

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036275**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.10.21

(21) Номер заявки
201690075

(22) Дата подачи заявки
2014.06.25

(51) Int. Cl. **A61K 31/00** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ИНФЕКЦИИ

(31) **2013902327; 2014901029; 2014901977**

(32) **2013.06.25; 2014.03.24; 2014.05.26**

(33) **AU**

(43) **2016.05.31**

(86) **PCT/AU2014/050092**

(87) **WO 2014/205516 2014.12.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ УОЛТЕР ЭНД ЭЛИЗА ХОЛ
ИНСТИТУТ ОФ МЕДИКАЛ
РИСЕРЧ (AU)**

(72) Изобретатель:
**Пеллегрини Марк, Эберт Грегор
Клаус-Петер (AU), Бегли Колин Гленн
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2009140447**

Busca, A. et al. "Critical role for antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-xL in human macrophage survival and cellular IAP1/2 (cIAP1/2) in resistance to HIV-Vpr-induced apoptosis" J Biol Chem. 2012. Vol. 287, No. 18, pages 15118-15133. see title, abstract, discussion

Srivastava, P. et al. "Azithromycin Treatment Modulates the Extracellular Signal-Regulated Kinase Mediated Pathway and Inhibits Inflammatory Cytokines and Chemokines in Epithelial Cells from Infertile Women with Recurrent Chlamydia trachomatis Infection" DNA and Cell Biology. 2011, Vol. 30, No. 8, pages 545-554 see title, abstract, page 551 LHS last paragraph

Zhang, X. et al. "Altered regulation of extrinsic apoptosis pathway in HCV-infected HCC cells enhances susceptibility to iraparumab-induced apoptosis" Hepatol Res. 2009. Vol. 39, No. 12, pages 1178-1189. see abstract, page 1186 RHS

WO-A1-2013071035

Inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists inhibit anti-viral immunity by interfering with T cell expansion during LCMV infection [retrieved on 22 July 2014] Retrieved from the internet < URL: <http://events.unimelb.edu.au/events/2607-inhibitors-of-apoptosis-protein-iap-antagonists-inhibit-and-viral-immunity-by> > published 12 March 2012 as per the document see whole document

(57) Изобретение представляет способ лечения внутриклеточной инфекции у индивидуума, где способ содержит введение индивидууму антагониста IAP. В определенных вариантах осуществления изобретения антагонист IAP является Smac миметиком.

B1**036275****036275****B1**

Дата подачи

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании австралийских патентных заявок под номерами 2013902327, 2014901029 и 2014901977, поданных 25 июня 2013 года, 24 марта 2014 и 26 мая 2014, соответственно. Описание каждой из этих заявок включено в настоящий документ в виде ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения внутриклеточных инфекций. Способ включает введение антагониста ингибитора апоптоза (IAP).

Предшествующий уровень техники по изобретению

Хронические генерализованные инфекции посредством патогенов, таких как вирус гепатита В (HBV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус папилломы человека (HPV), *Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma spp.* и *Plasmodium spp.* связаны с недостаточностью патоген-специфического иммунитета и аберрантным неспецифическим воспалительным ответом, который является болезнетворным, вызывая побочное повреждение клетки-хозяина. В то время как в течение многих лет разрабатывались различные стратегии лечения, они имели слабый эффект.

Гепатит В является широко распространенным во всем мире заболеванием, которое насчитывает 280,000,000 носителей HBV. В глобальном плане HBV инфекция является наиболее распространенной в развивающихся странах Юго-восточной Азии, Африки и разных частях Южной Америки, где вертикальная трансмиссия младенцам в раннем возрасте вызывает высокую долю инфицированных индивидуумов, становящихся хроническими носителями HBV. Младенцы мужского пола, получившие HBV, имеют приблизительно 40% риск смерти от цирроза или первичной печеночноклеточной карциномы в результате хронической HBV инфекции. В отличие от этого, младенцы женского пола, инфицированные при рождении, имеют приблизительно 15% риск смерти по похожим причинам от хронической инфекции гепатита В.

Инфекция гепатит В остается тяжелой для лечения несмотря на то, что в клинической практике в настоящее время существует несколько лекарственных средств, включая интерферон $\alpha 2b$ (IFN $\alpha 2b$), IFN $\alpha 2a$, ламивудин, адефовир и энтекавир. Лечение является либо неэффективным вначале, или может стать таковым из-за возникновения устойчивых к лекарственному средству вирусов. Кроме того, также известно, что недостатком существующих схем лекарственного лечения является то, что они являются длительными, дорогостоящими и связаны с нежелательными побочными эффектами. Например, в то время как ламивудин применяют с некоторым успехом в лечении HBV инфекции, он связан с увеличивающимся риском возникновения резистентности, которая может составлять до 45-55% после второго года лечения. Кроме того, HBV не может быть полностью элиминирован из печени при такой терапии, так что повторная активация HBV инфекции происходит во многих случаях даже после прекращения лечения. Когда у пациентов с хронической HBV инфекцией наступает конечная стадия печеночной недостаточности, единственной альтернативной формой лечения становится трансплантация печени. Однако пока HBV инфекция персистирует, трансплантат может стать инфицированным, таким образом ограничивая выживание пациента и трансплантата.

Вирус иммунодефицита человека/синдром приобретенного иммунодефицита (ВИЧ/ СПИД) также представляет глобальный кризис в здравоохранении, особенно в развивающихся странах. Применение противоретровирусных лекарственных средств значительно изменило перспективы и качество жизни ВИЧ-инфицированных индивидуумов. Однако несмотря на такое противоретровирусное воздействие лекарственных средств, длительная иммунная активация, разрушение CD4 T-клеток и B-клеток и потеря иммунной функции являются только частично обратимыми. Пациенты также находятся в состоянии риска заболеваний, не вызванных СПИДом и таких причин смерти, как рак, сердечно-сосудистое заболевание, печеночная и почечная недостаточность, заболевания центральной нервной системы (например, токсоплазменный энцефалит) и персистирующие инфекции.

Настоящее изобретение относится к разработке нового подхода к лечению внутриклеточных инфекций.

Сущность изобретения

Таким образом, в первом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения внутриклеточной инфекции у индивидуума, способ, включающий введение индивидууму антагониста IAP.

Краткое описание рисунков

На фиг. 1 представлена зависимость от времени уровней HBV ДНК в сыворотке инфицированных мышей в течение 8-недельного периода (верхняя часть рисунка). На нижней части рисунка представлены ЕМ микрофотографии вирионов (слева) и субвирусные частицы (справа) в сыворотке.

На фиг. 2 представлена зависимость от времени уровней HBV ДНК в сыворотке инфицированных мышей в течение 40-недельного периода. Несмотря на очевидный контроль виремии, инфицированные мыши демонстрируют рецидив вирусной репликации HBV с временным подъемом уровня HBV ДНК в сыворотке даже на 24 неделе после инфекции.

На фиг. 3 представлены уровни HBV ДНК в сыворотке у мышей, получивших лечение бинапантоном или контролем растворителем (DMSO).

На фиг. 4 представлен график времени до наступления события (HBV клиренс), на котором сравниваются HBV инфицированные мыши (C57BL/6), получившие лечение биринапантом и контролем растворителем.

На фиг. 5 представлено, что мыши, дефицитные по cIAP1 (печеночно-специфичная недостаточность), вместе с общей недостаточностью cIAP2 во всех органах, могут элиминировать HBV инфекцию до сходной степени с мышами дикого типа, получившими лечение биринапантом. Пунктирная, сплошная красная и сплошная синяя линии указывают на число мышей дикого типа, мышей с печеночно-специфичной cIAP1 недостаточностью плюс с недостаточностью cIAP2 во всем организме и мышей с XIAP недостаточностью (во всем организме) (%), избавлявшихся от инфекции в течение определенного времени, соответственно.

Фиг. 6 - ингибирование репликации ВИЧ-1 JR-CSF в PBMC посредством биринапанта.

Фиг. 7 - ингибирование репликации ВИЧ-1 JR-CSF в PBMC посредством биринапанта +10 нг/мл TNF- α .

Фиг. 8 - РНА-активированные PBMCs, выделенные из двух здоровых доноров, были оставлены неинфицированными или инфицированными ВИЧ L4,3 (GFP+), а затем получившие лечение посредством биринапанта или контроля растворителем (NT) в течение 6 ч или 24 ч в указанных концентрациях. Дополнительно неинфицированные интактные PBMCs обрабатывали биринапантом или контролем растворителем. FACS анализ доли живых (активная каспаза 3 негативные) а) ВИЧ-инфицированных (GFP+) культивируемых CD4+ лимфоцитов после 24 ч лечения биринапантом, относительно живых инфицированных клеток до лечения; доли живых б) интактных культивируемых или в) РНА-активированных, неинфицированных CD4+ лимфоцитов после 6 ч или 24 ч лечения биринапантом относительно необработанных клеток.

Фиг. 9 - бактериальное поражение *Mycobacterium tuberculosis* (КОЕ/легкое $\log_{10}$), в *M. tuberculosis* инфицированных мышах, получавших биринапант (n=17, вводимый в качестве интраперитонеальной инъекции, по 30 мкг/г с недельными интервалами $\times$ 3) по сравнению с контролем DMSO (n=15), демонстрирующим значительное уменьшение 0,33 $\log_{10}$ CFU/легкое (P=0,012).

Фиг. 10 - антагонистичный TNF-цитокин подавляет эффективность биринапанта.

Фиг. 11 - результаты экспериментов со SMAC миметиками, отличными от биринапанта.

Фиг. 12 - бактериальное поражение *Legionella pneumophila* в легких инфицированных мышей (КОЕ/мл), которым вводили биринапант (квадратики) или контроль растворителем (круги). Каждая точка представляет животное, величины ошибок представляют SEM. *P<0,05.

На фиг. 13 - представлены результаты лечения HBV инфицированных мышей с применением энтекавира, биринапанта и биринопанта, комбинированного с энтекавиром. ***p<0,001, **p<0,01, ns=не значимо.

На фиг. 14 - представлены результаты лечения первичных гепатоцитов человека, инфицированных HBV *in vitro* с применением аденовирусной системы доставки с TRAIL, биринапантом и комбинацией TRAIL и биринапанта.

Подробное описание изобретения

На всем протяжении этого описания, если из контекста не следует другое, слово "содержать", или вариации, такие как "содержит" или "содержащий", будут поняты как обозначающие включение заявленного элемента или числа или группы элементов или чисел, но не исключение любого другого элемента или числа или группы элементов или чисел.

Отсылка данного описания к любой предшествующей публикации (или информации, полученной из нее), или к любому понятию, которое известно, не является и не должно быть воспринято как признание или допущение или любая форма предположения, что предшествующая публикация (или информация, полученная из нее) или известное понятие образует часть общеизвестного знания в области деятельности, к которой это описание относится.

Все публикации, упоминаемые в этом описании, включены в настоящий документ в качестве ссылки полностью.

Следует отметить, как применяют в настоящем описании, формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественные аспекты, если из контекста явно не следует другое. Таким образом, например, отсылка к "средству" включает одно средство, а также два или более средств; отсылка к "молекуле" включает одну молекулу, а также две или более молекул; и т.д.

Механизм уничтожения патогенов предназначен для инфицированных клеток, чтобы активировать процесс программируемой гибели клеток. Это убивает и патоген, и инфицированную клетку и предотвращает распространение микробов.

Однако многие патогены разработали стратегии предохранения своей клетки-хозяина от совершения самоубийства. Группа молекул в клетках-хозяевах, называемая ингибиторами белков апоптоза (IAPs), играет несколько ролей в регуляции программы гибели клеток и в модулировании воспаления.

Настоящее изобретение основывается, частично, на факте, что антагонизирующие IAPs *in vivo*, клиренс персистентно инфицированных клеток-хозяев и элиминация патогенов усиливается, не оказывая

болезнетворного побочного вреда хозяину. Это может быть достигнуто посредством применения антагониста *rap-IAP*, который может быть антагонистом *rap-cIAP*, например, антагонист *cIAP1* и/или *cIAP2*.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения внутриклеточной инфекции у индивидуума, способ, включающий введение индивидууму антагониста IAP.

Как применяют в настоящем документе термин "лечение" означает, что уровень или число патогенов, ответственных за внутриклеточную инфекцию в организме, получающем лечение, например, пациенте человеке, уменьшается.

Семейство белков IAP включает XIAP (BIRC4), *cIAP1* (BIRC2), *CIAP2* (BIRC3); NAIP (BIRC1), сурвивин (BIRC5), Apollon (Bruce; BIRC6), ML-IAP (BIRC7; Livin, KIAP) и ILP2 (BIRC8).

Существует степень избыточности между членами семейства, но таргетная делеция XIAP+cIAP1+cIAP2 вызывает эмбриональную летальность у мышей. Эти молекулы способствуют воспалению и подавляют сигналинг гибели клеток. Авторы настоящего изобретения впервые продемонстрировали, что IAPs играют важную роль в поддержании персистирующей внутриклеточной инфекции в хозяине.

В одном из вариантов осуществления IAP является *cIAP1* или *cIAP2*, или обоими.

cIAP1 кодируется последовательностью, представленной в GenBank DQ068066,1. Варианты транскриптов *cIAP1* включают NCBI эталонные последовательности NM_001166,4, NM_001256163,1 и NM_001256166,1.

cIAP2 кодируется последовательностью, представленной в GenBank BC037420,1. Варианты транскриптов *CIAP2* включают NCBI эталонные последовательности NM_001165,4 и NM_182962,2.

XIAP (X-связанный ингибитор апоптоза) кодируется GenBank NCBI эталонной последовательностью NG_007264,1. Варианты транскриптов XIAP включают NCBI эталонные последовательности NM_001167,3, NM_001204401,1 и NR_037916,1.

Подходящие антагонисты IAP будут известны специалистам в данной области. Примеры включают моновалентные антагонисты IAP GDC-0145, GDC-0152 и GDC-0917 (Genentech, USA), AT-IAP (Astex, UK) и AT-406 (Ascenta, USA) и бивалентные антагонисты IAP AEG40826 (Aegera Therapeutics, USA), SM-1200 (Univ. of Michigan), HGS1029 (Human Genome Sciences, USA), BV6 (Genentech, USA), AEG40730 (Aegera Therapeutics); SM-164 (Univ. of Michigan); CS3 (Genentech); MLI01 (Sanford-Burnham Medical Research Institute); AEG35156 (Aegera Therapeutics) и биринапант/TL32711 (TetraLogic, USA). Некоторые из них дополнительно обсуждают в Fulda и Vucic (Nature Reviews Drug Discovery, 2012, voll 1, 109-124) и Fulda (Leukemia, 2012, vol26, 1155-1165), содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки. В то время как в настоящее время полагают, что и моновалентные и бивалентные антагонисты IAP можно использовать в настоящем изобретении в настоящем изобретении предпочтительно, чтобы антагонист IAP был бивалентным.

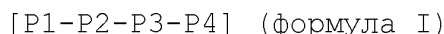
В одном из вариантов осуществления антагонист IAP является миметиком второго полученного из митохондрии активатора каспазы (Smac). Smac является проапоптотическим митохондриальным белком, который является эндогенным ингибитором IAPs. Было продемонстрировано, что Smac миметики стимулируют программируемую гибель клеток и, таким образом, стали центром внимания при разработке новых подходов терапии рака^{2,3}.

Smac антагонизирует IAP-опосредованное ингибирование каспазы посредством прямого взаимодействия с IAPs и/или индуцирует протеосомную деградацию некоторых членов семейства IAP (*cIAP1* и *cIAP2*). Способность Smac промотировать и протеолитическую активацию про-каспазы-3 и ферментативную активность зрелой каспазы-3 зависит от ее способности специфически взаимодействовать с IAP. Smac связывается с BIR1/BIR2 линкерной областью и BIR3 XIAP, нарушая ингибирование каспазы-3 и -7 и каспазы-9, таким образом, облегчая апоптоз или программируемую гибель клеток. Smac и Smac миметики также индуцируют протеосомную деградацию *cIAP1* и *cIAP2*, что приводит к ингибированию канонической NF-κB активации. Многие вирусы модулируют NF-κB активацию для промотирования патогенеза заболевания (Reference: Rahman и McFadden, Nat Rev Microbio 2011 9:291-306; Hiscott et al Oncogene 2006 30:6844-67; Shukla et al Carcinogenesis 2011 32:978-985). Не будучи связанным с конкретным пониманием механизма, лежащего в основе этого изобретения, эти действия предполагают механизм, при котором Smac миметики могут быть использованы при лечении таких инфекций.

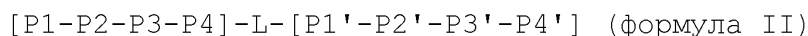
Открытие Smac миметиков стало возможным благодаря установлению кристаллической структуры взаимодействия между Smac и IAPs. Как выяснилось, Smac миметики облегчают апоптотическую гибель клеток в опухолевых клетках посредством множества механизмов, включая прямое связывание и противодействие IAPs, элиминацию IAPs посредством промотирования аутоубиквитинирования и протеосомной деградации *cIAPs* и активацию внешнего апоптотического сигнального пути посредством TNF стимуляции. TNF является критическим цитокином, требующимся для контроля многих инфекций, и когда TNF нейтрализуется для лечения аутоиммунных нарушений, многие латентные инфекции реактивируются (см. <http://cMr.asm.org/content/22/2/274.full#sec-49>). Как следствие, промотирование TNF активности при этих инфекциях может стимулировать их клиренс.

Примеры Smac пептидомиметиков, включая некоторые из идентифицированных выше, описаны, без ограничений, в US 7517906; US 7419975; US 7589118; US 7932382; US 7345081; US 7244851; US 7674787; US 7772177; US 7989441; US 20100324083; US 20100056467; US 20090069294; US 20110065726;

US 20110206690; WO 2011098904, все из которых включены в настоящий документ в качестве ссылки, как будет изложено далее. Соединения, описанные в настоящем документе, и Smac миметики, как правило, имеют структуру:



или



где P1-P2-P3- и P1'-P2'-P3'- относится к заменам пептидов, т.е. пептидомиметикам, N-концевого Ala-Val-Pro- трипептида зрелого Smac, и P4 и P4' относится к аминокислотным заменам четвертой N-концевой аминокислоты, Phe, Tyr, He или Val, и L является связывающей группой или связью, ковалентно связывающей [P1-P2-P3-P4] с [P'-P2'-P3'-P4'].

Например, без ограничений, Smac миметик может находиться в следующем виде соединений по формуле II:

P1 и P1' является $NHR^1-CHR^2-C(O)-$;

P2 и P2' является $-NH-CHR^3-C(O)-$;

P3 и P3' является пирролидином, пирролидином, слитым с циклоалкилом, или пирролидином, слитым с гетероциклоалкилом, имеющим -N-гетероатом, необязательно замещенный в каждом случае, и где пирролидин P3/P3' связан с P2/P2' посредством амидной связи;

P4 и P4' является $-M-Q_p-R^7$.

Различные заместители могут быть, например:

R¹: -H или $-CH_3$;

R²: $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ или $-CH_2OH$;

R³: C₂₋₆ алкилом, C₂₋₆ алкокси, C₃₋₆ циклоалкилом или гетероциклоалкилом, или C₆₋₈ арилом или гетероарилом, необязательно замещенным в каждом случае;

M: ковалентная связь, C₁₋₆ алкилен, замещенный C₁₋₆ алкиленом, таким как, но не ограничивающимся $-C(O)-$;

Q: ковалентная связь, C₁₋₆ алкилен, замещенный C₁₋₆ алкиленом, -O- или $-NR^8-$,

P: 0 или 1;

R⁷: циклоалкил, циклоалкил арил, алкиларил, алкилгетероарил, арил или гетероарил, необязательно замещенный в каждом случае;

R⁸: -H или C₁₋₆ алкил.

L является связывающей группой или связью, ковалентно связывающей [P1-P2-P3-P4] с [P1'-P2'-P3'-P4'].

"Алкил" (моновалентный) и "алкилен" (дивалентный) в отдельности или в качестве части другого термина (например, алкокси) означает разветвленную или неразветвленную, насыщенную алифатическую углеводородную группу, имеющую до 12 атомов углерода, если не указано иначе. Примеры конкретных алкильных групп в качестве неограничивающих примеров включают, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изо-бутил, сек-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-метилбутил, 2,2-диметилпропил, н-гексил, 2-метилпентил, 2,2-диметилбутил, н-гептил, 3-гептил, 2-метилгексил и т.п. Термин "низший" когда его используют для модификации алкила, алкенила и т.д., означает от 1 до 4 атомов углерода, разветвленных или линейных, так что, например, термины "низший алкил", "C₁₋₄ алкил" и "алкил из от 1 до 4 атомов углерода" являются синонимичными и их применяют взаимозаменяемо, чтобы обозначить метил, этил, 1-пропил, изопропил, 1-бутил, сек-бутил или трет-бутил. Примеры алкиленовых групп в качестве неограничивающих примеров включают метилен, этилен, н-пропилен, н-бутилен и 2-метилбутилен.

Термин замещенный алкил относится к алкильным составным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на один или несколько (часто не более, чем четыре) атома углерода углеводородного скелета. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из: галогена (например, I, Br, Cl или F, конкретно фтора (F)), гидроксид, amino, циано, меркапто, алкокси (такого как C₁₋₆ алкокси, или низший (C₁₋₄) алкокси, например, метокси или этокси для получения алкоксиалкила), арилокси (такой как фенокси для получения арилоксиалкила), нитро, оксо (например, для образования карбонила), карбоксил (который в действительности является комбинацией оксо и гидроксид заместителя единичного атома углерода), карбамоил (аминокарбонил, такой как R₂C(O)-, является заместителем оксо и amino единичного атома углерода), циклоалкил (например, циклоалкилалкил), арил (приводящий например, к аралкилам, таким как бензил или фенилэтил), гетероциклилалкил (например, гетероциклоалкилалкил), гетероарил (например, гетероарилалкил), алкилсульфонил (включая низший алкилсульфонил, такой как метил сульфонил), арилсульфонил (такой как фенил сульфонил), и -OCF₃ (который является галогеном, замещающим алкокси). В изобретении дополнительно рассматривается, что несколько из этих алкильных заместителей, включая конкретно алкокси, циклоалкил, арил, гетероциклилалкил и гетероарил, являются необязательно дополнительно замещенными, как определено в связи с каждым из их соответствующих определений, представленных ниже. Кроме того, определенные алкил замещающие функциональные группы происходят от комбинации таких заместителей единичного

атома углерода. Например, сложноэфирная функциональная группа, например, алкоксикарбонил, такой как метоксикарбонил, или трет-бутоксикарбонил (Вос) является результатом такого замещения. В частности, метоксикарбонил и Вос являются замещенными алкилами, которые являются результатом замещения метиловой группы ($-\text{CH}_3$) и оксо ($=\text{O}$), и незамещенного алкокси, например, метокси ($\text{CH}_3\text{-O}$) или трет-бутокс ($(\text{CH}_3)_3\text{C-O-}$), соответственно замещая три водорода. Сходным образом, амидная функциональная группа, например, алкиламинокарбонил, такой как диметиламинокарбонил или метиламинокарбонил, является замещенным алкилом, который является результатом замещения метильной группы ($-\text{CH}_3$) и оксо ($=\text{O}$) и моно-незамещенного алкиламино или незамещенного алкил amino, например, диметиламино ($-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$), или метиламино ($-\text{N}-(\text{CH}_3)$), замещающего три водорода (сходным образом арил аминокарбонил, такой как дифениламинокарбонил является замещенным алкилом, который является результатом замещения метильной группы ($-\text{CH}_3$) и оксо ($=\text{O}$) и моно незамещенный арил(фенил)амино). Примерные замещенные алкильные группы дополнительно включают цианометил, нитрометил, гидроксиметил, такие как гидроксиметил, тритилоксиметил, пропионилоксиметил, аминокислоты, такие как аминометил, карбоксил алкилы, такие как карбоксиметил, карбоксиэтил, карбоксипропил, 2,3-дихлорпентил, 3-гидрокси-5-карбоксигексил, ацетил (например, алканойл, где в случае ацетила два водородных атома на $-\text{CH}_2$ части этиловой группы замещены оксо ($=\text{O}$)), 2-аминопропилом, пентахлорбутилом, трифтор этилом, метокси этилом, 3-гидроксипентилом, 4-хлорбутилом, 1,2-диметил -пропилом, пентафторэтилом, алкилоксикарбонилметилом, аллилоксикарбониламинометилом, карбамоилоксиметилом, метоксиметилом, этоксиметилом, т-бутоксиметилом, ацетоксиметилом, хлорметилом, бромометилом, йодометилом, трифторметилом, 6-гидроксигексилом, 2,4-дихлор (н-бутилом), 2-амино (изопропилом), циклоалкилкарбонил (например, циклопропилкарбонил) и 2-карбамоилоксиэтилом. Конкретные замещенные алкилы являются замещенными метильными группами. Примеры замещенных метильных групп включают такие группы, как гидроксиметил, защищенный гидроксиметил (например, тетрагидропиранил-оксиметил), ацетоксиметил, карбамоилоксиметил, трифторметил, хлорметил, карбоксиметил, карбоксил (где три водородных атома на метиле замещены, два из водородов замещены оксо ($=\text{O}$) и другой водород замещен гидроксидом ($-\text{OH}$)), трет-бутоксикарбонил (где три водородных атома на метиле замещены, два из водородов замещены оксо ($=\text{O}$) и другой водород замещен трет-бутоксидом ($-\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$)), бромметил и йодметил. Когда описание и конкретно формула изобретения относится к конкретному заместителю алкила, таким образом, что заместитель может потенциально занять одну или несколько заместительных позиций на алкиле. Например, излагая, что алкил имеет фтор-заместитель, охватывало бы моно-, ди-, и, возможно, высшую степень замещения на алкильной функциональной группе.

Термин замещенный алкилен относится к алкиленовым функциональным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (часто не более, чем четырех) атомах углерода углеводородного скелета, алкилен является сходным образом замещенным группами, как указано выше для алкила.

Алкокси является -О-алкилом. Замещенный алкокси является -О-замещенным алкилом, где алкокси является сходным образом замещенным группами, как указано выше для алкила. Один замещенный алкокси является ацетокси, где два из водородов в этокси (например, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$) замещены оксо, ($=\text{O}$) чтобы получить $-\text{O-C}(\text{O})\text{-CH}_3$; другим является аралкокси, где один из водородов в алкокси замещен арилом, таким как бензилокси, и другой является карбаматом, где два из водородов на метокси (например, $-\text{O-CH}_3$) замещены оксо ($=\text{O}$) и другой водород замещен амином (например, $-\text{H}_2$, $-\text{NHR}$ или $-\text{RR}$) чтобы получить, например, $-\text{O-C}(\text{O})\text{-H}_2$. Низший алкокси является -О-низшим алкилом.

"Алкенил" (моновалентный) и "алкенилен" (дивалентный) в отдельности или в качестве части другого термина означает ненасыщенную углеводородную группу, содержащую, по меньшей мере, одну двойную связь углерод-углерод, как правило 1 или 2 двойные связи углерод-углерод, которые могут быть линейными или разветвленными и которые имеют, по меньшей мере, 2 и до 12 атомов углерода, если не указано иначе. Типичные алкенильные группы включают, в качестве примера, винил, аллил, изопропенил, но -2-енил, н-пент-2-енил, и н-гекс-2-енил.

Термины замещенный алкенил и замещенный алкенилен относятся к алкенильным и алкениленовым функциональным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (часто не более, чем четыре) атомах углерода углеводородного скелета. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из: галогенов (например, I, Br, Cl, F), гидроксидов, аминов, циано, алкокси (такого как $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкокси), арилокси (такой как фенокси), нитро, меркапто, карбоксил, оксо, карбамоил, циклоалкил, арил, гетероцикл, гетероарил, алкилсульфонил, арилсульфонил и OSF_3 .

"Алкинил" обозначает моновалентную ненасыщенную углеводородную группу, содержащую, по меньшей мере, одну тройную связь углерод-углерод, как правило, 1 тройную связь углерод-углерод, которая может быть линейной или разветвленной и которая имеет по меньшей мере 2 и до 12 атомов углерода, если не указано иначе. Типичные алкинильные группы включают, в качестве примера, этинил, пропаргил и бут-2-инил.

"Циклоалкил" в отдельности или в качестве части другого термина означает насыщенную или частично ненасыщенную циклическую алифатическую углеводородную группу (углеродную циклическую

группу), имеющую от 3 до 8 атомов углерода, если не указано иначе, такие как циклопропил, циклобутил, цикlopентил и циклогексил, и дополнительно включает полициклические, включая слитые циклоалкилы, такие как 1,2,3,4-тетрагидронафталины (1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ил, и 1,2,3,4-тетрагидронафтален-2-ил), инданилы (индан-1-ил, и индан-2-ил), изоинденилы (изоинден-1-ил, изоинден-2-ил, и изоинден-3-ил) и инденилы (инден-1-ил, инден-2-ил и инден-3-ил). Низший циклоалкил имеет от 3 до 6 атомов углерода и включает циклопропил, циклобутил, цикlopентил и циклогексил.

Термин замещенный циклоалкил относится к циклоалкильным функциональным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (часто не более, чем четырех) атомах углерода углеводородного скелета. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из: галогено (например, I, Br, Cl, F), гидроксид, амин, циано, алкокси (такого как C₁-C₆ алкокси), замещенного алкокси, арилокси (такого как феноксид), нитро, меркапто, карбоксил, оксо, карбамоил, алкил, замещенных алкилов, таких как трифторметил, арил, замещенные арилы, гетероциклил, гетероарил, алкил сульфонил, арилсульфонил и -OCF₃. Где описание и конкретно формула изобретения относится к конкретному заместителю циклоалкила таким образом, что заместитель может потенциально занять одну или несколько заместительных позиций на циклоалкиле. Например, заявление что циклоалкил имеет фтор-заместитель, охватывало бы моно-, ди-, и более высокую степень замещения на циклоалкильной функциональной группе. Примеры циклоалкилов включают циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, тетрагидронафтил и инданил.

"Арил" в отдельности или в качестве части другого термина обозначает ароматическую карбоциклическую группу слитую или не слитую, имеющую определенное число атомов углерода, или если никакого числа не определено, от 6 до 14 атомов углерода. Конкретные арильные группы включают фенил, нафтил, бифенил, фенантренил, нафтаценил, индолил и т.п. (см. например, Lang's Handbook of Chemistry (Dean, J. A., ed) 13th ed. Table 7-2 [1985]).

Термин замещенный арил относится к арильным функциональным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (как правило, не более, чем шести) атомах углерода ароматического углеводородного ядра. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из: галогено (например, I, Br, Cl, F), гидроксид, амин, циано, алкокси (такого как C₁-C₆ алкокси и конкретно низшего алкокси), замещенного алкокси, арилокси (такого как феноксид), нитро, меркапто, карбоксил, карбамоил, алкил, замещенного алкила (такого как трифторметил), арил, -OCF₃, алкилсульфонил (включая низший алкил сульфонил), арилсульфонил, гетероциклил и гетероарил. Примеры таких замещенных фенилов в качестве неограничивающих примеров включают моно- или ди (галогено) фенильную группу, такую как 2-хлорфенил, 2-бромфенил, 4-хлорфенил, 2,6-дихлорфенил, 2,5-дихлорфенил, 3,4-дихлорфенил, 3-хлорфенил, 3-бромфенил, 4-бромфенил, 3,4-дибромфенил, 3-хлор-4-фторфенил, 2-фторфенил; 3-фторфенил, 4-фторфенил, моно- или ди (гидроксид) фенильную группу, такую как 4-гидроксифенил, 3-гидроксифенил, 2,4-дигидроксифенил, их защищенные гидроксид производные;

нитрофенильную группу, такую как 3-или 4-нитрофенил; цианофенильную группу, например, 4-цианофенил; моно- или ди (низший алкил) фенильную группу, такую как 4-метилфенил, 2,4-диметилфенил, 2-метилфенил, 4-(изопропил) фенил, 4-этилфенил, 3-(н-пропил) фенил; моно или ди (алкокси) фенильную группу, например, 3,4-диметоксифенил, 3-метокси-4-бензилоксифенил, 3-метокси-4-(1-хлорметил)бензилокси-фенил, 3-этоксифенил, 4-(изопропокси)фенил, 4-(т-бутокси) фенил, 3-этоксид-4-метоксифенил; 3-или 4-трифторметилфенил; моно- или дикарбоксифенил или (защищенный карбоксид) фенильную группу, такую как 4-карбоксифенил; моно- или ди (гидроксиметил) фенил или (защищенный гидроксиметил) фенил, такой как 3-(защищенный гидроксиметил) фенил или 3,4-ди(гидроксиметил) фенил; моно- или ди (аминометил) фенил или (защищенный аминометил) фенил, такой как 2-(аминометил) фенил или 2,4-(защищенный аминометил) фенил; или моно- или ди(N-(метилсульфониламино)) фенил, такой как 3-(N-метил сульфонил амин) фенил. Кроме того, заместители, такие как в дизамещенных фенильных группах, могут быть такими же или отличными, например, 3-метил-4-гидроксифенил, 3-хлор-4-гидроксифенил, 2-метокси-4-бромфенил, 4-этил-2-гидроксифенил, 3-гидроксид-4-нитрофенил, 2-гидроксид-4-хлорфенил, а также для тризамещенных фенильных групп, где заместители являются отличными, как например, 3-метокси-4-бензилокси-6-метил сульфониламино, 3-метокси-4-бензилокси-6-фенил сульфониламино, и тетра-замещенные фенильные группы, где заместители являются отличными, такие как 3-метокси-4-бензилокси-5-метил-6-фенил сульфониламино. Конкретными замещенными фенильными группами являются 2-хлорфенильные, 2-аминофенильные, 2-бромфенильные, 3-метоксифенильные, 3-этоксид-фенильные, 4-бензилоксифенильные, 4-метоксифенильные, 3-этоксид-4-бензилоксифенильные, 3,4-диэтоксифенильные, 3-метокси-4-бензилоксифенильные, 3-метокси-4-(1-хлорметил)бензилоксифенильные, 3-метокси-4-(1-хлорметил) бензилокси-6-метил сульфонил аминифенильные группы. Когда описание и конкретно формула изобретения относится к конкретному заместителю для арила, таким образом, что заместитель может потенциально занять одну или несколько заместительных позиций на ариле. Например, заявление что арил имеет фтор-заместитель, охватывало бы моно-, ди-, три, тетра и более высокую степень замещения на арильной функциональной группе. Слитые арильные кольца также могут быть замещены заместителями, описанными в настоящем документе, например, 1, 2 или 3 заместителя-

ми, таким же образом, как и замещенные алкильные группы. Термины арил и замещенный арил не включают функциональные группы, в которых ароматическое кольцо слито с насыщенным или частично ненасыщенным алифатическим кольцом.

"Гетероциклическая группа", "гетероциклический", "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклоалкил" или "гетероцикло" в отдельности и при использовании в качестве функциональной группы в комплексной группе, применяют взаимозаменяемо и относят к любой моно-, би-, или трициклической, насыщенной или ненасыщенной, неароматической гетеро-атом-содержащей циклической системе, имеющей определенное число атомов, или, если нет никакого конкретно обозначенного числа, тогда от 5 до приблизительно 14 атомов, где атомами кольца являются углерод и по меньшей мере один гетероатом и, как правило, не более чем четыре гетероатома (т.е. азот, сера или кислород). Включенными в определение являются любые бициклические группы, где любое из вышеупомянутых гетероциклических колец слито с ароматическим кольцом (т.е. арилом (например, бензолом) или гетероарильным кольцом). В конкретном варианте осуществления группа включает от 1 до 4 гетероатомов. Как правило, 5-членное кольцо имеет от 0 до 1 двойных связей и 6- или 7-членное кольцо имеет от 0 до 2 двойных связей и гетероатомы азота или серы могут необязательно быть окислены (например, SO, SO₂), и любой гетероатом азота может необязательно быть кватернизован. Конкретные незамещенные неароматические гетероциклы включают морфолинил (морфолино), пирролидинилы, оксиранил, индолинил, 2,3-дигидроиндолил, изоиндолинил, 2,3-дигидроизоиндолил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, оксетанил, тетрагидрофуранил, 2,3-дигидрофуранил, 2Н-пиранилы, тетрагидропиранилы, азиридины, азетидинилы, 1-метил-2-пирролил, пиперазинилы и пиперидинилы.

Термин замещенный гетероцикло относится к гетероцикло функциональным группам, имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (как правило, не более, чем шести) атомах гетероцикло скелета. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из галогено (например, I, Br, Cl, F), гидроксид, амино, циано, алкокси (такой как C₁-C₆ алкокси), замещенный алкокси, арилокси (такой как фенокси), нитро, карбоксил, оксо, карбамоил, алкил, замещенный алкил (такой как трифторметил), -OCF₃, арил, замещенный арил, алкилсульфонил (включая низший алкил сульфонил), и арилсульфонил. Когда описание и конкретно формула изобретения относится к конкретному заместителю гетероциклоалкила, таким образом, что заместитель может потенциально занять одну или несколько заместительных позиций на гетероциклоалкиле. Например, заявление, что гетероциклоалкил имеет фтор-заместитель, охватывало бы моно-, ди-, три-, тетра- и более высокую степень замещения на гетероциклоалкильной функциональной группе.

"Гетероарил" в отдельности и при использовании в качестве функциональной группы в комплексной группе относится к любой моно-, би-, или трициклической ароматической циклической системе, имеющей определенное число атомов, или, если никакое число конкретно не определено, тогда, по меньшей мере, одно кольцо является 5-, 6-или 7-членным кольцом, и общее число атомов составляет от 5 до приблизительно 14, и состоит из от одного до четырех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы (Lang's Handbook of Chemistry, выше). Включенными в определение являются бициклические группы, где любое из перечисленных выше гетероарильных колец слито с бензольным кольцом. Следующие циклические системы являются примерами гетероарильных групп, обозначенных термином "гетероарил": тиенилы (альтернативно названные тиофенил), фурилы, имидазолилы, пиразолилы, тиазолилы, изотиазолилы, оксазолилы, изоксазолилы, триазолилы, тиадиазолилы, оксadiaзолилы, тетразолилы, тиатриазолилы, оксатриазолилы, пиридины, пиримидинилы (например, пиримидин-2-ил), пиразинилы, пиридазинилы, тиазинилы, оксазинилы, триазинилы, тиадиазинилы, оксadiaзинилы, дитиазинилы, диоксазинилы, оксатиазинилы, тетразинилы, тиатриазинилы, оксатриазинилы, дитиадиазинилы, имидазолинил, дигидропиримидил, тетрагидропиримидил, тетразол [1, 5-b] пиридазинилы и пурины, а также бензослитые производные, например, бензоксазолилы, бензофурилы, бензотиенилы, бензотиазолилы, бензотиадиазолилы, бензотриазолилы, бензоимидазолилы, изоиндолилы, индазолилы, индолизинилы, индолилы, нафтиридины, пиридопиримидины, фталазинилы, квинолилы, изоквинолилы и хиназолинил.

Термин замещенный гетероарил относится к гетероарильным функциональным группам (таким как идентифицированные выше), имеющим заместители, замещающие один или несколько водородов на одном или нескольких (как правило, не более, чем шести) атомах гетероарильного скелета. Такие заместители являются независимо выбранными из группы, состоящей из: галогено (например, I, Br, Cl, F), гидроксид, амино, циано, алкокси (такого как C₁-C₆ алкокси), арилокси (такой как фенокси), нитро, меркапто, карбоксил, карбамоил, алкил, замещенный алкил (такой как трифторметил), -OCF₃, арил, замещенный арил, алкилсульфонил (включая низший алкилсульфонил), и арилсульфонил. Когда описание и конкретно формула изобретения относится конкретному заместителю гетероарила таким образом, что заместитель может потенциально занять одну или несколько заместительных позиций на гетероариле. Например, заявление о том, что гетероарил имеет фтор-заместитель, охватывало бы моно-, ди-, три-, тетра- и более высокую степень замещения на гетероарильной функциональной группе.

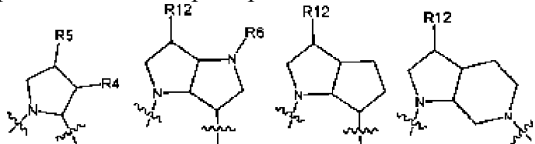
Конкретные "гетероарилы" (включая "замещенные гетероарилы") включают; 1Н-пирроло[2,3-b]пиридин, 1,3-тиазол-2-ил, 4-(карбоксиметил)-5-метил-1, 3-тиазол-2-ил, 1,2,4-тиадиазол-5-ил, 3-метил-1,2,4-

тиадиазол-5-ил, 1,3,4-триазол-5-ил, 2-метил-1,3,4-триазол-5-ил, 2-гидрокси-1,3, 4-триазол-5-ил, 2-карбоксит-4-метил-1,3,4-триазол-5-ил, 1,3-оксазол-2-ил, 1,3,4-оксадиазол-5-ил, 2-метил-1,3,4-оксадиазол-5-ил, 2-(гидроксиметил)-1,3,4-оксадиазол-5-ил, 1,2,4-оксадиазол-5-ил, 1,3,4-тиадиазол-5-ил, 2-тиол-1,3,4-тиадиазол-5-ил, 2-(метилтио)-1,3,4-тиадиазол-5-ил, 2-амино-1,3,4-тиадиазол-5-ил, 1Н-тетразол-5-ил, 1-метил-1Н-тетразол-5-ил, 1-(1-(диметиламино)ет-2-ил)-1Н-тетразол-5-ил, 1-(карбоксиметил)-1Н-тетразол-5-ил, 1-(метилсульфоновая кислота) Н-тетразол-5-ил, 2-метил-1Н-тетразол-5-ил, 1,2,3-триазол-5-ил, 1-метил-1,2,3-триазол-5-ил, 2-метил-1,2,3-триазол-5-ил, 4-метил-1,2,3-триазол-5-ил, пирид-2-ил N-оксид, 6-метокси-2-(н-оксид)пиридаз-3-ил, 6-гидроксипиридаз-3-ил, 1-метилпирид-2-ил, 1-метилпирид-4-ил, 2-гидроксипиримид-4-ил, 1,4,5,6-тетрагидро-5,6-диоксо-4-метил-аз-триазин-3-ил, 1,4,5,6-тетрагидро-4-(формилметил)-5,6-диоксо-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидроксиазтриазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидрокси-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидрокси-2-метилазтриазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидрокси-2-метил-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-метокси-2-метил-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-2-метил-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-2,6-диметил-аз-триазин-3-ил, тетразоло [1,5-b] пиридазин-6-ил, 8-аминотетразоло [1,5-b]-пиридазин-6-ил, квинол-2-ил, квинол-3-ил, квинол-4-ил, квинол-6-ил, квинол-8-ил, 2-метил-квинол-4-ил, 6-фтор-квинол-4-ил, 2-метил,8-фтор-квинол-4-ил, изоквинол-5-ил, изоквинол-8-ил, изоквинол-1-ил и квинолин-4-ил.

Альтернативная группа "гетероарил" включает 5-метил-2-фенил-2Н-пиразол-3-ил, 4-(карбоксит-метил)-5-метил-1,3-тиазол-2-ил, 1,3,4-триазол-5-ил, 2-метил-1,3,4-триазол-5-ил, 1Н-тетразол-5-ил, 1-метил-1Н-тетразол-5-ил, 1-(1-(диметиламино)ет-2-ил) Н-тетразол-5-ил, 1-(карбоксит-метил)-1Н-тетразол-5-ил, 1-(метил сульфоновая кислота)-1Н-тетразол-5-ил, 1,2,3-триазол-5-ил, 1,4,5,6-тетрагидро-5,6-диоксо-4-метил-аз-триазин-3-ил, 1,4,5,6-тетрагидро-4-(2-формилметил)-5,6-диоксо-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидрокси-2-метил-аз-триазин-3-ил, 2,5-дигидро-5-оксо-6-гидрокси-2-метил-аз-триазин-3-ил, тетразоло [1,5-b] пиридазин-6-ил, и 8-аминотетразоло [1,5-b] пиридазин-6-ил.

L является связывающей группой или связью, ковалентно связывающей один мономер [P1-P2-P3-P4] с другим мономером [P1'-P2'-P3'-P4']. Как правило, -L- связывает P2 с P2' позицией, таким образом как в R3, или P4 с P4', таким образом как в M, G, Q, или R⁷, или оба P2 с P2', и P4 с P4'. L, таким образом, единичная или двойная ковалентная связь или смежная цепь, разветвленная или неразветвленная, замещенная или незамещенная, от 1 до приблизительно 100 атомов, как правило, от 1 до приблизительно 30 атомов, например, необязательно замещенная алкиленовая, алкениленовая, алкилиновая, циклоалкильная, алкилциклоалкильная, алкиларилалкильная цепь из от 2 до 20 атомов необязательно с 1-4 гетероатомами, выбранными из -O-, -N-, и -S-. Иллюстративными примерами L является единичная или двойная ковалентная связь, C₁₋₁₂ алкилен, замещенный C₁₋₁₂ алкилен, C₁₋₁₂ алкенилен, замещенный C₁₋₁₂ алкенилен, C₁₋₁₂ алкинилен, замещенный C₁₋₁₂ алкинилен, X_n-фенил-Y_n, или X_n-(фенил)₂-Y_n, где X и Y являются независимо C₁₋₆ алкилен, замещенным C₁₋₆ алкиленом, C₁₋₆ алкениленом, замещенным C₁₋₆ алкениленом, C₁₋₆ алкиниленом, замещенным C₁₋₆ алкиниленом, или S(O)₂.

Группы в качестве неограничивающих примеров включают:



где R⁶ является -H, C₁₋₆ алкилом, замещенным C₁₋₆ алкилом, C₁₋₆ алкокси, замещенным C₁₋₆ алкокси, C₁₋₆ алкилсульфонилом, арилсульфонилом, циклоалкилом, замещенным циклоалкилом, гетероциклоалкилом, замещенным гетероциклоалкилом, арилом, замещенным арилом, гетероарилом или замещенным гетероарилом;

R⁴, R⁵ и R¹² являются, независимо, -H, -OH, C₁₋₆ алкилом, C₁₋₆ гетероалкилом, C₁₋₆ алкокси, арилокси, циклоалкилом, гетероциклоалкилом, арилом, C₁₋₆ алкил арилом или гетероарилом, или C₁₋₆ алкил гетероарилом, необязательно замещенным в каждом случае, кроме того, когда R⁴ является -H или -OH.

Как упомянуто, в определенных иллюстративных вариантах осуществления, S_{mac} миметик, применяемый в практическом осуществлении изобретения, является бивалентным.

В определенных иллюстративных вариантах осуществления выбранный S_{mac} миметик дерепрессирует XIAP-опосредованную репрессию каспазы-3 и/или расщепляет cIAP-1, не связанный с TRAF2 (не TRAF2-связанный, например, "цитоплазматический" cIAP-1 или "свободный" cIAP-1) а также cIAP1, связанный с TRAF2, и/или расщепляет cIAP-2, связанный с TRAF2, но не расщепляет cIAP-2, не связанный с TRAF2, или слабо расщепляет cIAP-2, не связанный с TRAF2, относительно расщепления cIAP-2, связанного с TRAF2.

S_{mac} миметики, применяемые в практическом осуществлении настоящего изобретения, могут вызывать расщепление cIAP-2, не связанного с TRAF2, но такого расщепления в процентах будет меньше, чем степень расщепления TRAF2-связанного cIAP-2. Как было замечено, значение различия в эффектах S_{mac} миметика на cIAP-2, не связанный с TRAF2, коррелирует с переносимостью (или профилем безопасности) S_{mac} миметика у животных. Если первый S_{mac} миметик вызывает меньшее расщепление

cIAP-2, не связанного с TRAF2, относительно расщепления TRAF2-связанного cIAP-2, чем второй Smac миметик, т.е. структурно отличный Smac миметик, тогда первый Smac миметик скорее будет обладать лучшей переносимостью (т.е. более безопасен для введения) у животных. Более конкретно, специалист может выбрать два Smac миметика, каждый из которых вызывает расщепление cIAP-1, не связанного с TRAF2, TRAF2-связанного cIAP-1 и TRAF2-связанного cIAP-2 с тем, который демонстрирует отличную (меньшую) степень расщепления cIAP-2, не связанного с TRAF2, тогда соединение, которое вызывает меньшее расщепление cIAP-2, не связанного с TRAF2, обладает скорее лучшей переносимостью без значимой потери противоопухолевой активности.

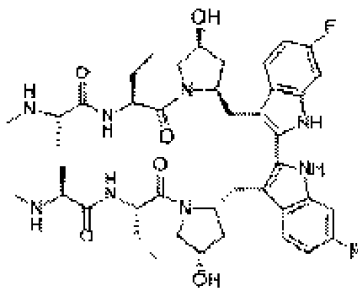
Кинетика расщепления TRAF2-несвязанного cIAP-1, TRAF2-несвязанного cIAP-2, TRAF2-связанного cIAP-1 и TRAF2-связанного cIAP-2 можно измерять посредством вестерн-блоттинга. Степень расщепления можно наблюдать визуально при таких анализах в течение некоторого периода времени. Например, по-видимому, степень расщепления TRAF2-несвязанного cIAP-2 и TRAF2-связанного cIAP-2 может по существу являться одинаковой незамедлительно после обработки клеток Smac миметиком, но через несколько минут, например, через от 15 до 30 мин, повышенное расщепление TRAF2-связанного cIAP-2 относительно расщепления TRAF2-несвязанного cIAP-2 можно наблюдать в обрабатываемых клетках. Различия в степени расщепления также могут быть подсчитаны. Например, в случае вестерн-блоттинга с применением зеленого флуоресцентного белка, меченного cIAPs, степень расщепления может быть подсчитана с применением устройства, которое измеряет интенсивность флуоресценции.

Для Smac миметика, который скорее обладает лучшей переносимостью у животных, степень расщепления TRAF2-несвязанного cIAP-2 будет, как правило, менее чем 75% (или приблизительно 75%), т.е., приблизительно 75% или менее, чем степень расщепления TRAF2-связанного cIAP-2 при релевантной концентрации, в течение, по меньшей мере, приблизительно 15 мин, например, от 30 до 120 мин (или приблизительно от 30 до приблизительно 120 мин). Количество Smac миметиков, применяемых в этом анализе, будет варьировать с активностью Smac миметика, но будет составлять, как правило, менее чем 1 мкМ, например, приблизительно от 1 до приблизительно 500 нМ или приблизительно от 10 до приблизительно 150 нМ.

В некоторых случаях степень расщепления TRAF2-несвязанного cIAP-2 будет составлять менее чем 50% от (или приблизительно 50% от), т.е., приблизительно 50% или менее чем; или менее чем 25% от (или приблизительно 25% от), т.е., приблизительно 25% или менее чем; или менее чем 10% от (или приблизительно 10% от), т.е., приблизительно 10% или менее чем, степень расщепления TRAF2-связанного cIAP-2. Например, при анализе расщепления cIAP посредством Smac миметика, имеющего профиль расщепления cIAP по изобретению, TRAF2-связанный cIAP-2 может быть приблизительно на 70-75% расщепленным через 30 мин (т.е., только приблизительно 30% исходно выявляемого количества TRAF2-связанного cIAP-2 все еще выявляется); в то время как TRAF2-несвязанный cIAP-2 может быть приблизительно на 35-40% расщепленным (т.е. от 60 до 65% от исходно выявленного количества TRAF2-несвязанного cIAP-2 все еще выявляется) через 30 мин. В этом случае, указано, что Smac миметик расщепляет TRAF2-несвязанный cIAP-2 при приблизительно 50% или менее, чем степень расщепления TRAF2-связанного cIAP-2 (от 35 до 40%, разделенные на (от 70 до 75%)=приблизительно 50%).

Индукция апоптоза является высоко специфичной для чувствительных опухолей, в то время как нормальная ткань, по-видимому, будет сохранена. Например, определенные Smac миметики способны убивать опухолевые клетки *in vitro* в пикомолярном диапазоне концентраций, не оказывая влияния на неопухолевые клетки в 100 микромолярном диапазоне.

Были разработаны несколько Smac миметиков, которые обладают значимой противоопухолевой активностью в доклинических исследованиях. Из тех, которые вошли в клиническую практику, биринапант (TL32711) является высокоактивным бивалентным низкомолекулярным Smac миметиком. Биринапант идентифицируют в US 8283372 в качестве Соединения 15. В одном из вариантов осуществления антагонистом IAP является биринапант.



биринапант (TL32711).

Дополнительная информация относительно активности биринапанта и сходных соединений представлена в USSN 17/24 6956, описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Фармацевтические композиции Smac миметиков могут содержать терапевтически эффективное количество соединения, как описано выше, или фармацевтически приемлемую соль или другие его формы

совместно с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Фраза "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для введения в медицинскую или ветеринарную практику. Композиция может также содержать дополнительные активные средства. Например, композиция может включать цитокины, такие как TNF- α или низкомолекулярные ингибиторы или антибиотики. Следует учитывать, что выбор подходящих лекарственных форм, величин доз и путей введения для конкретного пациента находятся в компетенции специалиста в фармацевтической и медицинской областях.

Композиции, подходящие для парентерального введения, в целях удобства содержат стерильный водный препарат соединения или композиция по изобретению, который предпочтительно является изотоническим с кровью реципиента. Этот водн препарат можно формулировать в соответствии с известными способами с применением подходящих диспергирующих средств или средств для смачивания, эмульгирующих и суспендирующих средств. Кроме того, могут быть включены различные антибактериальные и противогрибковые средства, например, парабены, хлорбутанол, фенол и сорбиновая кислота. Стерильный инъеклируемый препарат также может быть стерильным инъеклируемым раствором или суспензией в нетоксическом парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе, например, в качестве раствора в 1,3-бутан диоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, есть вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, нелетучие масла являются общеизвестно применимыми в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели любое легкое нелетучее масло можно применять, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, можно использовать при получении инъеклируемых препаратов. Пролонгированная абсорбция инъеклируемой фармацевтической формы может быть обусловлена применением средств, отсрочивающих абсорбцию, например, алюминий моностеарата и желатина. Состав носителя, подходящий для подкожных, внутривенных, внутримышечных и т.д. введений, можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтическая композиция во внутривенной стандартной лекарственной форме может содержать, например, флакон или предварительно наполненный шприц, или инфузионный мешок или устройство, каждый из которых содержат эффективное количество или подходящую долю эффективного количества, такую, чтобы содержимое флакона или шприца вводили за один раз.

Введение можно повторять до приблизительно 4 раз в сутки в течение некоторого периода времени, если необходимо достичь кумулятивной эффективной дозы, например, кумулятивной дозы, эффективной для контроля над инфекцией. Режим дозирования может быть, например, ежедневными или проводимыми дважды в неделю внутривенными или подкожными инъекциями или пероральной или местной доставкой, или, например, вводимыми раз в неделю дозами в циклах из трех недель введения и одной недели отдыха, или постоянным, при условии, что лечение является эффективным, например, пока инфекция находится под контролем или лекарственное средство является переносимым. Эффективной дозой, вводимой при каждой инъекции, является количество, которое является эффективным и переносимым.

Эффективной дозой является такая, которая на протяжении курса терапии, которая может проводиться, например, в течение 1 или нескольких недель, результатом которой является лечение нарушения, т.е., снижение скорости прогрессирования заболевания, прекращение заболевания.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом, таким как (a) наполнители или разбавители, как, например, крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, (b) связывающие средства, как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и гуммиарабик, (c) увлажнители, как, например, глицерин, (d) дезинтегрирующие средства, как, например, агар-агар, карбонат кальция, крахмал из картофеля или тапиоки, альгиновая кислота, определенные комплексные силикаты, и карбонат натрия, (e) замедлители растворов, как, например, парафин, (f) ускорители всасывания, как, например, соединения четвертичного аммония, (g) средства для смачивания, как, например, цетиловый спирт, и глицерин моностеарат, (h) адсорбенты, как например, каолин и бентонит, и (i) смазочные средства, как например, тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия или их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственных формы могут также содержать буферные средства. Твердые лекарственные формы, такие как таблетки, драже, капсулы, пилюли и гранулы также можно получать с покрытиями и оболочками, такими как растворяющиеся в кишечнике покрытия и другие хорошо известные в данной области. Твердая лекарственная форма также может содержать средства, снижающие прозрачность, и также может состоять из такой композиции, что они высвобождают активное соединение или соединения в определенной части желудочно-кишечного тракта с отсрочкой во времени. Примерами заливочных композиций, которые можно использовать, являются полимерные вещества и воска. Активные соединения могут находиться также в микроинкапсулированной форме, при необходимости, с одним или несколькими из указанных выше эксципиентов. Такие твердые лекарственные формы могут, как правило, содержать от 1 до 95% (мас./мас.)

активного соединения. В определенных вариантах осуществления активное соединение варьирует в диапазоне от 5 до 70% (мас./мас.).

Так как в одном из аспектов настоящего изобретения рассматривают лечение заболевания/состояний с комбинацией фармацевтически активных средств, которые можно вводить отдельно, изобретение дополнительно относится к комбинированию отдельных фармацевтических композиций в форме набора. Набор содержит две отдельные фармацевтические композиции: одна содержит S_{мас} миметик, применяемый в способе по настоящему изобретению, и вторая содержит второй активный фармацевтический ингредиент. Набор содержит контейнер для содержания отдельных композиций, таких как разделенную бутылку или разделенный пакет из фольги. Дополнительные примеры контейнеров включают шприцы, например, предварительно заполненные шприцы, коробки и мешки. Как правило, набор содержит инструкции для использования отдельных компонентов. Конкретно предпочтительной является та форма набора, в которой отдельные компоненты предпочтительно вводят в различных лекарственных формах (например, пероральной и парентеральной), вводят при различных дозировочных интервалах, или когда титрование индивидуальных компонентов комбинации является желательным по предписанию лечащего врача или ветеринара.

Примером такого набора является так называемая блистерная упаковка. Блистерные упаковки хорошо известны в упаковочной индустрии и широко применяются для упаковки фармацевтических стандартных лекарственных форм (таблеток, капсул и т.п.). Блистерные упаковки, как правило, состоят из листа относительно жесткого материала, покрытого пленкой из предпочтительно прозрачного пластического материала. Во время процесса упаковки образуются углубления в полимерной пленке. Углубления имеют размер и форму упаковываемых таблеток или капсул. Затем, таблетки или капсулы помещают в углубления и лист из относительно жесткого материала герметизируют полимерной пленкой на лицевой стороне пленки, которая находится на противоположной стороне от направления, в котором образованы углубления. В результате, таблетки или капсулы герметизируют в углублениях между полимерной пленкой и листом. Предпочтительно прочность листа такова, что таблетки или капсулы можно удалить из блистерной упаковки вручную, применяя давление на углубления, в результате чего в листе образуется отверстие на месте углубления. Таблетку или капсулу затем можно удалить через указанное отверстие.

Может быть желательным обеспечить набор памяткой, например, в форме номеров рядом с таблетками или капсулами, где номера соответствуют дням схемы лечения, в соответствии с которой таблетки или капсулы, оформленные таким образом, следует принимать. Другим примером такой памятки является календарь, напечатанный на карточке, например, как следует далее "Первая неделя, понедельник, вторник,... и т.д. Вторая неделя, понедельник, вторник,... " и т.д. Другие варианты памяток являются явно очевидными. "Суточная доза" может быть единичной таблеткой или капсулой, или несколько пилюль или капсул принимают в определенный день. Кроме того, суточная доза вещества, по настоящему изобретению может состоять из одной таблетки или капсулы, в то время как суточная доза второго вещества может состоять из нескольких таблеток или капсул и наоборот. Памятка должна отражать это и помогать в правильном введении активных средств.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения дозатор сконструирован для того, чтобы отмерять суточные дозы индивидууму за один раз, чтобы обеспечить назначаемое применение. Предпочтительно, дозатор оснащен памяткой, чтобы дополнительно облегчить соблюдение схемы лечения. Примером такой памятки является механический счетчик, который указывает число ежесуточных доз, которые были отмерены. Другим примером такой памятки является микрочип памяти на батарейках, объединенный с жидко-кристаллическим считывающим устройством, или акустическим напоминающим сигналом, который, например, считывает дату, когда была принята последняя суточная доза и/или напоминает пациенту, когда нужно принимать следующую дозу.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к соединению или композиции жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, широко используемые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, как, например, этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензил бензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и сезамовое масло, глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана или смеси этих веществ. Помимо таких инертных разбавителей, композиция может также включать адъюванты, такие как средства для смачивания, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, вкусоароматические вещества и ароматизирующие добавки.

Соединениям и композициям, применяемым в способе по настоящему изобретению, также могут принести пользу различные системы доставки, включая системы доставки с медленным высвобождением, отсроченным высвобождением или длительным высвобождением. Такая возможность может быть конкретно полезной, когда соединения и композицию применяют в сочетании с другими протоколами лечения, как подробно описано ниже.

Многие типы систем доставки с контролируемым высвобождением доступны и известны специали-

стам в данной области. Они включают полимерные базовые системы, такие как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, поликапролактоны, сложные полиэфирамида, полиортоэфиры, полигидроксимасляную кислоту и полиангидриды. Микрокапсулы указанных выше полимеров, содержащих лекарственные средства, описаны, например, в патенте США № 5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, такие как: липиды, включая стеролы, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и жирных кислот или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; гидрогелевые системы высвобождения; силастиковые системы; системы на основе пептидов; восковые покрытия; пресованные таблетки с применением общепринятых связывающих средств и эксципиентов; частично слитые имплантаты; и т.п. Конкретные примеры в качестве неограничивающих примеров включают: (а) эрозионные системы, в которых активное соединение содержится в форме внутри матрикса, такого как описан в патентах США №№ 4452775, 4667014, 4748034 и 5239660 и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент просачивается с контролируемой скоростью из полимера, как описано в патентах США №№ 3832253, и 3854480. Кроме того, можно использовать системы доставки в виде оборудования с системой накачки, некоторые из которых адаптированы к имплантации.

Предпочтительным может быть применение имплантата с долгосрочным устойчивым высвобождением. Длительное высвобождение, как применяют в настоящем документе, означает, что имплантат конструируют и приспособляют для доставки терапевтических уровней активного соединения в течение по меньшей мере 30 суток и предпочтительно 60 суток. Долгосрочное длительное высвобождение имплантатов является хорошо известным специалистам в данной области и включает некоторые системы высвобождения, описанные выше.

Антагонисты IAP также включают молекулы, которые снижают экспрессию гена IAP, такие как cIAP1 или cIAP2. Подходящие антагонисты, которые способны уменьшать экспрессию гена IAP должны быть известны специалистам в данной области. Примеры включают молекулы нуклеиновой кислоты, такие как РНК или молекулы ДНК (включая двухцепочечные или одноцепочечные), и пептиды, такие как антисмысловые пептидные нуклеиновые кислоты, которые интерферируют с экспрессией таргетного гена.

Пригодные молекулы ДНК включают антисмысловые, а также смысловые (например, кодирующие и/или регуляторные) молекулы ДНК. Антисмысловые молекулы ДНК включают короткие олигонуклеотиды. Специалисты в данной области будут способны сконструировать подходящие короткие олигонуклеотиды для применения в соответствии с настоящим изобретением. Примером является XIAP антисмысловой олигонуклеотид, AEG35156, как описано Carter et al. (Apoptosis, 2011 Vol. 16 (1):67-74). Другие примеры пригодных молекул ДНК включают такие молекулы, которые кодируют интерферирующую РНК, такую как кшРНК и миРНК. Однако другим примером являются каталитические молекулы ДНК, известные как ДНК-ферменты.

Пригодные молекулы РНК, способные уменьшать экспрессию гена IAP, также упоминаемые в настоящем документе как интерферирующие молекулы РНК, включают миРНК, диРНК, квРНК, кшРНК, и миРНК (например, короткая временная РНК и малые модуляторные РНК) и рибозимы.

РНК-интерференция (РНКi) является особенно пригодной для специфического ингибирования получения конкретного белка. Хотя не желая ограничиваться теорией, Waterhouse et al. (1998) представили модель механизма, с помощью которого диРНК можно использовать для снижения продукции белка. Эта технология основана на присутствии молекулы диРНК, которая содержит последовательность, которая является по существу идентичной мРНК гена, представляющего интерес, или его части, в данном случае мРНК, кодирующей полипептид по изобретению. Подходящим способом, диРНК можно получать из единичного промотора в рекомбинантном векторе или клетке-хозяине, где смысловые и антисмысловые последовательности поддерживаются не относящейся последовательностью, которая дает возможность смысловым и антисмысловым последовательностям гибридизоваться для образования молекулы диРНК с неотносящейся последовательностью, образуя петлеобразную структуру. Дизайн и получение подходящих молекул диРНК по настоящему изобретению входит в рамки возможностей специалиста в данной области, конкретно рассматривая Waterhouse et al. (1998, Proc Natl Acad Sci USA. 95(23): 13959-64), Smith et al. (2000, Nature. 407:319-320), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, и WO 01/34815.

В одном примере вводят ДНК, которая направляет синтез, по меньшей мере, частично двухцепочечного РНК продукта(ов) с гомологией к таргетному гену, который следует инактивировать. ДНК, таким образом, содержит как смысловую, так и антисмысловую последовательности, которые при транскрибировании в РНК, могут гибридизоваться для образования области двухцепочечной РНК. В предпочтительном варианте осуществления смысловые и антисмысловые последовательности разделяют посредством спейсерной области, которая содержит интрон, который при транскрибировании в РНК, удаляется. Было продемонстрировано, что это распределение приводит к более высокой эффективности подавления гена. Двухцепочечная область может содержать одну или две молекулы РНК, транскрибируемые либо из одной области ДНК, либо из двух. Полагают, что присутствие двухцепочечной молекулы запускает ответ клетки, которая разрушает и двухцепочечную РНК, и также гомологичный РНК транскрипт от таргетного гена, эффективно уменьшая или устраняя активность таргетного гена.

Длина смысловых и антисмысловых последовательностей, которые гибридизуются, каждая

должна составлять по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 30 или 50 нуклеотидов и более предпочтительно по меньшей мере 100, 200, 500 или 1000 нуклеотидов. Можно использовать полноразмерную последовательность, соответствующую полному транскрипту гена. Длины наиболее предпочтительно составляют 100-2000 нуклеотидов. Степень идентичности смысловых и антисмысловых последовательностей с таргетным транскриптом должна составлять по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно 95-100%). Молекула РНК может несомненно содержать неотносящиеся последовательности, функцией которых является стабилизация молекулы. Молекула РНК может быть экспрессирована под контролем промотора РНК-полимеразы II или РНК-полимеразы III. Примеры последних включают промоторы тРНК или мРНК.

Предпочтительные малые интерферирующие РНК ("миРНК") молекулы содержат нуклеотидную последовательность, которая является идентичной до приблизительно 19-21 смежных нуклеотидов мРНК-мишени. Предпочтительно, последовательность мРНК-мишени начинается с динуклеотида АА, содержит GC-контент из приблизительно 30-70% (предпочтительно, 30-60%, более предпочтительно 40-60% и более предпочтительно приблизительно 45%-55%), и не имеет высокого процента идентичности с любой нуклеотидной последовательностью, отличной от мишени в геноме клетки, в которую ее нужно ввести, например, как определено в стандартном исследовании в BLAST.

Синтез молекул РНКи, пригодных для использования в настоящем изобретении, можно оптимизировать посредством первичного сканирования последовательности мРНК таргетного участка в направлении считывания AUG стартового кодона для динуклеотидных последовательностей АА. Наличие каждого АА и 3' смежных 19 нуклеотидов записано в качестве потенциальных таргетных сайтов миРНК. Предпочтительно, таргетные сайты миРНК выбраны из открытой рамки считывания. Во-вторых, потенциальные таргетные сайты сравнивают с надлежащей геномной базой данных с применением любого программного обеспечения для выравнивания последовательностей, такого как BLAST. Предполагаемые таргетные сайты, которые демонстрируют значительную гомологию с другими кодирующими последовательностями, отфильтровывают.

Квалифицирующие таргетные последовательности выбраны в качестве матрицы для синтеза миРНК. Предпочтительными последовательностями являются последовательности, включающие небольшое содержание G/C, так как доказано, что они являются более эффективными при опосредовании подавления гена по сравнению с теми, у которых содержание G/C выше 55%. Несколько таргетных сайтов являются предпочтительно выбранными по длине таргетного гена для оценки.

Регуляция микроРНК является очевидно специализированной ветвью сигнального пути сайленсинга РНК, который развился в направлении регуляции гена, отклоняясь от общепринятых РНКи/PTGS. МикроРНК составляют специфический класс малых РНК, которые кодируются в геноподобных элементах, организованных в характеристических инвертированных повторах. При транскрибировании гены микроРНК приводят к образованию прекурсоров РНК типа "стебель-петля", из которых затем процессируются микроРНК. МикроРНК, как правило, приблизительно состоит из 21 нуклеотида в длину. Высвобожденные мРНК включены в RISC-подобные комплексы, содержащие конкретную субпопуляцию белков Argonaute, которые воздействуют на последовательность-специфическую репрессию гена (см., например, Millar и Waterhouse, 2005, *Funct Integr Genomics*, 5(3): 129-35; Pasquinelli et al., 2005, *Curr Opin Genet Dev*. 15(2):200-5; Almeida and Allshire, 2005, *TRENDS Cell Biol*, 15 (5):251-8).

ДНК-ферменты являются одноцепочечными полинуклеотидами, которые способны к расщеплению одно- и двухцепочечных полинуклеотидов, которые способны к расщеплению и одно- и двухцепочечных таргетных последовательностей (Breaker и Joyce. *Chemistry и Biology* 1995; 2:655; Santoro and Joyce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:4262) Была предложена общая модель (модель "10-23") для ДНК-фермента. "10-23" ДНК-ферменты обладают каталитическим доменом из 15 дезоксирибонуклеотидов, контактирующих по бокам с двумя доменами распознавания субстрата из от семи до девяти дезоксирибонуклеотидов каждый. Этот тип ДНК-фермента может эффективно расщеплять свой субстрат РНК в соединениях пурин:пиримидин (Santoro and Joyce, выше; для обзора ДНК-ферментов см. Khachigian, *Curr Opin Mol Ther* 4: 119-21; 2002).

Примеры конструирования и амплификации синтетических, спроектированных ДНК-ферментов, распознающих одно- и двухцепочечные таргетные участки расщепления, были описаны в патенте США № 632 6174 Joyce et al.

Термины "двухцепочечная РНК" или "дцРНК" относятся к молекулам РНК, которые содержатся в двух цепочках. Двухцепочечные молекулы включают такие молекулы, которые содержат единственную молекулу РНК, которая удваивается для образования двухцепочечной структуры. Например, структура "стебель-петля" прогениторной молекулы, из которой получают одноцепочечную мРНК, называемую пре-мРНК, содержит молекулу дцРНК.

Другие подходящие интерферирующие молекулы РНК включают немодифицированные и модифицированные двухцепочечные (дц) молекулы РНК, включая короткую временную РНК (квРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК), короткую шпильку РНК (кшРНК), микроРНК (мкРНК) и двухцепочечную РНК (дцРНК). Молекулы дцРНК (например, миРНК) также могут содержать 3' "липкие" концы, такие как 3'UU или 3'TT "липкие" концы.

В одном из вариантов осуществления молекулы миРНК по настоящему изобретению обладают двухцепочечной структурой. В одном из вариантов осуществления миРНК молекулы по настоящему изобретению являются двухцепочечными более чем на приблизительно 25%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 60%, более чем приблизительно 70%, более чем приблизительно 80%, более чем приблизительно 90% от их длины.

Как применяют в настоящем документе, "подавление гена", индуцированное РНК-интерференцией, относится к снижению уровня мРНК в клетке для таргетного гена (например, cIAP1 ген и/или cIAP2 ген) на, по меньшей мере, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 99%, приблизительно 100% уровня мРНК, выявленного в клетке в отсутствие РНК-интерференции.

Интерферирующие молекулы РНК также включают модифицированные молекулы РНК, обладающие одним или несколькими неприродными нуклеотидами; то есть, нуклеотидами, отличными от аденина "А", гуанина "G", урацила "U" или цитозина "С". Модифицированный нуклеотидный остаток или производное или аналог природного нуклеотида также можно использовать. Любой модифицированный остаток, производное или аналог можно использовать до степени, при которой он не устраняет или существенно снижает (на по меньшей мере 50%) активность молекулы РНК. Примеры подходящих модифицированных остатков включают аминоксил UTP, псевдо-UTP, 5-I-UTP, 5-I-CTP, 5-Br-UTP, альфа-S АТФ, альфа-S CTP, альфа-S GTP, альфа-S UTP, 4-тио UTP, 2-тио-CTP, 2'NH₂ UTP, 2'NH₂ CTP и 2'F UTP. Кроме того, подходящие модифицированные нуклеотиды включают аминоксил уридин, псевдо-уридин, 5-I-уридин, 5-I-цитидин, 5-Br-уридин, альфа-S аденозин, альфа-S цитидин, альфа-S гуанозин, альфа-S уридин, 4-тио уридин, 2-тио-цитидин, 2'NH₂ уридин, 2TS[H₂ цитидин, и 2'F уридин, включая свободные rho(NTP) молекулы РНК, а также все другие пригодные формы нуклеотидов.

Интерферирующие молекулы РНК могут также содержать модификации в сахаре рибозе, а также модификации в фосфатном скелете нуклеотидной цепи. Например, молекулы миРНК или мкРНК, содержащие α-D-арабинофуранозильные структуры вместо природных α-D-рибонуклеозидов, выявленных в РНК, можно использовать в качестве интерферирующих молекул РНК по настоящему изобретению. Другие примеры включают молекулы РНК, содержащие о-связь между сахаром и гетероциклическим основанием нуклеозида, которая обеспечивает устойчивость нуклеазы и прочное связывание комплементарной цепи с олигонуклеотидными молекулами, сходными с олигонуклеотидами, содержащими 2'-О-метил рибозу, арабинозу и конкретно α-арабинозу. Тиофосфатные связи также можно использовать для стабилизации молекул миРНК и мкРНК.

"МиРНК" относится к нуклеиновой кислоте, которая образует двухцепочечную РНК, двухцепочечная РНК которой обладают способностью уменьшать или ингибировать экспрессию гена или таргетного гена, когда миРНК экспрессируется в той же клетке, что и ген или таргетный ген. "МиРНК", таким образом, относится к двухцепочечной РНК, образованной комплементарными цепями. Комплементарные доли миРНК, которые гибридизируются для образования двухцепочечной молекулы, как правило, обладают существенной или полной идентичностью. В одном из вариантов осуществления миРНК относится к нуклеиновой кислоте, которая обладает существенной или полной идентичностью с таргетным геном и образует двухцепочечную миРНК. Последовательность миРНК может соответствовать полноразмерному таргетному гену, или его субпоследовательности.

В одном из вариантов осуществления миРНК составляет, по меньшей мере, приблизительно 15-50 нуклеотидов по длине (например, каждая комплементарная последовательность двухцепочечной миРНК составляет приблизительно 15-50 нуклеотидов по длине, и двухцепочечная миРНК составляет приблизительно 15-50 пар оснований по длине, предпочтительно приблизительно 19-30 основных нуклеотидов, предпочтительно приблизительно 20-25 нуклеотидов по длине, например, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 нуклеотидов по длине).

Подходящая миРНК также включает малую шпильку (также называемую "стебель-петля") РНК (кшРНК). В одном из вариантов осуществления кшРНК содержит короткую, например, приблизительно от 19 до приблизительно 25 нуклеотидов, антисмысловую цепь, за которой следует нуклеотидная петля из приблизительно от 5 до приблизительно 9 нуклеотидов, и аналогичная смысловая цепь. Альтернативно, смысловая цепь может предшествовать нуклеотидной петлевой структуре и далее может следовать антисмысловая цепь.

В одном из вариантов осуществления антагонистом IAP является миРНК, кшРНК или мкРНК.

Специфические интерферирующие молекулы РНК, такие как миРНК, кшРНК и мкРНК молекулы, могут быть с легкостью спроектированы специалистом в данной области, принимающим во внимание последовательность таргетного гена.

В одном из вариантов осуществления миРНК, кшРНК или мкРНК направлены против последовательности, выбранной из группы, состоящей из NCBI эталонной последовательности: NM 001 166,4, NCBI эталонной последовательности: NM_001256163,1, NCBI эталонной последовательности: NM 001256166,1, GenBank: DQ068066,1, NCBI эталонной последовательности: NM 001165,4, NCBI эталон-

ной последовательности: NM 182962,2, GenBank: BC037420,1, NCBI эталонной последовательности: NM_001167,3, NCBI эталонной последовательности: NM_001204401,1, NCBI эталонной последовательности: NR 037916,1, и NCBI эталонной последовательности: NG_007264,1.

Другие молекулы РНК, которые являются одноцепочечными, или их не рассматривают как интерферирующие молекулы РНК, могут также быть пригодными в качестве терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением, включая информационную РНК (и прогениторную пред-информационную РНК), малую ядерную РНК, малую ядрышковую РНК, транспортную РНК и рибосомную РНК.

Антагонисты IAP, способные снижать экспрессию IAP гена, как описано в настоящем документе (например, интерферирующие молекулы РНК, такие как миРНК, дцРНК, квРНК, кшРНК и мкРНК), можно вводить индивидууму, нуждающемуся в этом, посредством любых подходящих средств и путей введения, которые, как предполагается, известны специалистам в данной области (например, генотерапия или способы доставки генов). Следует понимать, что антагонист IAP должен быть введен индивидууму таким способом, чтобы удостовериться, что антагонист способен контактировать и входить в клетку в индивидууме, является ли клетка инфицированной патогеном или, по меньшей мере, способна ли становиться инфицированной патогеном. Примеры подходящих путей введения включают внутривенный, внутримышечный, местный, пероральный, интраназальный или посредством генетической пушки или безыгольного инъектора.

Альтернативно, способ лечения может включать контактирование клетки, полученной от индивидуума, *ex vivo* или *in vitro* с антагонистом IAP и в условиях, которые облегчат вход антагониста IAP в клетку (т.е. трансфекция). Стандартные методы трансфекции известны специалистам в данной области. В одном из вариантов осуществления антагонист IAP приводят в контакт с аутологичной клеткой от индивидуума и в условиях, которые способствуют входу антагониста IAP в клетку и его последующей трансфекции, таким образом, что антагонист IAP способен блокировать или, по меньшей мере, частично ингибировать экспрессию IAP гена в трансфицированной клетке, трансфицированную клетку затем вводят индивидууму, где она, по меньшей мере, частично будет устойчива к инфекции. Тип клетки, который выбран для трансфекции *in vitro* или *ex vivo*, предпочтительно является клеткой, которая, по меньшей мере, способна становиться инфицированной патогеном. Тип клетки, который выбран для трансфекции *in vitro* или *ex vivo* может, таким образом, зависеть от типа инфекции, которую необходимо вылечить у индивидуума. Например, когда инфекционным патогеном является ВИЧ, аутологичная клетка может быть Т-лимфоцитом. Другие типы клеток, которые могут являться подходящими для трансфекции *in vitro* или *ex vivo*, в соответствии с настоящим изобретением включают макрофаги, фибробласты, моноциты, нейтрофилы, В-лимфоциты, стволовые клетки (например, соматические стволовые клетки) и клетки-предшественники. Примеры клеток-предшественников, которые могут быть трансфицированы в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают предшественников эритроцитов и гемопоэтические стволовые клетки.

Способ по настоящему изобретению также можно использовать для лечения внутриклеточной инфекции другими патогенами. Например, обязательным для *Mycobacterium tuberculosis* является установление латентности в клетке-хозяине, которая является высоко комплексным мероприятием для внутриклеточной бактерии, которая находится в макрофагах. Таким образом, *Mycobacterium tuberculosis* должна критическим образом заблокировать всю передачу сигнала о гибели клеток^{4,6}, чтобы обеспечить продолжительную персистенцию в макрофагах¹⁰⁻¹³. Макрофаги, инфицированные *Mycobacterium tuberculosis*, испытывают существенный клеточный стресс, который должен индуцировать апоптоз. Посредством плохо изученных механизмов программы гибели клеток, которые должны обеспечить смерть инфицированной клетки и населяющего ее микроорганизма, подвергаются противодействию со стороны этого патогена¹⁴. Авторы изобретения продемонстрировали данные, которые решительно поддерживают концепцию о том, что поддержка программируемой гибели клеток в клетках, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, будет помогать в элиминации патогена.

Сходным образом, чтобы обеспечить продуктивный жизненный цикл и обеспечить латентность, ВИЧ в некоторых клетках и в некоторый момент времени, должен противодействовать смерти клетки-хозяина¹⁵⁻¹⁹. Смерть клетки-хозяина может быть следствием распознавания микробной инфекции или эффектов молекул, индуцирующих смерть, высвобождаемых иммунными клетками. Внутриклеточные патогены противодействуют этим ответам, чтобы облегчить их персистенцию и диссеминацию^{4,6}. Интерферирование с применением IAPs является механизмом, который можно использовать для повторной сенсibilизации инфицированных клеток к факторам и сигнальным путям, индуцирующим гибель клеток, которые содействуют элиминации патогенов.

В одном из вариантов осуществления инфекция вызвана вирусом, бактерией, грибом, дрожжами или простейшими.

В одном из вариантов осуществления инфекция вызвана вирусом, выбранным из группы, состоящей из папилломавирусов человека, вирусов герпеса, включая простой герпес 1/2, вируса ветряной оспы, EBV, CMV, HHV-6/7, HTLV, паповавирусов человека, включая JC вирус и BK вирус, адено- и парвовирусов, ВИЧ, HBV и HCV.

В одном из вариантов осуществления инфекция вызвана бактерией, выбранной из группы, состоящей из *Salmonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycobacteria* spp., *Spirochetes*, *Legionella* spp., *Listeria* spp., *Rickettsia* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *Coxiella* spp., *Yersinia* spp., *Francisella* spp., *Brucella* spp., *Neisseria* spp и *Nocardia* spp.

В одном из вариантов осуществления инфекция вызвана грибом или дрожжами, выбранными из группы, состоящей из *Histoplasma* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. и *Pneumocystis jirovecii*.

В одном из вариантов осуществления инфекция вызвана простейшим, выбранным из группы, состоящей из *Trypanosomatids* (например, *Leishmania* spp.), *Apicomplexans*, включая печеночные формы *Plasmodium* spp., *Toxoplasma* spp. и *Cryptosporidium* spp.

Настоящее изобретение также относится к применению антагониста IAP для лечения внутриклеточной инфекции у индивидуума.

Способ по настоящему изобретению может дополнительно содержать введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств. Специалисты в данной области поймут, что тип дополнительного(ых) терапевтического(их) средства(а) будет зависеть от инфекции, которую надо лечить. Например, когда инфекция является вирусной инфекцией, такой как HBV инфекция, индивидууму можно дополнительно вводить нуклеозидный аналог противовирусного средства. Примеры таких средств включают препараты нуклеозидных аналогов включая диданозин, видарабин, цитарабин, эмтрицитабин, ламивудин, зальцитабин, абакавир, ацикловир, энтекавир, ставудин, телбивудин, зидовудин (азидотимидин, или AZT) и идоксуридин. Предпочтительные средства выбраны из группы, состоящей из ламивудина, адефовира, тенофовира, телбивудина и энтекавира. Когда инфекция является HCV инфекцией, индивидууму можно дополнительно вводить пегилированный IFN и рибавирин и/или миравирсен (Janssen et al. N Engl J Med, 2013, vol.368(18): 1685-94).

Другим предпочтительным дополнительным терапевтическим средством является TRAIL. Дополнительную информацию, касающуюся TRAIL, можно найти в WO 97/01633, WO 02/085946, WO 02/22175 и WO 2009/025743. Описание каждого из этих документов включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Дополнительное(ые) терапевтическое(ие) средство(а) можно вводить одновременно (например, в той же лекарственной форме, что антагонист IAP) или последовательно; другими словами, или до или после введения антагониста IAP. Для последовательного введения дополнительное(ые) терапевтическое(ие) средство(а) можно вводить в течение секунд, минут, часов, суток или недель относительно антагониста IAP.

Антагонист IAP может быть введен нуждающемуся в этом индивидууму посредством любых подходящих способов, известных специалистам в данной области. Например, специалисты в данной области поймут, что когда антагонист IAP является интерферирующей молекулой РНК, способ введения должен будет облегчать доставку антагониста IAP к клеточной цитоплазме, где он сможет взаимодействовать с таргетной последовательностью. Когда антагонист IAP является молекулой миРНК, интерферирующая молекула РНК может быть доставлена индивидууму посредством совместного введения направленного на гепатоциты, N-ацетилгалактозамин-конъюгированного мелитин-подобного пептида (NAG-MLP) с обладающей тропностью к печени холестерин-конъюгированной миРНК (см., например, Woodell et al, Molecular Therapy, 2013 May; 21(5): 973-985). Когда молекула является олигонуклеотидной молекулой антисмысловой ДНК, она может быть доставлена нуждающемуся в этом индивидууму посредством способов, описанных Janssen et al. (N Engl J Med, 2013, vol.368 (18) : 1685-94) .

В альтернативном варианте осуществления генотерапию можно проводить у индивидуума для снижения экспрессии или инактивации одного или нескольких IAP генов у индивидуума.

Способ доставки включает применение растворов и суспензий, которые пригодны для введения индивидууму. Подходящие способы введения будут известны специалистам в данной области. Примеры включают внутривенный, подкожный, внутримышечный или интраперитонеальный.

Индивидуум, у которого надо лечить инфекцию, может быть человеком или млекопитающим, важным для людей в экономическом и/или социальном аспекте, например, платоядными, отличными от людей (такими как кошки и собаки), свиньей (домашними свиньями, дикими свиньями и кабанами), жвачными животными (такими как крупный рогатый скот, бык, овца, жирафы, олень, козы, зубр и верблюды), лошади и птицы, включая те виды птиц, которые представляют опасность, содержаться в зоопарках и подвергаются охоте, и более конкретно одомашненная птица, например, используемая в птицеводстве, такая как индейки, курицы, утки, гуси, цесарки и т.п., так как они также обладают экономической значимостью для людей. Термин "индивидуум" не обозначает конкретный возраст. Таким образом, и взрослые и новорожденные индивидуумы, как предполагается, охвачены настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также относится к применению антагониста IAP в производстве лекарственного средства для лечения внутриклеточной инфекции у индивидуума.

Лекарственное средство может включать дополнительные количества фармацевтически приемлемых и подходящих носителей, разбавителей или эксципиентов. Они включают все известные растворители, диспергирующие среды, наполнители, твердые носители, жидкие носители, противогрибковые и антибактериальные средства, поверхностно-активные вещества, изотонические и абсорбирующие веще-

ства и т.п. Следует понимать, что лекарственное средство также может включать одно или несколько дополнительных терапевтических средств (т.е. в дополнение к антагонисту IAP), как описано в настоящем документе. Например, когда инфекцией является HBV инфекция, лекарственное средство может дополнительно содержать HBV противовирусное средство, выбранное из группы, состоящей из ламивудина, адефовира, тенофовира, телбивудина и энтекавира. Когда инфекцией является HCV инфекция, лекарственное средство может дополнительно содержать пегилированный IFN- α и рибавирин, и/или миравирсен (Janssen et al. N Engl J Med, 2013, vol.368(18): 1685-94).

Настоящее изобретение также предполагает со-состав и/или со-введение с другими фармацевтическими активными средствами, включая, без ограничения, TNF-агонисты, такие как TNF- α , TRAIL (TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз) или TRAIL агонисты, такие как, но без ограничения, антитела к TRAIL рецептору.

Специалисты в данной области оценят, что изобретение, описываемое в настоящем документе, подвержено вариациям и модификациям, отличным от тех, которые конкретно описаны. Следует понимать, что изобретение включает все такие вариации и модификации, которые соответствуют духу и объему изобретения. Изобретение также включает все этапы, черты, композиции и соединения, упоминаемые или указанные в этом описании, в отдельности или в совокупности, и любые и все комбинации любых двух или более из указанных этапов или черт.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и обычно понимаемые специалистом в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя любые материалы и способы, подобные или эквивалентные описываемым в настоящем документе, можно использовать для применения на практике или тестирования настоящего изобретения, предпочтительные материалы и способы описаны далее.

Примеры

Пример 1. Инфицирование мышей гепатитом В.

Авторы настоящего изобретения адаптировали метод^{7,8}, который можно использовать, чтобы вызвать HBV инфекцию у мышей. "Голая" плазмидная ДНК, содержащая больше чем длину генома HBV1,2, с расположенными по бокам инвертированными концевыми повторами аденоассоциированного вируса инъецируют гидродинамически, чтобы вызвать существенное давление нижней полой вены, чтобы усилить введение ДНК в печень, где она встраивается в гепатоциты^{7,8}. Важно отметить, что ДНК, инъецированная в животных, не содержит каких-либо адено-ассоциированных вирусных кодирующих последовательностей. Плазида не инкапсулирована, таким образом, не содержит вирусных структурных или неструктурных белков в инъецируемом препарате.

У мышей периодически забирали кровь и выделяли их сыворотку. Набор для выделения вирусной ДНК Qiagen применяли для очищения вирусной ДНК. Абсолютный количественный анализ HBV генома производили посредством ПЦР-РВ, как описано ранее⁹.

С применением этого метода, мышей линии C57BL/6 (6-12 недельного возраста обоих полов) инфицировали HBV, и они экспрессировали поверхностный антиген, ядерный антиген, и е-антиген и демонстрировали высокие уровни HBV ДНК в сыворотке (см. фиг. 1). Дополнительно, вирионы идентифицировали в сыворотке инфицированных животных, и гистологическое исследование печени, продемонстрировало, что приблизительно 20% гепатоцитов были инфицированы HBV (экспрессировали HBsAg). Это очень близко имитирует инфекцию у человека. Кроме того, очень похоже на инфекцию человека, мыши начинали контролировать вирус на от 8 до 12 неделе после инфицирования, но HBV ДНК могло продолжать детектироваться в сыворотке мышей более 24 недель после инфицирования (см. фигура 2). Это указывает на то, что полный репликативный жизненный цикл HBV был воспроизведен в гепатоцитах мышей, и эписомальная HBV транскрипционная матрица вероятно сохраняется в некоторых гепатоцитах, давая начало рецидиву виремии, наблюдаемой на 24 неделе после инфекции.

Пример 2. Лечение мышей биринапантом.

Мыши линии C57BL/6 были инфицированы HBV и через 6 суток после инфицирования получали еженедельную дозу биринапанта (30 мг/кг, вводимые интраперитонеально) или контроль растворителем (ДМСО) в течение 3 недель (3 дозы).

Через шесть суток после инфицирования HBV мышам давали биринапант или контроль растворителем. После трех доз биринапанта HBV вирусная нагрузка была уменьшена на 2 логарифма по сравнению с вирусными нагрузками у мышей, получавших контроль растворителем. У всех получавших биринапант HBV-инфицированных мышей HBV ДНК не выявлялась в их сыворотке через 39 суток после первой дозы биринапанта. В среднем, мыши, получавшие контроль растворителем по-прежнему имели приблизительно 10^6 копий HBV ДНК в их сыворотке в этот момент времени (см. фигура 3). Выявлено, что 3 дозы биринапанта обладали эквивалентной эффективностью с 6 дозами биринапанта в активизации элиминации HBV. Обработка биринапантом приводила к элиминации HBV уже через 10 суток после введения первой дозы (см. фиг. 4).

Пример 3. Генетическое нацеливание CIAPL и CIAP2 повторяло кинетику элиминации HBV, наблюдаемую при лечении биринапантом.

Мыши, подвергнутые генетическому нацеливанию, у которых был дефицит cIAP1 (печеночноспецифическая недостаточность) вместе с дефицитом cIAP2 во всех тканях, были способны элиминировать HBV инфекцию с кинетикой, сходной с мышами, получавшими биринапант (см. фиг. 5).

Пример 4. Активность биринапанта против ВИЧ-1JR-CSF в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMCs).

Способы.

Изолят вируса.

Изолят ВИЧ-1 JR-CSF (группа M, подтип B, CCR5-тропный, выделенный из профильтрованной цереброспинальной жидкости пациента со СПИД-деменцией) получали из NIAID СПИД Research and Reference Reagent Program. Стоковые растворы первых пассажей вируса получали с применением PBMCs человека и хранили в жидком азоте. Предварительно профильтрованные алиquotы вируса вынимали из холодильника и быстро размораживали до комнатной температуры в боксе биологической безопасности непосредственно до использования.

Оценка эффективности против ВИЧ в свежих PBMCs.

Свежие PBMCs человека, серонегативные к ВИЧ и HBV, выделяли от отобранных в результате скрининга доноров (Biological Specialty Corporation, Colmar, PA). Клетки осаждали/промывали 2-3 раза посредством низкоскоростного центрифугирования и ресуспендировали в PBS для удаления контаминирующих тромбоцитов. Кровь, подвергнутую лейкоферезу, затем разбавляли 1:1 с применением модифицированного Дульбекко фосфатно-солевого буфера (DPBS) и наслаивали поверх 14 мл среды для разделения лимфоцитов (LSM; Cellgro® от Mediatech, Inc.; плотность 1,078+/-0,002 г/мл; Cat.# 85-072-CL) в 50 мл центрифужной пробирке, а затем центрифугировали в течение 30 минут при 600 X g. Разделенные на слои PBMCs аккуратно отсасывали из полученной поверхности и затем промывали 2X с применением PBS посредством низкоскоростного центрифугирования. После завершающей промывки, клетки пересчитывали посредством эксклюзии трипанового синего и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в RPMI 1640, дополненной 15% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и 2 mM L-глутамином, 4 мкг/мл фитогемагглютинином (PHA, Sigma). Клетки инкубировали в течение 48-72 ч при 37°C. После инкубации, PBMCs центрифугировали и ресуспендировали в RPMI 1640 с 15% FBS, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 20 Ед/мл рекомбинантного IL-2 человека (R&D Systems, Inc). IL-2 включен в среду для культивирования для поддержания деления клеток, запускаемого митогенной стимуляцией PHA. PBMCs поддерживали в этой среде в концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток/мл со сменой среды раз в две недели до использования в анализе. Клетки поддерживали в культуре максимум в течение двух недель до момента, когда их признавали слишком старыми для применения в анализах и утилизировали. Макрофаги, полученные из моноцитов, (MDMs) были удалены из культуры в результате адгезии к флакону для тканевых культур.

Для стандартного PBMC анализа клетки, стимулированные РИА, от, по меньшей мере двух нормальных доноров, были объединены (смешаны вместе), разбавлены в свежей среде до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл, и помещены в нижние лунки 96-луночного круглодонного микропланшета в концентрации 50 мкл/лунку (5×10^4 клеток/лунку). Объединение (смешивание) мононуклеарных клеток более чем от одного донора применяли, чтобы минимизировать вариабельность, наблюдаемую между отдельными донорами, которая является результатом количественных и качественных различий инфицирования ВИЧ и общего ответа на PHA и IL-2 первичных популяций лимфоцитов. Каждый планшет содержит контрольные лунки вирус/клетка (клетки плюс вирус) и экспериментальные лунки (лекарственное средство плюс клетки плюс вирус). В этом *in vitro* анализе, жизнеспособность PBMC остается высокой в течение продолжительности инкубационного периода. Таким образом, инфицированные лунки применяют при оценке как противовирусной активности, так и цитотоксичности. Разведения тестируемого лекарственного средства получали при 2X концентрации в микротитровальных пробирках и 100 мкл каждой концентрации (девять суммарных концентраций) помещают в соответствующие лунки с применением стандартного формата. 50 мкл predetermined разведения стокового раствора вируса помещали в каждую тестируемую лунку (окончательный MOI=0,1). Культуры PBMC поддерживали в течение шести суток после инфицирования при 37°C, 5% CO₂. После этого периода, образцы супернатанта, свободные от клеток, собирали для анализа активности обратной транскриптазы. После удаления образцов супернатанта, цитотоксичность соединения измеряли посредством добавления MTS к планшетам для определения жизнеспособности клеток. Лунки также исследовали с применением микроскопа и отмечали любые отклонения.

Анализ активности обратной транскрипции.

Был использован микротитровальный планшет для проведения реакции с обратной транскрипцией (RT) (Buckheit et al., AIDS Research and Human Retroviruses 7:295-302, 1991). Меченый тритием тимидин трифосфат (³H-TTP, 80 Ci/ммоль, NEN) получали в 1:1 dH₂O: этанол в концентрации 1 MCi/мл. Поли rA:oligodTtemplate:праймер (Pharmacia) получали в качестве стокового раствора посредством комбинирования 150 мкл поли rA (20 мг/мл) с 0,5 мл oligodT (20 единиц/мл) и 5,35 мл стерильной dH₂O с последующим разделением на алиquotы (1,0 мл) и хранением при -20°C. Буфер для RT реакции получали све-

жим ежедневно, и он состоял из 125 мкл 1,0 М EGTA, 125 мкл dH₂O, 125 мкл 20% тритона X100, 50 мкл 1,0 М трис (pH 7,4), 50 мкл 1,0 М DTT, и 40 мкл 1,0 М MgCl₂. Окончательную реакционную смесь получали посредством комбинирования 1 части ³H-ТТР, 4 частей dH₂O, 2,5 частей поли rA:oligodT стокового раствора и 2,5 частей реакционного буфера. Десять микролитров этой реакционной смеси помещали в круглодонный планшет для микротитрования и 15 мкл супернатанта, содержащего вирус, добавляли и смешивали. Планшет инкубировали при 37°C в течение 60 мин. После инкубации объем реакционной смеси наносили пятнами на DE81 плоский фильтр (Wallac), промывали 5 раз в течение 5 мин, каждый раз в 5% натрий фосфатном буфере или 2X SSC (Life Technologies), 2 раза в течение 1 мин, каждый раз в дистиллированной воде, 2 раза в течение 1 мин, каждый раз в 70% этаноле, а затем высушивали. Включенную радиоактивность (число импульсов в минуту, ИМП/МИН) количественно определяли с применением стандартных жидкостно-сцинтилляционных методов.

MTS окрашивание на жизнеспособность PBMC для измерения цитотоксичности.

При завершении анализа планшеты для анализа окрашивали с применением растворимого красителя на основе тетразолия MTS (CellTiter®96 Reagent, Promega) для определения жизнеспособности клеток и количественного измерения токсичности соединения. MTS метаболизируется митохондриальными ферментами метаболически активных клеток до образования растворимого продукта формазана, что делает возможным быстрый количественный анализ клеточной жизнеспособности и цитотоксичности соединения. Этот реагент является стабильным, простым раствором, который не требует приготовления перед использованием. При завершении анализа, 10-25 мкл реагента MTS добавляли на лунку (10% конечная концентрация на основе объема) и планшеты для микротитрования затем инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C, 5% CO₂ для оценки жизнеспособности клеток. Клейкие приспособления для заклеивания планшетов применяли вместо крышек, заклеенный планшет переворачивали несколько раз чтобы перемешать растворимый продукт формазан и спектрофотометрически снимали показания с планшета при 490/650 нм с применением спектрофотометра для чтения планшетов Molecular Devices Vmax или SpectraMax plus.

Анализ данных.

С применением внутрилабораторной компьютерной программы анализ данных PBMC включает вычисление IC₅₀ (50% ингибирование репликации вируса), IC₉₀ (90% ингибирование репликации вируса), IC₉₅ (95% ингибирование репликации вируса), TC₅₀ (50% цитотоксичность), TC₉₀ (90% цитотоксичность), TC₉₅ (95% цитотоксичность) и значения терапевтического индекса (TI = TC/IC; также обозначаемые как Противовирусный индекс или AI). Сырые данные как для противовирусной активности, так и для токсичности с графическим представлением данных представлены ниже.

Результаты.

Биринапант с и без фиксированной концентрации TNF-α оценивали на предмет противовирусной активности против ВИЧ-1 и результаты обобщены в табл. 1. Кроме того, ингибирование ВИЧ JR-CSF репликации в PBMC посредством различных концентраций биринапанта в отдельности и в комбинации с 10 нг/мл TNF-α представлены на фигурах 6 и 7, соответственно.

Таблица 1

Активность биринапанта ±TNF-α против ВИЧ-1 JR-CSF в PBMCs				
Соединение	Установленная в результате тестирования концентрация	IC ₅₀	TC ₅₀	Противовирусный индекс (TC ₅₀ /IC ₅₀)
Биринанпант	10 мкМ	0,25	6,47	26,1
Биринанпант +TNF-α	10 мкМ+ фиксированные 10 нг/мл	0,04	3,98	101
AZT	1000 нМ	1,71	>1000	>584

Была продемонстрирована противовирусная активность биринапанта против ВИЧ-1, а также некоторая степень цитотоксичности в PBMC. В присутствии фиксированной концентрации (10 нг/мл) TNF-α, происходило 6-кратное повышение противовирусной активности. 1,6-кратное повышение цитотоксичности находится в пределах ожидаемой вариабельности анализа. TNF-α в отдельности вызывал 35% снижение репликации ВИЧ в этом анализе и не оказывал влияние на жизнеспособность клетки, ориентируясь на конечный показатель MTS.

Пример 5. Активность биринапанта против ВИЧ-инфицированных клеток.

Способы.

Выделение и активация. PBMCs от здоровых доноров выделяли посредством центрифугирования в градиенте фикола (GE) и извлекали CD8+ клетки с применением магнитных частиц (Miltenyi). Оставшиеся PBMCs либо поддерживали в интактном состоянии, либо активировали в РНА (10 мкг/мл) и куль-

тивировали в RF10 (RPMI, 10% ЭТС, 2% глутамин), с добавлением IL-2 (10 Ед/мл) и IL-7 (25 нг/мл) в течение 3 суток.

Инфицирование ВИЧ. Активированные PBMCs инфицировали с применением ВИЧ NL4.3 (GFP+, nef-дефицитный) при MOI 0,1 при 37°C в течение 2 ч или оставляли неинфицированными. После инкубации клетки отмывали 3 раза в PBS и ресуспендировали в RF10, с добавлением IL-2 и IL-7, и культивировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в течение последующих 3 суток.

Обработка биринапантом. К PBMCs добавляли свежую среду, с последующей обработкой биринапантом (0,1 мкМ, 1 мкМ или 10 мкМ), или ДМСО в отдельности (1% окончательная концентрация), в течение 6 часов или 24 часов. После обработки клетки фиксировали в конечной концентрации 2% (масс./об.) параформальдегидом.

FACS. Фиксированные клетки пермеабелизовали с использованием PermWash (BD) и окрашивали при 4°C в течение 1 ч с применением антител, направленных против CD4 (APC-H7; 1:20), CD3 (PE-Cy7, 1:40) и активной каспазы 3 (AF647, 1:25) (все антитела приобретали в BD).

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 8. После добавления однократной дозы 10 мкМ биринапанта, 55% ВИЧ-инфицированных клеток умирали в течение 24 ч. Биринапант оказывал минимальное действие на жизнеспособность интактных клеток и небольшое действие на активированные Т-клетки.

Пример 5. Активность биринапанта против инфекции *Mycobacterium tuberculosis* (штамм H37Rv) и после 4 недель

покоя 17 мышам вводили биринапант (посредством интраперитонеальной инъекции, в концентрации 30 мг/г) и 15 мышам вводили ДМСО, каждый из которых вводили еженедельно.

После трех введений дозы, мышей подвергали эвтаназии и легкие извлекали, гомогенизировали и гомогенат помещали посредством серийных разведений в планшеты с агаром Middlebrook 7H11. Колониеобразующие единицы (КОЕ) определяли после 3 недель культивирования, и результаты представлены на фиг. 9.

В результате диссекции мышей макроскопически было отмечено, что легкие, извлеченные из групп, получавших биринапант, стали розовыми, однородными и здоровыми по внешнему виду. Селезенки были также увеличены по сравнению с группой, получавшей ДМСО. Результаты продемонстрировали статистически значимое снижение ($p=0,012$) бактериальной нагрузки в группе, получавшей биринапант ($0,33 \text{ Log}_{10}\text{CFU/легкое}$).

Пример 6. Эффект противодействия TNF-цитокина активности биринапанта.

Мыши были инфицированы HBV, а затем получали инъекции (интраперитонеально) антител, противодействующих TNF- α , в различные указанные моменты времени. В качестве контроля другую когорту HBV инфицированных мышей инъецировали с применением нерелевантного антитела изотипического контроля IgG1.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 10. Как представлено на этой фигуре, противодействие активности TNF- α нейтрализует эффективность биринапанта. Таким образом, биринапант, по меньшей мере, частично стимулирует способность эндогенно продуцируемого TNF- α убивать инфицированные гепатоциты и или снижать уровни HBV.

Биринпант, как оказалось, облегчает и усиливает активность эндогенно продуцируемого TNF- α и стимулирует способность этого цитокина элиминировать инфекцию. IAPs также, как известно, модулируют эндогенный сигналинг TRAIL (другого члена суперсемейства TNF) и, таким образом, биринапант, посредством их способности противодействовать IAPs, может также стимулировать способность TRAIL уничтожать инфицированные клетки.

Данные указывают на то, что биринапант стимулирует активность эндогенного TNF- α и облегчает способность этого цитокина уничтожать инфицированные клетки. Комбинация биринапанта и экзогенной одновременно вводимой TNF- α -подобной молекулы, тогда вероятно продемонстрирует выраженное повышение эффективности уничтожения HBV по сравнению с биринапантом в отдельности. (Это было продемонстрировано для ВИЧ в примере 4). Вследствие своей токсичности TNF- α сложно вводить людям, но родственная молекула TRAIL была применена в испытаниях на людях и не было выявлено ее токсичности. Таким образом, комбинация антагонистов IAP по настоящему изобретению, и в частности биринапанта и TRAIL могла бы быть использована для усиления эффективности биринапанта и стимулирования клиренса инфицированных клеток.

Пример 7. Активность других антагонистов IAP.

Мышей инфицировали HBV и вводили им или биринапант, или другой антагонист IAP (SMAC миметик), называемый GT13072, описанный Fan et al 2 013 (20).

C57BL/6 мышей инфицировали HBV и через 6 суток после инфицирования мышей случайным образом делили на 3 когорты. Одной когорте вводили биринапант (как описано в примере 2), другой когорте вводили еженедельные дозы GT13072 (15 мг/кг вводили интраперитонеально - в целом 3 дозы в течение 3 недель) и 3ей когорте вводили контроль растворителем. Результаты представлены на фиг. 11.

Согласно результату, представленному на фиг. 11, способность биринапанта элиминировать HBV

инфекцию является общей и для других SMAC миметиков. Таким образом, SMAC миметики/антагонисты IAP как класс лекарственных средств является эффективным при лечении внутриклеточных инфекций.

Пример 8. Активность биринапанта против инфекции *Legionella pneumophila*.

Мышей линии C57BL/6 возрастом от шести до 12 недель инфицировали *Legionella pneumophila* ($2,5 \times 10^6$ колониеобразующих единиц в 50 мкл фосфатно-солевого буфера) интраназально. Через шесть часов после инфицирования мышам вводили однократную дозу биринапанта (10 мг/кг вводили интраперитонеально - квадраты) или вводили контроль растворителем (круги). Через двое суток после инфицирования легкие забирали на исследование от животных и число бактерий количественно определяли посредством культивирования. Результаты представлены на фиг. 12, где каждая точка представляет животное, величины ошибок представляют SEM. $*P < 0,05$. Данные демонстрируют, что лечение биринапантом стимулирует клиренс *Legionella pneumophila* и разрешение заболевания по сравнению с введением контроля.

Пример 9. Эффект энтекавира в комбинации с биринапантом.

Мышей линии C57BL/6 инфицировали HBV и через 6 суток после лечения вводили биринапант в отдельности (30 мг/кг давали еженедельно интраперитонеально в течение 2 недель в общей сложности 2 дозы) или энтекавир (3,2 мг/кг вводили один раз в сутки посредством принудительного кормления в течение 8 суток в общей сложности 8 доз) или биринапант плюс энтекавир в дозах и продолжительности, указанной выше.

Результаты представлены на фиг. 13, где серая заштрихованная область указывает на продолжительность лечения энтекавиром и стрелки указывают на дозы биринапанта. $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, ns=не значимо, шесть мышей в каждой группе и полученные данные были воспроизведены в 3 независимых экспериментах.

Как очевидно из этих результатов, комбинирование биринапанта с нуклеозидным аналогом энтекавира улучшает эффективность стимулирования клиренса HBV ДНК в сыворотке у инфицированных мышей по сравнению с эффективностью любого лекарственного средства, вводимого в качестве единственного средства.

Пример 10. Эффект Trail в комбинации с биринапантом.

Первичные гепатоциты человека инфицировали *in vitro* HBV с применением аденовирусной системы доставки, как описано ранее (Chin R, Earnest-Silveira L, Koeberlein B, Franz S, Zentgraf H, Bowden S, Bock C-T, Torresi J. Modulation of MAPK pathways and cell cycle by replicating hepatitis B virus: factors contributing to hepatocarcinogenesis. *J Hepatology* 2007;47:325-37). Система доставки включала зеленый флуоресцентный белок-маркер, так что пропорция инфицированных клеток могла быть подсчитана. С применением этой системы приблизительно 100% гепатоцитов были инфицированы HBV. Клетки оставляли в покое в течение 2 суток после инфицирования, а затем их обрабатывали указанными средствами. Через сорок восемь часов после лечения жизнеспособность клеток оценивали с применением CellTiter-Glo® (Promega, Madison WI USA) по протоколу производителя. Этот эксперимент проводили в трех параллелях и повторяли 2 раза с применением 2 независимых доноров. Наивысший CellTiter-Glo результат от одного из трех параллелей необработанных образцов применяли, чтобы настроить отметку 100% жизнеспособности. Результат представлен на фигуре 14.

Исходя из результатов этого эксперимента, было очевидно, что TRAIL, при применении в качестве единственного средства, фактически не обладал эффективностью при стимулировании смерти первичных гепатоцитов человека, инфицированных HBV. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что биринапант является неэффективным для контроля над HBV инфекцией *in vivo*, когда нейтролизирован TNF- α сигналингом. Аналогичным образом, в отсутствие TNF- α , биринапант не эффективен при уничтожении инфицированных гепатоцитов *in vitro*.

Однако комбинирование TRAIL и биринапанта очень эффективно уничтожает первичные гепатоциты человека, инфицированные HBV даже в отсутствие TNF- α . Эти данные указывают на то, что TRAIL способен стимулировать эффективность биринапанта в отношении элиминации инфицированных клеток, и что *in vivo* эффективность биринапанта может быть стимулирована посредством сопутствующего введения TRAIL агониста.

Сущность.

Данные результаты демонстрируют, что лечение биринапантом элиминирует HBV инфекцию. Аналогичным образом, нацеленная на ген делеция IAPs стимулирует клиренс HBV инфекции. В совокупности, эти данные демонстрируют, что любой способ противодействия IAPs обладает терапевтической эффективностью при элиминации HBV инфекции. Никакой токсичности, связанной с лечением биринапантом, в HBV-инфицированных мышах выявлено не было, и IAP-дефицитные животные, инфицированные HBV, также становились здоровыми. Эти данные указывают на то, что противодействие IAPs сенсibiliзирует инфицированные клетки к смерти, но не сенсibiliзирует нормальные или неинфицированные клетки к программируемой гибели клеток. Кроме того, ингибирование IAPs предотвращало разрушительные воспалительные ответы. Эти результаты также демонстрируют активность биринапанта против

клеток, инфицированных ВИЧ, *M. tuberculosis* и *Legionella pneumophila*. Полагают, что эти результаты могут быть с легкостью распространены на другие инфекции, которые персистируют в клетках-хозяевах, включая HCV, HPV, CMV и другие внутриклеточные вирусы, бактерии, грибы, дрожжи и паразиты.

Ссылки:

1. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000; 102: 33-42.
2. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF alpha-dependent apoptosis. *Cell*. 2007; 131: 682-93.
3. Vince JEW, W.W. Gentle, I. Lawlor, K.E. Allam, R. O'Reilly, L. Mason, K. Gross, O. Ma, S. Guarda, G. Anderton, H. Castillo, R. Hacker, G. Silke, J. Tschopp, J. Inhibitor of Apoptosis Proteins Limit RIP3 Kinase-Dependent Interleukin-1 Activation. *Immunity*. 2012; 36: 215-27.
4. Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of host-cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2010; 8: 44-54.
5. Yatim N, Albert MJ. Dying to replicate: the orchestration of viral life cycle, cell death pathways, and immunity. *Immunity*. 2011; 35: 478-90.
6. Mocarski ES, Upton JW, Kaiser WJ. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nature reviews*. 2012; 12: 79-88.
7. Lin YJ, Huang LR, Yang HC, Tzeng HT, Hsu PN, Wu HL, et al. Hepatitis B virus core antigen determines viral persistence in a C57BL/6 mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 9340-5.
8. Huang LR, Wu HL, Chen PJ, Chen DS. An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 17862- 7.
9. Ebert G, Poeck H, Lucifora J, Baschuk N, Esser K, Esposito I, et al. 5' triphosphorylated small interfering RNAs control replication of hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice. *Gastroenterology*. 2011; 141: 696-706, e1-3.
10. Cooper AM, Torrado E. Protection versus pathology in tuberculosis: recent insights. *Current opinion in immunology*. 2012; 24: 431-7.
11. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85: 103-11.
12. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol*. 2010; 185: 15-22.
13. Abebe M, Kim L, Rook G, Aseffa A, Wassie L, Zewdie M,

et al. Modulation of cell death by *M. tuberculosis* as a strategy for pathogen survival. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011: 678570.

14. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 668-74.

15. Melki MT, Saidi H, Dufour A, Olivo-Marin JC, Gougeon ML. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1000862.

16. Gougeon ML, Piacentini M. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis.* 2009; 14: 501-8.

17. Herbein G, Khan KA. Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol.* 2008; 29: 61-7.

18. Kaminsky V, Zhivotovsky B. To kill or be killed: how viruses interact with cell death machinery. *Journal of internal medicine.* 2010; 267: 473-82.

19. Shedlock DJ, Hwang D, Choo AY, Chung CW, Muthumani K, Weiner DB. HIV-1 viral genes and mitochondrial apoptosis. *Apoptosis.* 2008; 13: 1088-99.

20. Fan LX, Zhou X, Sweeney WE Jr, Wallace DF, Avner ED, Grantham JJ, Li X. Smac-mimetic-induced epithelial Cell death reduces the growth of renal cyts. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24:2010-22.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения персистирующей внутриклеточной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антагониста ингибитора апоптоза (IAP), где инфекция вызвана одним из следующего:

(a) вирусом, выбранным из группы, состоящей из Т-лимфотропного вируса человека (HTLV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вируса гепатита В (HBV);

(b) бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Mycobacteria tuberculosis* и *Legionella pneumophila*; или

(c) простейшими, выбранными из группы, состоящей из *Leishmania donovani* и *Plasmodium berghei*, и где антагонист IAP выбран из группы, состоящей из моновалентного антагониста IAP, бивалентного антагониста IAP, антагониста IAP, не являющегося пептидомиметиком, и антагониста IAP, который снижает экспрессию гена IAP.

2. Способ по п.1, в котором антагонист IAP является антагонистом cIAP2 и/или cIAP2.

3. Способ по п.1 или 2, в котором антагонист IAP является моновалентным антагонистом IAP.

4. Способ по п.1 или 2, в котором антагонист IAP является миметиком второго полученного из митохондрии активатора каспазы (Smac).

5. Способ по п.4, в котором миметик Smac проявляет одну или несколько из следующих характеристик:

(a) миметик Smac является бивалентным;

(b) миметик Smac дерепрессирует опосредованную X-связанным ингибитором апоптоза (XIAP-опосредованную) репрессию каспазы-3;

(c) миметик Smac расщепляет cIAP-1, не связанный со связанным с рецептором TNF фактором 2 (TRAF2), и cIAP1, связанный с TRAF2;

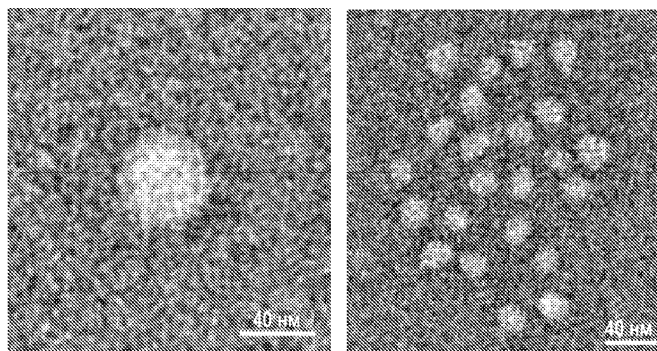
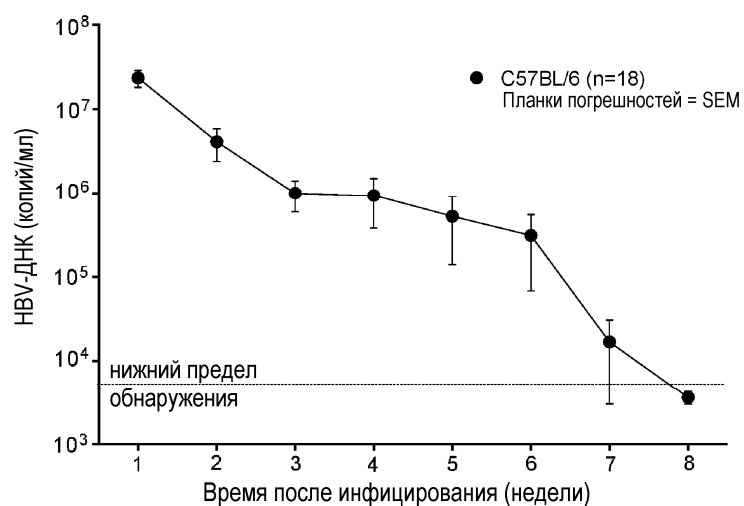
(d) миметик Smac расщепляет cIAP-2, связанный с TRAF2, но не расщепляет cIAP-2, не связанный с TRAF2;

(e) миметик Smac слабо расщепляет cIAP-2, не связанный с TRAF2, относительно расщепления cIAP-2, связанного с TRAF; и

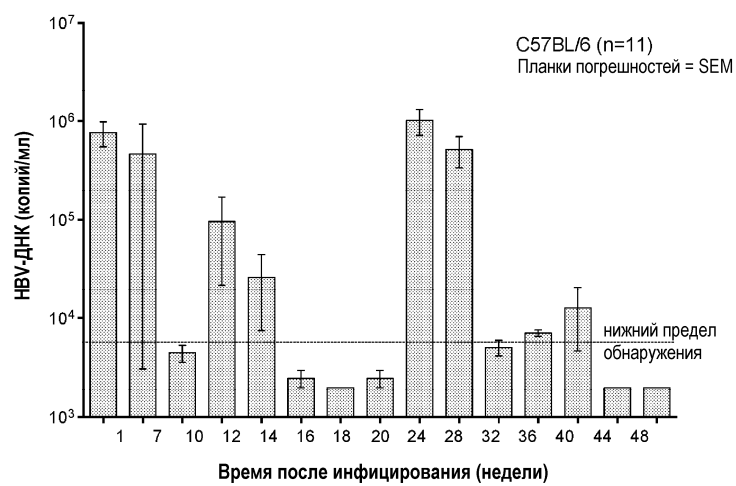
(f) Smac миметик имеет общую структуру [P1-P2-P3-P4] или [P1-P2-P3-P4]-L-[P1'-P2'-P3'-P4'], где P1-P2-P3- и P1'-P2'-P3'-соответствуют пептидным заменам, или пептидомиметикам N-концевого Ala-Val-Pro- трипептида зрелого Smac, и P4 и P4' соответствует аминокислотным заменам Phe, Tyr, Ile или Val, и

L является соединяющей группой или связью, ковалентно связывающей [P1-P2-P3-P4] с [P1'-P2'-P3'-P4'].

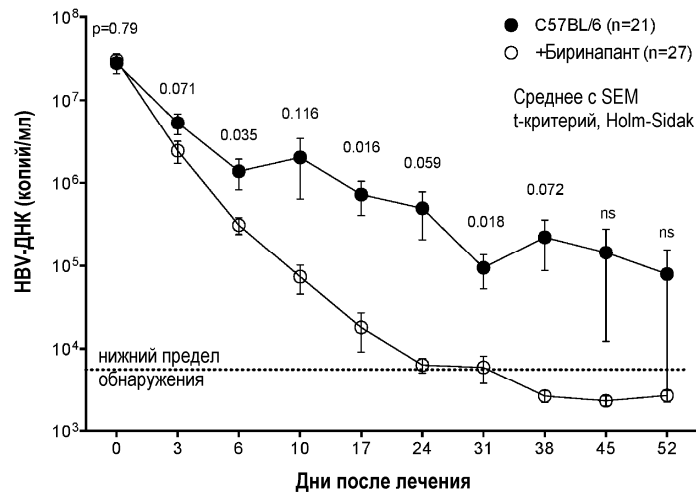
6. Способ по п.4 или 5, в котором Smac миметик является биринапантом.
7. Способ по п.1, в котором антагонист снижает экспрессию IAP гена.
8. Способ по п.7, в котором IAP геном является cIAP1 или cIAP2 ген.
9. Способ по п.7 или 8, в котором антагонистом IAP является малая интерферирующая РНК (миРНК), короткая шпилька РНК (кшРНК) или микроРНК (мкРНК).
10. Способ по п.9, в котором миРНК, кшРНК или мкРНК является нацеленной против последовательности, выбранной из группы, состоящей из NCBI эталонной последовательности: NM_001166,4, NCBI эталонной последовательности: NM_001256163,1, NCBI эталонной последовательности: NM_001256166,1, GenBank: DQ068066,1, NCBI эталонной последовательности: NM_001165,4, NCBI эталонной последовательности: NM_182962,2, GenBank: BC037420,1, NCBI эталонной последовательности: NM_001167,3, NCBI эталонной последовательности: NM_001204401,1, NCBI эталонной последовательности: NR_037916,1, и NCBI эталонной последовательности: NG_007264,1.
11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором инфекцию вызывает вирус, выбранный из группы, состоящей из ВИЧ, HBV и HTLV.
12. Способ по п.11, в котором антагонист является моновалентным антагонистом IAP.
13. Способ по п.11, в котором инфекция вызвана HBV.
14. Способ по п.11, в котором инфекция вызвана ВИЧ.
15. Способ по п.11, в котором инфекция вызвана HTLV.
16. Способ по любому из пп. 1-10, в котором инфекция вызвана *Mycobacteria tuberculosis*.
17. Способ по любому из пп. 1-10, в котором инфекция вызвана *Legionella pneumophila*.
18. Способ по любому из пп. 1-10, в котором инфекция вызвана *Leishmania donovani*.
19. Способ по любому из пп. 1-10, в котором инфекция вызвана *Plasmodium berghei*.
20. Способ по п.14, в котором инфекция вызвана ВИЧ, и антагонист IAP вводят в комбинации с TNF- α .
21. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антагонист IAP вводят совместно с TNF- α или другим агонистом TNF рецептора.
22. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антагонист IAP вводят совместно с TNF-зависимым лигандом, индуцирующим апоптоз (TRAIL).
23. Способ по любому из пп.1-9, в котором антагонист IAP вводят совместно с противовирусным нуклеозидным аналогом.
24. Способ по п.23, в котором нуклеозидным аналогом является энтекавир.
25. Применение антагониста IAP в лечении персистирующей внутриклеточной инфекции у индивидуума, где инфекция вызвана одним из следующего:
 - (a) вирусом, выбранным из группы, состоящей из HTLV, ВИЧ и HBV;
 - (b) бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Mycobacteria tuberculosis* и *Legionella pneumophila*; или
 - (c) простейшими, выбранными из группы, состоящей из *Leishmania donovani* и *Plasmodium berghei*, и где антагонист IAP выбран из группы, состоящей из моновалентного антагониста IAP, бивалентного антагониста IAP, антагониста IAP, не являющегося пептидомиметиком, и антагониста IAP, который снижает экспрессию гена IAP.
26. Применение антагониста IAP в получении лекарственного средства для лечения персистирующей внутриклеточной инфекции у индивидуума, где инфекция вызвана одним из следующего:
 - (a) вирусом, выбранным из группы, состоящей из HTLV, ВИЧ и HBV;
 - (b) бактериями, выбранными из группы, состоящей из *Mycobacteria tuberculosis* и *Legionella pneumophila*; или
 - (c) простейшими, выбранными из группы, состоящей из *Leishmania donovani* и *Plasmodium berghei*, и где антагонист IAP выбран из группы, состоящей из моновалентного антагониста IAP, бивалентного антагониста IAP, антагониста IAP, не являющегося пептидомиметиком, и антагониста IAP, который снижает экспрессию гена IAP.



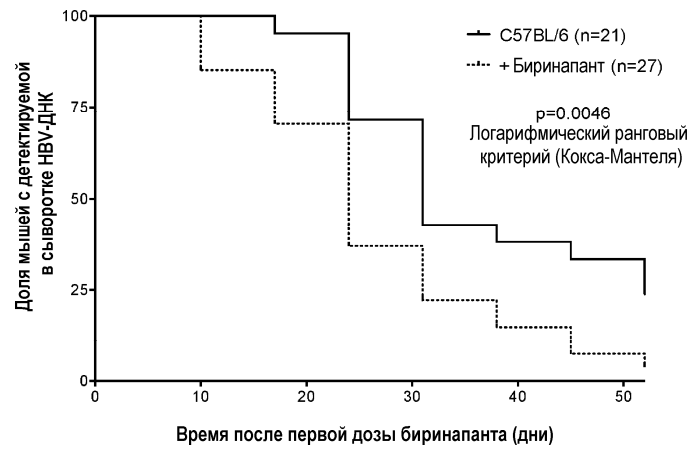
Фиг. 1



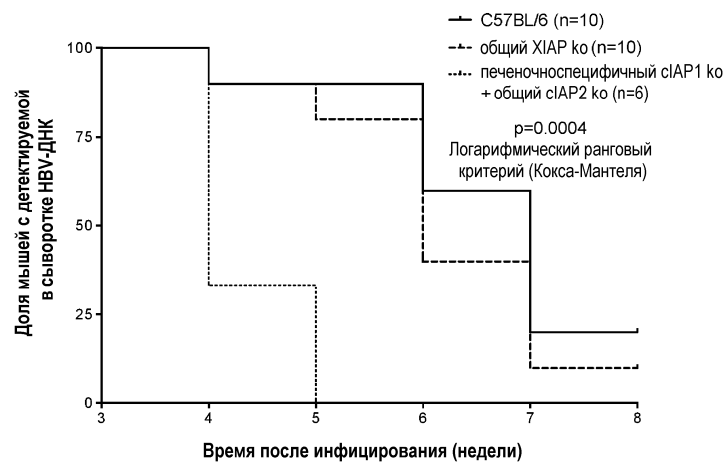
Фиг. 2



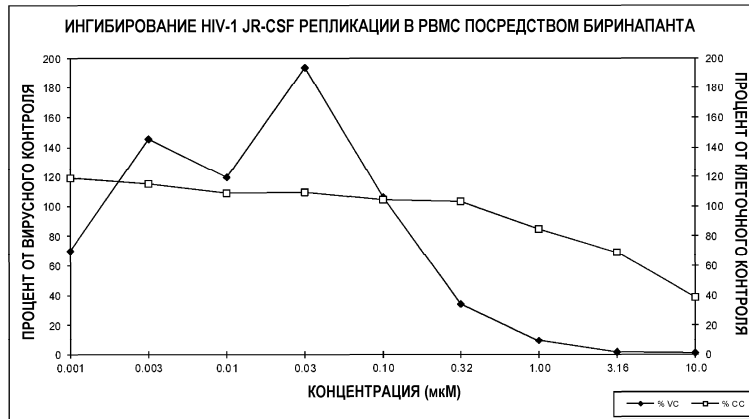
Фиг. 3



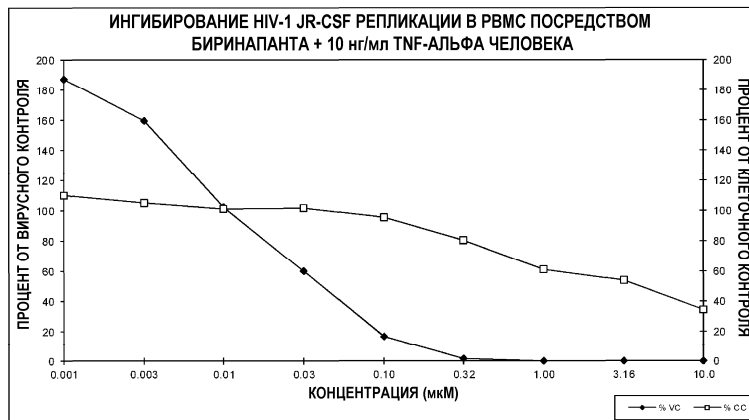
Фиг. 4



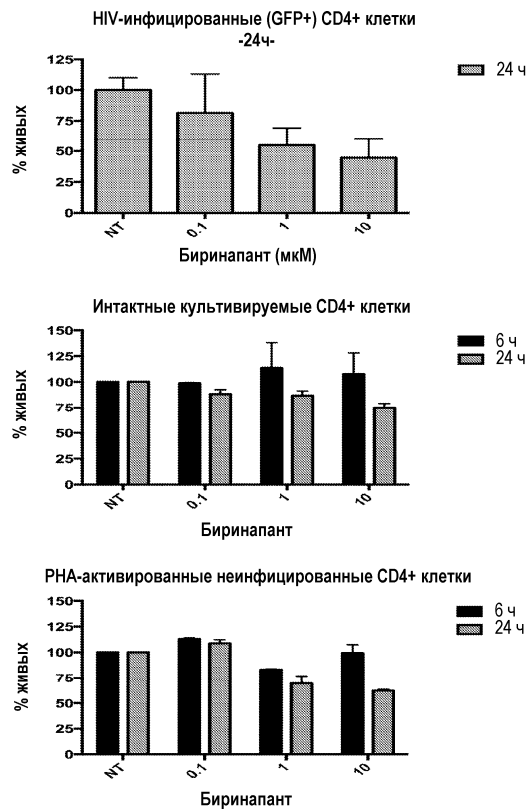
Фиг. 5



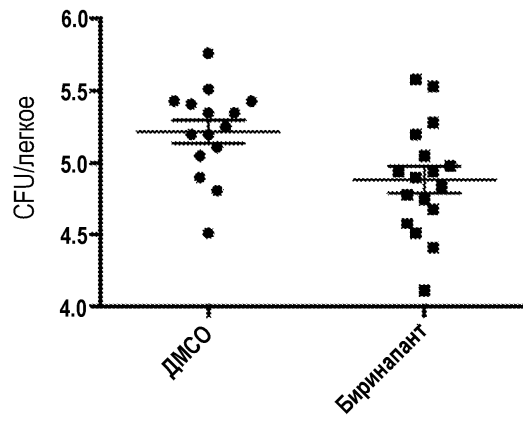
Фиг. 6



Фиг. 7

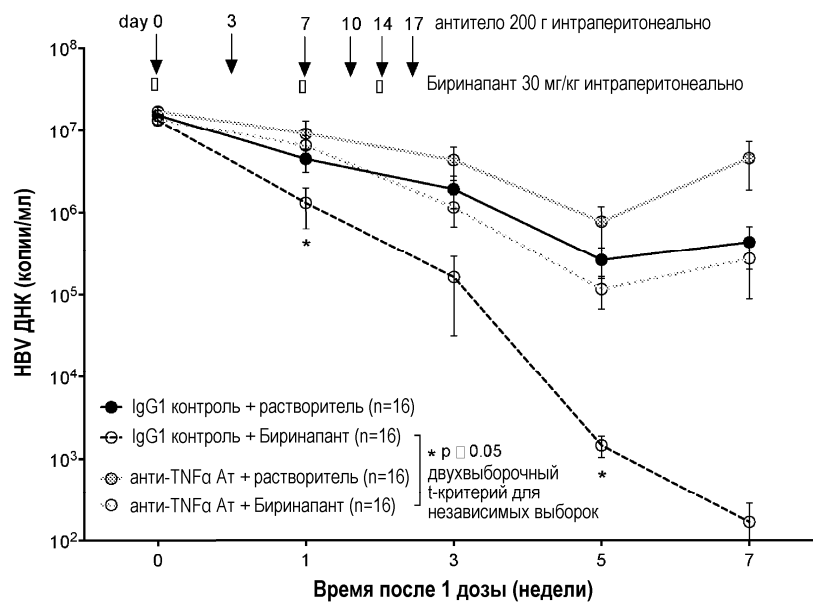


Фиг. 8

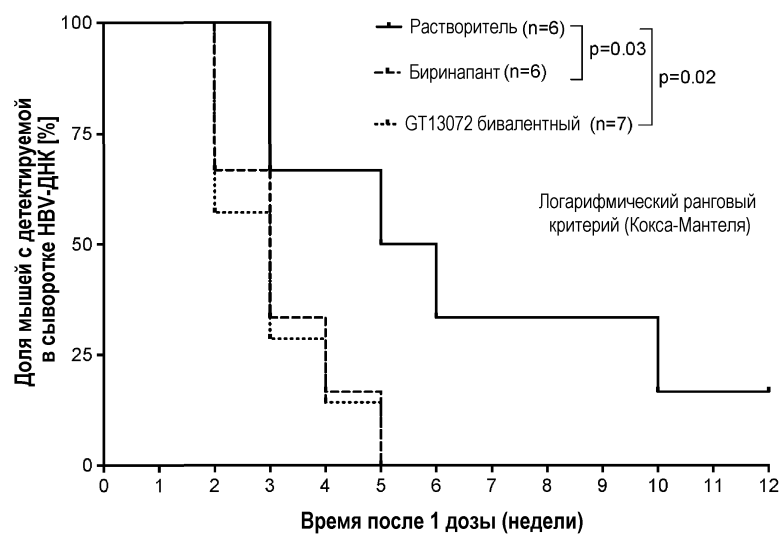


Лечение

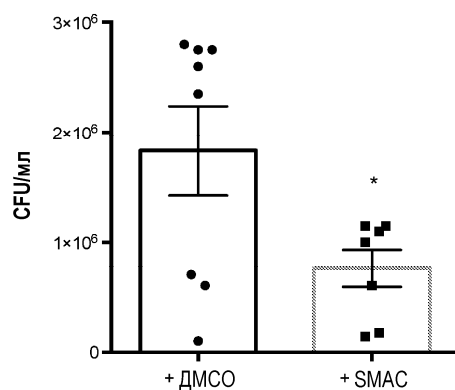
Фиг. 9



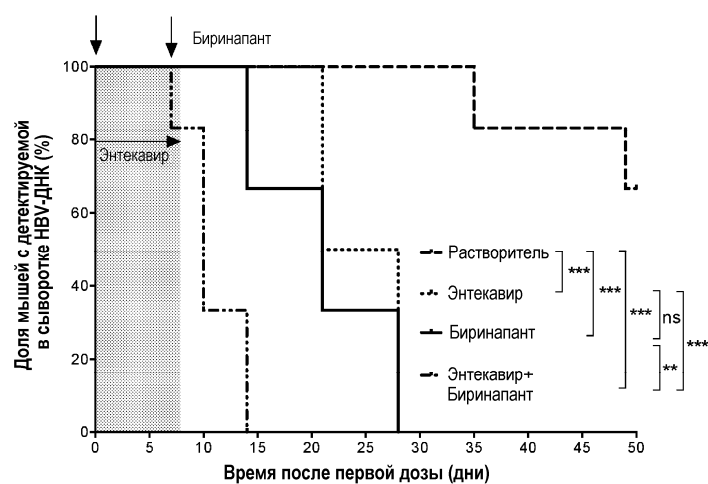
Фиг. 10



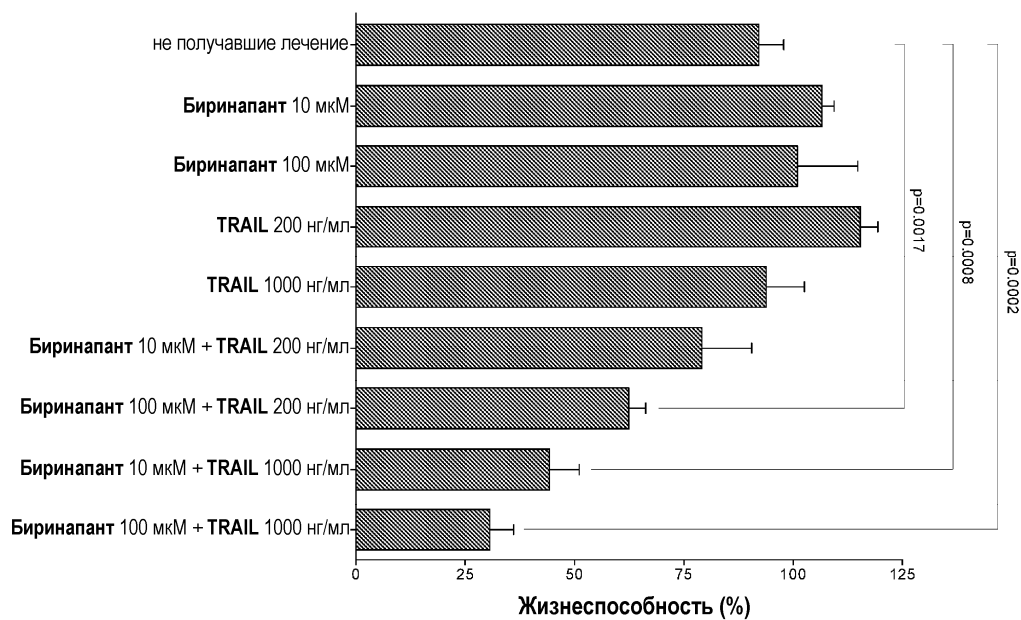
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

