1H,H16),7.66(s,1H,H13),7.42(d,J=23.0,1H,H17),7.31-7.08(m,4H,H5-8),4.97(d,J=17.7,1H,H10i),4.68(br,1H,H2),4.48(d,J=17.7,1H,H10ii),3.27-3.09(m,2H,H3);LC-MS(50-98%MeCN)室温=4.99min;m/z 350.25([M+H]⁺);HRMS(m/z):[M+H]⁺+C₁₇H₁₄N₃O₃的计算值:350.0351;实测值:350.0356。

[0471] 2-(3,4-二氯苯甲酰基)-N-乙基-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酰胺,化合物15。

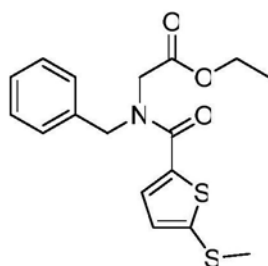
[0472] 由中间体17制备化合物15。将17(100mg,0.286mmol)的DMF(15mL)溶液用TEA(0.080mL,0.57mmol),EDC偶联剂(76.5mg,0.400mmol)和HOBt(54.1mg,0.400mmol)处理,并在室温下搅拌5分钟。向该混合物中加入乙胺2.0M(0.17M Res Drug Discovery& Development 2017mL,0.34mmol),并将反应混合物在N₂气氛下室温搅拌过夜。加入40mL dH₂O以淬灭反应,产物用EtOAc(3 $\times$ 15mL)萃取。将所有有机部分混合在一起,并用5%LiCl(3 $\times$ 15mL)洗涤,以消除痕量DMF,NaHCO₃(3 $\times$ 15mL)和盐水(3 $\times$ 15mL),干燥(MgSO₄),过滤,并在减压下蒸发。通过色谱法(正己烷与EtOAc之比,1:1,Rf:0.26)纯化粗产物,得到15,为淡黄色油状物(74mg;产率:69%)。旋转异构体的比率为5.4:4,由室温下¹H NMR积分得出。¹H-NMR((CD₃)₂SO)旋转异构体A δ =7.94(t,J=5.5,1H,NH),7.79(s,1H,H15),7.77(d,J=8.1,1H,H19),7.49(d,J=7.8,1H,H18),7.24-7.05(m,4H,H7-10),4.88(br,1H,H4),4.50(m,2H,H12),3.11(m,2H,H5),3.03(q,J=4.0,2H,H2),0.90(t,J=6.7,3H,H1)。旋转异构体B δ =

7.94 (t, J=5.5, 1H, NH), 7.72 (d, J=8.1, 1H, H19), 7.62 (s, 1H, H15), 7.36 (d, J=7.8, 1H, H18), 7.24-7.05 (m, 4H, H7-10), 4.96 (d, J=17.1, 1H, H12i), 4.56 (m, 1H, H12ii), 4.36 (br, 1H, H4), 3.11 (m, 2H, H5), 2.92 (m, 2H, H2), 0.81 (t, J=6.7, 3H, H1); $^{13}\text{C}/\text{ppm}$ ((CD₃)₂SO) δ = 169.45 (C3), 169.14 (C3), 168.27 (C13), 167.97 (C13), 137.09, 136.64, 133.67, 133.47, 132.60, 132.44, 132.30, 132.17, 131.29, 130.98, 130.85, 129.23, 128.37, 128.03, 127.77, 127.48, 127.05, 126.70, 126.48, 126.34, 125.80, 56.88 (C4), 53.60 (C4), 47.68 (C12), 43.49 (C12), 33.53 (C2), 33.45 (C2), 31.64 (C5), 30.74 (C5), 14.73 (C1), 14.56 (C1); LC-MS (20-98% MeCN) 室温 = 10.87 min; m/z 377.18 ([M+H]⁺); HRMS (m/z): [M+H]⁺ C₁₉H₁₉N₂O₂C₁₂ 的计算值: 377.0824; 实测值: 377.0821。

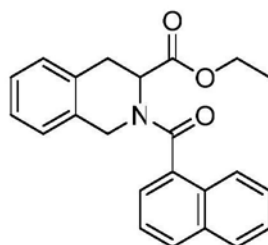
[0473] 实施例2-筛选具有REV-ERB α 拮抗剂活性的化合物

[0474] 将HEK293T细胞解冻,并在补充有10%FCS和1%P/S的DMEM中在37℃和5%CO₂下保存。将细胞铺板在24孔板中(7x10⁴个细胞/孔,在0.5ml DMEM+10%FCS中)。接种后24小时,用100ng Bmal-luc转染细胞,10ng pRL-CMV Renilla作为内对照和10ngREV-ERB α 或空载体pcDNA3作为对照。使用BSM,所有条件均相当于总计400ng DNA。为了制备转染样品,在Opti-MEM中制备每种条件所需的计算量的DNA,并以5:2的Fugene:DNA的比例添加Fugene。将混合物涡旋以确保均匀性,并在室温下孵育15分钟。之后,将每种DNA混合物转移至包含预接种细胞的24孔板中,每种条件重复三次。转染后5小时,细胞用化合物2-12,AG1-AG5或DMSO作为载体进行处理。将化合物在DMEM中的溶液制备为最终所需浓度的两倍,然后将0.5mL这些溶液添加到每个孔中。转染后24小时,裂解细胞,并使用双荧光素酶报告基因测定系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System)E2920 (Promega)测量荧光素酶活性。为了进行实验,通过向每个孔中添加50 μ L被动裂解缓冲液(PLB)(1:5稀释)裂解细胞,并轻轻搅拌30分钟。将每种细胞裂解物转移至96孔板。将50 μ L Dual-Glo试剂分配到每个孔中,轻轻敲击以混合并孵育10分钟。使用Tecan VICTOR发光计数器设备测量萤火虫荧光素酶的发光。然后,分配50 μ L Stop&Glo试剂以淬灭萤火虫活性并激活Renilla荧光素酶,孵育10分钟并进行测量。将萤火虫活性标准化为Renilla荧光素酶活性。使用Welch校正后的参数t检验对结果进行了分析。

openSR

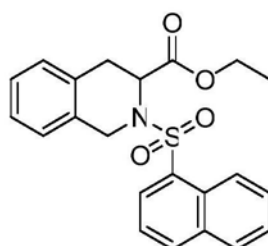


AG1

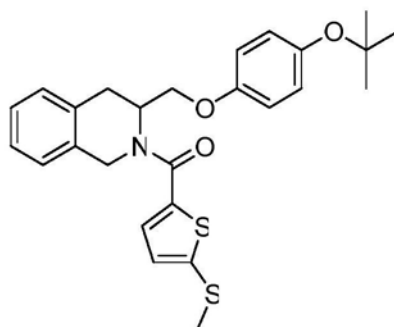


[0475]

AG2



AG5



[0476] 2. 所得数据如图3所示,表示为三个重复进行的三个独立实验获得的平均值和标准误差。

[0477] 从图3可以清楚地看出,与SR8278相比,化合物4、7、8、11和12均显著增加了萤光素酶的表达(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$),表明它们是比SR8278更强的REV-ERB α 拮抗剂。

[0478] 实施例3-筛选具有REV-ERB α 拮抗剂活性的其他化合物

[0479] 使用化合物70至72(如实施例1中所述产生)重复实施例2的方法。化合物4、7和11(在实施例2中测试)用作REV-ERB抑制活性的阳性对照,激动剂化合物AG2(也在实施例2中测试)和DMSO也作为比较剂进行了测试。

[0480] 所得数据如图4所示,表示为三个重复进行的两个独立实验获得的平均值和标准误差。化合物72对REV-ERB的抑制作用大于使用SR8278获得的抑制作用,结果具有统计学意义(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$),表明它是比SR8278更强的REV-ERB α 拮抗剂。

[0481] 实施例4-筛选具有REV-ERB α 拮抗剂活性的其他化合物

[0482] 使用化合物64至66、69和70至73(如实施例1所述产生)重复实施例2的方法。再次将化合物4、7和11(在实施例2中测试)用作REV-ERB抑制活性的阳性对照,激动剂化合物AG2

(也在实施例2中测试)和DMS也作为比较剂进行了测试。

[0483] 所得数据如图5所示,表示为三个重复进行的三个独立实验获得的平均值和标准误差。在所有化合物中,特别是在化合物71至73中,均观察到对REV-ERB的抑制作用,结果具有统计学意义(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 和****, $p < 0.0001$)。

[0484] 实施例5-筛选具有REV-ERB β 拮抗剂活性的化合物

[0485] 重复实施例2的方法,但是用10ng的REV-ERB β 代替REV-ERB α 。测试化合物4、66、69和73(如实施例1中所述产生)。激动剂化合物AG2和DMSO也作为比较剂进行了测试。

[0486] 所得数据如图6所示,表示为三个重复进行的三个独立实验获得的平均值和标准误差。对于所有化合物,特别是对于化合物4,均观察到对REV-ERB的抑制作用,结果具有统计学意义(*, $p < 0.05$ 和****, $p < 0.0001$)。

[0487] 实施例6-筛选具有REV-ERB α 拮抗剂活性的其他化合物

[0488] 使用化合物16至19、27、28和44(如实施例1所述产生)重复实施例2的方法。再次将化合物4、7和11(在实施例2中测试)用作REV-ERB抑制活性的阳性对照,激动剂化合物AG2(也在实施例2中测试)和DMSO也作为比较剂进行了测试。

[0489] 所得数据如图7所示,表示为三个重复进行的三个独立实验获得的平均值和标准误差。特别是对于化合物27和28,观察到对REV-ERB的抑制作用,结果具有统计学意义(*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ 和****, $p < 0.0001$)。

[0490] 实施例7-筛选具有REV-ERB β 拮抗剂活性的其他化合物

[0491] 使用化合物18和19(如实施例1所述产生)重复实施例5的方法。激动剂化合物AG5和DMSO也作为比较剂进行了测试。

[0492] 所得数据如图8所示,表示为两个重复进行的两个独立实验获得的平均值和标准误差。对于两种化合物均观察到对REV-ERB的抑制作用。(****, $p < 0.0001$)

[0493] 实施例8-REV-ERB α 抑制剂增加产生的NK细胞总数

[0494] 化合物7和11与SR8278一起被筛选。

[0495] 小鼠。这项研究中使用的所有小鼠均为野生型,背景为C57BL/6,年龄在6至12周之间。所有畜牧业和实验程序均根据英国内政部法规和研究所指南进行。

[0496] OP9细胞系和细胞培养。OP9是一种来自小鼠骨髓的基质细胞系,已知与它们共同培养时可支持造血祖细胞的淋巴细胞分化。将OP9-GFP细胞在补充有20%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素亲和素(P/S)的Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)(Sigma-Aldrich)中进行培养。在将Lin细胞转移到其上前两天,将它们分成24孔板,每孔2500个细胞。将细胞置于37°C的5%CO₂湿润气氛中。

[0497] 从骨髓中分离出谱系阴性细胞。在含2%FBS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中压碎小鼠的腿和髌骨,以释放骨髓细胞。通过40 μ m过滤器过滤细胞悬液,用PBS+2%FBS加满40mL,并以500xg离心4分钟。将细胞重悬于2mL PBS+2%FBS中,并用藻红蛋白(PE)偶联的鸡尾酒(20 μ L抗B220(RA3/6B2),20 μ L抗CD2(RM2-5),20 μ L抗Ter119(TER119),20 μ L抗NK1.1(PK136),5 μ L抗CD11b(M1/70)和5 μ LGr1(RB6-8C5)抗体(均来自eBioscience)在4°C下染色5分钟。将细胞进行洗涤,离心并与抗PE Microbeads(Miltenyi)在4°C下孵育15分钟。然后,用PBS洗涤细胞并使之通过LD柱(Miltenyi),使流过该柱的未染色Lin-细胞能够进行阴性选择。取50 μ L细胞,使用流式细胞仪检验耗尽后纯度。

[0498] 由谱系阴性细胞的体外NK细胞发育。将Lin细胞铺板于24孔板中,每孔1mL补充有10%胚胎干细胞合格的FBS (ES-FBS), 1%P/S, 50 μ M β -巯基乙醇 (β -ME), 10ng/ml Flt3-配体 (Flt3L) (R&D Systems), 10ng/mL IL-7 (R&D Systems) 和100ng/mL干细胞因子 (SCF) (R&D Systems) 的Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) 中 5×10^5 细胞,并培养2天。转移细胞用于与OP9-GFP基质细胞在24孔板中共培养,每孔1mL补充有20%ES-FBS, 1%P/S, 50 μ M β -ME和10ng/mL IL-15 (R&D Systems) 中 3×10^4 细胞,并培养7天。在第2天添加化合物,同时将细胞与OP9一起转移。在第5天除去上清液,并向新培养基中加入化合物。将细胞置于37 $^{\circ}$ C的5%CO₂湿润气氛中。

[0499] 流式细胞仪。培养7天后,收获细胞,通过40 μ m过滤器过滤以除去OP9细胞,并用PBS洗涤。在4 $^{\circ}$ C下以500xg离心5分钟后,将它们在100 μ L荧光激活细胞分选 (FACS) 缓冲液 (含1%BSA的PBS) 中,用适当的荧光染料偶联的抗体以1:300的稀释度在4 $^{\circ}$ C下于黑暗中染色15分钟。抗体包括CD3 (e450), NK1.1 (APC), NKp46 (Percp e710) 和PI,它们都是抗小鼠的,并来自eBioscience。然后将细胞在1mL FACS缓冲液中洗涤,离心并重悬于300 μ LFACS缓冲液中。使用抗-小鼠Ig,k和抗-大鼠/仓鼠Ig,k Compensation Particles Set (BDTM Combead) 建立补偿。使用BD LSRFortessaTM细胞分析仪 (Becton Dickinson Bioscience) 进行流式细胞仪分析,并使用FlowJo进行数据分析。

[0500] 与SR8278相比,添加10 μ M的化合物7和11均显示NK细胞总数增加,而在化合物7的情况下则显著增加 (图9) (*, $p < 0.05$)。

[0501] 实施例8-REV-ERBa的其他抑制剂增加产生的NK细胞总数

[0502] 使用5 μ M的化合物7和11,和5和10 μ M的化合物72重复实施例7的方法。

[0503] 与SR8278相比,添加5 μ M的7和11以及5和10 μ M的化合物72显示NK细胞总数显著增加 (图10) (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)。

序列表

<110> 帝国理工学院创新有限公司(IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED)

<120> 天然杀伤细胞

<130> P51465W0

<150> GB 1810486.9

<151> 2018-06-26

<160> 10

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1923

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1833) .. (1833)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 1

```

gccccctttct ttctcctcgt cggcccgaga gcaggaacac gataacgaag gaggcccaac 60
ttcattcaat aaggagcctg acggatttat cccagacggt agaacaaaag gaagaatatt 120
gatggatttt aaaccagagt ttttaaagag cttgagaata cggggaaatt aatttgttct 180
cctacacaca tagatagggt aaggttgttt ctgatgcagc tgagaaaaat gcagaccgtc 240
aaaaaggagc aggcgtctct tgatgccagt agcaatgtgg acaagatgat ggtccttaat 300
tctgctttta cgaagtgctc agaagactcc acaacaggtg aggacgtgct tctcagttaa 360
ggaagtgtgg ggaagaacaa atcttctgca tgtcggagga aacgggaatt cattcctgat 420
gaaaagaaag atgctatgta ttgggaaaaa aggcggaaaa ataataagc tgccaaaaga 480
tctcgtgaga agcgtcgact gaatgacctg gttttagaga acaaactaat tgcactggga 540
gaagaaaacg ccactttaaa agctgagctg ctttactaa aattaaagtt tggtttaatt 600
agctccacag catatgctca agagattcag aaactcagta attctacagc tgtgtacttt 660
caagattacc agacttccaa atccaatgtg agttcatttg tggacgagca cgaaccctcg 720
atgggtgtcaa gtagttgtat ttctgtcatt aaacactctc cacaagctc gctgtccgat 780
gtttcagaag tgcctcagt agaacacacg caggagagct ctgtgcaggg aagctgcaga 840
agtcctgaaa acaagttcca gattatcaag caagagccga tggaattaga gagctacaca 900
aggagacca gagatgaccg aggtctttac acagcgtcca tctatcaaaa ctatatgggg 960
aattctttct ctgggtactc aactctccc ccactactgc aagtcaaccg atcctccagc 1020
aactccccga gaacgtcgga aactgatgat ggtgtggtag gaaagtcac tgatggagaa 1080
gacgagcaac aggtcccaaa gggccccatc cattctccag ttgaactcaa gcatgtgcat 1140
gcaactgtgg ttaaagtcc agaagtgaat tcctctgcct tgccacacaa gctccgcatc 1200
aaagccaaag ccatgcagat caaagtagaa gcctttgata atgaatttga ggccacgcaa 1260

```

aaactttcct cacctattga catgacatct aaaagacatt tcgaactcga aaagcatagt 1320
 gccccaaagta tgggtacattc ttctcttact cttttctcag tgcaagtgac taacattcaa 1380
 gattgggtctc tcaaatcgga gcactggcat caaaaagaac tgagtggcaa aactcagaat 1440
 agttttcaaaa ctggagttgt tgaaatgaaa gacagtggct acaaagtttc tgaccagag 1500
 aacttgtatt tgaagcaggg gatagcaaac ttatctgcag aggttgtctc actcaagaga 1560
 cttatagcca cacaaccaat ctctgcttca gactctgggt aaattactac tgagtaagag 1620
 ctgggcattt agaaagatgt catttgcaat agagcagtcc attttgtatt atgctgaatt 1680
 ttcactggac ctgtgatgtc atttcactgt gatgtgcaca tgttgtctgt ttgggtgtctt 1740
 tttgtgcaca gattatgatg aagattagat tgtgttatca ctctgcctgt gtatagtcag 1800
 atagtcatat gcgtaaggct gtatatatta agnttttatt tttgttgttc tattataaag 1860
 tgtgtaagtt accagtttca ataaaggatt ggtgacaaac acagaaaaaa aaaaaaaaaa 1920
 aaa 1923

<210> 2

<211> 462

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met	Gln	Leu	Arg	Lys	Met	Gln	Thr	Val	Lys	Lys	Glu	Gln	Ala	Ser	Leu
1				5					10					15	
Asp	Ala	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Lys	Met	Met	Val	Leu	Asn	Ser	Ala	Leu
				20				25						30	
Thr	Glu	Val	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Asp	Val	Leu	Leu	Ser
				35				40						45	
Glu	Gly	Ser	Val	Gly	Lys	Asn	Lys	Ser	Ser	Ala	Cys	Arg	Arg	Lys	Arg
				50			55				60				
Glu	Phe	Ile	Pro	Asp	Glu	Lys	Lys	Asp	Ala	Met	Tyr	Trp	Glu	Lys	Arg
65				70					75					80	
Arg	Lys	Asn	Asn	Glu	Ala	Ala	Lys	Arg	Ser	Arg	Glu	Lys	Arg	Arg	Leu
				85				90						95	
Asn	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Lys	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn
				100				105						110	
Ala	Thr	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Leu	Lys	Phe	Gly	Leu
				115				120						125	
Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ile	Gln	Lys	Leu	Ser	Asn	Ser
				130			135				140				
Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Gln	Asp	Tyr	Gln	Thr	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Ser
145				150						155				160	
Ser	Phe	Val	Asp	Glu	His	Glu	Pro	Ser	Met	Val	Ser	Ser	Ser	Cys	Ile
				165					170					175	

Ser Val Ile Lys His Ser Pro Gln Ser Ser Leu Ser Asp Val Ser Glu		
180	185	190
Val Ser Ser Val Glu His Thr Gln Glu Ser Ser Val Gln Gly Ser Cys		
195	200	205
Arg Ser Pro Glu Asn Lys Phe Gln Ile Ile Lys Gln Glu Pro Met Glu		
210	215	220
Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Glu Pro Arg Asp Asp Arg Gly Ser Tyr Thr		
225	230	235
Ala Ser Ile Tyr Gln Asn Tyr Met Gly Asn Ser Phe Ser Gly Tyr Ser		
245	250	255
His Ser Pro Pro Leu Leu Gln Val Asn Arg Ser Ser Ser Asn Ser Pro		
260	265	270
Arg Thr Ser Glu Thr Asp Asp Gly Val Val Gly Lys Ser Ser Asp Gly		
275	280	285
Glu Asp Glu Gln Gln Val Pro Lys Gly Pro Ile His Ser Pro Val Glu		
290	295	300
Leu Lys His Val His Ala Thr Val Val Lys Val Pro Glu Val Asn Ser		
305	310	315
Ser Ala Leu Pro His Lys Leu Arg Ile Lys Ala Lys Ala Met Gln Ile		
325	330	335
Lys Val Glu Ala Phe Asp Asn Glu Phe Glu Ala Thr Gln Lys Leu Ser		
340	345	350
Ser Pro Ile Asp Met Thr Ser Lys Arg His Phe Glu Leu Glu Lys His		
355	360	365
Ser Ala Pro Ser Met Val His Ser Ser Leu Thr Pro Phe Ser Val Gln		
370	375	380
Val Thr Asn Ile Gln Asp Trp Ser Leu Lys Ser Glu His Trp His Gln		
385	390	395
Lys Glu Leu Ser Gly Lys Thr Gln Asn Ser Phe Lys Thr Gly Val Val		
405	410	415
Glu Met Lys Asp Ser Gly Tyr Lys Val Ser Asp Pro Glu Asn Leu Tyr		
420	425	430
Leu Lys Gln Gly Ile Ala Asn Leu Ser Ala Glu Val Val Ser Leu Lys		
435	440	445
Arg Leu Ile Ala Thr Gln Pro Ile Ser Ala Ser Asp Ser Gly		
450	455	460

<210> 3

<211> 2793

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

```

gggcacgagg cgctccctgg gatcacatgg tacctgctcc agtgccgcgt gcggcccggg 60
aaccctgggc tgctggcgcc tgcgcagagc cctctgtccc agggaaaggc tcgggcaaaa 120
ggcggctgag attggcagag tgaaatatta ctgccgaggg aacgtagcag ggcacacgtc 180
tcgcctcttt gcgactcggg gccccgtttc tccccatcac ctacttactt cctggttgca 240
acctctcttc ctctgggact tttgcaccgg gagctccaga ttgccacccc cgcagcgctg 300
cggagccggc aggcagaggc acccgtaca ctgcagagac ccgaccctcc ttgctacctt 360
ctagccagaa ctactgcagg ctgattcccc ctacacactc tctctgctct tcccatgcaa 420
agcagaactc cgttgccctca acgtccaacc cttctgcagg gctgcagtcc ggccacccca 480
agaccttgct gcagggtgct tcggatcctg atcgtgagtc gcgggggtcca ctccccgccc 540
ttagccagtg ccaggggggc aacagcggcg atcgcaacct ctagtttgag tcaagggtcca 600
gtttgaatga ccgctctcag ctggtgaaga catgacgacc ctggactcca acaacaacac 660
aggtggcgct atcacctaca ttggtccag tggtcctcc ccaagccgca ccagccctga 720
atccctctat agtgacaact ccaatggcag cttccagtc ctgacccaag gctgtccac 780
ctacttccca ccatccccc ctggtccct cacccaagac ccggtcgtc cttttgggag 840
cattccaccc agcctgagtg atgacggctc cccttcttc tcctcttct cgtcgtcatc 900
ctcctcctcc ttctataatg ggagcccccc tgggagtcta caagtggcca tggaggacag 960
cagccgagtg tccccagca agagcaccag caacatcacc aagctgaatg gcatggtgtt 1020
actgtgtaaa gtgtgtgggg acgttgccctc gggcttccac tacggtgtgc acgcctgcga 1080
gggctgcaag ggctttttcc gtcggagcat ccagcagaac atccagtaca aaaggtgtct 1140
gaagaatgag aattgctcca tcgtccgcat caatcgcaac cgctgccagc aatgtcgctt 1200
caagaagtgt ctctctgtgg gcatgtctcg agacgctgtg cgttttgggc gcatcccaa 1260
acgagagaag cagcggatgc ttgctgagat gcagagtgcc atgaacctgg ccaacaacca 1320
gttgagcagc cagtggccgc tggagacttc acccaccag caccacccc caggccccat 1380
gggccccctg ccacccccctg ctccggctcc ctcacccctg gtgggcttct cccagtttcc 1440
acaacagctg acgcctccca gatccccaag ccctgagccc acagtggagg atgtgatatc 1500
ccaggtggcc cgggcccac gagagatctt cacctacgcc catgacaagc tgggcagctc 1560
acctggcaac ttcaatgcca accatgcac aggtagccct ccagccacca cccacatcg 1620
ctgggaaaat cagggtgcc cacctgcccc caatgacaac aacaccttg ctgccagcg 1680
tcataacgag gccctaaatg gtctgcgcca ggctccctcc tctaccctc ccacctggcc 1740
tcctggccct gcacaccaca gctgccacca gtccaacagc aacgggcacc gtctatgccc 1800
caccacgtg tatgcagccc cagaaggcaa ggcacctgcc aacagtcccc ggcagggcaa 1860
ctcaaagaat gttctgctgg catgtcctat gaacatgtac ccgcatggac gcagtgggcg 1920
aacggtgcag gagatctggg aggatttctc catgagcttc acgcccgtg tgcgggaggt 1980
ggtagagttt gccaaacaca tcccgggett ccgtgacctt tctcagcatg accaagtcac 2040
cctgcttaag gctggcacct ttgaggtgct gatggtgcgc tttgcttcgt tgttcaacgt 2100
gaaggaccag acagtgatgt tcctaagccg caccacctac agcctgcagg agcttggtgc 2160
catgggcatg ggagacctgc tcagtgccat gttcgacttc agcgagaagc tcaactccct 2220

```

ggcgcttacc gaggaggagc tgggcctctt caccgcggtg gtgcttgtct ctgcagaccg 2280
 ctcgggcatg gagaattccg cttcggtgga gcagctccag gagacgtgc tgcgggctct 2340
 tcgggctctg gtgctgaaga accggccctt ggagacttcc cgcttcacca agctgctgct 2400
 caagctgccg gacctgcgga ccctgaacaa catgcattcc gagaagctgc tgtccttccg 2460
 ggtggacgcc cagtgacccg cccggccggc cttctgccgc tgcccccttg tacagaatcg 2520
 aactctgcac ttctctctcc ttacgagac gaaaaggaaa agcaaaccag aatcttattt 2580
 atattgttat aaaaatttcc aagatgagcc tctggcccc tgagccttct tgtaaatacc 2640
 tgcctccctc ccccatcacc gaacttcccc tctcccccta tttaaaccac tctgtctccc 2700
 ccacaaccct cccctggccc tctgatttgt tctgttcttg tctcaaatcc aatagttcac 2760
 agctgagctg gcttcaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2793

<210> 4

<211> 614

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Met	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr
1			5						10					15	
Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu
			20						25				30		
Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Gly	Cys
			35						40				45		
Pro	Thr	Tyr	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro
			50						55				60		
Ala	Arg	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	Ser	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Ser
65				70						75				80	
Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Phe	Tyr	Asn
				85						90				95	
Gly	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	Ser	Arg
				100					105				110		
Val	Ser	Pro	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Leu	Asn	Gly	Met
				115					120				125		
Val	Leu	Leu	Cys	Lys	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	His	Tyr
				130					135				140		
Gly	Val	His	Ala	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Arg	Arg	Ser	Ile
145					150					155				160	
Gln	Gln	Asn	Ile	Gln	Tyr	Lys	Arg	Cys	Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Cys	Ser
					165					170				175	
Ile	Val	Arg	Ile	Asn	Arg	Asn	Arg	Cys	Gln	Gln	Cys	Arg	Phe	Lys	Lys
				180						185				190	

Cys	Leu	Ser	Val	Gly	Met	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Arg	Phe	Gly	Arg	Ile
195							200					205			
Pro	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Arg	Met	Leu	Ala	Glu	Met	Gln	Ser	Ala	Met
210						215					220				
Asn	Leu	Ala	Asn	Asn	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Cys	Pro	Leu	Glu	Thr	Ser
225					230					235					240
Pro	Thr	Gln	His	Pro	Thr	Pro	Gly	Pro	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro
				245					250					255	
Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	Gly	Phe	Ser	Gln	Phe	Pro	Gln	Gln
			260					265					270		
Leu	Thr	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Val	Glu	Asp	Val
			275				280					285			
Ile	Ser	Gln	Val	Ala	Arg	Ala	His	Arg	Glu	Ile	Phe	Thr	Tyr	Ala	His
290						295					300				
Asp	Lys	Leu	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Asn	Phe	Asn	Ala	Asn	His	Ala	Ser
305					310					315					320
Gly	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	His	Arg	Trp	Glu	Asn	Gln	Gly	Cys
				325					330					335	
Pro	Pro	Ala	Pro	Asn	Asp	Asn	Asn	Thr	Leu	Ala	Ala	Gln	Arg	His	Asn
			340					345						350	
Glu	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Ser	Ser	Tyr	Pro	Pro	Thr
			355				360					365			
Trp	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	His	His	Ser	Cys	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Asn
370					375						380				
Gly	His	Arg	Leu	Cys	Pro	Thr	His	Val	Tyr	Ala	Ala	Pro	Glu	Gly	Lys
385					390					395					400
Ala	Pro	Ala	Asn	Ser	Pro	Arg	Gln	Gly	Asn	Ser	Lys	Asn	Val	Leu	Leu
			405						410					415	
Ala	Cys	Pro	Met	Asn	Met	Tyr	Pro	His	Gly	Arg	Ser	Gly	Arg	Thr	Val
			420					425					430		
Gln	Glu	Ile	Trp	Glu	Asp	Phe	Ser	Met	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	Arg
			435				440					445			
Glu	Val	Val	Glu	Phe	Ala	Lys	His	Ile	Pro	Gly	Phe	Arg	Asp	Leu	Ser
			450				455				460				
Gln	His	Asp	Gln	Val	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Phe	Glu	Val	Leu
465					470					475					480
Met	Val	Arg	Phe	Ala	Ser	Leu	Phe	Asn	Val	Lys	Asp	Gln	Thr	Val	Met
			485						490					495	
Phe	Leu	Ser	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Gly	Ala	Met	Gly

500	505	510
Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala	Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn	
515	520	525
Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val		
530	535	540
Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu		
545	550	555
Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys		
565	570	575
Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu		
580	585	590
Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser		
595	600	605
Phe Arg Val Asp Ala Gln		

610

<210> 5

<211> 1740

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (994) .. (994)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 5

```

atggagggtga atgcaggagg tgtgattgcc tatatcagtt cttccagctc agcctcaagc 60
cctgcctctt gtcacagtga gggttctgag aatagtttcc agtcctcctc ctcttctggt 120
ccatcttctc caaatagctc taattctgat accaatggta atcccaagaa tggatgatctc 180
gccaatattg aaggcatctt gaagaatgat cgaatagatt gttctatgaa aacaagcaaa 240
tcgagtgcac ctgggatgac aaaaaatcat agtgggtgtga caaaatttag tggcatgggt 300
ctactgtgta aagtctgtgg ggatgtggcg tcaggattcc actatggagt tcatgcttgc 360
gaaggctgta agggtttctt tcggagaagt attcaacaaa acatccagta caagaagtgc 420
ctgaagaatg aaaactgttc tataatgaga atgaatagga acagatgtca gcaatgtcgc 480
ttcaaaaagt gtctgtctgt tggaatgtca agagatgctg ttcggtttgg tcgtattcct 540
aagcgtgaaa aacagaggat gctaattgaa atgcaaagtg caatgaagac catgatgaac 600
agccagttca gtggtcactt gcaaaatgac acattagtag aacatcatga acagacagcc 660
ttgccagccc aggaacagct gcgacccaag cccaactgg agcaagaaaa catcaaaagc 720
tcttctcctc catcttctga ttttgcaaag gaagaagtga ttggcatggt gaccagagct 780
cacaaggata cctttatgta taatcaagag cagcaagaaa actcagctga gagcatgcag 840
ccccagagag gagaacggat tccaagaac atggagcaat ataatttaaa tcatgatcat 900

```

tgcggcaatg ggcttagcag ccattttccc tgtagtgaga gccagcagca tctcaatgga 960
 cagttcaaag ggaggaatat aatgcattac ccanatggcc atgccatttg tattgcaaat 1020
 ggacattgta tgaacttctc caatgcttat actcaaagag tatgtgatag agttccgata 1080
 gatggatttt ctcagaatga gaacaagaat agttacctgt gcaacactgg aggaagaatg 1140
 catctggttt gtccaatgag taagtctcca tatgtggatc ctcataaatc aggacatgaa 1200
 atctgggaag aattttcgat gagcttcaact ccagcagtga aagaagtggg ggaatttgca 1260
 aagcgtattc ctgggttcag agatctctct cagcatgacc aggtcaacct tttaaaggct 1320
 gggacttttg aggttttaat ggtacggttc gcatcattat ttgatgcaaa ggaacgtact 1380
 gtcacctttt taagtggaaa gaaatatagt gtggatgatt tacactcaat gggagcaggg 1440
 gatctgctaa actctatgtt tgaatttagt gagaagctaa atgccctcca acttagtgat 1500
 gaagagatga gtttgtttac agctgttctc ctggtatctg cagatcgatc tggaatagaa 1560
 aacgtcaact ctgtggaggc tttgcaggaa actctcattc gtgcactaag gaccttaata 1620
 atgaaaaacc atccaaatga ggctcttatt ttacaaaac tgcttctaaa gttgccagat 1680
 cttcgatctt taaacaacat gcactctgag gagctcttgg cctttaaagt tcacccttaa 1740

<210> 6

<211> 578

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (332) .. (332)

<223> Xaa是任意天然氨基酸

<220>

<221> UNSURE

<222> (332) .. (332)

<223> The 'Xaa' at location 332 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.

<400> 6

Met	Glu	Val	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser
1				5					10					15	
Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Ala	Ser	Cys	His	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ser
			20					25						30	
Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Asn
			35					40						45	
Ser	Asp	Thr	Asn	Gly	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Ala	Asn	Ile	Glu
			50					55						60	
Gly	Ile	Leu	Lys	Asn	Asp	Arg	Ile	Asp	Cys	Ser	Met	Lys	Thr	Ser	Lys
65				70						75					80
Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Met	Thr	Lys	Asn	His	Ser	Gly	Val	Thr	Lys	Phe
				85						90					95

Ser Gly Met Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly		
100	105	110
Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg		
115	120	125
Arg Ser Ile Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Lys Cys Leu Lys Asn Glu		
130	135	140
Asn Cys Ser Ile Met Arg Met Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg		
145	150	155
Phe Lys Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe		
165	170	175
Gly Arg Ile Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ile Glu Met Gln		
180	185	190
Ser Ala Met Lys Thr Met Met Asn Ser Gln Phe Ser Gly His Leu Gln		
195	200	205
Asn Asp Thr Leu Val Glu His His Glu Gln Thr Ala Leu Pro Ala Gln		
210	215	220
Glu Gln Leu Arg Pro Lys Pro Gln Leu Glu Gln Glu Asn Ile Lys Ser		
225	230	235
Ser Ser Pro Pro Ser Ser Asp Phe Ala Lys Glu Glu Val Ile Gly Met		
245	250	255
Val Thr Arg Ala His Lys Asp Thr Phe Met Tyr Asn Gln Glu Gln Gln		
260	265	270
Glu Asn Ser Ala Glu Ser Met Gln Pro Gln Arg Gly Glu Arg Ile Pro		
275	280	285
Lys Asn Met Glu Gln Tyr Asn Leu Asn His Asp His Cys Gly Asn Gly		
290	295	300
Leu Ser Ser His Phe Pro Cys Ser Glu Ser Gln Gln His Leu Asn Gly		
305	310	315
Gln Phe Lys Gly Arg Asn Ile Met His Tyr Pro Xaa Gly His Ala Ile		
325	330	335
Cys Ile Ala Asn Gly His Cys Met Asn Phe Ser Asn Ala Tyr Thr Gln		
340	345	350
Arg Val Cys Asp Arg Val Pro Ile Asp Gly Phe Ser Gln Asn Glu Asn		
355	360	365
Lys Asn Ser Tyr Leu Cys Asn Thr Gly Gly Arg Met His Leu Val Cys		
370	375	380
Pro Met Ser Lys Ser Pro Tyr Val Asp Pro His Lys Ser Gly His Glu		
385	390	395
Ile Trp Glu Glu Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Lys Glu Val		

405	410	415
Val Glu Phe Ala Lys Arg Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser Gln His		
420	425	430
Asp Gln Val Asn Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu Met Val		
435	440	445
Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asp Ala Lys Glu Arg Thr Val Thr Phe Leu		
450	455	460
Ser Gly Lys Lys Tyr Ser Val Asp Asp Leu His Ser Met Gly Ala Gly		
465	470	475
Asp Leu Leu Asn Ser Met Phe Glu Phe Ser Glu Lys Leu Asn Ala Leu		
485	490	495
Gln Leu Ser Asp Glu Glu Met Ser Leu Phe Thr Ala Val Val Leu Val		
500	505	510
Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ile Glu Asn Val Asn Ser Val Glu Ala Leu		
515	520	525
Gln Glu Thr Leu Ile Arg Ala Leu Arg Thr Leu Ile Met Lys Asn His		
530	535	540
Pro Asn Glu Ala Ser Ile Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu Pro Asp		
545	550	555
Leu Arg Ser Leu Asn Asn Met His Ser Glu Glu Leu Leu Ala Phe Lys		
565	570	575

Val His

<210> 7

<211> 2058

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

```

atggcggcag cgtcccggag cgcctctggc tgggcgctac tgctgctggt ggcactttgg 60
cagcagcgcg cgccgggtc cggtgtcttc cagctgcagc tgcaggagtt catcaacgag 120
cgcggtgtac tggccagtgg gcggccttgc gagcccggct gccggacttt cttccgcgtc 180
tgccttaagc acttccaggc ggtcgtctcg cccggaccct gcaccttcgg gaccgtctcc 240
acgccgttat tgggcaccaa ctcttcgct gtccgggacg acagtagcgg cggggggcgc 300
aaccctctcc aactgccctt caatttcacc tggccgggta cttctctgct catcatcgaa 360
gcttggcacg cgccaggaga cgacctgcgg ccagaggcct tgccaccaga tgcactcatc 420
agcaagatcg ccatccaggg ctccctagct gtgggtcaga actggttatt ggatgagcaa 480
accagcacc tcacaaggt gcgtactct taccgggtca tctgcagtga caactactat 540
ggagacaact gctccgcct gtgcaagaag cgcaatgacc acttcggcca ctatgtgtgc 600
cagccagatg gcaactgtc ctgcctgcc ggttgactg gggaatattg ccaacagcct 660
atctgtcttt cgggctgtca tgaacagaat ggctactgca gcaagccagc agagtgcctc 720

```

tgccgcccag gctggcaggg ccggctgtgt aacgaatgca tccccacaa tggctgtcgc 780
 cacggcacct gcagcactcc ctggcaatgt acttgtgatg agggctgggg aggcctgttt 840
 tgtgaccaag atctcaacta ctgcacccac cactcccat gcaagaatgg ggcaacgtgc 900
 tccaacagtg ggcagcgaag ctacacctgc acctgtcgcc caggctacac tgggtgtggac 960
 tgtgagctgg agctcagcga gtgtgacagc aaccctgtc gcaatggagg cagctgtaag 1020
 gaccaggagg atggctacca ctgcctgtgt cctccgggct actatggcct gcattgtgaa 1080
 cacagcacct tgagctgcgc cgactcccc tgcttcaatg ggggctcctg ccgggagcgc 1140
 aaccaggggg ccaactatgc ttgtgaatgt cccccaact tcaccggctc caactgcgag 1200
 aagaaagtgg acaggtgcac cagcaacccc tgtgccaacg ggggacagtg cctgaaccga 1260
 ggtccaagcc gcatgtgccg ctgccgtcct ggattcacgg gcacctactg tgaactccac 1320
 gtcagcgact gtccccgtaa cccttgcgcc cagggtggca cttgccatga cctggagaat 1380
 gggctcatgt gcacctgccc tgccggttc tctggccgac gctgtgaggt gcggacatcc 1440
 atcgatgcct gtgcctcgag tcctgtcttc aacagggcc cctgctacac cgacctctcc 1500
 acagacacct ttgtgtgcaa ctgcccttat ggctttgtgg gcagccgtg cgagttcccc 1560
 gtgggcttgc cgcccagctt cccctgggtg gccgtctcgc tgggtgtggg gctggcagt 1620
 ctgctggtac tgctgggcat ggtggcagt gctgtgcggc agctgcggct tcgacggccg 1680
 gacgacggca gcagggaagc catgaacaac ttgtcggact tccagaagga caacctgatt 1740
 cctgccgccc agcttaaaaa cacaaccag aagaaggagc tggaagtga ctgtggcctg 1800
 gacaagtcca actgtggcaa acagcaaac cacacattgg actataatct ggccccagg 1860
 cccctggggc gggggaccat gccaggaaag tttcccaca gtgacaagag cttaggagag 1920
 aaggcgccac tgcggttaca cagtgaagc ccagagtgtc ggatatcagc gatatgtcc 1980
 cccagggact ccatgtacca gtctgtgtgt ttgatatcag aggagaggaa tgaatgtgtc 2040
 attgccacgg aggtataa 2058

<210> 8

<211> 685

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Met Ala Ala Ala Ser Arg Ser Ala Ser Gly Trp Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Leu Trp Gln Gln Arg Ala Ala Gly Ser Gly Val Phe Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Gln Glu Phe Ile Asn Glu Arg Gly Val Leu Ala Ser Gly Arg
 35 40 45
 Pro Cys Glu Pro Gly Cys Arg Thr Phe Phe Arg Val Cys Leu Lys His
 50 55 60
 Phe Gln Ala Val Val Ser Pro Gly Pro Cys Thr Phe Gly Thr Val Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Val Leu Gly Thr Asn Ser Phe Ala Val Arg Asp Asp Ser Ser

				85					90					95			
Gly	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	Asn	Phe	Thr	Trp	Pro		
				100					105					110			
Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Trp	His	Ala	Pro	Gly	Asp	Asp		
				115				120						125			
Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Lys	Ile	Ala		
				130				135						140			
Ile	Gln	Gly	Ser	Leu	Ala	Val	Gly	Gln	Asn	Trp	Leu	Leu	Asp	Glu	Gln		
145					150				155					160			
Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Val	Ile	Cys	Ser		
				165					170					175			
Asp	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Asn	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Asn		
				180					185					190			
Asp	His	Phe	Gly	His	Tyr	Val	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Cys		
				195				200						205			
Leu	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Gln	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Ser		
				210				215						220			
Gly	Cys	His	Glu	Gln	Asn	Gly	Tyr	Cys	Ser	Lys	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu		
225					230				235					240			
Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Leu	Cys	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	His		
				245					250					255			
Asn	Gly	Cys	Arg	His	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Cys		
				260					265					270			
Asp	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys	Asp	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys		
				275					280					285			
Thr	His	His	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Cys	Ser	Asn	Ser	Gly		
				290					295					300			
Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Val	Asp		
305					310				315					320			
Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Cys	Asp	Ser	Asn	Pro	Cys	Arg	Asn	Gly		
				325					330					335			
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Glu	Asp	Gly	Tyr	His	Cys	Leu	Cys	Pro	Pro		
				340					345					350			
Gly	Tyr	Tyr	Gly	Leu	His	Cys	Glu	His	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Ala	Asp		
				355					360					365			
Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Glu	Arg	Asn	Gln	Gly	Ala		
				370					375					380			
Asn	Tyr	Ala	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	Asn	Cys	Glu		
385					390				395					400			

Lys	Lys	Val	Asp	Arg	Cys	Thr	Ser	Asn	Pro	Cys	Ala	Asn	Gly	Gly	Gln
					405				410					415	
Cys	Leu	Asn	Arg	Gly	Pro	Ser	Arg	Met	Cys	Arg	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
					420				425					430	
Thr	Gly	Thr	Tyr	Cys	Glu	Leu	His	Val	Ser	Asp	Cys	Ala	Arg	Asn	Pro
					435				440					445	
Cys	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Leu	Met	Cys
					450				455					460	
Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Gly	Arg	Arg	Cys	Glu	Val	Arg	Thr	Ser
465									470					475	
Ile	Asp	Ala	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Phe	Asn	Arg	Ala	Thr	Cys	Tyr
					485				490					495	
Thr	Asp	Leu	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Val	Cys	Asn	Cys	Pro	Tyr	Gly	Phe
					500				505					510	
Val	Gly	Ser	Arg	Cys	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Phe	Pro
					515				520					525	
Trp	Val	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Leu	Val	Leu
					530				535					540	
Leu	Gly	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro
545									550					555	
Asp	Asp	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Met	Asn	Asn	Leu	Ser	Asp	Phe	Gln	Lys
					565				570					575	
Asp	Asn	Leu	Ile	Pro	Ala	Ala	Gln	Leu	Lys	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys
					580				585					590	
Glu	Leu	Glu	Val	Asp	Cys	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Cys	Gly	Lys	Gln
					595				600					605	
Gln	Asn	His	Thr	Leu	Asp	Tyr	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Pro	Leu	Gly	Arg
					610				615					620	
Gly	Thr	Met	Pro	Gly	Lys	Phe	Pro	His	Ser	Asp	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu
625									630					635	
Lys	Ala	Pro	Leu	Arg	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Pro	Glu	Cys	Arg	Ile	Ser
					645				650					655	
Ala	Ile	Cys	Ser	Pro	Arg	Asp	Ser	Met	Tyr	Gln	Ser	Val	Cys	Leu	Ile
					660				665					670	
Ser	Glu	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Val	Ile	Ala	Thr	Glu	Val			
					675				680					685	

<210> 9

<211> 426

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

```
atgtcaaaca tgagatgtgt ggactgtggc acttgcctgg gtcacacacg gaggcatacct 60
acccttttct ggggaaagac actgcctggg ctgaccccg tggcggcccc agcacctcag 120
cctgcacagt gtcccccagg ttccgaagaa gatgctccag caacacagcc tgggccccag 180
ctcgcgggac ccgaccccc gtgggctccc gtgttttgta ggagacttgc cagagccggg 240
cacattgagc tgtgcaacgc cgtgggctgc gtcctttggt cctgtccccg cagccctggc 300
agggggcatg cggtcgggca ggggctggag ggaggcgggg gctgcccttg ggccaccct 360
cctagtittg gaggagcaga tttttgcaat accaagtata gcctatggca gaaaaaatgt 420
ctttaa 426
```

<210> 10

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

```
Met Ser Asn Met Arg Cys Val Asp Cys Gly Thr Cys Leu Gly His Thr
1          5          10          15
Arg Arg His Pro Thr Leu Phe Trp Gly Lys Thr Leu Pro Gly Leu Thr
          20          25          30
Pro Val Ala Ala Pro Ala Pro Gln Pro Ala Gln Cys Pro Pro Gly Ser
          35          40          45
Glu Glu Asp Ala Pro Ala Thr Gln Pro Gly Pro Gln Leu Ala Gly Pro
          50          55          60
Asp Pro Pro Trp Ala Pro Val Phe Cys Arg Arg Leu Ala Arg Ala Gly
65          70          75          80
His Ile Glu Leu Cys Asn Ala Val Gly Cys Val Leu Trp Ser Cys Pro
          85          90          95
Arg Ser Pro Gly Arg Gly His Ala Val Gly Gln Gly Leu Glu Gly Gly
          100          105          110
Gly Gly Cys Pro Trp Ala Thr Pro Pro Ser Leu Gly Gly Ala Asp Phe
          115          120          125
Cys Asn Thr Lys Tyr Ser Leu Trp Gln Lys Lys Cys Leu
          130          135          140
```

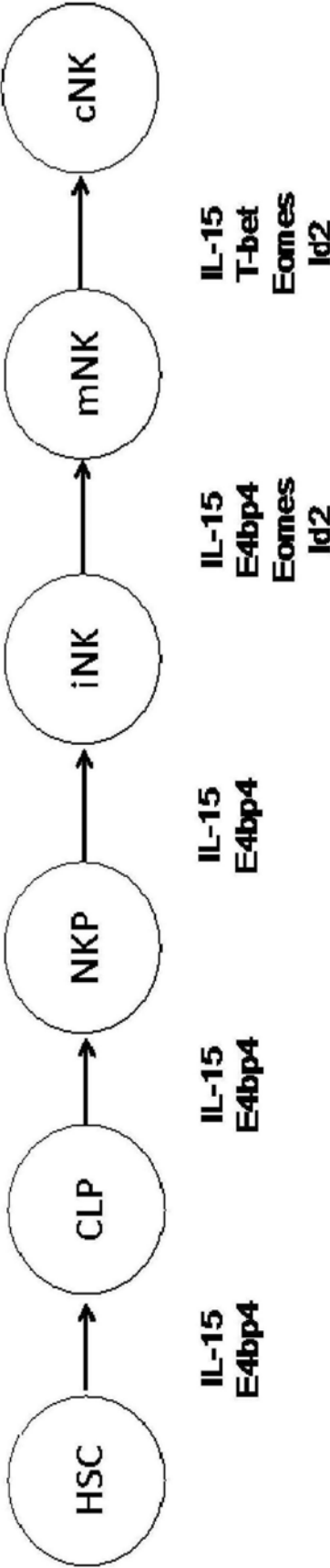


图1

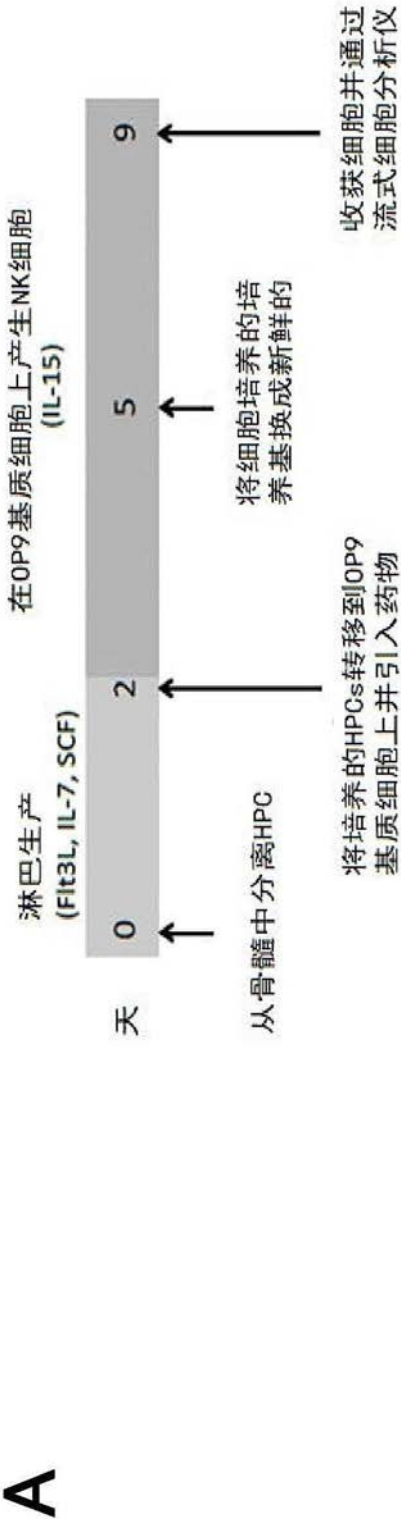


图2

B

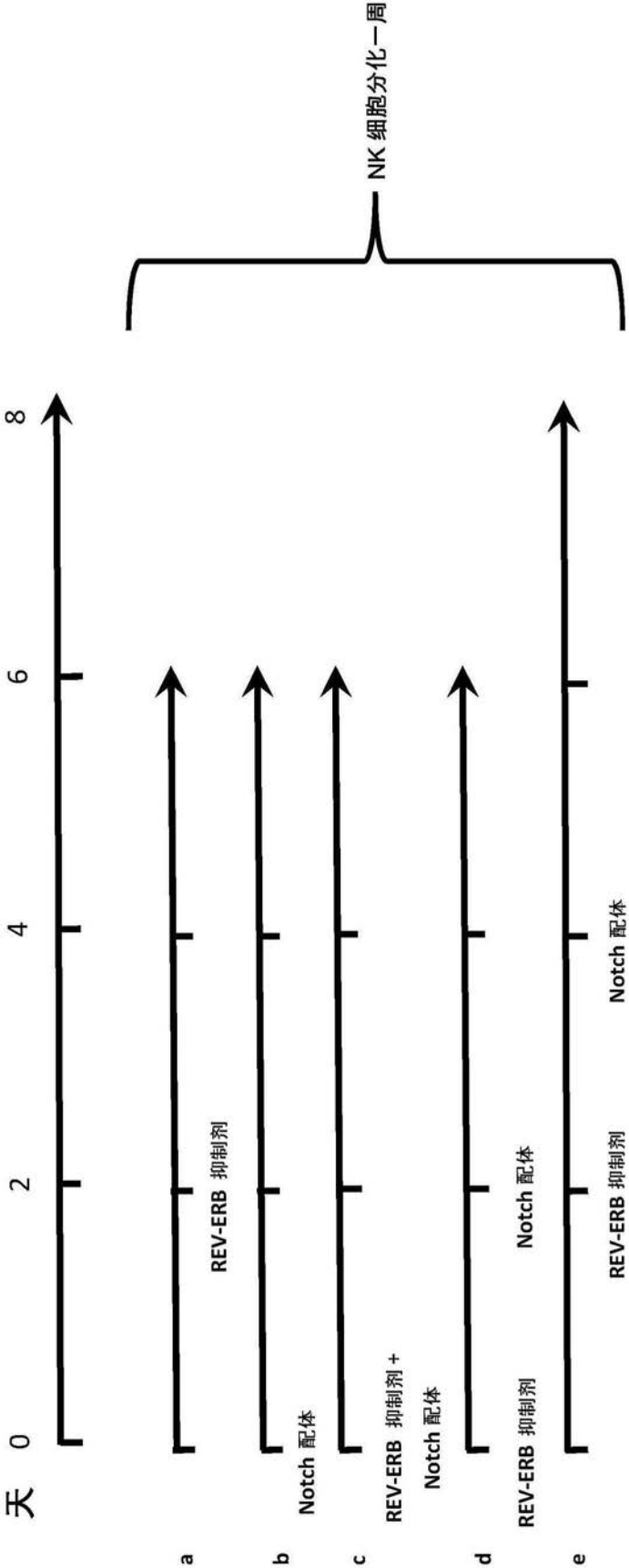


图2(续)

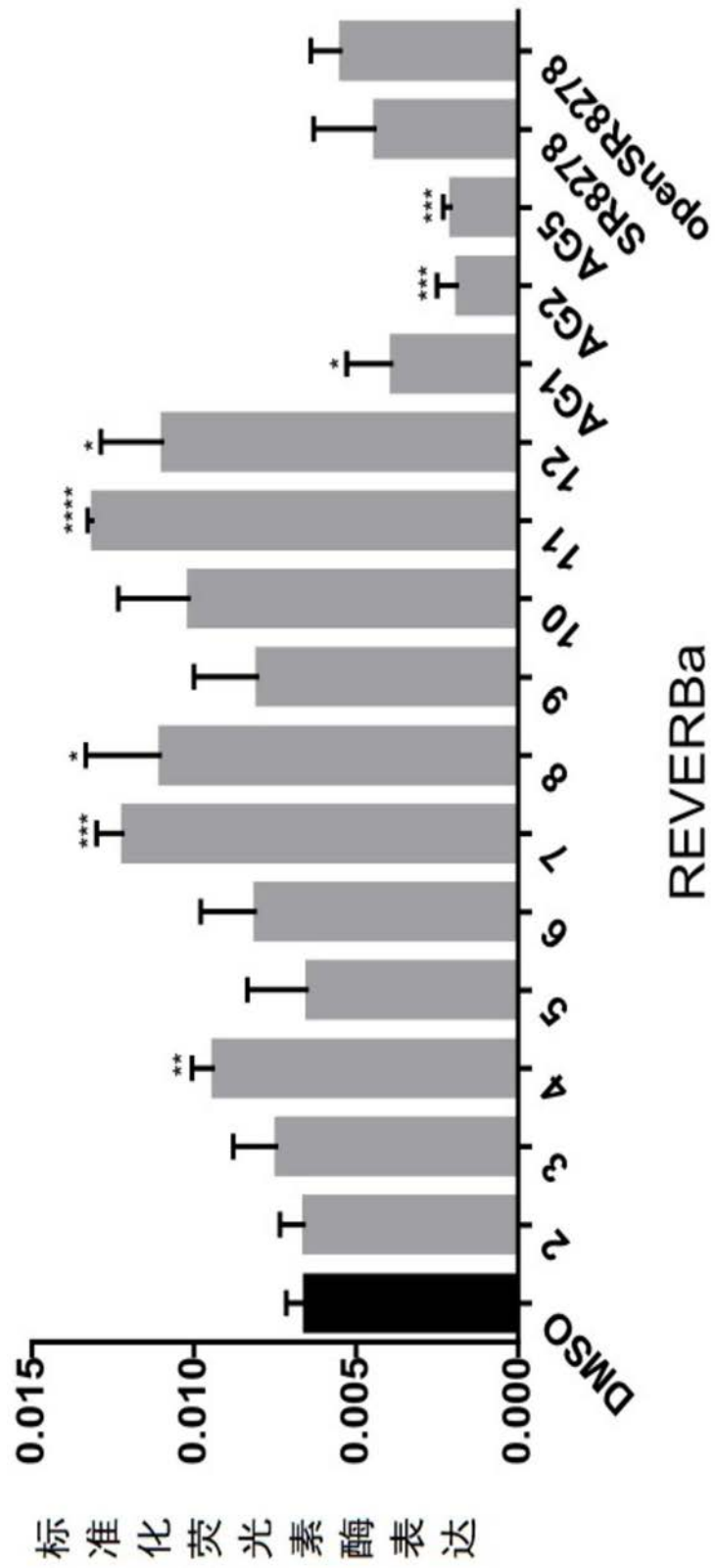


图3

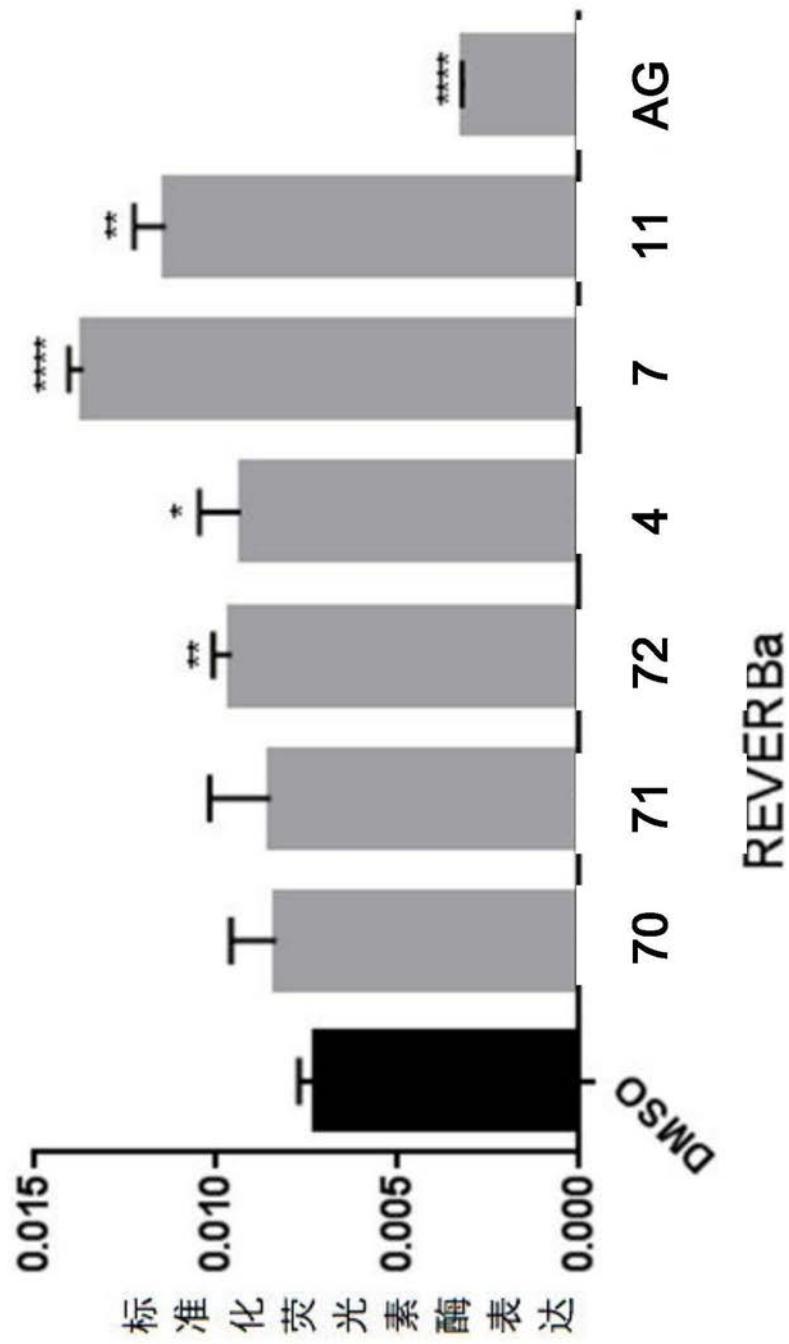


图4

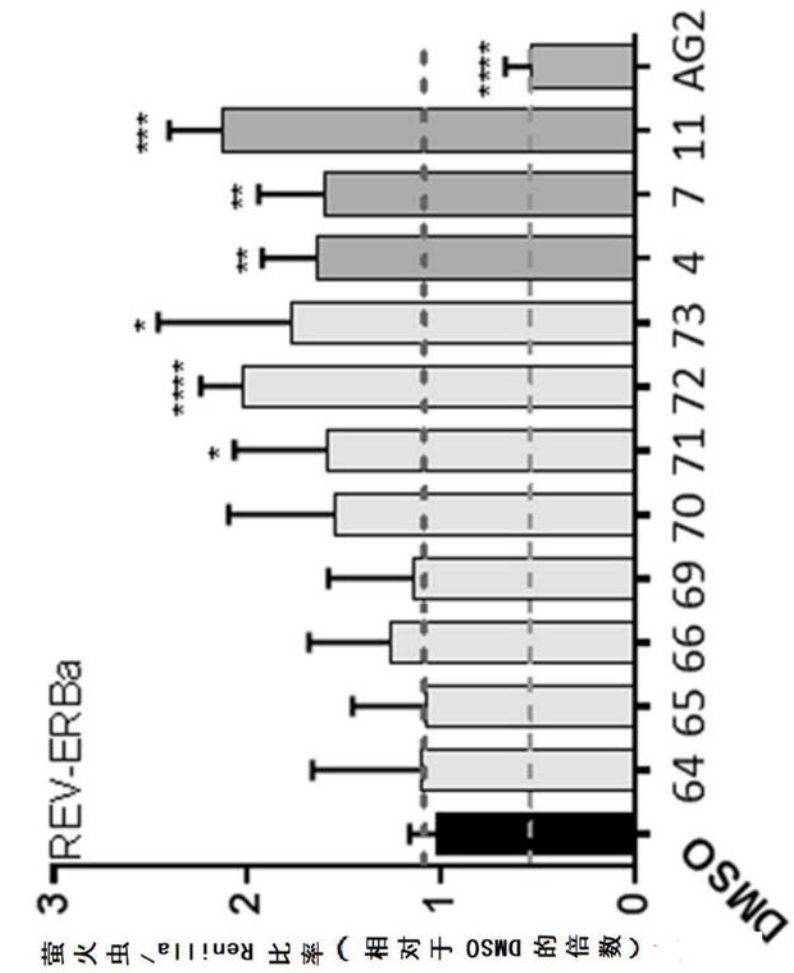


图5

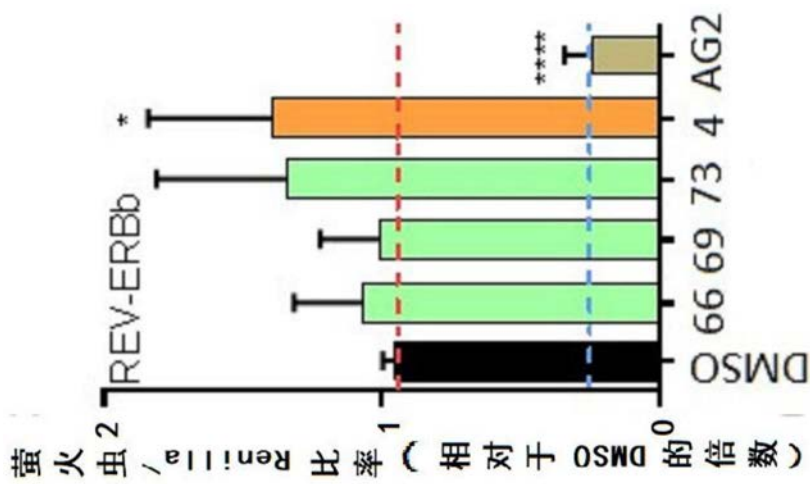


图6

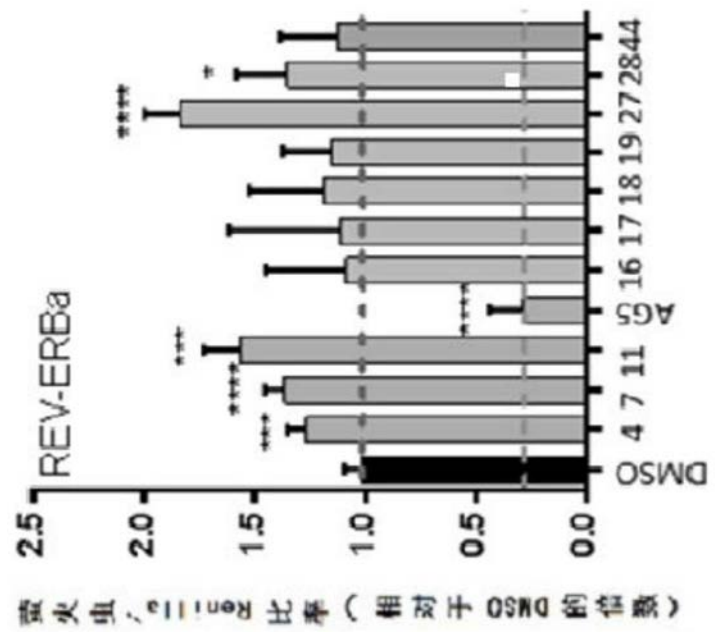


图7

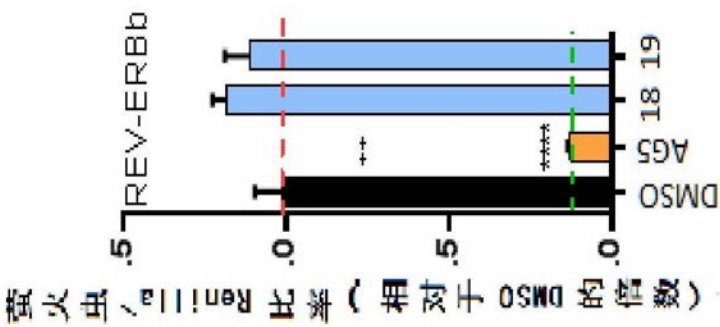


图8

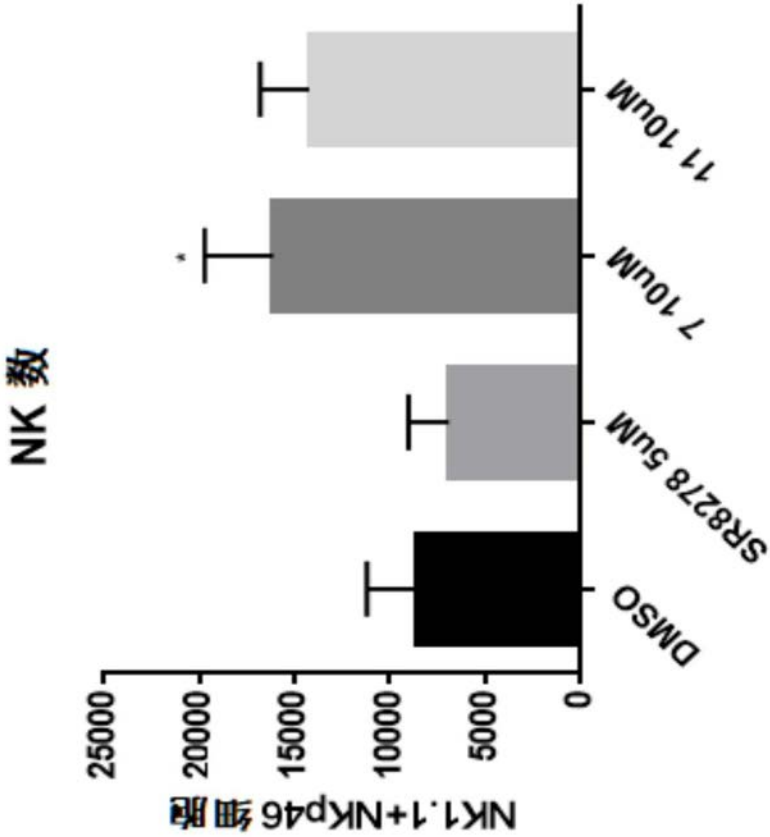


图9

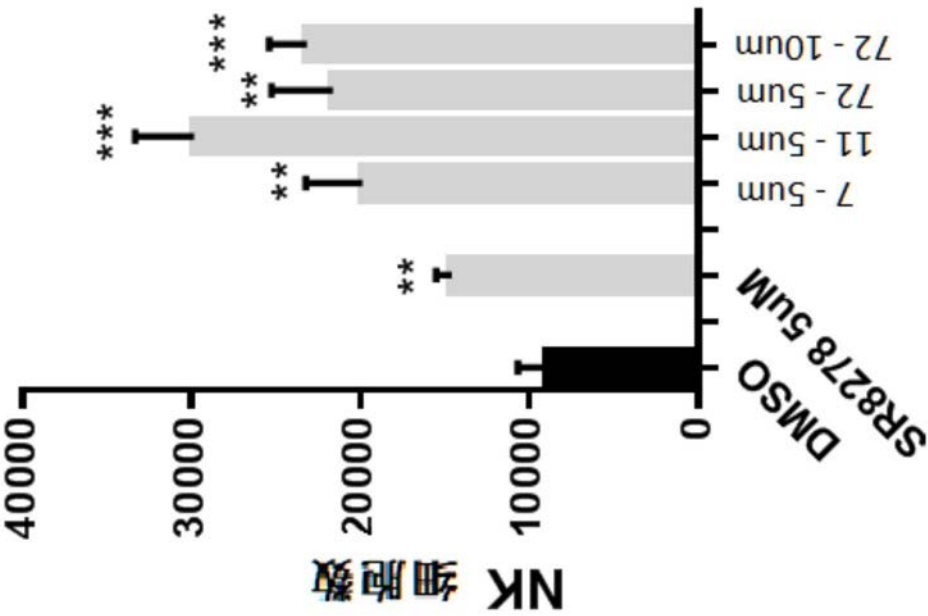


图10