



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103842364 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 04

(21) 申请号 201280047114. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 09. 27

C07D 487/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 405/04 (2006. 01)

61/542, 056 2011. 09. 30 US

A61K 31/519 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/057562 2012. 09. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/049352 EN 2013. 04. 04

(71) 申请人 奇尼塔公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 肖恩·P·艾度纳托

克里斯廷·贝达德

米拉·王·伊曼纳卡

凯利·W·佛勒

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 张世俊

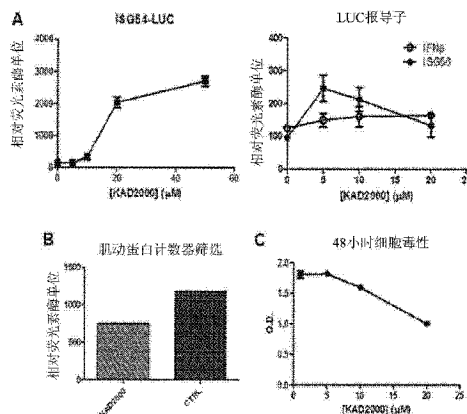
权利要求书3页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

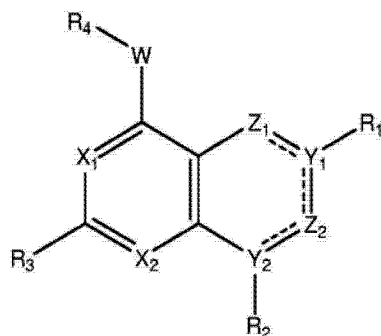
抗病毒化合物

(57) 摘要

本发明揭示用于治疗病毒感染（包括 RNA 病毒感染）的化合物和相关组合物，以及可以调节脊椎动物细胞中的 RIG-I 路径的化合物，包括可以活化所述 RIG-I 路径的化合物。



1. 一种由下式表示的化合物，



其中虚线表示存在或不存在键；

W 是选自键、O、S、NR₁ 或 CR_aR_b；

X₁ 是 CR₅ 或 N；

X₂ 是 CR₆ 或 N；

R_a、R_b、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 各自独立地是 H、任选地经取代的烷基、任选地经取代的芳基或任选地经取代的杂芳基；

Y₁ 和 Y₂ 独立地是 C 或 N；以及

Z₁ 和 Z₂ 独立地是 CR_aR_b、C=O、COR_a、CNR_aR_b 或 C=NR_a。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中 W 是 S。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中 R₁ 是 CH₃。

4. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 R₂ 是 CH₃。

5. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 R₃ 是任选地经取代的咪喃-2-基。

6. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 R₄ 是任选地经取代的苄基。

7. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 X₁ 是 N。

8. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 X₂ 是 N。

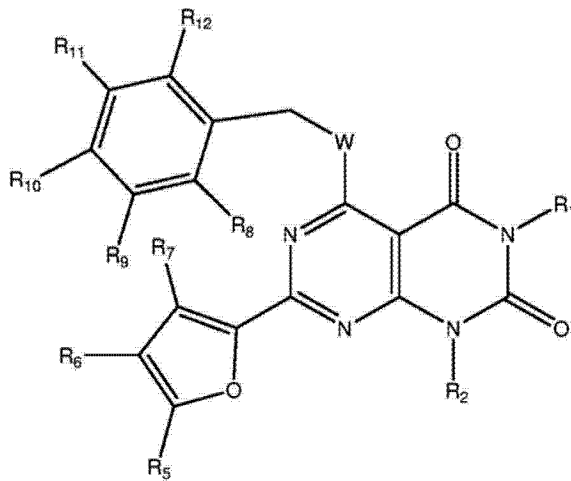
9. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 Y₁ 是 N。

10. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 Y₂ 是 N。

11. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 Z₁ 是 C=O。

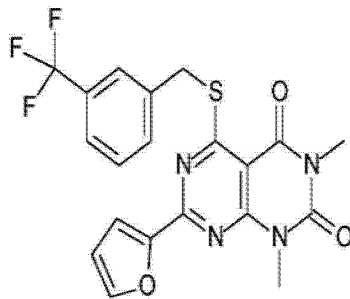
12. 根据前述权利要求中任一权利要求所述的化合物，其中 Z₂ 是 C=O。

13. 根据权利要求 1 所述的化合物，其进一步由下式表示：



其中 R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 和 R_{12} 独立地是 R_c 、 OR_c 、 COR_c 、 CO_2R_c 、 $OCOR_c$ 、 NR_cR_d 、 CF_3 、 CN 、 NO_2 、 F 、 Cl 、 Br 或 I ，其中 R_c 和 R_d 独立地是 H 或 C_{1-3} 烷基。

14. 根据权利要求 13 所述的化合物，其中 R_{11} 是 CF_3 。
15. 根据权利要求 13 或 14 所述的化合物，其中 R_1 是 CH_3 。
16. 根据权利要求 13、14 或 15 所述的化合物，其中 R_2 是 CH_3 。
17. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中所述化合物是由下式表示：



18. 一种医药组合物，其包含根据权利要求 1 到 17 中任一权利要求所述的化合物。
19. 一种治疗或预防脊椎动物的病毒感染的方法，其包含向所述脊椎动物授予根据权利要求 16 所述的医药组合物。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述病毒感染是由来自一个或一个以上以下病毒科的病毒引起：沙粒病毒科 (Arenaviridae)、星状病毒科 (Astroviridae)、双 RNA 病毒科 (Birnaviridae)、雀麦镶嵌病毒科 (Bromoviridae)、布尼亚病毒科 (Bunyaviridae)、杯状病毒科 (Caliciviridae)、长线形病毒科 (Closteroviridae)、豇豆镶嵌病毒科 (Comoviridae)、囊状噬菌体科 (Cystoviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae)、弯曲病毒科 (Flexiviridae)、肝炎病毒科 (Hepavirus)、光滑病毒科 (Leviviridae)、黄症病毒科 (Luteoviridae)、单股负链病毒科 (Mononegavirales)、花叶病毒科 (Mosaic Viruses)、网巢病毒科 (Nidovirales)、野田病毒科 (Nodaviridae)、正粘液病毒科 (Orthomyxoviridae)、小双节 RNA 病毒科 (Picobirnavirus)、小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)、马铃薯 Y 病毒科 (Potyviriidae)、呼肠孤病毒科 (Reoviridae)、逆转录病毒科 (Retroviridae)、随伴病毒科 (Sequiviridae)、纤细病毒科 (Tenuivirus)、披衣病毒科 (Togaviridae)、番茄丛矮病毒科 (Tombusviridae)、整体病毒科 (Totiviridae)、芜菁变黄镶嵌病毒科 (Tymoviridae)、肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae)、

疱疹病毒科 (Herpesviridae)、副粘液病毒科 (Paramyxoviridae) 或乳头瘤病毒科 (Papillomaviridae)。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述病毒感染是流感病毒、C 型肝炎病毒、西尼罗河病毒、SARS 冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、登革热病毒 (Dengue virus)、黄热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒、圣路易脑炎病毒 (St.Louis encephalitis virus)、墨瑞谷脑炎病毒 (Murray Valley virus)、波瓦森病毒 (Powassan virus)、罗西奥病毒 (Rocio virus)、跳跃病病毒 (louping-ill virus)、斑齐病毒 (Banzi virus)、伊利乌斯病毒 (Ilheus virus)、科科贝拉病毒 (Kokobera virus)、库宁病毒 (Kunjin virus)、阿尔弗病毒 (Alfuy virus)、牛腹泻病毒、卡萨努森林病病毒 (Kysanur forest disease virus) 或人类免疫缺乏病毒 HIV。

22. 根据权利要求 19 到 21 中任一权利要求所述的方法,其中所述医药组合物是作为预防性或治疗性疫苗的佐剂而授予。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述方法包含通过另外授予针对以下病毒的疫苗对脊椎动物进行接种:流感病毒、C 型肝炎病毒、西尼罗河病毒、SARS 冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、登革热病毒、黄热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒、圣路易脑炎病毒、墨瑞谷脑炎病毒、波瓦森病毒、罗西奥病毒、跳跃病病毒、斑齐病毒、伊利乌斯病毒、科科贝拉病毒、库宁病毒、阿尔弗病毒、牛腹泻病毒、卡萨努森林病病毒或人类免疫缺乏病毒 HIV。

24. 一种调节真核细胞的先天免疫反应的方法,其包含向所述细胞授予根据权利要求 1 到 15 中任一权利要求所述的化合物。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述细胞是活体内细胞。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述细胞是活体外细胞。

抗病毒化合物

技术领域

[0001] 本文中所公开的化合物和方法适用于治疗脊椎动物的病毒感染,包括 RNA 病毒感染。

背景技术

[0002] 总体来说, RNA 病毒在美国和全世界代表一个巨大的公共卫生问题。熟知的 RNA 病毒包括流感病毒(包括禽类和猪类分离株)、C 型肝炎病毒(HCV)、西尼罗河病毒(West Nile virus)、SARS 冠状病毒、呼吸道融合性病毒(RSV)和人类免疫缺乏病毒(HIV)。

[0003] 全世界超过 17 亿人感染 HCV,并且其中 13 亿是处于患上慢性肝病(肝硬化、肝癌和肝衰竭)风险中的慢性携带者(chronic carrier)。因此,HCV 是已开发世界中占有所有肝脏移植三分之二的原因。最近研究显示 HCV 感染的死亡率因慢性感染患者的年龄增长而升高。同样,季节性流感感染 5-20%的人口,导致每年 200,000 人住院和 36,000 人死亡。

[0004] 与流感和 HCV 相比,西尼罗河病毒造成的感染数最低,2010 年美国感染者是 981。20%的感染患者患上重型疾病,导致 4.5%的死亡率。与流感和 HCV 不同,不存在被核准用于治疗西尼罗河病毒感染的疗法,并且西尼罗河病毒因其可能作为生物战剂(bioterrorist agent)而为药物开发的高优先级病原体。

[0005] 在所列举的 RNA 病毒中,仅流感病毒存在疫苗。因此,药物治疗对降低与这些病毒相关的显著发病率和死亡率必不可少。令人遗憾的是,抗病毒药物的数目有限,多数有效性较差,并且几乎全部受病毒抗性快速进化和有限作用范围困扰。此外,急性流感和 HCV 感染的治疗仅适度有效。HCV 感染的护理标准(standard of care)聚乙二醇化干扰素和病毒唑(ribavirin)仅对 50%的患者有效,并且存在许多与组合疗法有关的剂量限制性副作用。两类急性流感抗病毒剂(金刚烷和神经氨酸酶抑制剂)仅在感染后最初 48 小时内有效,因此限制治疗的机会窗口。金刚烷的高抗性已限制其使用,并且神经氨酸酶抑制剂的大量储备将最终导致滥用并且出现流感抗性株。

[0006] 大部分针对这些病毒的药物开发上的努力靶向病毒蛋白。其较大部分原因在于当前药物作用范围较窄并且出现病毒抗性。大部分 RNA 病毒具有较小基因体并且多数编码不到一打蛋白质。病毒靶因此有限。根据上文,对于针对病毒感染的有效治疗存在未满足的巨大需求。

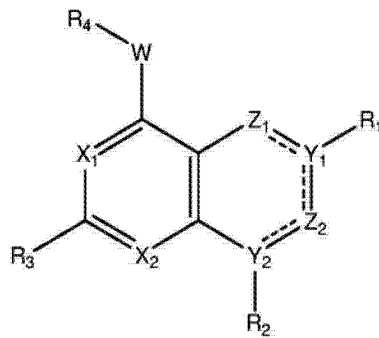
发明内容

[0007] 本文中所公开的化合物和方法将病毒药物开发的焦点从靶向病毒蛋白转变为开发靶向并且增强宿主先天抗病毒反应的药物。此类化合物和方法可能更有效,不太容易出现病毒抗性,引起较少副作用并且有效针对一系列不同病毒。

[0008] RIG-I 路径密切涉及调控 RNA 病毒感染的先天免疫反应。预期 RIG-I 激动剂适用于治疗许多病毒,包括(但不限于)HCV、流感和西尼罗河病毒。因此,本发明涉及用于治疗病毒感染(包括 RNA 病毒感染)的化合物和方法,其中所述化合物可以调节 RIG-I 路径。

[0009] 本发明的一个实施例包括由下式表示的化合物，

[0010]

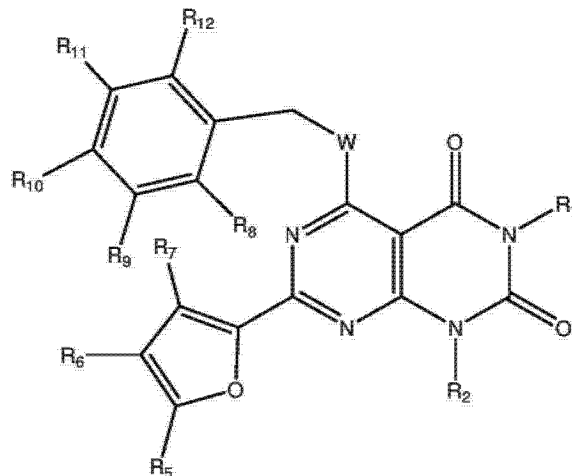


[0011] 其中虚线表示存在或不存在键；W 选自键、O、S、NR₁ 或 CR_aR_b；X₁ 是 CR₅ 或 N；X₂ 是 CR₆ 或 N；R_a、R_b、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 各自独立地是 H、任选地经取代的烷基、任选地经取代的芳基或任选地经取代的杂芳基；Y₁ 和 Y₂ 独立地是 C 或 N；并且 Z₁ 和 Z₂ 独立地是 CR_aR_b、C=O、COR_a、CNR_aR_b 或 C=NR_a。

[0012] 在一些实施例中，W 是 S。在一些实施例中，R₁ 是 CH₃。在一些实施例中，R₂ 是 CH₃。在一些实施例中，R₃ 是任选地经取代的呋喃-2-基。在一些实施例中，R₄ 是任选地经取代的苄基。在一些实施例中，X₁ 是 N。在一些实施例中，X₂ 是 N。在一些实施例中，Y₁ 是 N。在一些实施例中，Y₂ 是 N。在一些实施例中，Z₁ 是 C=O。在一些实施例中，Z₂ 是 C=O。

[0013] 本发明的一些实施例包括进一步由下式表示的化合物，

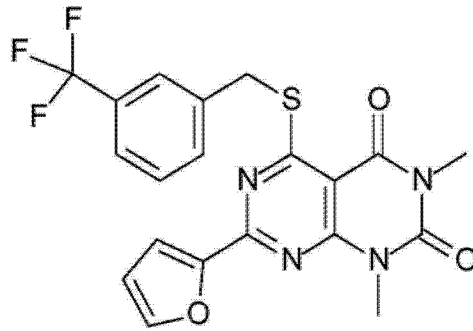
[0014]



[0015] 其中 R₁、R₂、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁ 和 R₁₂ 独立地是 R_c、OR_c、COR_c、CO₂R_c、OCOR_c、NR_cR_d、CF₃、CN、NO₂、F、Cl、Br 或 I，其中 R_c 和 R_d 独立地是 H 或 C₁₋₃ 烷基。在一些实施例中，R₁₁ 是 CF₃。在一些实施例中，R₁ 是 CH₃。在一些实施例中，R₂ 是 CH₃。

[0016] 本发明的一些实施例包括由下式表示的化合物

[0017]



[0018] 本发明的一些实施例包括一种医药组合物,所述医药组合物包含如本文所述的化合物。

[0019] 本发明的一些实施例包括一种治疗或预防脊椎动物病毒感染的方法,所述方法包含向所述脊椎动物授予医药组合物,所述医药组合物包含如本文所述的化合物。在一些实施例中,病毒感染是由来自一个或一个以上以下病毒科的病毒引起:沙粒病毒科(Arenaviridae)、星状病毒科(Astroviridae)、双RNA病毒科(Birnaviridae)、雀麦镶嵌病毒科(Bromoviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、长线形病毒科(Closteroviridae)、豇豆镶嵌病毒科(Comoviridae)、囊状噬菌体科(Cystoviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、弯曲病毒科(Flexiviridae)、肝炎病毒科(Hepavirus)、光滑病毒科(Leviviridae)、黄症病毒科(Luteoviridae)、单股负链病毒科(Mononegavirales)、花叶病毒科(Mosaic Viruses)、网巢病毒科(Nidovirales)、野田病毒科(Nodaviridae)、正粘液病毒科(Orthomyxoviridae)、小双节RNA病毒科(Picobirnavirus)、小RNA病毒科(Picornaviridae)、马铃薯Y病毒科(Potyviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、随伴病毒科(Sequiviridae)、纤细病毒科(Tenuivirus)、披衣病毒科(Togaviridae)、番茄丛矮病毒科(Tombusviridae)、整体病毒科(Totiviridae)、芜菁变黄镶嵌病毒科(Tymoviridae)、肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、副粘液病毒科(Paramyxoviridae)或乳头瘤病毒科(Papillomaviridae)。在一些实施例中,病毒感染是流感病毒、C型肝炎病毒、西尼罗河病毒、SARS冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、登革热病毒(Dengue virus)、黄热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒、圣路易脑炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、墨瑞谷脑炎病毒(Murray Valley virus)、波瓦森病毒(Powassan virus)、罗西奥病毒(Rocio virus)、跳跃病病毒(louping-ill virus)、斑齐病毒(Banji virus)、伊利乌斯病毒(Ilheus virus)、科科贝拉病毒(Kokobera virus)、库宁病毒(Kunjin virus)、阿尔弗病毒(Alfuy virus)、牛腹泻病毒、卡萨努森林病病毒(Kyasanur forest disease virus)或HIV。

[0020] 在一些实施例中,医药组合物作为预防性或治疗性疫苗的佐剂授予。在一些实施例中,所述方法包括通过另外授予针对以下病毒的疫苗对脊椎动物进行接种:流感病毒、C型肝炎病毒、西尼罗河病毒、SARS冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、登革热病毒、黄热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒、圣路易脑炎病毒、墨瑞谷脑炎病毒、波瓦森病毒、罗西奥病毒、跳跃病病毒、斑齐病毒、伊利乌斯病毒、科科贝拉病毒、库宁病毒、阿尔弗病毒、牛腹泻病毒、卡萨努森林病病毒或HIV。

[0021] 本发明的一些实施例包括一种调节真核细胞的先天免疫反应的方法,所述方法包含向细胞授予如本文所述的化合物。在一些实施例中,细胞是体内细胞。在其它实施例中,所述细胞是体外细胞。

附图说明

[0022] 图 1 显示 KIN2000 的验证和表征 (“RLU”= 相对荧光素酶单位)。在图 1A 中,通过证明 IFN β - 荧光素酶报导基因和 ISG56- 荧光素酶报导基因 (LUC 报导子,右) 和 ISG54- 荧光素酶报导子 (ISG54-LUC,左) 的剂量依赖性诱发来验证初始“攻毒”化合物。图 1B 证实 KIN2000 的特异性,KIN2000 不诱发非特异性 β - 肌动蛋白启动子 (“KIN2000”= 在 KIN2000 存在下的 β - 肌动蛋白- 荧光素酶报导子;“CTRL”= 阳性对照 β - 肌动蛋白诱发)。在图 1C 中,MTS 分析证明 KIN2000 未显示对使用所述化合物处理 48 小时的人类细胞的明显细胞毒性。

[0023] 图 2 显示 KIN2000 活化转录因子。在图 2A 中,用增加量 KIN2000 处理的海拉细胞显示通过核强度减去细胞质强度 (“正规化核强度”) 定量的易位到细胞核的 IRF-3 的剂量相关性增加。在图 2B 中,用增加量 KIN2000 处理的海拉细胞显示通过核强度减去细胞质强度定量的 NF κ B 易位随剂量变化而增加。

[0024] 图 3 显示由 KIN2000 诱发的细胞激素表达的 Luminex[®] (德克萨斯州奥斯汀路明克斯公司 (Luminex Corp., Austin, TX)) 定量含量。用增加量 KIN2000 处理的人类树突状细胞显示细胞激素 IL-8、MCP-1 (CCL2) 以及 MIP-1 α 和 β (分别是 CCL3 和 CCL4) 的剂量依赖性表达。

具体实施方式

[0025] 本发明提供将病毒治疗的焦点从靶向病毒蛋白转变为开发靶向并且增强宿主 (患者) 先天抗病毒反应的药物的化合物和方法。此类化合物和方法可能更有效,不太容易出现病毒抗性,引起较少副作用并且有效针对一系列不同病毒。

[0026] RIG-I 路径密切涉及调控 RNA 病毒感染的先天免疫反应。RIG-I 是触发广泛范围的 RNA 病毒免疫性所必需的胞溶质病原体识别受体。RIG-I 是结合于 RNA 病毒基因体内由均聚尿苷延伸所表征的基序或聚合 U / A 基序的双股 RNA 解螺旋酶。结合于 RNA 诱发构形变化,减轻由自体阻遏域抑制 RIG-I 信号传导,因此允许 RIG-I 通过其串联卡斯蛋白酶活化和募集域 (CARD) 到信号下游。RIG-I 信号传导取决于其 NTP 酶活性,但不需要解螺旋酶域。RIG-I 信号传导于静止细胞中沉默,并且阻遏域充当对病毒感染作出反应支配信号传导的启闭开关。

[0027] RIG-I 信号通过存在于线粒体外膜中的必需接附蛋白 IPS-1 (也称为 Cardif、MAVs 和 VISA) 转导。IPS-1 募集刺激下游 IRF-3 活化的巨分子信号传导复合物,其中 IRF-3 是诱发控制感染的 I 型 IFN 基因和病毒反应性基因表达的转录因子。直接或通过调节 RIG-I 路径组分 (包括 IRF-3) 触发 RIG-I 信号传导的化合物作为抗病毒剂或免疫调节剂提供有吸引力的治疗应用。

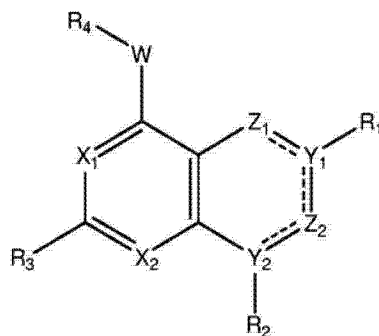
[0028] 使用高通量筛选方法识别调节 RIG-I 路径的化合物,即 RNA 病毒感染细胞先天免疫反应的关键调控剂。在特定实施例中,已证明被验证的 RIG-I 激动剂主导化合物特异性

活化干扰素调控因子-3 (IRF-3)。在其它实施例中,所述化合物显示以下一者或一者以上:其诱发干扰素刺激基因 (ISG) 表达,在基于细胞的分析中具有低细胞毒性,适用于类似物开发和 SAR 研究,具有药物状生化性质,并且具有针对 A 型流感病毒和 / 或 HCV 的抗病毒活性。在某些实施例中,化合物显示所有这些特征。

[0029] 如下所述,这些化合物表示一类新型潜在抗病毒治疗剂。虽然本发明不受化合物体内特异性作用机制束缚,但选择用于调节 RIG-I 路径的化合物。在某些实施例中,所述调节是活化 RIG-I 路径。本文中所公开的化合物和方法用于以下一者或一者以上:减少 HCV 和 / 或流感病毒的细胞培养物模型中的病毒蛋白、病毒 RNA 和感染性病毒。

[0030] 在一个实施例中,本发明涉及一类由下式表示的化合物,

[0031]

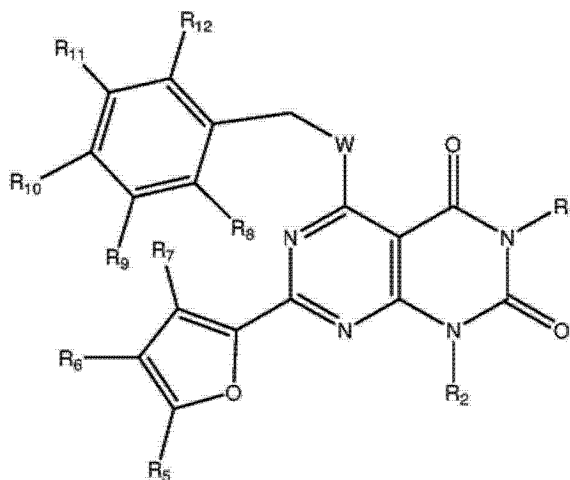


[0032] 其中虚线表示存在或不存在键;W 选自键、O、S、NR₁ 或 CR_aR_b;X₁ 是 CR₅ 或 N;X₂ 是 CR₆ 或 N;R_a、R_b、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 R₆ 各自独立地是 H、任选地经取代的烷基、任选地经取代的芳基或任选地经取代的杂芳基;Y₁ 和 Y₂ 独立地是 C 或 N;并且 Z₁ 和 Z₂ 独立地是 CR_aR_b、C=O、COR_a、CNR_aR_b 或 C=NR_a。

[0033] 另外, W 可以是 S, R₁ 可以是 CH₃, R₂ 可以是 CH₃, R₃ 可以是任选地经取代的咪喃-2-基, R₄ 可以是任选地经取代的苄基, X₁ 可以是 N, X₂ 可以是 N, Y₁ 可以是 N, Y₂ 可以是 N, Z₁ 可以是 C=O, 和 / 或 Z₂ 可以是 C=O。

[0034] 本发明的一些实施例包括由下式表示的化合物,

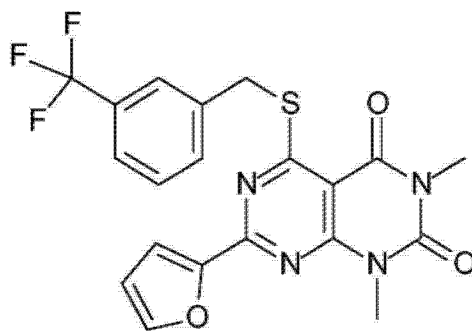
[0035]



[0036] 其中 R₁、R₂、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁ 和 R₁₂ 可以独立地是 R_c、OR_c、COR_c、CO₂R_c、OCOR_c、NR_cR_d、CF₃、CN、NO₂、F、Cl、Br 或 I, 其中 R_c 和 R_d 可以独立地是 H 或 C₁₋₃ 烷基。在一些实施例中, R₁₁ 可以是 CF₃。在一些实施例中, R₁ 可以是 CH₃。在一些实施例中, R₂ 可以是 CH₃。

[0037] 在本文中所公开的另一个实施例中,化合物具有下式(称为 KIN2000 化合物)

[0038]



[0039] 除非另外指明,否则通过结构、化学式、名称或任何其它手段对本文中化合物的任何提及包括药学上可接受的盐,如钠盐、钾盐和铵盐;前药,如酯前药;替代固体形式,如多晶型物、溶剂合物、水合物等;互变异构体;或在如本文所述使用化合物的条件下可以迅速转化为本文所述的化合物的任何其它化学物质。

[0040] 除非明确地描述立体化学,否则化合物的任何结构、化学式或名称可以指所述化合物的任何立体异构体或立体异构体的任何混合物。

[0041] 如本文中所用,术语“官能团”是指分子内造成那些分子的特征化学反应的特定原子团。

[0042] 除非另外指明,否则当任何化合物或化学结构特征(在本文中统称为“化合物”)(如烷基、芳基等)称为“任选地经取代”时,所述化合物可能不具有取代基(在此情况下其“未经取代”),或其可能包括一个或一个以上取代基(在此情况下其“经取代”)。术语“取代基”具有所属领域的一般技术人员已知的普通含义。在一些实施例中,取代基可以是所属领域中已知的普通有机部分,其可以具有 15g/mol 到 50g/mol、15g/mol 到 100g/mol、15g/mol 到 150g/mol、15g/mol 到 200g/mol、15g/mol 到 300g/mol 或 15g/mol 到 500g/mol 的分子量(例如,取代基原子的原子质量的总和)。在一些实施例中,取代基包含:0-30、0-20、0-10 或 0-5 个碳(C)原子;和/或 0-30、0-20、0-10 或 0-5 个杂原子,包括 N、O、S、Si、F、Cl、Br 或 I;其限制条件是取代化合物中的取代基包含至少一个包括 C、N、O、S、Si、F、Cl、Br 或 I 的原子。取代基的实例包括(但不限于)烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、酰氧基、烷基羧酸酯基、硫醇、烷硫基、氰基、卤基、硫羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫氨基甲酰基、N-硫氨基甲酰基、C-酰胺基、N-酰胺基、S-磺酰胺基、N-磺酰胺基、异氰酰基、硫氰基、异硫氰基、硝基、硅烷基、次磺酰基、亚磺酰基、磺酰基、卤烷基、卤烷氧基、三卤甲磺酰基、三卤甲磺酰胺基、氨基等。为方便起见,对于分子的基团部分或一部分使用术语“分子量”以表示分子的所述基团部分或一部分中原子的原子质量总和,即使所述分子可能不是完整分子。

[0043] 如本文中所用的术语“烃基”具有所属领域中通常理解的广泛含义并且可以包括由碳和氢构成的部分。一些实例可以包括烷基、烯基、炔基、芳基等和其组合,并且可以是直链、分支链、环状或其组合。烃基可以键结到结构可以携带的任何其它数目的部分(例如,可以键结到一个其它基团,如 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 等;两个其它基团,如 $-\text{苯基}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 等;或任何数目的其它基团),并且在一些实施例中,可以含有一到三十五个碳原子。烃基的实例包括(但不限于) C_1 烷基、 C_2 烷基、 C_2 烯基、 C_2 炔基、 C_3 烷基、 C_3 烯基、 C_3 炔基、 C_4 烷基、 C_4 烯

基、C₄ 炔基、C₅ 烷基、C₅ 烯基、C₅ 炔基、C₆ 烷基、C₆ 烯基、C₆ 炔基、苯基等。

[0044] 如本文中所述的术语“烷基”具有所属领域中通常理解的广泛含义，并且可以包括由碳和氢构成、不含双键或三键并且不具有任何环状结构的部分。烷基可以是直链烷基、分支链烷基、环烷基或其组合，并且在一些实施例中，可以含有一到三十五个碳原子。在一些实施例中，烷基可以包括 C₁₋₁₀ 直链烷基，如甲基 (-CH₃)、乙基 (-CH₂CH₃)、正丙基 (-CH₂CH₂CH₃)、正丁基 (-CH₂CH₂CH₂CH₃)、正戊基 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、正己基 (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃) 等；C₃₋₁₀ 分支链烷基，如 C₃H₇ (例如异丙基)、C₄H₉ (例如分支链丁基异构体)、C₅H₁₁ (例如分支链戊基异构体)、C₆H₁₃ (例如分支链己基异构体)、C₇H₁₅ (例如分支链庚基异构体) 等；C₃₋₁₀ 环烷基，如 C₃H₅ (例如环丙基)、C₄H₇ (例如环丁基异构体，如环丁基、甲基环丙基等)、C₅H₉ (例如环戊基异构体，如环戊基、甲基环丁基、二甲基环丙基等)、C₆H₁₁ (例如环己基异构体)、C₇H₁₃ (例如环庚基异构体) 等；等。

[0045] 术语“烷基”、“烯基”和“炔基”分别是指经取代和未经取代的烷基、烯基和炔基。烷基可以如本文中所述定义任选地经取代。

[0046] 经取代的烷基、烯基和炔基是指经一到五个取代基取代的烷基、烯基和炔基，所述取代基包括 H、低碳烷基、芳基、烯基、炔基、芳基烷基、烷氧基、芳氧基、芳基烷氧基、烷氧基烷基芳基、烷基氨基、芳基氨基、NH₂、OH、CN、NO₂、OCF₃、CF₃、F、1- 脞、2- 脞、烷基羰基、吗啉基、哌啶基、二噁烷基、吡喃基、杂芳基、呋喃基、苯硫基、四唑基、噻唑基、异噻唑基、咪唑基、噻二唑基、噻二唑 S- 氧化物、噻二唑 S, S- 二氧化物、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、SR、SOR、SO₂R、CO₂R、COR、CONR' R''、CSNR' R'' 和 SO_nNR' R''。

[0047] 如本文中单独或组合使用的术语“炔基”是指包含含 2 到 20 个碳原子并且具有一个或一个以上碳-碳三键并且不具有任何环状结构的直链或分支链烃的官能团。炔基可以如本文中所述定义任选地经取代。炔基的实例包括 (但不限于) 乙炔基、丙炔基、羟基丙炔基、丁炔基、丁炔 -1- 基、丁炔 -2- 基、3- 甲基丁炔 -1- 基、戊炔基、戊炔 -1- 基、己炔基、己炔 -2- 基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基、十一炔基、十二炔基、十三炔基、十四炔基、十五炔基、十六炔基、十七炔基、十八炔基、十九炔基、二十炔基等。

[0048] 如本文中单独或组合使用的术语“亚烷基”是指衍生自直链或分支链饱和烃并且在两个或两个以上位置处连接的饱和脂肪族基，如亚甲基 (-CH₂-)。除非另外指定，否则术语“烷基”可以包括“亚烷基”。

[0049] 如本文中单独或组合使用的术语“烷基羰基”或“烷酰基”是指所包含的烷基通过羰基连接于亲本分子部分的官能团。烷基羰基的实例包括 (但不限于) 甲基羰基、乙基羰基等。

[0050] 如本文中单独或组合使用的术语“杂烷基”是指包含仅由单键键联的 1 到 20 个原子的直链或分支链烃的官能团，其中所述链中至少一个原子是碳并且所述链中至少一个原子是 O、S、N 或其任何组合。杂烷基可以完全饱和或含有 1 到 3 不饱和度。非碳原子可以在杂烷基的任何内部位置，并且至多两个非碳原子可以是连续的，如 -CH₂-NH-OCH₃。此外，非碳原子可以任选地被氧化并且氮可以任选地季铵化。

[0051] 如本文中单独或组合使用的术语“烷氧基”是指包含烷基醚基的官能团。烷氧基的实例包括 (但不限于) 甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基等。

[0052] 如本文中单独或组合使用的术语“羟基”是指官能团羟基 (-OH)。

[0053] 如本文中单独或组合使用的术语“羧基”是指官能团 $-C(=O)OH$ 或相应“羧酸根”阴离子 $-C(=O)O^-$ 。实例包括 (但不限于) 甲酸、乙酸、草酸、苯甲酸。“O-羧基”是指具有通式 $RCOO$ 的羧基, 其中 R 是有机部分或基团。“C-羧基”是指具有通式 $COOR$ 的羧基, 其中 R 是有机部分或基团。

[0054] 如本文中单独或组合使用的术语“氧代”是指官能团 $=O$ 。

[0055] 如本文中所述的术语“碳环”具有所属领域中通常理解的广泛含义, 并且包括环原子全部是碳的环或环系统。实例包括 (但不限于) 苯基、萘基、蒽基、环烷基、环烯基、环炔基等, 和其组合。

[0056] 如本文中所述的术语“杂环”具有所属领域中通常理解的广泛含义, 并且包括至少一个环原子不是碳 (如 N、O、S 等) 的环或环系统。实例包括 (但不限于) 杂芳基、环杂烷基、环杂烯基、环杂炔基等, 和其组合。

[0057] 如本文中单独或组合使用的术语“环烷基”和“碳环烷基”是指包含经取代或未经取代的具有 3 到 12 个碳原子的非共轭环状分子环结构的非芳香族烃的官能团, 其中所述碳环结构中仅使用碳-碳单键键联所述碳原子。环烷基可以是单环、双环或多环, 并且可以任选地包括一到三个其它环状结构, 如芳基、杂芳基、环烯基、杂环烷基或杂环烯基。

[0058] 如本文中单独或组合使用的术语“低碳环烷基”是指包含经取代或未经取代的具有 3 到 6 个碳原子的非共轭环状分子环结构的单环非芳香族烃的官能团, 其中所述碳环结构中仅使用碳-碳单键键联所述碳原子。低碳环烷基的实例包括 (但不限于) 环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

[0059] 如本文中所述的术语“芳基”具有所属领域中通常理解的广泛含义, 并且可以包括芳香族环或芳香族环系统。芳基可以是单环、双环或多环, 并且可以任选地包括一到三个其它环状结构; 如环烷基、环烯基、杂环烷基、杂环烯基或杂芳基。术语“芳基”包括 (但不限于) 苯基 (次苄基)、苯硫基、吡啶基、萘基、甲苯基、二甲苯基、蒽基、菲基、萘基、联苯、萘基、1-甲基萘基、二氢萘基、萘基、蒽基、苝基、丙炔合萘基、菲基、苯并 [a] 蒽基、苯并 [c] 菲基、屈基、苝基、并四苯基 (稠四苯基)、三亚苯基、蒽嵌蒽基、苯并蒽基、苯并 [a] 蒽基、苯并 [e] 苝基、苯并 [ghi] 蒽基、苯并 [j] 苝基、苯并 [k] 苝基、碗烯基 (corannulenylyl)、蒽基、二蒽基、螺烯基 (helicenylyl)、稠七苯基、稠六苯基、蒽基、稠五苯基、蒽基、蒽基、联四苯基等。

[0060] 另外, 如本文中单独或组合使用的术语“芳基”、“烃基芳基”或“芳基烃”可以指包含经取代或未经取代的具有 3 到 12 个碳原子的共轭环状分子环结构的芳香族烃的官能团。经取代的芳基是指被一到五个取代基取代的芳基, 所述取代基包括 H、低碳烷基、芳基、烯基、炔基、芳基烷基、烷氧基、芳氧基、芳基烷氧基、烷氧基烷基芳基、烷基氨基、芳基氨基、 NH_2 、OH、CN、 NO_2 、 OCF_3 、 CF_3 、Br、Cl、F、1-甲脒基、2-甲脒基、烷基羰基、吗啉基、哌啶基、二噁烷基、吡喃基、杂芳基、呋喃基、苯硫基、四唑基、噻唑、异噻唑基、咪唑基、噻二唑、噻二唑 S-氧化物、噻二唑 S, S-二氧化物、吡唑基、噁唑、异噁唑、吡啶基、嘧啶基、喹啉、异喹啉、SR、SOR、 SO_2R 、 CO_2R 、COR、CONRR、CSNRR 和 SO_nNRR 等。

[0061] 如本文中单独或组合使用的术语“低碳芳基”是指包含经取代或未经取代的具有 3 到 6 个碳原子的共轭环状分子环结构的芳香族烃的官能团。低碳芳基的实例包括 (但不

限于) 苯基和萘基。

[0062] 如本文中单独或组合使用的术语“杂芳基”是指包含经取代或未经取代的具有 3 到 12 个原子的共轭环状分子环结构的芳香族烃的官能团, 其中所述环结构中至少一个原子是碳并且所述环结构中至少一个原子是 O、S、N 或其任何组合。杂芳基可以是单环、双环或多环, 并且可以任选地包括一到三个其它环状结构, 如芳基、环烷基、环烯基、杂环烷基或杂环烯基。杂芳基的实例包括(但不限于)吡啶基、苯并吡啶基(benzidolyl)、苯并咪唑基、苯并异噁唑基、苯并二氧杂环己烯基、二氢苯并二氧杂环己烯基、苯并间二氧杂环戊烯基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并异噁唑基、苯并吡喃基、苯并苯硫基、苯并[c]苯硫基、苯并三唑基、苯并噁二唑基、苯并噁唑基、苯并噻二唑基、苯并噻唑基、苯并噻吩基、咪唑基、色酮基、喹啶基、二氢喹啶基、香豆素基、二苯并呋喃基、呋喃并吡啶基、呋喃基、吡啶基、吡啶基、二氢吡啶基、咪唑基、吡唑基、异苯并呋喃基、异吡啶基、异吡啶基、二氢异吡啶基、异喹啶基、二氢异喹啶基、异噁唑基、异噻唑基、噁唑基、噁二唑基、啡啶基、啡啶基、嘌呤基、吡喃基、吡喃基、吡唑基、吡啶基、噻吩基、吡咯基、吡咯并吡啶基、喹啶基、喹啶基、喹啶基、四氢喹啶基、四唑并吡喃基、四氢异喹啶基、苯硫基、噻唑基、噻二唑基、噻吩并吡啶基、噻吩基、苯硫基、三唑基、咕吨基等。

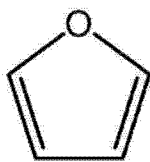
[0063] 如本文中单独或组合使用的术语“低碳杂芳基”是指包含经取代或未经取代的具有 3 到 6 个原子的共轭环状分子环结构的单环或双环芳香族烃的官能团, 其中所述环结构中至少一个原子是碳并且所述环结构中至少一个原子是 O、S、N 或其任何组合。

[0064] 与本文中提及的一些化学名称有关的结构描述如下。这些结构可以如下所示未经取代, 或取代基可以独立地处于所述结构未经取代时通常由氢原子占据的任何位置。除非连接点由 -I 表示, 否则连接可以发生在通常由氢原子占据的任何位置处。

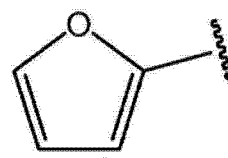
[0065]



苯基



呋喃基



呋喃-2-基

[0066] 每一 R_a 可以独立地是 H; 任选地经取代的烷基; 任选地经取代的芳基, 如任选地经取代的苯基或任选地经取代的芳基; 任选地经取代的杂芳基, 如任选地经取代的吡啶基、任选地经取代的呋喃基、任选地经取代的噻吩基等。在一些实施例中, 每一 R_a 可以独立地是 H 或 C_{1-12} 烷基, 包括: 具有式 C_aH_{a+1} 的直链或分支链烷基或具有式 C_aH_{a-1} 的环烷基, 其中 a 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12, 如具有下式的直链或分支链烷基: CH_3 、 C_2H_5 、 C_3H_7 、 C_4H_9 、 C_5H_{11} 、 C_6H_{13} 、 C_7H_{15} 、 C_8H_{17} 、 C_9H_{19} 、 $C_{10}H_{21}$ 等, 或具有下式的环烷基: C_3H_5 、 C_4H_7 、 C_5H_9 、 C_6H_{11} 、 C_7H_{13} 、 C_8H_{15} 、 C_9H_{17} 、 $C_{10}H_{19}$ 等。

[0067] 每一 R_b 可以独立地是 H; 任选地经取代的烷基; 任选地经取代的芳基, 如任选地经取代的苯基或任选地经取代的芳基; 任选地经取代的杂芳基, 如任选地经取代的吡啶基、任选地经取代的呋喃基、任选地经取代的噻吩基等。在一些实施例中, 每一 R_b 可以独立地是 H 或 C_{1-12} 烷基, 包括: 具有式 C_aH_{a+1} 的直链或分支链烷基或具有式 C_aH_{a-1} 的环烷基, 其中 a 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12, 如具有下式的直链或分支链烷基: CH_3 、 C_2H_5 、 C_3H_7 、 C_4H_9 、 C_5H_{11} 、 C_6H_{13} 、 C_7H_{15} 、 C_8H_{17} 、 C_9H_{19} 、 $C_{10}H_{21}$ 等, 或具有下式的环烷基: C_3H_5 、 C_4H_7 、 C_5H_9 、 C_6H_{11} 、 C_7H_{13} 、 C_8H_{15} 、 C_9H_{17} 、

C₁₀H₁₉ 等。

[0068] 每一 R_c 可以独立地是 H 或 C₁₋₃ 烷基, 如甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基等。

[0069] 每一 R_d 可以独立地是 H 或 C₁₋₃ 烷基, 如甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基等。

[0070] 术语“治疗”包括人类或其它动物的疾病的诊断、治愈、缓解、接种、加强疗法或预防中的一者或一者以上。

[0071] 如本文中所用, 术语“脊椎动物”包括所有活的脊椎动物, 如 (但不限于) 哺乳动物、人类、鸟类、犬、猫、家畜、农畜、放养区牧群等。

[0072] 许多 RNA 病毒共用生物化学、调控和信号传导路径。这些病毒包括 (但不限于) 流感病毒 (包括禽类和猪类分离株)、C 型肝炎病毒、西尼罗河病毒、SARS 冠状病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、登革热病毒、黄热病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒、圣路易脑炎病毒、墨瑞谷脑炎病毒、波瓦森病毒、罗西奥病毒、跳跃病病毒、斑齐病毒、伊利乌斯病毒、科科贝拉病毒、库宁病毒、阿尔弗病毒、牛腹泻病毒和卡萨努森林病病毒。本文中所公开的化合物和方法可以用于治疗这些病毒。

[0073] RNA 病毒的相关分类病毒科包括 (但不限于) 星状病毒科、双 RNA 病毒科、雀麦镶嵌病毒科、杯状病毒科、长线形病毒科、豇豆镶嵌病毒科、囊状噬菌体科、黄病毒科、弯曲病毒科、肝炎病毒科、光滑病毒科、黄症病毒科、单股负链病毒科、花叶病毒科、网巢病毒科、野田病毒科、正粘液病毒科、小双节 RNA 病毒科、小 RNA 病毒科、马铃薯 Y 病毒科、呼肠孤病毒科、逆转录病毒科、随伴病毒科、纤细病毒科、披衣病毒科、番茄丛矮病毒科、整体病毒科和芜菁变黄镶嵌病毒科。本文中所公开的化合物和方法可以用于作为药理学上可接受的药物调配物的一部分治疗这些病毒科内的病毒。其它相关病毒科包括 (但不限于) 肝 DNA 病毒、疱疹病毒科、副粘液病毒科和乳头瘤病毒科。

[0074] 本发明提供包含单独或与抗原组合的化合物的医药组合物和疫苗, 用于治疗和 / 或预防动物 (包括脊椎动物) 的疾病。

[0075] 本发明提供所述化合物作为佐剂的用途。

[0076] 本文中所公开的化合物和方法可以与目前开发或使用的其它疗法累加或协同。举例来说, 病毒唑和干扰素 -α 在组合使用时提供对 HCV 感染的有效性治疗。其组合功效可以超过任一药品单独使用时的功效。本发明的组合物可以单独或与干扰素、病毒唑和 / 或针对病毒标靶 (病毒蛋白酶、病毒聚合酶、病毒复制复合物的组合) 和宿主标靶 (病毒加工所需的宿主蛋白酶、病毒标靶 (如 NS5A) 磷酸化所需的宿主激酶和有效使用病毒内部核糖体入口位点所需的宿主因子或 IRES 的抑制剂) 两者所开发的多种小分子组合或结合投予。

[0077] 本文中所公开的化合物和方法可以与以下组合或结合使用, 但不限于金刚烷抑制剂、神经氨酸酶抑制剂、α 干扰素、非核苷或核苷聚合酶抑制剂、NS5A 抑制剂、抗组织胺剂、蛋白酶抑制剂、解螺旋酶抑制剂、P7 抑制剂、进入抑制剂、IRES 抑制剂、免疫刺激剂、HCV 复制抑制剂、亲环蛋白 A 抑制剂、A₃ 腺苷激动剂和微小 RNA 抑制剂。

[0078] 可以与本文中所公开的化合物和方法组合或结合投予的细胞激素包括 (但不限于) IL-2、IL-12、IL-23、IL-27 或 IFN-γ。可以用于或将用于可能与本文中所公开的化合物和方法组合或结合投予的新颖 HCV 药物包括 (但不限于) ACH-1625 (阿克琉斯公司 (Achillion)); 糖基化干扰素 (阿里奥斯生物制药公司 (Alios Biopharma)); ANA598、ANA773 (阿那帝斯药厂 (Anadys Pharm)); ATI-0810 (阿里森治疗公司 (Arisyn

Therapeutics));AVL-181(阿维拉治疗公司(Avila Therapeutics));**LOCTERON®**(比洛克西公司(Biolex));CTS-1027(珂尼蒂思公司(Conatus));SD-101(戴那瓦克斯技术公司(Dynavax Technologies));克立咪唑(Clemizole,艾格尔生物制药公司(Eiger Biopharmaceuticals));GS-9190(吉利德科学公司(Gilead Sciences));GI-5005(哥洛巴尔伊穆生物制药公司(GlobalImmune BioPharma));雷西喹莫特(Resiquimod) / R-848(格雷斯威制药公司(Graceway Pharmaceuticals));人血清白蛋白融合干扰素 α -2b(人类基因组科学公司(Human Genome Sciences));IDX-184、IDX-320、IDX-375(伊德尼克斯公司(Idenix));IMO-2125(伊德拉制药公司(Idera Pharmaceuticals));INX-189(因希比特克斯公司(Inhibitex));ITCA-638(银达尔西雅治疗公司(Intarcia Therapeutics));ITMN-191 / RG7227(因特穆尼公司(Intermune));ITX-5061、ITX-4520(伊赛尔克斯制药公司(iTherx Pharmaceuticals));MB11362(美达贝斯治疗公司(Metabasis Therapeutics));巴维昔单抗(Bavituximab,游隼制药公司(Peregrine Pharmaceuticals));PSI-7977、RG7128、PSI-938(法玛赛特公司(Pharmasset));PHX1766(芬诺米克斯公司(Phenomix));硝唑尼特(Nitazoxanide) / **ALINIA®**(勒马克实验室(Romark Laboratories));SP-30(撒马利坦制药公司(Samaritan Pharmaceuticals));SCV-07(赛生公司(SciClone));SCY-635(西耐克西斯公司(Scynexis));TT-033(塔赛尔治疗公司(Tacere Therapeutics));伟拉咪定(Viramidine) / 塔巴韦林(taribavirin)(威朗制药公司(Valeant Pharmaceuticals));特拉普维(Telaprevir)、VCH-759、VCH-916、VCH-222、VX-500、VX-813(威泰克斯制药公司(Vertex Pharmaceuticals));和 PEG-INF λ (兹莫基因公司(Zymogenetics))。

[0079] 可以用于或将用于可能与本文中所公开的化合物和方法组合或结合授予的新颖流感病毒药物和西尼罗河病毒药物包括(但不限于)神经氨酸酶抑制剂(帕拉米韦(Peramivir)、拉尼奈米韦(Laninamivir));三合一疗法-神经氨酸酶抑制剂病毒唑、金刚烷胺(ADS-8902);聚合酶抑制剂(法匹拉韦(Favipiravir));逆转录酶抑制剂(ANX-201);吸入型壳聚糖(ANX-211);进入/结合抑制剂(结合位点模拟剂,Flucide™);进入抑制剂(**Fludase®**;加利福尼亚州圣地亚哥耐百公司(NexBio, Inc., San Diego, CA));融合抑制剂(MGAWN1用于西尼罗河病毒);宿主细胞抑制剂(羊毛硫抗生素(lantibiotics));RNA基因体裂解剂(RNAi、RNAse L);免疫刺激剂(干扰素,Alferon-LD0;神经激肽1激动剂、宏巴拉(Homspera)、干扰素 Alferon N用于西尼罗河病毒);和 TG21。

[0080] 可以用于可能与本文中所公开的化合物和方法组合或结合授予的用于治疗流感和/或肝炎的其它药物包括(但不限于):

[0081] 表 1. 肝炎和流感药物

[0082]

商标名称	通用名称	已批准的适应症
PEGASYS [®] (加利福尼亚州旧金山南部基因泰克公司(Genentech, South San Francisco, California))	聚乙二醇化干扰素 α -2a	C 型肝炎、B 型肝炎
PEGINTRON [®] (新泽西州怀特豪斯站默克公司(Merck, Whitehouse Station, New Jersey))	聚乙二醇化干扰素 α -2b	C 型肝炎
COPEGUS [®] (新泽西州纳特利罗氏制药公司(Roche Pharmaceuticals, Nutley, New Jersey))	病毒唑	C 型肝炎
REBETOL [®] (新泽西州肯纳尔沃斯堡先灵葆雅公司(Schering Plough, Kenilworth, New Jersey))	病毒唑	C 型肝炎
-----	病毒唑	C 型肝炎
TAMIFLU [®] (新泽西州纳特利罗氏制药公司)	奥司他韦(Oseltamivir)	A 型、B 型、C 型流感
RELENZA [®] (英国伦敦葛兰素史克公司(GlaxoSmithKline, London, UK))	扎那米韦(Zanamivir)	A 型、B 型、C 型流感
-----	金刚烷胺	A 型流感
-----	金刚乙胺	A 型流感

[0083] 这些药剂可以并入作为相同医药组合物的一部分或可以与本发明的化合物（并行或根据另一治疗进度）分开投予。

[0084] 本文中所公开的化合物和方法可以与其它化合物和方法累加或协同以实现疫苗开发。所述化合物可以借助于其抗病毒性和免疫增强性用于实现预防性或治疗性接种。所述化合物不需要与其它疫苗组分同时或组合投予而具有有效性。所述化合物的疫苗应用因由所述化合物引发的免疫反应的一般性质，不限于预防或治疗病毒感染，而是可以涵盖所有治疗性和预防性疫苗应用。

[0085] 如所属领域的一般技术人员所理解，疫苗可以抵抗病毒、细菌感染、癌症等并且可以包括（但不限于）以下一者或一者以上：活减毒疫苗（LAIV）、不活化疫苗（IIV；杀死的病毒疫苗）、次单位（裂解疫苗）；亚病毒粒子疫苗；纯化蛋白疫苗；或 DNA 疫苗。合适佐剂包括（但不限于）以下一者或一者以上：水 / 油乳液；非离子型共聚物佐剂，例如 CRL1005 (Optivax[™]；乔治亚州诺克斯市瓦克赛尔公司 (Vaxcel Inc., Norcross, Ga.))；磷酸铝；氢氧化铝；氢氧化铝和氢氧化镁的水性悬浮液；细菌内毒素；聚核苷酸；聚电解质；亲脂性佐剂和合成胞壁酰二肽 (norMDP) 类似物，如 N-乙酰基-去甲基-胞壁酰-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺、N-乙酰基-胞壁酰-(6-O-硬脂酰)-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺或 N-乙二醇-胞壁酰-L- α -Abu-D-异谷氨酰胺（汽巴-嘉基有限公司 (Ciba-Geigy Ltd.))。

[0086] 包含本发明化合物的医药组合物可以多种形式调配；例如以液体、凝胶、冻干或压缩固体形式。优选形式将取决于所治疗的具体适应症并且可以由所属领域的一般技术人员辨别。在一个实施例中，所公开的 RIG-I 激动剂包括用于经口递送的调配物，所述调配物可以是使用直接药物化学方法的小分子药物。

[0087] 本发明调配物的投予可以多种方式进行，包括（但不限于）经口、皮下、静脉内、大脑内、经鼻内、经皮、腹膜内、肌内、肺内、鞘内、经阴道、经直肠、眼内或任何其它可接受的方式。所述调配物可以通过使用所属领域中已知的技术，如泵（例如皮下渗透泵）输注或植入而连续投予，但快速注射是可接受的。在一些情况下，所述调配物可以直接以溶液或喷雾

形式应用。

[0088] 医药组合物的实例是经设计用于不经肠给药的溶液。虽然在许多情况下,医药溶液调配物以适于即刻使用的液体形式提供,但此类不经肠调配物还可以冷冻或冻干形式提供。在前一种情况下,所述组合物在使用之前必须融化。后一种形式常用以增强所述组合物中所含的活性化合物在较广泛的多种储存条件下的稳定性,如所属领域的一般技术人员所公认的一样,冻干制剂通常比其液体对应物更稳定。此类冻干制剂在使用之前通过添加一种或一种以上合适的医药上可接受的稀释剂(如(但不限于)无菌注射用水或无菌生理盐水溶液)复原。

[0089] 不经肠药物可以通过使视情况而定具有所需纯度的化合物与通常用于所属领域的一种或一种以上医药上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(其全部称为“赋形剂”),例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子型洗涤剂、抗氧化剂和/或其它各种添加剂混合而制备成冻干调配物或水溶液以便储存。

[0090] 缓冲剂有助于使pH值维持在近似生理学条件的范围内。其通常以介于2mM到50mM范围内的浓度存在。适合与本发明一起使用的缓冲剂包括有机酸与无机酸两者和其盐,如柠檬酸盐缓冲剂(例如柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、丁二酸盐缓冲剂(例如丁二酸-丁二酸一钠混合物、丁二酸-氢氧化钠混合物、丁二酸-丁二酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、反丁烯二酸盐缓冲剂(例如反丁烯二酸-反丁烯二酸一钠混合物、反丁烯二酸-反丁烯二酸二钠混合物、反丁烯二酸一钠-反丁烯二酸二钠混合物等)、葡糖酸盐缓冲剂(例如葡糖酸-葡糖酸钠混合物、葡糖酸-氢氧化钠混合物、葡糖酸-葡糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲剂(例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲剂(例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸盐缓冲剂(例如乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。其它可能缓冲剂是磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐(如Tris)。

[0091] 可以添加防腐剂以延缓微生物生长,并且通常以0.2%-1%(w/v)的量添加。适合与本发明一起使用的防腐剂包括(但不限于)苯酚、苯甲醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苯甲基铵、卤化苯甲烃铵(例如氯化苯甲烃铵、溴化苯甲烃铵或碘化苯甲烃铵)、氯化六羟季铵、对羟基苯甲酸烷基酯(如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和3-戊醇。

[0092] 可以添加等渗剂以确保液体组合物的等渗性并且包括(但不限于)多元糖醇,优选三元或三元以上糖醇,如甘油、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。以其它成分的相对量计,多元醇可以0.1重量%到25重量%、通常1重量%到5重量%的量存在。

[0093] 稳定剂是指赋形剂的一大类,其功能范围可以从增积剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或防止粘着于容器壁的添加剂。典型稳定剂可以是多元糖醇(上文所罗列);氨基酸,如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘油等,包括环多醇,如肌醇;聚乙二

醇；氨基酸聚合物；含硫还原剂，如脲、麸胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量多肽（即<10个残基）；蛋白质，如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；单糖，如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖；二糖，如乳糖、麦芽糖和蔗糖；三糖，如棉子糖；和多糖，如葡聚糖。以活性化合物重量计，稳定剂含量通常是0.1重量份到10,000重量份的范围内。

[0094] 其它杂项赋形剂包括填充剂（例如淀粉）、螯合剂（例如EDTA）、抗氧化剂（例如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E）和共溶剂。

[0095] 还可以例如通过凝聚技术或通过界面聚合法，将活性成分囊封于所制备的微囊中，例如羟甲基纤维素微囊、明胶微囊或聚-（甲基丙烯酸甲酯）微囊；囊封于胶体药物递送系统（例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊）中或于巨乳液中。此类技术公开于雷明顿，药物科学与实践（Remington, The Science and Practice of Pharmacy），第21版，由利平科特威廉姆斯和威尔金斯出版社（Lippincott Williams&Wilkins）（威科集团公司（A Wolters Kluwer Company））出版，2005中，所述文献的教示以引用的方式并入本文中。

[0096] 欲用于体内投予的不经肠调配物通常是无菌。其很容易例如通过经过无菌过滤膜进行过滤来达成。

[0097] 持续释放型制剂的适合实例包括含有化合物或组合物的固体疏水性聚合物的半渗透基质，所述基质具有适合形式，如膜或微囊。持续释放型基质的实例包括聚酯、水凝胶（例如聚（甲基丙烯酸2-羟乙酯）或聚（乙烯醇））、聚乳酸交酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物（如PROLEASE[®]技术（马萨诸塞州坎布里奇市奥克美思公司（Alkermes, Cambridge, Massachusetts））或LUPRON DEPOT[®]（由乳酸-乙醇酸共聚物和亮丙立德乙酸盐构成的可注射微球体；伊利诺伊州雅培科技园雅培实验室（Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois））和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能够释放分子维持较长时段（如多达100天或超过100天），但特定水凝胶释放化合物维持较短时段。

[0098] 经口投予化合物和组合物是本发明的一个预定实践。对于经口投予，医药组合物可以呈固体或液体形式，例如呈胶囊、片剂、散剂、颗粒、悬浮液、乳液或溶液形式。医药组合物优选以含有一定量活性成分的剂量单位形式制得。适用于人类或其它脊椎动物的日剂量可以视患者病状和其它因素而大范围变化，但可以由所属领域的一般技术人员使用常规方法确定。

[0099] 在固体剂型中，活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂（如蔗糖、乳糖或淀粉）混合。根据常规惯例，此类剂型还可以包含其它物质，例如润滑剂，如硬脂酸镁。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，剂型还可以包含缓冲剂。片剂和丸剂可以另外使用肠溶衣制备。

[0100] 化合物或组合物可以与佐剂，如乳糖、蔗糖、淀粉、烷酸纤维素酯、硬脂酸、滑石、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠盐和钙盐、阿拉伯胶、明胶、褐藻酸钠、聚乙烯-吡咯烷酮和/或聚乙烯醇混合，并且制成片或囊封用于常规投予。或者，所述化合物或组合物可溶解于盐水、水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、油类（如玉米油、花生油、棉籽油或芝麻油）、黄耆胶和/或各种缓冲剂中。其它佐剂和给药模式是药物技术中所已知。载剂或稀释剂可以包括延时材料，如单独或与蜡组合的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯，或所属领域中已知的

其它材料。

[0101] 本发明进一步包括本文中的化合物、组合物和方法在许多应用中的体外使用和应用,包括(但不限于)开发针对病毒感染的疗法和疫苗、调节真核细胞的先天免疫反应的研究等。本发明的化合物、组合物和方法还可以用于动物模型。本发明的化合物、组合物和方法的此类体外和动物体内使用的结果可以例如了解其在人类中的体内使用,或其可以具有与任何人类治疗性或预防性使用无关的价值。

[0102] 实例

[0103] 以下实例描述本发明化合物的抗病毒性和药理学性质。所包括的实例证明本发明的具体实施例。所属领域的一般技术人员应了解,实例中所公开的技术表示本发明的发明者所发现的技术和组合物在本发明实践中起良好作用,并且因此可以视为构成其优选实践模式。然而,所属领域的一般技术人员根据本发明应了解,在不悖离本发明的精神和范围的情况下,可以在所公开的特定实施例中进行许多变化并且仍获得相同或相似的结果。举例来说,以下实例提供用于测试本发明化合物的体外方法。其它体外病毒感染模型包括(但不限于)黄病毒属,如牛腹泻病毒、西尼罗河病毒和 GBV-C 病毒;其它 RNA 病毒,如呼吸道融合性病毒;和 HCV 复制子系统。此外,胜任于病毒复制的任何合适培养细胞可以用于抗病毒分析。

[0104] 实例 1. KIN2000 的生物活性

[0105] 识别活性化合物的荧光素酶分析。接种以由 RIG-I 反应启动子 (IFN β 、ISG56 或 ISG54 启动子) 驱动的荧光素酶报导基因稳定转染的所培养的人类细胞并且使其生长过夜。接着添加化合物“KIN2000”并且使细胞在 KIN2000 存在下生长 18-20 小时。添加 Steady-Glo 荧光素酶底物 (普洛麦格公司 (Promega)) 并且在光度计 (伯托公司 (Berthold)) 上读取荧光。

[0106] 图 1A 显示通过证明与 IFN β 与 ISG56 (右;LUC 报导子) 和 ISG54 (左;ISG54-LUC) 的启动子偶合的荧光素酶报导基因的剂量依赖性诱发来验证如本文所述的 KIN2000。另外, KIN2000 未诱发非特异性启动子 (图 1B, 肌动蛋白计数器筛选)。

[0107] 测定细胞毒性的 MTS 分析。用稀释于培养基中的增加量的化合物或等量 DMSO 处理所培养的人类海拉细胞 48 小时以观察其对细胞生存率的影响。使用测量活细胞中四唑鎓化合物 (3-(4,5-二甲基-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑鎓内盐;MTS 分析) 转化为有色甲贲化合物的转化率的细胞生存率分析,计算活细胞比例。

[0108] 在 96 孔微量滴定板读取器中检测 MTS 到甲贲的转化率,并且随后可以直接绘制所得光学密度以估计细胞生存率。CELLTITER 96[®] AQ_{ueous} 单溶液细胞 (One Solution Cell) (普洛麦格公司) 是根据制造商方案所用的一步骤分析,并且在试剂存在下培育细胞三小时,随后进行 O. D. 读取。KIN2000 在含有 0.5% DMSO 的培养基中稀释到 0 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M 和 20 μ M 的最终浓度。使用导致 100% 细胞病变效应的 EMCV 感染检查不含有化合物的阴性对照孔和阳性对照的细胞毒性。每一化合物浓度和对照在三个重复孔中进行。KIN2000 显示无明显细胞毒性 (MTS 分析,图 1C)。

[0109] 测定 IRF-3 活化和易位到细胞核的免疫荧光细胞化学分析。通过 IRF-3 转录因子的磷酸化、二聚化和细胞核易位而诱发由 RIG-I 介导的 ISG 表达。用稀释于培养基中的增加量化合物或等量 DMSO 处理所培养的人类 U2OS 细胞 20 小时。用 100HA / mL 仙台病毒感

染阳性对照孔一段相等的时间。使用特异性针对 IRF-3 的多株兔血清和与 DYLIGHT™488 结合的二级抗体检测 IRF-3。

[0110] 测定 NF κ B 活化的免疫荧光细胞化学分析。依赖 RIG-I 的先天免疫反应还活化 NF κ B 转录因子并且因此增加细胞核含量。用稀释于培养基中的增加量化合物或等量 DMSO 处理所培养的人类海拉细胞 20 小时。用 100HA / mL 仙台病毒感染阳性对照孔一段相等时间。在这个实例中,使用特异性针对 NF κ B 的 p65 次单位的单株小鼠抗体和与 DyLight488 结合的二级抗体检测 NF κ B。

[0111] 免疫荧光分析的定量。使用 **ARRAYSCAN**® 仪器和软件 (赛洛美克斯 (Cellomics)) 扫描并且定量含有用化合物处理并且染色的所培养的人类细胞的 96 孔板的 IRF-3 或 NF κ B。由经过细胞质强度正规化后提高的核强度或细胞核 - 细胞质差值证明转录因子活化。

[0112] KIN2000 显示 IRF-3 (图 2A) 和 NF κ B (图 2B) 两者的细胞核 - 细胞质差值随剂量变化而增加。

[0113] 如本文所述的其它化合物也可以通过这个实例中所述的方法评估,并且也可以使用其它细胞类型。

[0114] 实例 2. KIN2000 的间接体内免疫刺激活性

[0115] 分析初级免疫细胞中 KIN2000 的活性以测定 KIN2000 是否刺激免疫反应。在这个实例中,用 0、1 或 10 μ M KIN2000 处理所培养的人类初级树突状细胞 24 小时。分离所治疗孔的上清液并且测试细胞激素蛋白的含量。使用与磁珠粒结合的特异性抗体和与抗生蛋白链菌素 / 藻红蛋白反应产生荧光信号的二级抗体检测细胞激素。在这个实例中,使用 **MAGPIX**® 仪器 (**LUMINEX**®) 检测并且定量结合的珠粒,但也可以使用相似技术测量荧光蛋白产量,如 ELISA。

[0116] 显示 KIN2000 诱发由树突状细胞表达趋化激素 (IL-8、MCP-1、MIP-1 α 和 MIP-1 β , 图 3)。

[0117] 可以测量细胞激素分泌物的其它细胞包括 (但不限于) 人类外周血液单核细胞、人类巨噬细胞、小鼠巨噬细胞、小鼠脾细胞、大鼠胸腺细胞、大鼠脾细胞。

[0118] 实例 3. 使用定量构效关系 (SAR) 研究的抗病毒活性和药理学性质

[0119] 这个实例描述化合物抗病毒作用的最佳化。首先使用较小类似衍生物集合来定义结构类型。接着使用在这个第一阶段识别的活性类似物来定义所关注的结构类型的子集,用于进一步最佳化 (阶段 2)。

[0120] 阶段 2, 衍生物扩展。阶段 2 集中于产生结构多样性和评估核心变化形式。测试结构衍生物在 IRF-3 易位分析中的生物活性、针对 HCV 和流感病毒的抗病毒活性和在一种或一种以上细胞株或外周血液单核细胞中的细胞毒性。显示改进的功效和低细胞毒性的最佳化分子再通过体外毒物学和吸收、分布、代谢和排出 (ADME) 的其它测量法进一步分析特征。也研究其作用机制和抗病毒活性广度。

[0121] SAR 研究的化学设计。为设计类似物结构,分析主导化合物的类药物性质、代谢不稳定性、和毒性潜能。如里宾斯基规则 (Lipinski's Rules) 所测量的类药物性质和相关生理化学性质是生物利用度的主要指标。表现出代谢和毒物学倾向性的结构特征可预示有限稳定性、半衰期缩短、反应性中间体或特异性毒性,并且因此应移除。构建 5 到 10 个化合物

类似物集合,以移除或改变化学反应性或代谢敏感性结构特征,由此发展初步 SAR。

[0122] 测试化合物针对 HCV2A 和 A 型流感病毒 (A / WSN / 33) 的体外抗病毒活性。使用上述分析,评估药物处理后的病毒蛋白和 RNA 含量。

[0123] 在几轮反复 SAR 后,选择化合物用于分析其体外毒物学性质和 ADMA 性质的特征,以及用于进一步机转研究。设计 SAR 研究以提供具有皮摩尔到纳摩尔效能的主导化合物,其适于支持临床前开发。

[0124] 体外药理学。进行体外药理学研究以测量在肠道渗透性、代谢稳定性和毒性的一个或一个以上分析中最有前途的类似物的性能。关键体外表征研究可以包括例如(但不限于)血浆蛋白结合;人类和模型生物体中血清、血浆和全血稳定性;肠道渗透性;内在清除率;人类 Ether-à-go-go (hERG) 通道抑制;和遗传毒性 (genotoxicity)。

[0125] 对于每一类似物,使用基于 HPLC 和 / 或基于 HPLC- 质谱分析的分析方法评估各种测试系统中的药物和代谢物浓度。虽然每一分子的特异性分析方法已最佳化,但逆相层析可以单独或与四极质谱分析组合使用来分析若干主导分子的身份和纯度特征。最初,通过 HPLC 评估药物在哺乳动物物种(如小鼠、食蟹猕猴和人类)的增大浓度的血清、血浆和全血中随时间推移的稳定性并且测定半衰期。

[0126] 通过质谱分析表征的显著代谢物。使用平衡透析通过分割分析 (partition analysis) 评估人类血浆蛋白结合。对于肠道渗透性建模,评估人类上皮细胞株 TC7 的顶端到基底侧通量。在人类肝微粒体培育期间,通过测量母体化合物消失的速率估算最有前途的类似物子集的肝脏清除率。如上所述分离并且表征特异性代谢物。

[0127] 体外毒物学。进行体外毒物学研究以评估主导类似物的潜在心脏和遗传毒性。使用自动化膜片钳评估每一化合物对于转殖基因表达人类 Kv11.1 基因的重组中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞株中 hERG 通道电流的影响。评估每一化合物达小于 30 倍最大血清浓度的浓度或溶解度极限以便测定分子对于 hERG 通道的 IC₅₀ 值。在浓度范围内评估化合物子集的诱发鼠伤寒沙门杆菌 (*salmonella typhimurium*) 病毒株 TA98 和 TA100 回复突变的能力或促进培养物的 CHO 细胞中形成小核的能力。

[0128] 实例 4. KIN2000 的抗病毒活性

[0129] 细胞培养感染模型中的抗病毒作用。为进一步表征最佳化分子的抗病毒活性广度,使用细胞培养感染模型分析不同病毒,包括(但不限于)流感病毒的不同病毒株、HCV、登革热病毒、RSV 和西尼罗河病毒 (WNV),一种新兴的公共卫生问题。研究包括在感染前用化合物处理细胞 2-12 小时或在感染后处理细胞 8 小时。经一段时程评估病毒产生和细胞 ISG 表达以分析主导结构类型的代表性化合物的抗病毒作用。使用 IFN β 处理作为阳性对照。

[0130] 通过病灶形成或空斑分析测量病毒产生。在平行实验中,通过 qPCR 和免疫印迹分析测量病毒 RNA 和细胞 ISG 表达。这些实验经设计以验证在病毒感染期间的化合物信号传导作用和评估化合物引导针对各种病毒株的先天免疫抗病毒程式的作用和在病毒对抗措施环境中的作用。在每一病毒感染系统中,对处理前和处理后感染模型两者进行每一化合物的详细剂量 - 反应分析以测定与对照细胞相比抑制病毒产生达 50% (IC₅₀) 和 90% (IC₉₀) 的有效剂量。

[0131] 表 2. 主导化合物抗病毒分析的病毒系统和研究设计

[0132]

病毒	病毒株	研究计划
HCV	H77 (基因型 1a) JFH1 (基因型 2a)	分析 ■ 空斑或病灶形成分析(感染性病毒) ■ qPCR(RNA 含量)
FLU	在小鼠中具高致病性	

[0133]

	A/PR/8/34 (H1N1 小鼠适应病毒) A/WSN/33 (H1N1 小鼠适应神经毒性病毒) 在小鼠中具低致病性 A/Texas/36/91 (H1N1 循环病毒) A/Udorn/72 (H3N2)	■ 免疫印迹和 ELISA(蛋白含量) 研究计划 ■ 感染前和感染后细胞的化合物处理 ■ 测定 EC ₅₀ 和 EC ₉₀ ■ 抑制病毒生命周期
WNV	TX02 (谱系 1) MAD78 (谱系 2)	

[0134] 实例 5. 最佳化药物先导物在相关临床前动物模型中的体内药代动力学、毒物学和抗病毒性

[0135] 临床前药代动力学和耐受性概况。评估化合物的体内药代动力学 (PK) 概况和耐受性 / 毒性, 以便在流感病毒和 WNV 感染的动物模型中进行其抗病毒活性的进一步表征。小鼠是被选择用于这些研究的测试物种, 因为其是最常用的 WNV 和流感的啮齿动物模型。

[0136] 使用逆相 HPLC-MS / MS 检测方法测量小鼠血浆中每一化合物的浓度。在 PK 概况分析之前, 使用主要集中于在少量储存条件下使水溶性和稳定性最大的有限调配物组分筛选开发每一化合物的初始经口和静脉内调配物。所属领域中已知的现有分析方法可以用于测量调配物性能。根据三层策略开发每一化合物的调配物:

[0137] ■ 第 1 层: pH 值 (pH3 到 9)、缓冲液和重量摩尔渗透浓度调节

[0138] ■ 第 2 层: 添加乙醇 (<10%)、丙二醇 (<40%) 或聚乙二醇 (PEG) 300 或 400 (<60%) 共溶剂以增加溶解度

[0139] ■ 第 3 层: 视需要添加 N-N- 二甲基乙酰胺 (DMA, <30%)、N- 甲基 -2- 吡咯烷酮 (NMP, <20%) 和 / 或二甲亚砜 (DMSO, <20%) 共溶剂或环糊精 (<40%) 以进一步改良溶解度。

[0140] 对在体外抗病毒、机械学、ADME 和毒物学研究中显示足够性能的化合物进行初步小鼠 PK 研究。参见表 3。通过经口管饲 (<10ml / kg) 或静脉内快速注射 (<5ml / kg) 向空腹过夜后的动物授予单次剂量的每一化合物。每一给药组给多只动物服药, 使得在每一时间点可以取样 3 只动物。在给药前和在给药后 5、15 和 30 分钟以及 1、2、4、8 和 24 小时, 由后眼眶收集血液样品。根据以前开发的生物分析方法测量药物浓度。使用 WinNonlin 软件评估药代动力学参数。

[0141] 表 3

[0142]

研究	实验设计	给药途径	结果
小鼠 PK	单次剂量药代动力学研究	静脉内和经口	口服生物利用度, C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 Cl 、 V_d 、 $AUC_{0-24,0-\infty}$
小鼠耐受性	阶段 1: 递升剂量耐受性和 MTD 测定; 阶段 2: 在 MTD 下安慰剂对照的 7 天毒性	经口	MTD、急性毒性、血液 学、血清化学、大体病 理学

[0143] 基于探索性 PK 研究中的性能,进一步评估化合物在小鼠中的初步耐受性和毒性,随后评估其在抗病毒模型中的表征。分两阶段进行耐受性研究:首剂量增加阶段(多达 5 个剂量,每次隔开 5 天清除期)以测定最大耐受剂量 (MTD, 阶段 1),随后七天每日投予 MTD 以评估急性毒性(阶段 2)。参见表 4。所有剂量通过经口管饲投予。在示范性实验中,将每种性别五只动物置于阶段 1 研究并且阶段 2 中每一给药组每种性别 15 只动物。研究端点包括测定 MTD、身体检查、临床观察、血液学、血清化学和动物体重。对所有动物(无论已死亡的、在临终或在实验预定结束时安乐死的)进行大体病理学。毒物学研究实际上主要是探索性的并且希望识别早期毒物学端点和驱使选择抗病毒动物模型的主导候选物。

[0144] 表 4. 化合物针对 WNV 和流感病毒作用的体内研究

[0145]

实验	分析	目标	小鼠的实例 编号*
有效化合物剂量测定	血清中的病毒负荷分析	定义体内 EC_{50} 和 EC_{90}	238
病毒发病机制研究 1: EC_{50} 和 EC_{90} 处理	到濒死态的时间、感染 病理理性体征的临床得分	定义化合物对于限制病 毒发病机制的作用	739
病毒发病机制研究 2: EC_{50} 和 EC_{90} 处理和时程分析	血清和各种目标器官中 的病毒负荷分析	定义化合物对于限制病 毒复制和传播的作用	1056
病毒发病机制研究 3: (神经入侵模型) EC_{50} 和 EC_{90} 处理	到濒死态的时间、感染 病理理性体征的临床得分	定义化合物对于限制 CNS 中的病毒发病机制 的作用	370

[0146] * 数目反映每一实验至少两次反复的平均值

[0147] 使用小鼠感染模型评估抗病毒性和免疫保护。基于化合物药代动力学、抗病毒作用和先天免疫作用选择最佳化合物用于在临床前小鼠感染模型中进一步评估。参见表 4。测量化合物的先天免疫作用,并且评估其保护小鼠免受 WNV 和流感病毒攻毒的能力。关于 WNV 感染模型,用 WNV 的毒性谱系 1 病毒株 (WNV-TX) 皮下足垫感染野生型 C57B1 / 6 小鼠。进行流感病毒株 A / PR / 8 / 34、A / WSN / 33 和 A / Udorn / 72 的非手术气管滴入法。

[0148] 用于特定实验的流感病毒株具有两种不同亚型 (H1N1 和 H3N2) 并且在 C57B1 / 6 小鼠中显示不同致病性和临床表现。在单独或与感染前 12 小时或感染后 24 小时开始的化

合物处理组合的攻毒剂量（如 10 到 1,000pfu 的病毒）范围内监测小鼠发病率和死亡率并且每日继续进行以测定药物的血浆半衰期。进行化合物剂量 - 反应分析和感染时程研究以评估化合物以下功效：1) 限制血清病毒负荷、2) 限制目标器官中的病毒复制和传播和 3) 防止病毒发病。

[0149] 关于 WNV, 除血清的外, 评估淋巴结、脾脏和脑中的病毒负荷; 关于流感病毒, 评估心脏、肺脏、肾脏、肝脏和脑中的病毒负荷。这些实验设计中包括在 100pfuWNV-TX 或 1,000pfu 流感病毒的标准攻毒后, 测定每一化合物抑制 50% 和 90% 血清病毒负荷 (ED50 和 ED90) 时的有效剂量。在化合物处理后, 在 24 小时时间间隔下通过病毒 RNA 的 qPCR 测定血清病毒负荷。使用 WNV 神经入侵感染模型, 在 ED50 和 ED90 下测试化合物对于限制大脑神经系统中 WNV 发病的作用。

[0150] 在单独或与感染后 24 小时开始的化合物处理组合的 1pfu WNV-MAD 标准颅内攻毒后, 监测小鼠发病率和死亡率。

[0151] 除非另有陈述, 否则说明书和权利要求书中所使用的表示分量、如分子量、反应条件等的性质的所有数字应被理解为在一切情况下由术语“约”修饰。因此, 除非相反地指示, 否则在说明书和随附权利要求书中阐明的数值参数是可以视设法通过本发明获得的所需性质而变化的近似值。最低限度地, 并且并非作为限制均等论应用于权利要求书的范围的尝试, 每一数值参数至少根据所报导的有效数位并且通过应用普通舍入技术来解释。

[0152] 尽管阐述本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值, 但已尽可能精确地报导特定实例中所述的数值。然而, 任何数值均固有地含有某些必然误差, 这是由其相应的测试测量中可见的标准差所产生。

[0153] 除非本文中另作说明或与上下文明显抵触, 否则描述本发明的上下文中（尤其在以下权利要求书的上下文中）所用的术语“一个（或一种）”、“所述”和类似指示物应解释为包括单数和复数。在本文中列举数值范围仅希望充当个别参考处于所述范围内的每一独立值的简写方法。除非在本文中另外指明, 否则每一个别值如其个别列举于本文中一般并入说明书。除非本文中另外指明或与上下文明显抵触, 否则本文所述的所有方法可以任何适合顺序进行。除非另外主张, 否则任何和所有实例或本文中所提供的示范性语言（例如, “如”）的使用仅希望更好地阐明本发明并且不对本发明的范围予以限制。本说明书中所有语言均不应视为表明任何未主张要素是实施本发明所必要。

[0154] 本文中所公开的本发明的替代性要素或实施例的分组不应理解为限制性。每一组的成员可以被个别提及和主张或与所述组的其它成员或本文中可见的其它要素任意组合。出于便利性和 / 或专利性的原因, 预期一组的一个或一个以上成员可以包括于一组中或从一组中删去。当出现任何此类包括或删去时, 本说明书视为含有被修改因此满足随附权利要求书中所用的所有马库什组 (Markush group) 的书面描述说明的组。

[0155] 本文中描述本发明的某些实施例, 包括本发明的发明者已知用于进行本发明的最佳方式。当然, 关于这些所述实施例的变化将在所属领域的一般技术人员阅读以上描述后变得显而易见。本发明的发明者期望所属领域的技术人员任选地使用此类变化, 并且除本文中特定描述的外, 本发明的发明者希望实践本发明。因此, 本发明包括随附权利要求书中所述的标的物的所有修改形式和等效物, 如适用的法律所容许。此外, 除非本文中另外指明或与上下文明显抵触, 否则本发明涵盖上述要素在所有可能变化形式中的任何组合。

[0156] 本文中所公开的特定实施例可以在权利要求书中使用由组成或 / 和基本上由组成的措辞进一步限制。当用于权利要求书时, 无论是否根据修正案申请或添加, 过渡术语“由... 组成”不包括权利要求书中未规定的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上由... 组成”限制权利要求书关于规定材料或步骤的范围并且其并未本质上影响基本特性和新颖特征。所主张的本发明实施例自然或明显地描述于本文中并且在本文中可行。

[0157] 最后, 应了解本文中所公开的本发明实施例说明本发明的原理。可以使用的其它修改属于本发明范围内。因此, 举例来说 (但不限于), 可以根据本文中的教示使用本发明的替代性配置。因此, 本发明不限于如精确所示和描述的内容。

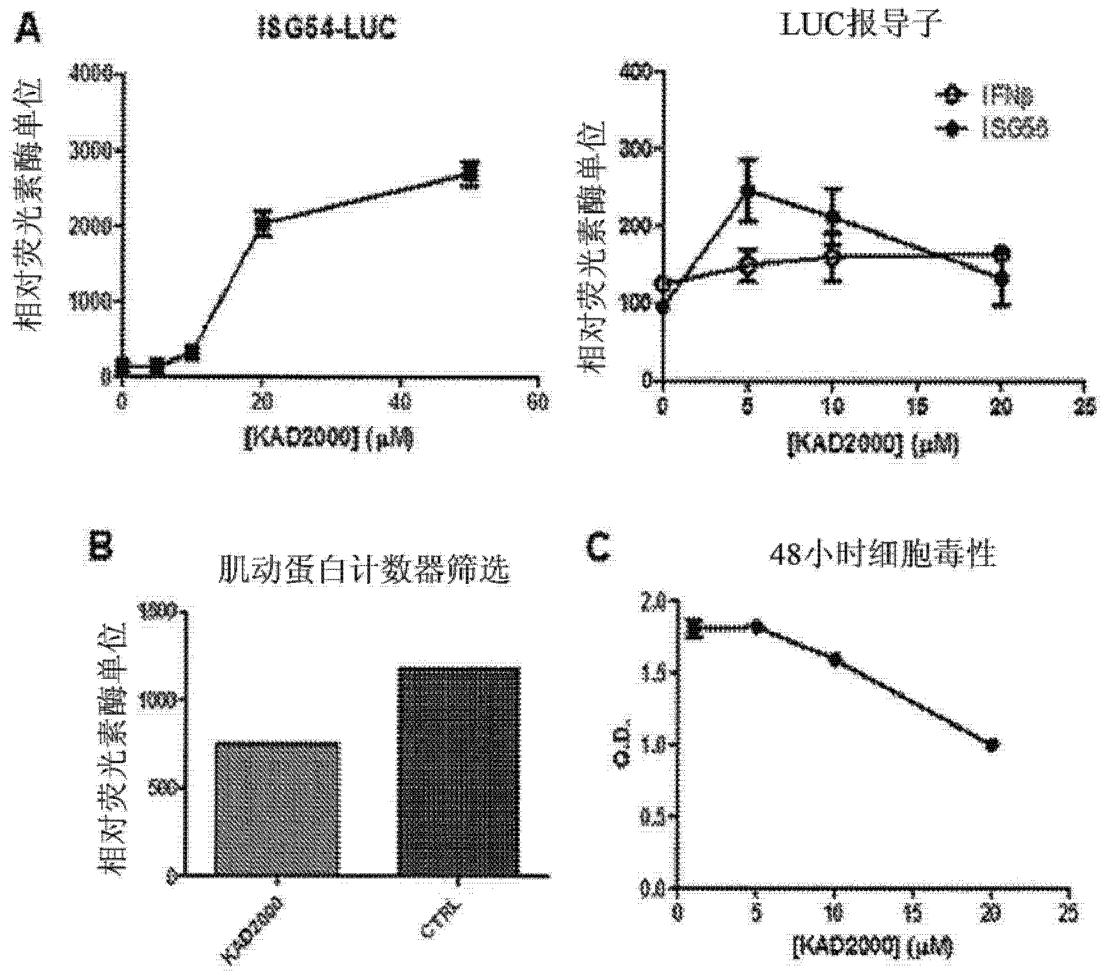


图 1

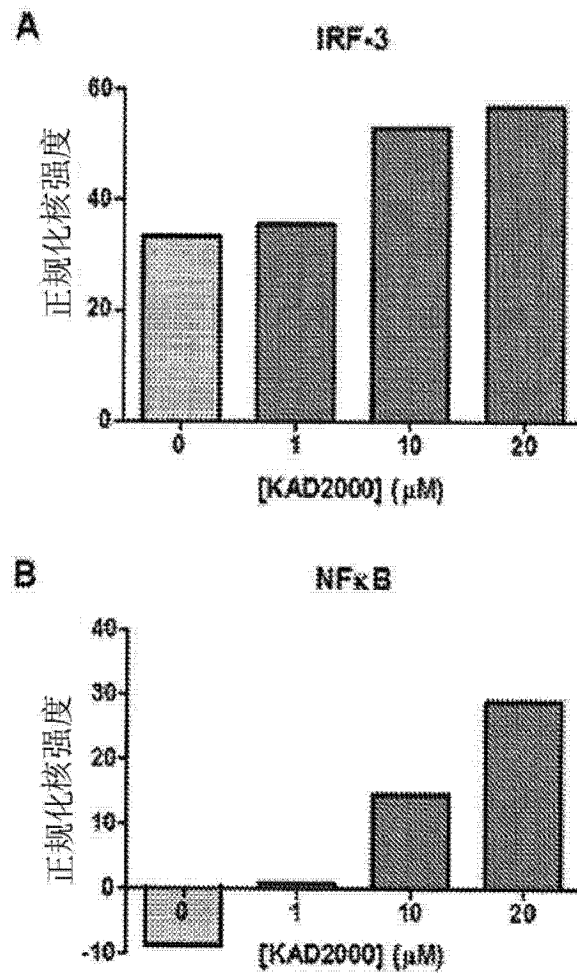


图 2

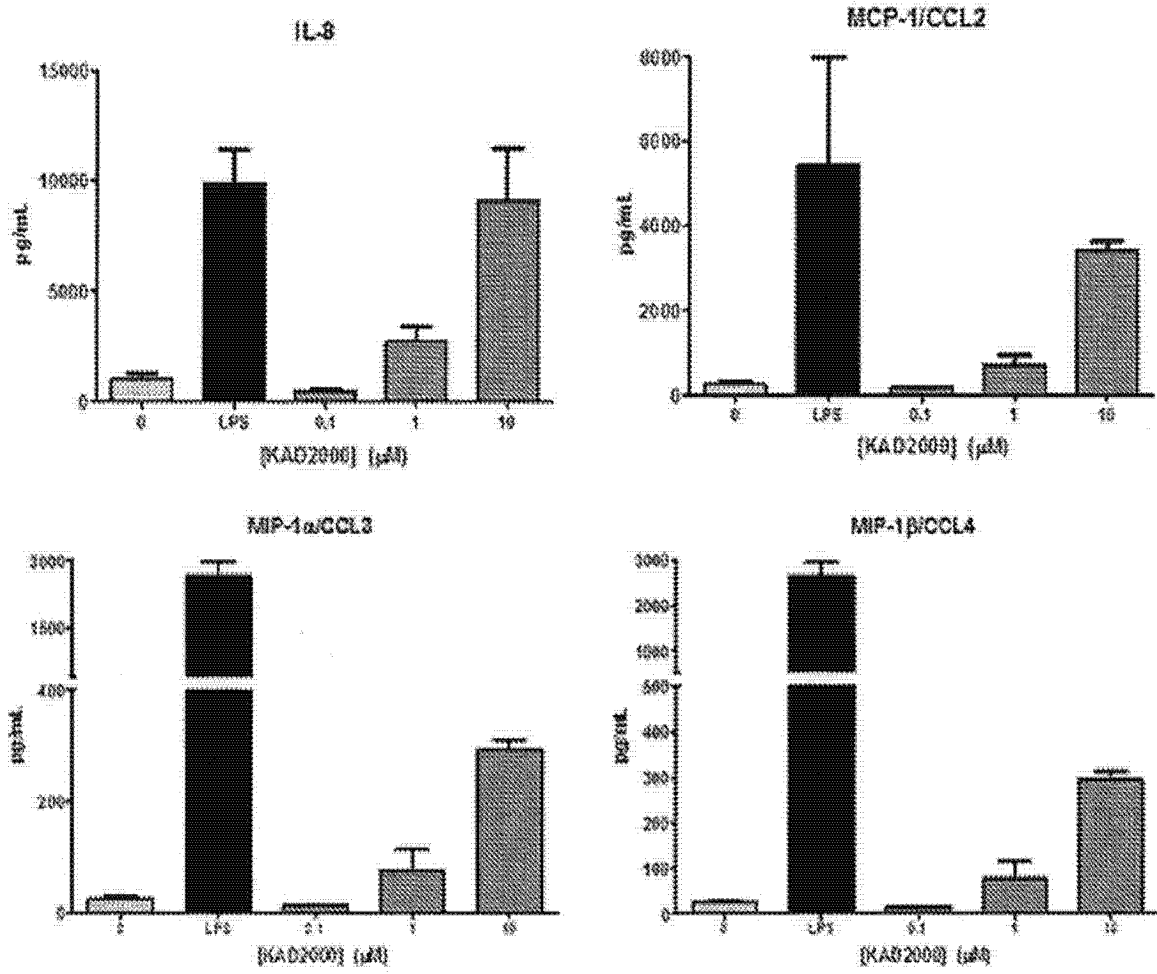


图 3