



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101990433 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 200980112358. 0

(22) 申请日 2009. 02. 09

(30) 优先权数据
61/027, 032 2008. 02. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/033569 2009. 02. 09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/100438 EN 2009. 08. 13

(73) 专利权人 马萨诸塞眼科耳科诊所
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 布里格姆及妇女医院股份有限公司

(72) 发明人 艾伯特·埃奇 凯瑟琳·西布
马西·格里克斯曼 乔立新
格雷戈里·D·库尼 乔桑俊

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 封新琴

A61K 31/4184(2006. 01)
A61K 31/423(2006. 01)
A61K 31/4245(2006. 01)
A61K 31/426(2006. 01)
A61K 31/428(2006. 01)
A61P 27/16(2006. 01)

(56) 对比文件
WO 2006076009 A2, 2006. 07. 20,
Chen W. et. al..The human fetal
cochlea can be a source for auditory
progenitors/stem cells isolation. 《Hearing
Research》. 2007, (第 223 期), 23-29.
Kokare et al.Design, synthesis and
utilization of a novel coupling reagent
for the preparation of O-alkyl hydroxamic
acids. 《Tetrahedron Letters》. 2007, 第 48 卷
(第 25 期), 4437-4440.

审查员 修文

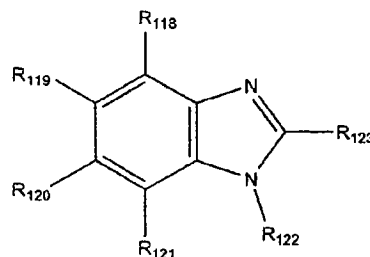
(51) Int. Cl.
A61K 31/341(2006. 01)
A61K 31/343(2006. 01)
A61K 31/381(2006. 01)
A61K 31/415(2006. 01)

权利要求书2页 说明书66页 附图56页

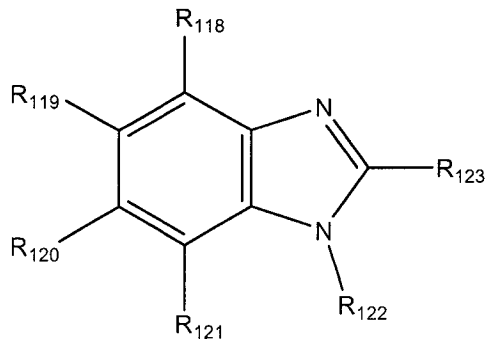
(54) 发明名称
提高 Atoh1 表达的化合物

(57) 摘要

本发明一般提供化合物、药物组合物和其使用方法, 其包括导致在生物细胞中 Atoh1 基因 (如, Hath1) 表达增加的方法。更具体地, 本发明涉及将得益于 Atoh1 表达增加的疾病和 / 或疾患的治疗, 例如, 与听觉毛细胞损失有关的听力障碍或不平衡疾患, 或与异常细胞增殖有关的疾患。



1. 具有下式的化合物或其药学上可接受的盐用于制备治疗与听觉毛细胞损失相关的听力障碍或不平衡疾患的药物的用途：



其中：

R₁₁₈、R₁₁₉ 和 R₁₂₁ 中每个独立地为 H；

R₁₂₀ 选自 H、卤代、NO₂、C₁-C₃ 烷基；

R₁₂₂ 是氢或 -Z-R^a；其中：

Z 是 O 或键；并且

R^a 是：

(i) C₁-C₆ 烷基；或

(ii) 苄基或苯乙基，其中它们每个的苄基部分由 1-2 个独立地选自卤代、C₁-C₆ 烷基和 C₁-C₆ 烷氧基的取代基任选地取代；

R₁₂₃ 是：

(i) 苄基，其任选地取代有 1-3 个独立地选自 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、羟基和 -NHC(O) (C₁-C₃ 烷基) 的取代基；或

(ii) 苄基或苯乙基，其中它们每个的苄基部分由 NH₂ 任选地取代；或

(iii) -(C₁-C₆ 烷基)-Z¹-(苄基)，其中 Z¹ 是 O、S、NH 或 N(CH₃)；所述苄基部分由 1-5 个独立地选自卤代、C₁-C₆ 烷基和 C₁-C₆ 烷氧基的取代基任选地取代。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其中所述药物局部地施用于需要治疗的患者的内耳，并且增加所述患者内耳中的具有听觉毛细胞特性的细胞的数量。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其中所述药物通过注射进入耳蜗腔中的一个或多个，进入到内耳道的听觉神经干，或进入鼓阶来施用。

4. 如权利要求 2 所述的用途，其中所述听觉毛细胞是外听觉毛细胞或内听觉毛细胞。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R₁₂₂ 是 -Z-R^a。

6. 如权利要求 5 所述的用途，其中 Z 是 O。

7. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R₁₂₃ 是苄基，其由 1-3 个选自 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、羟基和 -NHC(O) (C₁-C₃ 烷基) 的取代基任选地取代。

8. 如权利要求 1 所述的用途，其中 R₁₂₀ 是卤代或 NO₂。

9. 如权利要求 1 所述的用途，其中：

R₁₂₂ 是 -Z-R^a，其中 R^a 是苄基或苯乙基，其中它们每个的苄基部分由 1-2 个独立地选自卤代、C₁-C₆ 烷基和 C₁-C₆ 烷氧基的取代基任选地取代；并且

R₁₂₃ 是苄基，其由 1-3 个独立地选自 C₁-C₆ 烷基、C₁-C₆ 烷氧基、羟基和 -NHC(O) (C₁-C₃ 烷

基)的取代基任选地取代。

10. 如权利要求 1 所述的用途,其中:

R_{122} 是 $-Z-R^a$, 其中 Z 是 O , 并且 R^a 是苄基或苯乙基, 其中它们每个的苯基部分由 1-2 个独立地选自卤代、 C_1-C_6 烷基和 C_1-C_6 烷氧基的取代基任选地取代; 并且

R_{123} 是苯基, 其由 1-3 个选自 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基和 $-NHC(O)$ (C_1-C_3 烷基) 的取代基任选地取代; 并且

R_{120} 选自 H 、卤代和 NO_2 。

11. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述化合物选自:

6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑;

6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑;

6-氯-2-(4-甲氧基苯基)-1-(4-甲基苄氧基)-1H-苯并[d]咪唑;

6-氯-1-(3,5-二甲基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑;

6-氯-1-(4-甲氧基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑;

1-(4-甲基苄氧基)-6-硝基-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑;

2,5-二氯-N-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)苯胺;

4-(2-(1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙基)苯胺;

2-((4-氟苄氧基)甲基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑;

2-(4-甲氧基苯基)-1-苯乙基-1H-苯并[d]咪唑;

或其药学上可接受的盐。

12. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述化合物是 6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑, 或其药学上可接受的盐。

提高 Atoh1 表达的化合物

[0001] 要求优先权

[0002] 本申请依据 35USC § 119(e) 要求 2008 年 2 月 7 日提交的美国临时专利申请号 61/027, 032 的优先权, 其全部内容通过参考引入本文。

技术领域

[0003] 本发明概括地提供化合物、药物组合物、以及它们的使用方法, 该方法包括在生物细胞中导致 Atoh1 基因 (例如, Hath1) 表达增加的方法。更具体地说, 本发明涉及得益于 Atoh1 表达增加的疾病和 / 或疾患的治疗。

背景技术

[0004] 最常见类型的听力损失之一是由毛细胞损失造成的感音神经性耳聋, 该毛细胞是在耳蜗中负责将声音转导成电信号的感觉细胞。人类出生时内耳每个耳蜗只包含大约 15, 000 个毛细胞, 然而这些细胞会由于各种遗传或环境因素而损失, 这种损失或受损的细胞不能被替换。然而, 转录因子 Atoh1 的过度表达, 可诱导耳蜗的感觉器官 Corti 器上的表皮细胞分化成毛细胞 (Zheng 和 Gao, *Nat Neurosci* 2000 ;3 :580-586 ;Kawamoto 等人, *J Neurosci*2003 ;23 :4395-4400 ;Gubbels 等人, *Nature* 2008 ;455 :537-541)。Atoh-1 的表达也起着推动其他细胞, 例如肠细胞, 进入分化状态的作用 (Aragaki 等人., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2008 年 4 月 ;368(4) :923-929), 并且 Atoh-1 的过度表达会降低结肠癌细胞的增殖 (Leow 等人, *Ann N Y Acad Sci.* 2005 年 11 月 ;1059 :174-83)。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明特征在于本文所述的化合物, 和包含这些化合物的组合物。例如, 本发明特征在于包含了能够增加细胞内 Atoh1 表达的本文公开的一种或多种化合物, 或其药学上可接受的盐, 和药学上可接受的载体的药物组合物。该组合物可配制用于施用于患者。因此, 本发明包含该药物组合物, 以及适用于保存在组织培养物中的细胞或组织的浓缩原液和组合物, 以及所述化合物和组合物的使用方法。

[0007] 如果该组合物是药学上可接受的 (即无毒的), 其可以包括药学上可接受的载体, 诸如缓冲液 (例如, 磷酸盐缓冲液)、氨基酸、脲、醇、抗坏血酸、磷脂、多肽、EDTA、氯化钠 (如生理盐水)、脂质体、甘露醇、山梨醇、水、甘油或其组合。也可包括防腐剂和染料。在一些具体实施方案中, 该组合物是无菌的。

[0008] 此处所述的化合物可用于改变保存在细胞培养物中细胞的特征 (例如, 在体外), 并且所述化合物和 / 或经处理的细胞可以施用于需要治疗的患者。例如, 治疗患者的方法可以按包含下列步骤的方法进行: (a) 选择需要治疗的患者, 以及 (b) 将有效治疗量的本文所述的化合物 (例如, 制造用于施用的化合物) 施用于该患者。药物组合物可以全身施用 (如口服或肠胃外)。具体而言, 可静脉内、肌内、腹膜内、舌下、直肠、阴道、透皮、皮下或通过吸入施用该组合物。当口服施用时, 该组合物可配制成片剂 (如, 压制片)、丸剂、糖浆、悬浮液、乳液或胶囊。当肠胃外施用, 该组合物可配制成锭剂、滴剂 (如耳滴液)、溶液, 灌肠

剂、栓剂或喷雾剂。该组合物也可以使用导管或泵施用。

[0009] 所述组合物也可以局部施用（例如，向耳或需要细胞分化和 / 或 Atoh1 表达的其他部位）。为了向耳部施用，可通过注射入耳蜗的腔 (luminae)，注射入内耳道听觉神经干和 / 或注射入鼓阶来施用药物组合物。更加具体地，可通过鼓室内注射，应用于（即注射入）外耳、中耳或内耳，通过耳圆窗注射，或通过耳蜗囊注射来施用药物组合物。还可以使用导管或泵将药物组合物施用于患者（例如，局部地向中耳和 / 或内耳）。

[0010] 需要治疗的患者可患有或有风险发展为，与听觉毛细胞的损失有关的听力障碍或不平衡疾患。虽然本发明不限于通过任何特定机制起作用的化合物，可在治疗有效地增加了患者内耳（或其它靶组织（例如，肿瘤））中 Atoh1 基因在细胞中的表达，或有效地提高患者内耳中具有听觉毛细胞特征的细胞数目之处使用该组合物。听觉毛细胞可以是外部或内部的听觉毛细胞。

[0011] 需要治疗的患者也可患有或有风险发展为癌症。癌症可能是胃肠癌（例如，食道癌、胆囊癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、小肠癌、大肠癌、结肠癌或直肠癌）。

[0012] 需要治疗的患者也可患有或有风险发展为小脑颗粒神经元缺乏、关节病和 / 或骨关节炎。

[0013] 在一个具体实施方案中，治疗患有听力障碍或不平衡疾患的患者的方法可以由包括下述步骤的方法施行：(a) 任选地选择需要治疗的患者，(b) 获得能够分化为听觉毛细胞的细胞群体，(c) 将细胞群体在体外与有效量的本文所述的一种或多种化合物接触足以使得该群体中有分化的听觉毛细胞特征的细胞数目增加的时间，和 (d) 将细胞群体或其亚群 (subset)（例如，更高度分化的细胞亚群）施用于患者的耳部。能够分化为听觉毛细胞的细胞群体可以包括干细胞、诱导多能性干细胞 (iPS)、祖细胞、支持细胞、Deiters 细胞、柱细胞、内指状细胞、顶盖细胞 (tectal cell)、Hensen 细胞和生殖细胞。干细胞可以是成体干细胞（例如，源于内耳、骨髓、间质、皮肤、脂肪、肝脏、肌肉或血液的干细胞）、胚胎干细胞或从胎盘或脐带获得的干细胞。如同干细胞一样，祖细胞可以来自内耳、骨髓、间质、皮肤、脂肪、肝脏、肌肉或血液。施用细胞群体可以按下述步骤完成 (a) 将细胞注入耳蜗腔，注入内耳中的听觉神经干，或注入鼓阶，或 (b) 在耳蜗植入物内植入这些细胞。在使用细胞治疗的患者任何方法中，它们也可使用一种或多种本化合物治疗，反之亦然。如前文所述，药物组合物可以全身或局部施用。

[0014] 本发明的其他方法包括增加体外细胞群体中具有听觉毛细胞特征的细胞数目的方法。这些方法可以实施如下：获得能够分化为听觉毛细胞的细胞群体，将体外（例如，在细胞培养物中）细胞群体与有效量的本文所述的一种或多种化合物接触足以使得细胞群体中具有听觉毛细胞特征的细胞数目增加的时间。能够分化成毛细胞的细胞群体包括选自以下组成的组的细胞：干细胞、iPS 细胞、内耳干细胞、成体干细胞、骨髓源干细胞、胚胎干细胞、间质干细胞、皮肤干细胞、脂肪源性干细胞、祖细胞、内耳祖细胞、支持细胞、Deiters 细胞、柱细胞、内指状细胞、顶盖细胞、Hensen 细胞和生殖细胞。

[0015] 本发明还包括本文所述的化合物作为药物的用途，和在制备用于治疗或预防本文所述疾患的药物的用途。例如，该药物可在用于治疗或预防与毛细胞损失相关的听力损失或不平衡，或与不期望的细胞增殖相关的病症的方法中使用。另外，本发明包括所述化合物在治疗本文所述的疾患中的用途，所述疾患例如与听觉细胞损失相关的听力损失，或与不

期望的细胞增殖相关的病症。该药物可以是本文所述的任何形式，并可以单独施用或与另外的治疗或活性剂结合使用。

[0016] 此外，本文还提供试剂盒（例如，包括上文描述的药物组合物以及信息材料的试剂盒，或包含本文所述的化合物以及信息材料的试剂盒）。试剂盒中的细胞可以按照上文描述的方法制备，而且任一种试剂盒都可包含附加材料，例如适用于药物组合物或细胞群体施用的装置，例如，适用于插入受治疗者内耳的无菌灵活套管。

[0017] 此外，本发明所包括由本文所述的方法制备的细胞或细胞群体。

[0018] 本发明还包括使用本文所述的化合物中的一种或多种作为药物，例如，可以用于治疗与听觉毛细胞损失相关的听力障碍或不平衡疾患，和 / 或与异常细胞增殖相关的病症的药物。

[0019] 本发明也包括本文所述的化合物中的一种或多种用于治疗与听觉毛细胞损失相关的听力障碍或不平衡疾患和 / 或异常细胞增殖相关的疾患的用途。

[0020] 定义

[0021] 本文使用的术语“异常增殖”定义为任何类型的细胞的任何不期望的过度增殖，其中所述细胞没有受到正常细胞周期发展的限制，并且其中所述增殖可导致肿瘤或任何癌症的发展。

[0022] 本文使用的术语“治疗”是指其中疾病或病症的一种或多种症状被改善或其他有益地改变的任何方法。正如本文所使用的，特定疾患的症状的改善是指可以归因于通过本发明的组合物和方法的治疗的，或与该治疗相关的任何减轻，无论是永久或暂时的，持久或短暂的。

[0023] 本文中所述的术语“有效量”和“有效治疗”，是指本文所述的一种或多种化合物或药物组合物作用一段时间（包括急性或慢性地施用，以及周期性或连续性地施用）后，在其施用状况下有效产生预期效果或生理结果的量或浓度。

[0024] 本发明使用的一种或多种化合物或药物组合物的有效量包括：促进 Atoh1 表达增加的量；促进一个或多个细胞全部或部分分化以治疗某种将得益于 Atoh1 表达增加的疾病的量，例如，阻止或延缓得益于 Atoh1 表达增加的一种或多种疾病的发病、延缓得益于 Atoh1 表达增加的一种或多种疾病的进展、缓解得益于 Atoh1 表达增加的一种或多种疾病的影响，或普遍地改善被诊断为得益于 Atoh1 表达增加的一种或多种疾病的患者的预后的量，该疾病例如一种或多种本文所述的疾病。例如，在听力衰退的治疗中，能提高听力至任何程度或者阻滞听力衰退的任何症状的化合物将是治疗有效的。例如在异常细胞增殖的治疗中，能减少细胞的增殖、减小肿瘤大小、降低转移、降低血管向所述肿瘤增殖的化合物都是治疗有效的。化合物的治疗有效量并不是要求治愈疾病，而是为疾病提供治疗。

[0025] 在整个说明书中，术语“患者”是用于描述根据本发明的方法提供治疗的动物、人类或非人类。包括兽医和非兽医应用。该术语包括，但不局限于，鸟类，爬行类，两栖类和哺乳动物类，例如，人类、其他灵长类动物、猪、啮齿类如小鼠和大鼠、兔、豚鼠、仓鼠、牛、马、猫、狗、绵羊和山羊。典型的患者包括人类、家畜和家养宠物，如猫和狗。

[0026] 术语“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘的任何基团。

[0027] 一般而言，并且除非另有说明，否则取代基（基团）前缀名是通过以下衍生自母体氢化物：(i) 将母体氢化物中的“烷 (ane)”替换为后缀“基 (yl)”、“二基 (diyl)”、“三基

(triy1) ”、“四基 (tetray1) ”等 ;或 (ii) 将母体氢化物中的“e”替换为后缀“基 (y1) ”、“二基 (diyl) ”、“三基 (triy1) ”、“四基 (tetray1) ”等。(在此,当指定具有自由价的原子时,该原子的给定价数与母体氢化物中任何确定的价数一样低)。本文全文也使用可接受约定名称 (contracted names),如金刚烷基、萘基、蒽基、菲基、呋喃基、吡啶基、异喹啉基、喹啉基和哌啶基,以及通用名,如乙烯基、烯丙基、苯基和噻吩基。稠环、双环、三环、多环的取代基编号和命名遵守使用常规编号 / 编码系统。

[0028] 术语“烷基”是指可以是直链或支链的,包含指定数目的碳原子的饱和烃链。例如, C_1 - C_6 烷基表示,该基团可能含有 1 到 6 (1 和 6 包含在内) 碳原子。任何原子都可以,例如,被一个或多个取代基 (例如,诸如描本文所述的任何 R^a 的定义中描述的那些) 任选地取代。烷基的例子包括,但不局限于甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

[0029] 术语“卤代烷基”是指其中至少有一个氢原子被卤代取代的烷基。在一些实施方案中,多于一个氢原子 (例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14) 被卤代取代。在一些实施方案中,氢原子可以各自被相同的卤素取代 (如氟),或氢原子可以被不同卤素的组合取代 (如氟和氯)。“卤代烷基”还包括其中所有的氢都被卤代取代的烷基部分 (有时本文称全卤代烷基,例如,全氟烷基,如三氟甲基)。任何原子可以,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^b 的定义中描述的那些) 任选地取代。

[0030] 术语“芳烷基”是指其中烷基氢原子被芳基取代的烷基部分。烷基部分碳之一作为芳烷基与其它部分的连接点。任何环或链原子可以,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^c 的定义中描述的那些) 任选地取代。“芳烷基”的非限制性实例,包括苄基,2- 苄乙基和 3- 苄丙基。

[0031] 术语“杂芳烷基”是指其中烷基氢原子由杂芳基取代的烷基部分。烷基碳之一作为芳烷基与另一个部分的连接点。杂芳烷基包括其中烷基部分上多于一个氢原子由杂芳基取代的基团。任何环或链原子可,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^c 的定义中描述的那些) 任选地取代。杂芳烷基可以包括,例如,2- 吡啶基乙基。

[0032] 术语“烷氧基”和“卤代烷氧基”分别是指 -O- 烷基和 -O- 卤代烷基基团。术语“苯氧基”是指 -O- 苯基基团。

[0033] 术语“杂环基”指含有独立地选自 O、N 或 S 的一个或多个 (如 1-4 个) 杂环原子的完全饱和的单环、双环、三环或其他多环系。杂原子或环碳原子是杂环基取代基与另一个部分的连接点。任何原子可,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^c 的定义中描述的那些) 任选地取代。杂环基可以包括,例如,四氢呋喃基、四氢吡喃基、哌啶基 (哌啶子基)、哌嗪基、吗啉基 (吗啉代)、吡咯啉基和吡咯烷基。

[0034] 术语“环烷基”是指完全饱和的单环、双环、三环或其他多环烷基。任何原子可以,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^c 的定义中描述的那些) 任选地取代。一个环碳原子作为一个环烷基与另一个部分的连接点。环烷基部分可以包括,例如,环丙基、丁烷基、环戊烷基、环己基,环庚基、金刚烷基和降冰片基 (norbornyl) (双环 [2. 2. 1] 庚基)。

[0035] 术语“环烯基”是指部分不饱和的单环、双环、三环或其他多环烷基。一个环碳 (如饱和的或不饱和的) 是环烯基取代基的连接点。任何原子可以,例如,由一个或多个取代基 (例如,像本文所述的任何 R^c 的定义中描述的那些) 任选地取代。环烯基部分可以包括,例

如,环己烯基、环己二烯基或降冰片烯基。

[0036] 术语“芳基”是指芳族单环或双环的烃环系统,其中任何环原子可以,例如,通过一个或多个取代基(例如,像本文所述的任何 R^d 的定义中描述的那些)任选地取代。芳基部分可以包括苯基和萘基。

[0037] 术语“杂芳基”指含有独立地选自 O、N 或 S(以及其一氧化物和 dioxide,例如, $N \rightarrow O^-$ 、 $S(O)$ 、 SO_2) 的一个或多个(如 1-6 个)杂原子环原子的芳族单环或双环烃基。任何原子可以,例如,由一个或多个取代基(例如,像本文所述的任何 R^d 的定义中描述的那些)任选地取代。杂芳基可以包括,吡啶基、噻吩基、呋喃基(呋喃基)、咪唑基、异噻啉基、噻啉基和吡咯基。

[0038] 符号 $C(O)$ 是指通过双键与氧原子相连的碳原子。术语“氧代”是指双键的氧,即 $=O$ 。

[0039] 术语“取代基”是指例如,烷基、卤代烷基、环烷基、芳烷基、杂芳烷基、杂环基、环烯基、芳基或杂环基基团的任何原子上“取代”的基团。一般而言,当特定变量的定义包括氢和非氢(卤代、烷基、芳基等)的可能性时,术语“非氢取代基”是统指该特别变量中的非氢可能性。

[0040] 符号,如“被从 1-5 个 R^d 任选地取代的 C_6-C_{10} 芳基”(等等),旨在包括未取代的 C_6-C_{10} 芳基和被从 1-5 个 R^d 取代的 C_6-C_{10} 芳基。使用没有修饰语“任选地取代”或“取代”的取代基(基团)前缀名,如烷基,应被理解为特定的取代基是未被取代。然而,使用没有修饰语“任选地取代”或“取代”的“卤代烷基”,仍然被理解为其中至少一个氢原子被卤代取代的烷基。

[0041] 为了阐述方便,还应理解,如果在本说明书(包括权利要求书)中,基团被定义为“如同本文任何处所定义”(或类似的),该特定基团的定义包括,本说明书中首次出现和最广泛通用的定义,以及任何地方描述的任何亚通用的(sub-generic)和具体的定义。

[0042] 本申请涉及 2004 年 8 月 31 日提交的美国临时专利申请号 60/605,746、2005 年 8 月 30 日提交的国际申请号 PCT/US2005/030714、2004 年 11 月 15 日提交的美国申请序列号 10/989,649、2007 年 12 月 12 日提交的美国申请序列号 11/953,797、2008 年 8 月 7 日提交的美国申请序列号 12/187,543、2006 年 11 月 15 日提交的美国临时申请序列号 60/859,041、2007 年 11 月 14 日提交的国际申请号 PCT/US2007/084654、2008 年 9 月 18 日提交的美国申请序列号 12/233,017、2008 年 11 月 24 日提交的美国临时申请序列号 60/859,041,上述各项全部内容通过参考引入本文。

[0043] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员的通常理解相同的含义。本文描述了本发明使用的方法和材料;另外,也可使用本领域熟知的适合的方法和材料。材料、方法和实例仅是示例性的,且无意限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、段落、数据库条目和其他参考资料全部通过参考引入。一旦发生冲突,以本说明书为准,包括定义。

[0044] 本发明的其他特征和优点根据以下的详细阐述和附图、以及权利要求中,将是显然的。

附图说明

- [0045] 图 1A-1H 是酚类化合物或其衍生物的通用结构。
- [0046] 图 1I-1K 是特定的酚类化合物及其衍生物的结构。
- [0047] 图 2A-2F 是苯甲酰胺化合物或相关化合物的通用结构。
- [0048] 图 2G-2I 是特定苯甲酰胺化合物或相关化合物的结构。
- [0049] 图 3A-3X 是包含一个或多个杂环的化合物的通用结构。
- [0050] 图 3Y-3ZZ 是包含一个或多个杂环的特定化合物的结构。
- [0051] 图 4A-4G 是包含一个或多个苯环的化合物的通用结构。
- [0052] 图 4H-4I 是包含一个或多个苯环的特定化合物的结构。
- [0053] 图 5A-5E 是包含连接到五元杂环系统的酰胺基团的化合物的通用结构。
- [0054] 图 5F 和 5G 是包含连接到五元杂环系统的酰胺基团的特定化合物的结构。
- [0055] 图 6A-6O 是包含稠合到另一个环系统的五元杂环系统的化合物的通用结构。
- [0056] 图 6P-6V 是包含一个五元杂环系统并与另一个环系统融合的特定化合物的结构。
- [0057] 图 7A-7C 是吡啶化合物的通用结构,而图 7D 是嘧啶化合物的通用结构。
- [0058] 图 7E-7F 是特定的吡啶或嘧啶化合物的结构。
- [0059] 图 8A 和 8B 是苯胺化合物或苯胺衍生物的通用结构。
- [0060] 图 8C 是苯胺化合物或苯胺衍生物的特定结构的结构。
- [0061] 图 9-116 是显示了在具有由 Math1 增强子和最小启动子控制的稳定表达荧光素酶基因的 HEK 细胞中 Math1 的表达 (见实施例 1) 的线图。图中所示化合物编号对应图 1 到图 8 中标出的化合物结构。采用在实施例 1 和实施例 2 中介绍的高通量筛选方法,测定 Math1 活性。
- [0062] 图 117A 和 117B 是显示进行优化高通量筛选的实验结果的图。
- [0063] 图 118A 和 118B 是显示进行优化高通量筛选的重复实验的散点图。
- [0064] 图 119 是显示 Math1 活化的柱状图,该活化在暴露于所示化合物的细胞中,使用实施例 1 和实施例 2 中描述的 Math1 荧光素酶报告测定进行评估。图 1 到图 8 中提供这些化合物的结构。这些化合物的初始 Atoh1 活化结果可参见图 9-114。
- [0065] 图 120A 是显示 Math1 活化的柱状图,该活化在暴露于所示化合物的细胞中,使用实施例 1 和实施例 2 中描述的 Math1 荧光素酶报告测定进行评估。图 1 到图 8 中提供这些化合物的结构。这些化合物的初始 Atoh1 活性结果可参见图 9-114。
- [0066] 图 120B 显示了图 117A 中所示化合物的结构。
- [0067] 图 120C 显示了在暴露于所示化合物的细胞中 Atoh1mRNA 表达。
- [0068] 图 121A 和 121B 是未处理的细胞 (A) 和接触了化合物 (Cp) Cp. -0000540 的细胞 (B) 的照片。阳性染色毛细细胞特异性标记物 Math1-GFP 和肌球蛋白 7a 的细胞群用箭头表示。
- [0069] 发明详述
- [0070] 此外,本发明提供涉及用于治疗本文所述病症的患者的化合物和 / 或药物组合物的化合物和方法。虽然治疗方法不局限于其中特定的潜在细胞事件发生的那些,但本化合物和组合物可提高受治疗者和 / 或细胞的 Atoh1 基因的表达,从而导致细胞分化成为,例如,听觉毛细胞。
- [0071] Atoh-1
- [0072] Atoh1 蛋白同系物 1 (Atoh1 或 atonal) 是编码包含基本的螺旋 - 环 - 螺旋 (bHLH)

结构域的蛋白的原神经基因,该蛋白似乎在果蝇 (*Drosophila*) 神经系统发育中起决定细胞命运的重要作用 (Jarman 等人, *Cell*, 73 :1307-1321, 1993)。Atoh1 是进化上保守的,是在赤拟谷盗 (*Tribolium castenium*, 红色面粉甲虫 (red flour beetle))、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*, 河豚鱼 (puffer fish))、鸡 (Cath1)、小鼠 (Math1) 和人类 (Hath1) 中鉴别的同源物 (Ben-Arie 等人, *Hum. Mol. Gene.*, 5 :1207-1216, 1996)。这些同源物每个都包含长度相同并且与 Atoh1 bHLH 结构域有高度序列同源性的 bHLH 结构域。例如, Hath1 和 Math1 基因的长度几乎相同。这些分子也有高度相似的核苷酸序列 (86% 同源性) 和高度相似的 bHLH 氨基酸序列 (89%)。Cath1 的 bHLH 结构域分别与 Hath1 和 Math1 的 bHLH 结构域有 97% 和 95% 的同源性。Cath1 的 bHLH 与 Atoh1 bHLH 结构域有 67% 的同源性。相比之下,果蝇的其他编码蛋白的 bHLH 结构域只共享 40% -50% 的序列同源性。

[0073] 每个哺乳动物 Atoh1 同源物起活化 E box (CANNTG (SEQ ID NO :1)) 依赖性转录的转录因子的功能 (Arie 等人, *Hum. Mol. Genet.*, 9 :1207-1216, 1996 ;Akazawa 等人, *J. Biol. Chem.*, 270 :8730-8738, 1995), 并且在神经组织和胃肠 (GI) 道中起决定细胞命运的重要正调节子的功能。

[0074] Zoghbi 等人 (美国公开号 2004/0237127) 描述了将上述编码 Atoh1 同源物的核酸用于治疗耳聋、骨关节炎和异常细胞增殖的用途。

[0075] 如本文所使用的,“Atoh1”是指任何以及所有 Atoh1 相关的核酸或蛋白序列,并且包括分别与 Atoh1 核酸或氨基酸序列直向同源或同源 (homologous) 的或与 Atoh1 核酸或氨基酸序列具有明显序列相似性的任何序列,因此,术语“Atoh1”包括其他哺乳动物同源物,例如,人类、小鼠、大鼠等等。序列可以存在于任何动物中,包括哺乳动物 (例如,人类)。Atoh1 核酸和氨基酸序列的实例包括但不限于,Atoh1 (例如,分别为 NM_001012432.1 和 NP_001012434.1) (黑猩猩 (*Pan troglodytes*))、Hath1 (例如, NM_005172.1 和 NP_005163.1) (智人 (*Homo sapiens*))、Math1 (例如, NM_007500.4 和 NP_031526.1) (小家鼠 (*Mus musculus*))、Atoh1 (NM_001109238.1 和 NP_001102708.1) (褐鼠 (*Rattus norvegicus*))、Atoh1 (XM_001102247.1 和 XP_001102247.1) (猕猴 (*Macaca mulatta*))、Atoh1 (NM_001098099.1 和 NP_001091568.1) (黄牛 (*Bos taurus*))、Atoh1 (XM_544986.2 和 XP_544986.2) (家犬 (*Canis lupus familiaris*)) 和 Cath1 (例如, U61149.1 和 AF467292.1) (*Gallus gallus*), 以及所有能用来指代这些蛋白的其他同义词,例如, atonal、atonal 同源物 1、Ath1 和螺旋-环-螺旋蛋白 Hath1。而且,在动物中可存在多个同源序列或相似序列。见,例如, GeneID :474 (智人)、GeneID :11921 (小家鼠)、GeneID :461380 (黑猩猩)、GeneID :500156 (褐鼠)、GeneID :704893 (猕猴)、GeneID :539158 (黄牛) 和 GeneID :487864 (家犬)。

[0076] 与人类 Atoh1 序列 (参见 Genbank Acc. Nos. NM_005172.1 和 NP_005163.1) 有显著序列相似性 (即,整条序列相似性大于 80%, 例如,至少是 85%、90%、95%、99% 或更高) 的任何序列都可以用于本方法。为了测定两条核酸序列同源性的百分比,为最优比较的目的,进行序列比对 (按照最优比对的目的是需要,将缺口引入第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者,并且为了达到比较的目的可以弃去非同源序列)。比对为了比较目的比对的参考序列的长度的至少 80% (在一些实施方案中,参考序列长度的大约 85%、90%、95% 或 100%)。然后比较相应的核苷酸位置的核苷酸。当占据第一条序列中的某个位置的核

苷酸,与第二条序列相应位置的核苷酸相同时,认为该分子在该位置是相同的。两条序列的同源性百分比是所述序列共享的相同位置的数目的函数,为了得到两条序列的最优比对,还需要将缺口的数目和每个缺口的长度考虑进去。

[0077] 两条序列的序列比较和同源性百分比的测定,可以用数学算法完成。例如,两条氨基酸序列间的同源性百分比可以用 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48 :444-453) 算法确定,该算法已经并入 GCG 软件包的 GAP 程序中,使用 Blossum 62 评分矩阵,缺口罚分 12、缺口延伸罚分 4,以及移码缺口罚分 5。

[0078] 化合物

[0079] 本发明提供能够增加细胞中 Atoh1 表达的化合物。在一些实施方案中,Atoh1 表达的增加是显著增加。在一些实施方案中,Atoh1 表达的增加可以是,例如,大约在基线以上 1-10%、11-20%、21-30%、31-40%、41-50%、51-60%、61-70%、71-80%、81-90%、91-100%、101-200%、201-300%、301-400%、401-500%、501-1000%、1001-10000%、10001-100000% 之间或更高。Atoh1 的增加也可以表示为成倍增加,例如,其中 100% 的增长是一倍增长,1000% 的增长是 10 倍增长等等。可选地或此外,Atoh1 表达的增加足以促进细胞的分化,例如,非听觉毛细胞(即,不是听觉毛细胞的细胞,例如,祖细胞或干细胞)分化成为或趋于听觉毛细胞。

[0080] 可用于本文所述的任何方法的化合物是酚类化合物(或它们的硫类似物,例如,苯基硫醇),或这些化合物衍生的化合物,如苯基醚(或硫醚),例如,直链或环状苯基醚。例如,这些化合物可以用图 1A-1H 中所示的那些结构一般表示,并且具体示例于图 1I-1K 中所示那些结构。任何酚类化合物(或硫类似物),可以是中性或盐的形式,例如,其锂盐、钠盐、钾盐或钙盐。

[0081] 这些酚类化合物及衍生物(或它们的硫类似物),由图 1A 中的结构表示,其中 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子且任选地包含一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;X 为 O(见图 1B) 或 S(见图 1C);而且 R_1 是 H 或包含至多 16 个碳原子且任选地包含一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如,包含至多 16 个碳原子且任选地包含一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分可以是烷氧基或三氟甲基。

[0082] 对于图 1D,在特定的实施方案中, R_1 和 R_2 共同定义一个或多个环系统,每个环系统包含至多 16 个碳原子且任选地包含一个或多个 N、O、S 或 F 原子。

[0083] 对于图 1E,在特定的实施方案中, R_1 是 H;即该化合物是酚类。

[0084] 对于图 1F-1H,在某些实施方案中,酚类衍生物是环醚衍生物。例如,可通过引入羰基(见图 1F)和/或碳-碳双键(见图 1G,其包含两者),使得分子的环醚部分变刚性。在其它实施方案中,可通过在环醚系统上引入第二环系统,使得这些环醚衍生物变刚性。在特定的实施方案中,图 1F 的结构代表环醚衍生物,其中 R_8 、 R_9 、 R_{10} 和 R_{11} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子且任选地包括一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。在其他特定的实施方案中,图 1G 的结构表示环醚衍生物,其中 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。在其他特定实施方案,图 1H 的结构表示环醚衍生物,其中 R_{14} 和 R_{15} 共同定义一个或多个环系统,每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分, R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多

个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0085] 本化合物是酰胺化合物和 / 或其相关化合物。这些化合物可以用图 2A-2F 所示的那些结构一般表示, 并且具体示例于图 2G-2I 中所示那些结构。任何所述酰胺或其相关化合物可以是中性或盐的形式。

[0086] 所述苯甲酰胺化合物和 / 或其衍生物可以用图 2A 的结构表示, 其中 R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 和 R_{24} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 并且 R_{24} 和 R_{26} 各自独立地为 H 或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0087] 在图 2A 的化合物中, R_{24} 和 R_{25} 可以共同定义一个或多个环系统, 每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子。这些化合物可以用图 2B 中的结构表示。例如, 这些化合物可以有如图 2C 和 2D 所示的结构, 其中 R_{27} 、 R_{28} 、 R_{29} 、 R_{31} 和 R_{32} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 且 R_{26} 是 H 或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0088] 其他苯甲酰胺相关的化合物及其衍生物, 由图 2E 和 2F 中的结构描述, 其中 R_{33} 、 R_{34} 、 R_{35} 、 R_{36} 和 R_{37} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; R_{39} 、 R_{40} 、 R_{41} 和 R_{42} 各自独立地为 H 或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0089] 本化合物是或可以包括, 一个或多个杂环系统, 如 3、4、5、6 或 7 元环系统, 该环系统包括一个以上杂原子, 如 O、S、或 N。例如, 一个或多个环系统可以包括 1、2、3、4 或甚至 5 个杂原子, 如 O、S 或 N。在许多实施方案中, 环系统是芳族。例如, 这些化合物可以用图 3A-3X 中所示的结构一般表示, 并且具体示例于图 3Y-3ZZ 中所示那些结构。是或包含一个或多个环系统的任何所述的化合物, 可以是中性或盐的形式。

[0090] 是或者包括一个或多个杂环系统的化合物如图 3A 的结构表示, 其中 R_{43} 和 R_{44} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 并且 X 为 O(图 3B) 或 S(图 3C)。

[0091] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物如图 3D 的结构表示, 其中 R_{45} 、 R_{46} 和 R_{48} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 而且 R_{47} 和 R_{49} 各自独立地为 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0092] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3E 的结构表示, 其中 R_{50} 、 R_{51} 、 R_{52} 和 R_{53} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 而且 X 为 O(图 3F) 或 S(图 3G)。

[0093] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3H 的结构表示, 其中 R_{55} 、 R_{56} 和 R_{57} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 而且 R_{54} 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如, 在具体实施方案中, R_{54} 和 R_{55} 可以共同定义一个或多个环系统, 每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个为 N、O、S 或 F 原子, 如图 3I 所示。

[0094] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3J 的结构表示, 其中 R_{57} 、 R_{59} 和 R_{60} 各

自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；而且 R₅₈ 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如，在具体实施方案中，R₅₈ 和 R₅₉ 可以共同定义一个或多个环系统，每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子，如图 3K 所示。例如，在具体实施方案中，R₅₇ 及 R₆₀ 可以共同定义一个或多个环系统，每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子，如图 3L 所示。例如，在具体实施方案中，R₅₇ 和 R₆₀ 与 R₅₈ 和 R₅₉ 可以共同每个定义一个或多个环系统，每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子，如图 3M 所示。

[0095] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3N 的结构表示，其中 R₆₁、R₆₂ 和 R₆₄ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；而且 R₆₃ 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如，在具体实施方案中，R₆₁ 和 R₆₂ 可以共同定义一个或多个环系统，每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子，如图 3O 所示。

[0096] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3P 中的结构表示，其中 R₆₅ 和 R₆₆ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；而且 X 为 O(图 3Q) 或 S(图 3R)。

[0097] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3S 中的结构表示。其中 R₆₇、R₆₈ 和 R₆₉ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；且 X 为 O(图 3T) 或 S(图 3U)。

[0098] 是或包含一个或多个杂环系统的化合物由图 3V 中的结构表示，其中 R₇₀、R₇₁ 和 R₇₂ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；且 X 为 O(图 3W) 或 S(图 3X)。

[0099] 可以在本文所述的任何方法中使用的本化合物，是或包含一个或多个苯环，如耦合苯环系统，例如，是类黄酮、香豆素或其他类似系统的一部分的耦合苯环系统。例如，这种化合物通常可以用图 4A-4G 所示的结构表示，并且具体示例于图 4H 和 4I 中所示的那些结构。是或包含一个或多个环系统的任何所述的化合物可以是中性或盐的形式。

[0100] 是或包含一个或多个苯环系统的化合物由图 4A 中的结构表示，其中 R₇₄、R₇₅、R₇₆、R₇₇、R₇₈ 和 R₇₉ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如，在具体实施方案中，R₇₆ 和 R₇₇ 可以共同定义一个或多个环系统，每个环系统包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个为 N、O、S 或 F 原子，如图 4B 所示。例如，图 4B 中的化合物可以用图 4C 和 4D 中的化合物表示，其中 R₈₁、R₈₂、R₈₃ 和 R₈₄ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如，在其他具体实施方案中，其中 R₇₆ 和 R₇₇ 共同定义一个或多个环系统，该化合物可以由图 4E-4G 中的那些结构表示，其中 R₈₅、R₈₆、R₈₇ 和 R₈₈ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分；且 R₈₉ 是 H 或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0101] 在一些实施方案中，可用于本文所述的任何方法的化合物，包含结合到五元杂环系统的酰胺基，例如，包含多于一个杂原子（如 O、S 或 N）的杂环系统。例如，一个或多个环系统可以包含 1、2、3、4 或甚至 5 个杂原子，如 O、S 或 N。在许多实施方案中，环系统是芳族。

例如,这种化合物通常可以图 5A-5E 中所示的那些结构表示,并且具体示例于图 5F-5G 中所示的那些结构。是或包含一个或多个环系统的任何所述的化合物可以是中性或盐的形式。

[0102] 在某些实施方案中,包含结合到五元杂环系统的酰胺基的化合物由图 5A 中的结构表示,其中 R_{92} 、 R_{93} 和 R_{94} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 R_{90} 和 R_{91} 各自独立地为 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 X 为 O(图 5B) 或 S(图 5C)。例如,在一些具体实施方案中, R_{90} 和 R_{91} 可以共同定义一个或多个环系统,其中包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分(见图 5D)。

[0103] 在其他某些实施方案中,包含结合到五元杂环系统的酰胺基的化合物由图 5E 中的结构表示,其中 R_{97} 和 R_{98} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;而且 R_{95} 、 R_{96} 和 R_{99} 各自独立地为 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0104] 在一些实施方案中,可用于本文所述任何方法的化合物,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统,如,定义一个或多个 4-、5-、6-、7- 或 8 元环系统的环系统。例如,这种化合物可以用图 6A-6O 所示的那些结构一般表示,并且具体示例于图 6P-6V 中所示那些结构。是或包含一个或多个环系统的任何所述的化合物,可以是中性或盐的形式。

[0105] 在一些实施方案中,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6A 表示,其中 R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 、 R_{103} 、 R_{104} 和 R_{105} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;而且 X 为 S(见图 6B) 或 O(见图 6C)。

[0106] 在其它实施方案中,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6D 表示,其中 R_{106} 、 R_{107} 、 R_{108} 、 R_{109} 、 R_{110} 、 R_{111} 、 R_{112} 、 R_{113} 、 R_{114} 和 R_{115} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 X 为 S(见图 6E) 或 O(见图 6F)。

[0107] 在某些实施方案中,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6G 表示,其中 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 、 R_{121} 、 R_{123} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 R_{123} 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0108] 在某些实施方案中,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6H 表示,其中 R_{124} 、 R_{125} 、 R_{126} 和 R_{127} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 R_{128} 和 R_{129} 共同定义一个或多个环,每个环包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子。例如,图 6H 中的化合物可用图 6I 表示,其中 R_{130} 、 R_{131} 、 R_{132} 和 $R_{128'}$ 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 $R_{129'}$ 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0109] 在其他某些实施方案中,包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6J 表示,其中 R_{134} 、 R_{135} 、 R_{136} 、 R_{137} 、 R_{140} 和 R_{141} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NO_2 、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分;且 R_{139} 是 H 或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。例如,并参考图 6K,在具

体的实施方案中, R_{140} 和 R_{141} 共同定义一个或多个环, 每个环包括包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子。

[0110] 在一些实施方案中, 包含融合到一个或多个其他环系统的五元杂环系统的化合物由图 6L 表示, 其中 R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 、 R_{146} 和 R_{147} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 而且 X 为 O (见图 6M) 或 S (见图 6N)。

[0111] 在另外一些实施方案中, 包含融合到一个或多个其他环的五元杂环系统的化合物由图 6O 表示, 其中 R_{149} 、 R_{150} 、 R_{151} 和 R_{152} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 且 R_{153} 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0112] 在一些实施方案中, 可用于本文所述的任何方法的化合物, 是吡啶或嘧啶。例如, 这种化合物可以用图 7A-7D 所示的结构一般表示, 并且具体示例于图 7E 和 7D 中所示那些结构。为吡啶或嘧啶的任何所述化合物, 可以是中性或盐的形式, 例如, 其盐酸盐。

[0113] 在一些实施方案中, 图 7A 描述了吡啶化合物, 其中 R_{155} 、 R_{156} 、 R_{157} 、 R_{159} 和 R_{160} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。在一些特定的实施方案中, R_{156} 和 R_{157} (见图 7B), 或 R_{156} 和 R_{157} 以及 R_{159} 和 R_{160} (见图 7C) 共同定义一个或多个环, 每个环包括包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子。

[0114] 在一些实施方案中, 图 7D 描述了嘧啶化合物, 其中 R_{161} 、 R_{162} 、 R_{163} 和 R_{164} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

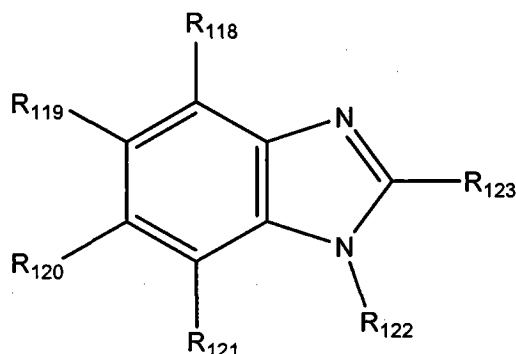
[0115] 在一些实施方案中, 可用于本文所述的任何方法的化合物是苯胺或苯胺衍生物。例如, 这种化合物可以用图 8A 和 8B 所示的那些结构一般表示, 并且具体示例于图 8C 中所示那些结构。为吡啶或嘧啶的任何所述化合物, 可以是中性或盐的形式。

[0116] 在一些实施方案中, 图 8A 描述了苯胺化合物, 其中 R_{170} 、 R_{171} 、 R_{172} 、 R_{173} 和 R_{174} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 且 R_{175} 和 R_{176} 各自独立地为 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0117] 在一些实施方案中, 图 8B 描述了苯胺衍生化合物, 其中 R_{178} 、 R_{179} 、 R_{180} 和 R_{181} 各自独立地为 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NO₂、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分; 且 R_{177} 是 H、或包含至多 16 个碳原子和任选地一个或多个 N、O、S 或 F 原子的部分。

[0118] 在一些实施方案中, 这些化合物可以具有图 6G 中描述的式:

[0119]



[0120] 在一些具体实施方案中：

[0121] R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中的每一个独立地选自 H、卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基和 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基；

[0122] R_{122} 是氢或 $-\text{Z}-\text{R}^a$ ；其中：

[0123] Z 是 O 或键；并且

[0124] R^a 是：

[0125] (i) $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 卤代烷基，它们每个由 1-3 个 R^b 任选地取代；或

[0126] (ii) $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 环烯基，它们每个被 1-5 个 R^c 任选地取代；或

[0127] (iii) $\text{C}_7\text{-C}_{11}$ 芳烷基，或包含 6-11 个原子的杂芳烷基，它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代；

[0128] (iv) $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基，它们每个由 1-5 个 R^d 任选地取代；

[0129] R_{123} 是：

[0130] (i) 氢；或

[0131] (ii) $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 烷基或 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 卤代烷基，它们每个由 1-3 个 R^b 取代；或

[0132] (iii) $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基，它们每个由 1-5 个 R^d 任选地取代；或

[0133] (iv) $\text{C}_7\text{-C}_{11}$ 芳烷基、或包含 6-11 个原子的杂芳烷基，它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代；或

[0134] (v) $-(\text{C}_1\text{-C}_6 \text{ 烷基})-\text{Z}^1-(\text{C}_6\text{-C}_{10} \text{ 芳基})$ ，其中 Z^1 是 O、S、NH 或 $\text{N}(\text{CH}_3)$ ；烷基部分由 1-3 个 R^b 任选地取代；并且芳基部分由 1-5 个 R^d 任选地取代；或

[0135] (vi) $-(\text{C}_1\text{-C}_6 \text{ 烷基})-\text{Z}^2-(\text{包含 } 5\text{-}10 \text{ 个原子的杂芳基})$ ，其中 Z^2 是 O、S、NH 或 $\text{N}(\text{CH}_3)$ ；烷基部分由 1-3 个 R^b 任选地取代；并且杂芳基部分由 1-5 个 R^d 任选地取代；或

[0136] $-(\text{C}_1\text{-C}_6 \text{ 烷基})-\text{Z}^3-(\text{C}_3\text{-C}_{10} \text{ 环烷基})$ ，其中 Z^3 是 O、S、NH 或 $\text{N}(\text{CH}_3)$ ；烷基部分由 1-3 个 R^b 任选地取代；并且环烷基部分由 1-5 个 R^c 任选地取代；

[0137] R_b 每次出现时，独立地是：

[0138] (i) NH_2 ； $\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$ ； $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})_2$ ；羟基； $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 卤代烷氧基；或

[0139] (ii) $\text{C}_3\text{-C}_7$ 环烷基由 1-3 个取代基任选地取代，取代基独立地选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 NH_2 ； $\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$ ； $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})_2$ ；羟基； $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 卤代烷氧基；

[0140] R^c 每次出现时,独立地是:

[0141] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基; C_1-C_6 卤代烷氧基; 或氧代; 或

[0142] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基; 以及

[0143] R^d 每次出现时,独立地是:

[0144] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; $-NHC(O)(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; 或氰基; 或

[0145] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基。

[0146] 实施方案可以包含下述特征中的一个或多个。

[0147] 变量 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121}

[0148] 在某些实施方案中, R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 每个都是氢。在其它实施方案中, 每个 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 独立地选自 H、卤代和 NO_2 。在又一其他的实施方案中, R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 之一 (例如, R_{120}) 是卤代、OH、CN、 NO_2 、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 卤代烷基、 C_1-C_3 烷氧基或 C_1-C_3 卤代烷氧基 (例如, 卤代, 如氯; 或 NO_2); 并且其他的是氢 (如 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中的一个 (如 R_{120}) 是卤代和 NO_2 , 而且其他的是氢)。

[0149] 变量 R_{122}

[0150] 在某些实施方案中, R_{122} 可以是 $-Z-R^a$ 。实施方案可以包含下述的特征中的一个或多个。

[0151] Z 可以是 0。

[0152] Z 可是键。

[0153] R^a 可以是:

[0154] (i) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基, 它们每个都可以由 1-3 个 R^b 任选地取代; 或

[0155] (iii) C_7-C_{11} 芳烷基或包含 6-11 个原子的杂芳烷基, 它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代。

[0156] 例如, R^a 可以是:

[0157] (i) C_1-C_6 烷基, 它们每个都可以由 1-3 个 R^b 任选地取代; 或

[0158] (iii) C_7-C_{11} 芳烷基, 其由 1-5 个 R^c 任选地取代。

[0159] R^a 可以是 C_7-C_{11} 芳烷基, 或包含 6-11 个原子的杂芳烷基, 它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代 (例如, 由 1-5 个 R^c 任选地取代的 C_7-C_{11} 芳烷基)。例如, R^a 可以是苄基或苯乙基, 其中苄基部分是由 1-5 (如 1-4、1-3、1-2、或 1 (如 1-2 或 1)) 个 R^c (例如, 卤 (如氯); C_1-C_6 烷氧基 (如, OCH_3); 或 C_1-C_6 烷基 (如, CH_3)) 任选地取代。在某些实施方案中, Z 可以是 0。

[0160] R^a 可以是 C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基, 它们每个由 1-3 个 R^b 任选地取代 (例如, 由 1-3 个 R^b 任选地取代的 C_1-C_6 烷基)。例如, R^a 可以是 CH_3 。在某些实施方案中, Z 可以是键。

[0161] 在某些实施方案中, R_{122} 可以是氢。

[0162] 变量 R_{123}

[0163] 在一些实施方案中, R_{123} 可以是:

[0164] (iii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^d 任选地取代; 或

[0165] (iv) C_7-C_{11} 芳烷基、或包含 6-11 个原子的杂芳烷基, 它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代; 或

[0166] (v) $-(C_1-C_6 \text{ 烷基})-Z^1-(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中 Z^1 是 O、S、NH 或 $N(CH_3)$; 烷基部分由 1-3 个 R^b 任选地取代; 且芳基部分由 1-5 个 R^d 任选地取代。

[0167] 例如, R_{123} 可以是:

[0168] (iii) 由 1-5 个 R^d 任选地取代的 C_6-C_{10} 芳基; 或

[0169] (iv) 由 1-5 个 R^c 任选地取代的 C_7-C_{11} 芳烷基; 或

[0170] (v) $-(C_1-C_6 \text{ 烷基})-Z^1-(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中 Z^1 是 O、S、NH 或 $N(CH_3)$; 烷基部分由 1-3 个 R^a 任选地取代; 且芳基部分由 1-5 个 R^d 任选地取代。

[0171] 在实施方案中, R_{123} 可以是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^d 任选地取代 (如, 由 1-5 个 R^d 任选地取代的 C_6-C_{10} 芳基)。例如, R_{123} 可以由 1-5 (如, 1-4、1-3、1-2 或 1) 个 R^d (如, C_1-C_6 烷氧基 (如, OCH_3)) 任选地取代的苯基。

[0172] 在实施方案中, R_{123} 可以是 C_7-C_{11} 芳烷基、或包含 6-11 个原子的杂芳烷基, 它们每个由 1-5 个 R^c 任选地取代 (如, 由 1-5 个 R^c 任选地取代的 C_7-C_{11} 芳烷基)。例如, R_{123} 可以是苄基或苯乙基, 其中苯基部分由 1-5 (如, 1-4、1-3、1-2 或 1) 个 R^c (例如, 卤代 (如氯); C_1-C_6 烷氧基 (如, OCH_3); C_1-C_6 烷基 (如, CH_3); NH_2 ; 或羟基) 任选地取代。

[0173] 在实施方案中, R_{123} 可以是 $-(C_1-C_6 \text{ 烷基})-Z^1-(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中 Z^1 是 O、S、NH 或 $N(CH_3)$; 烷基部分由 1-3 个 R^b 任选地取代; 并且芳基部分由 1-5 个 R^d 任选地取代。例如, R_{123} 可以是 $-(CH_2)-Z^1-(\text{苯基})$, 其中苯基部分由 1-5 (如 1-4、1-3、1-2 或 1) 个 R^d (例如, 卤代 (如氯); C_1-C_6 烷氧基 (如, OCH_3); C_1-C_6 烷基 (如, CH_3); NH_2 ; 或羟基) 任选地取代。

[0174] 该化合物的一个子集包括以下那些, 其中:

[0175] R_{122} 是 $-Z-R^a$, 其中 R^a 可以是 C_7-C_{11} 芳烷基, 或包含 6-11 个原子的杂芳烷基, 它们每个由 1-5 个 R^c (如, 由 1-5 个 R^c 任选地取代的 C_7-C_{11} 芳烷基, 例如苄基或苯乙基) 任选地取代; 以及

[0176] R_{123} 可以是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^d (例如, 由 1-5 个 R^d 任选地取代的 C_6-C_{10} 芳基, 例如苯基) 任选地取代。

[0177] 实施方案可以包括下述特征中的一个或多个:

[0178] R^c 和 R^d 可以如本文任何地方所定义。

[0179] Z 可以是 O。

[0180] R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中每个都是氢。在其他实施例中, R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 每一个独立地选自 H、卤代和 NO_2 。在另外其他的实施方案中, R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 、和 R_{121} 中的一个 (例如, R_{120}) 是卤代、OH、CN、 NO_2 、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 卤代烷基、 C_1-C_3 烷氧基或 C_1-C_3 卤代烷氧基 (如, 卤, 如氯; 或 NO_2); 并且其他的都是氢 (例如, R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} (例如, R_{120}) 中的一个) 是卤代或 NO_2 , 并且其他的都是氢; 例如, 其中一个是卤代 (如氯) 或硝基, 例如, 卤代 (如氯), 并且其他的都是氢。

[0181] 例如:

[0182] R_{122} 是 $-Z-R^a$, 其中 Z 是 O, 并且 R^a 是由 1-5 个 R^c 任选地取代的 C_7-C_{11} 芳烷基; 并且

[0183] R_{123} 是由 1-5 个 R^d 任选地取代得 C_6-C_{10} 芳基, 以及

[0184] R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中的每个都可以是氢; 或 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中的每个可以独

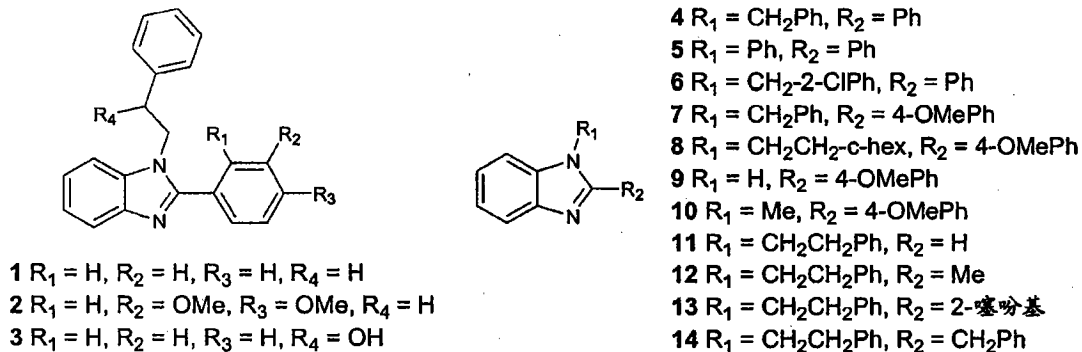
立地是卤代（如氯）或硝基，例如，卤代（如氯）；或 R_{118} 、 R_{119} 、 R_{120} 和 R_{121} 中的一个可以是卤代（如氯）或 NO_2 ，例如，卤代（如氯）；并且其他的都是氢。

[0185] 作为另一个实例，Z 是键，并且应用上述实例中的定义。

[0186] 具有图 6G 中所示的式的化合物的实例，包括：CP-0000489、CP-0000540、CP-0000550、CP-0000553、CP-0000554、CP-0000557、CP-0000571、CP-0047659、CP-0064483、CP-0066829、CP-0069961、CP-0074806、CP-0080773、CP-0091818、CP-0109953、CP-0105772 和 CP-0193184。

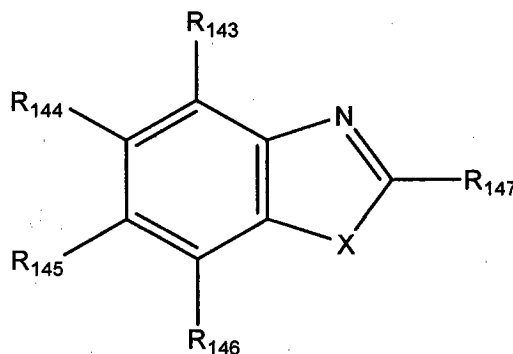
[0187] 具有图 6G 中所示的式的化合物的其他实例，包括：

[0188]



[0189] 在一些实施方案中，化合物可以有图 6L 中所示的式：

[0190]



[0191] 在一些实施方案中：

[0192] X 是 O 或 S；

[0193] R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146} 中的每一个独立地选自 H、卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基；以及 $\text{-NHC(O)(C}_1\text{-C}_3\text{ 烷基)}$ ；

[0194] R_{147} 是 NR^eR^f ，其中 R^e 和 R^f 中的一个为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基；并且 R^e 和 R^f 中的另一个是：

[0195] (i) -C(O)R^g ；其中 R^g 是 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基，它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代；或

[0196] (ii) $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基；

[0197] 或

[0198] R_{147} 是 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基，它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代；

[0199] 或

[0200] R_{147} 是 $\text{-SCH}_2\text{R}^i$ ，其中 R^i 是：

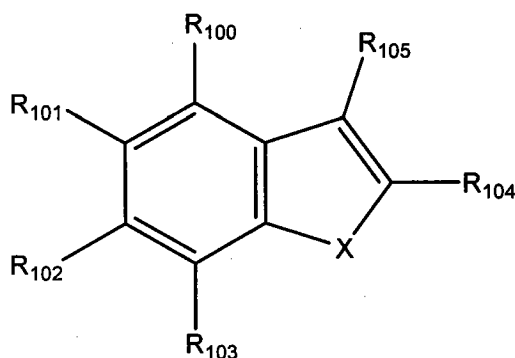
- [0201] (i) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代; 或
- [0202] (ii) $-C(O)NR^eR^f$, 其中 R^e 和 R^f 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基; 并且 R^e 和 R^f 中的另一个是 $-C(O)R^g$; 其中 R^g 是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代; 并且
- [0203] R^h 每次出现时, 独立地是:
- [0204] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 或氰基; 或
- [0205] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基。
- [0206] 实施方案可以包括下述特征中的一个或多个。
- [0207] 变量 X
- [0208] X 可以是 S。
- [0209] X 可以是 O。
- [0210] 变量 R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146}
- [0211] 在某些实施方案中, R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146} 的每个都是氢。在其他实施方案中, R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146} 之一是卤代、OH、CN、 NO_2 、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 卤代烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 C_1-C_3 卤代烷氧基; 或 $-NHC(O)(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; 并且其他都是氢。
- [0212] 变量 R_{147}
- [0213] 在某些实施方案中, R_{147} 可以是 NR^eR^f , 其中 R^e 和 R^f 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基 (例如, 氢); 并且 R^e 和 R^f 中的另一个是:
- [0214] (i) $-C(O)R^g$; 其中 R^g 是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代; 或
- [0215] (ii) C_1-C_3 烷基。
- [0216] 在实施方案中, R_{147} 可以是 NR^eR^f , 其中 R^e 和 R^f 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基 (例如, 氢); 并且 R^e 和 R^f 中的另一个是 $-C(O)R^g$; 其中 R^g 是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代。
- [0217] 通过实例, R^g 可以是苯基, 其由 1-5 (例如, 1-4, 1-3, 1-2 或 1) 个 R^h (例如, 卤代 (例如, 氯); C_1-C_6 烷氧基 (如, OCH_3); 或 C_1-C_6 烷基 (如, CH_3)) 任选地取代。
- [0218] 通过实例, R^g 可以是包含 5-6 个 (例如, 5 个) 原子的杂芳基, 其由 1-2 (例如 1) 个 R^h (例如, C_1-C_6 烷基 (如, CH_3)) 任选地取代。
- [0219] 在某些实施方案中:
- [0220] X 可以是 S; 并且
- [0221] R_{147} 可以是 NR^eR^f , 其中 R^e 和 R^f 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基 (例如, 氢); 并且 R^e 和 R^f 中的另一个是:
- [0222] (i) $-C(O)R^g$; 其中 R^g 是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代; 或
- [0223] (ii) C_1-C_3 烷基;
- [0224] (例如, R^e 和 R^f 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基 (例如, 氢); 并且 R^e 和 R^f 中的另一个是 $-C(O)R^g$; 其中 R^g 是 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^h 任选地取代)。

[0225] 在某些实施方案中, R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146} 每个都是氢。在其他实施方案中, R_{143} 、 R_{144} 、 R_{145} 和 R_{146} 之一是卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基;或 $-\text{NHC}(\text{O})$ ($\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基);并且其他都是氢。

[0226] 具有图 6L 中所示的式的化合物的实例包括:CP-0064917、CP-0067233、CP-0068578、CP-0103014、CP-0105777、CP-0107060、CP-0029300、CP-0079983 和 CP-0103978。

[0227] 在一些实施方案中,所述化合物可以具有图 6A 中所示的式:

[0228]



[0229] 在一些实施方案中:

[0230] X 是 O 或 S;

[0231] R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 和 R_{103} 中的每一个独立地选自 H、卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基;或

[0232] R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 和 R_{103} 中任意两个相邻对,和其连接的碳原子一起形成共包含 5 或 6 个环原子的稠合杂环;其中杂环是由独立地选自 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基和氧代的 1-3 个取代基任选地取代。

[0233] R_{104} 是 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^j\text{R}^k$, 其中 R^j 和 R^k 中的一个为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基;并且 R^j 和 R^k 中的另一个是:

[0234] (i) 由 5-6 杂环基任选地取代的 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基;或

[0235] (ii) 包含 5-6 个原子的杂芳基,其由 1-5 个取代基任选地取代,该取代基独立地选自卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基; $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $-\text{NHC}(\text{O})$ ($\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基);以及稠合 $\text{C}_5\text{-C}_6$ 环烷基环;

[0236] 或

[0237] R_{104} 是包含 5-6 个原子的杂芳基,其由 1-5 个取代基任选地取代,该取代基独立地选自卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基; $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $-\text{NHC}(\text{O})$ ($\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基);并且

[0238] R_{105} 是卤代或 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基。

[0239] 实施方案包括下述特征中的一个或多个。

[0240] 变量 X

[0241] X 可以是 S。

[0242] X 可以是 O。

[0243] 变量 R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 和 R_{103}

[0244] 在某些实施方案中, R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 和 R_{103} 中的每个都是氢。在其他的实施方案中, R_{100} 、 R_{101} 、 R_{102} 和 R_{103} 中的一个为卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基; 或 $-\text{NHC(O)}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$; 并且其他的是氢。

[0245] 变量 R_{104}

[0246] 在某些实施方案中, R_{104} 是 $-\text{C(O)NR}^j\text{R}^k$, 其中 R^j 和 R^k 中的一个为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基 (例如氢); 并且 R^j 和 R^k 中的另一个是:

[0247] (i) 由 5-6 杂环基任选地取代的 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基; 或

[0248] (ii) 包含 5-6 个原子的杂芳基, 其由 1-5 个取代基任选地取代, 该取代基独立地选自卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基; 氰基; $-\text{C(O)NH}_2$; $-\text{NHC(O)}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$; $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基; $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基; 以及稠合 $\text{C}_5\text{-C}_6$ 环烷基环。

[0249] 通过实例, R^j 和 R^k 中的一个为氢或 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基 (例如氢); 并且 R^j 和 R^k 中的另一个是包含 5-6 个原子的杂芳基, 其由 1-5 个取代基任选地取代, 该取代基独立地选自卤代、OH、CN、 NO_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷氧基; $-\text{C(O)NH}_2$; $-\text{NHC(O)}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$; 以及稠合 $\text{C}_5\text{-C}_6$ 环烷基环。

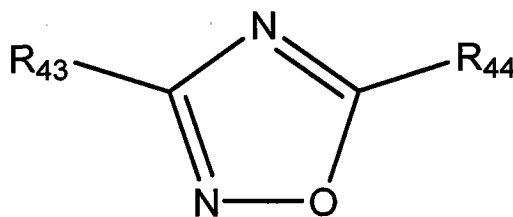
[0250] 变量 R_{105}

[0251] R_{105} 可以是氯或甲基。

[0252] 具有图 6A 中所示的式的化合物的实例, 包括: CP-0079175、CP-0087336、CP-0064314、CP-0068577 和 CP-0102404。

[0253] 在一些实施方案中, 化合物可具有图 3A 中所示的式:

[0254]



[0255] 在某些实施方案中:

[0256] R_{43} 是 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^m 任选地取代。

[0257] R_{44} 是:

[0258] (i) $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^m 任选地取代; 或

[0259] (ii) $-\text{Z}^4-(\text{C}_1\text{-C}_6 \text{ 烷基})$, 其中:

[0260] Z^4 是键或 NH; 并且

[0261] $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基由下述之一取代:

[0262] (a) 包含 5-6 个原子的杂环, 其由 1-3 个取代基任选地取代, 该取代基独立地选自氧代和 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基; 或

[0263] (b) 由 1-5 个 R^m 任选地取代的苯氧基; 且

[0264] R^m 每次出现时, 独立地是:

[0265] (i) 卤代; NH_2 ; $\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})$; $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 卤代烷氧基; 硝基; 或氰基; 或

[0266] (ii) $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 卤代烷基。

[0267] 实施方案包括下述特征中的一个或多个。

[0268] 变量 R_{43}

[0269] 在某些实施方案中, R_{43} 可以是 C_6-C_{10} 芳基, 其由 1-5 个 R^m 任选地取代。例如, R_{43} 可以是苯基, 其由 1-5 (例如, 1-4、1-3、1-2 或 1) 个 R^m (例如, C_1-C_6 烷基 (如 CH_3)) 任选地取代。

[0270] 在某些实施方案中, R_{43} 可以是包含 5-6 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^m 任选地取代。

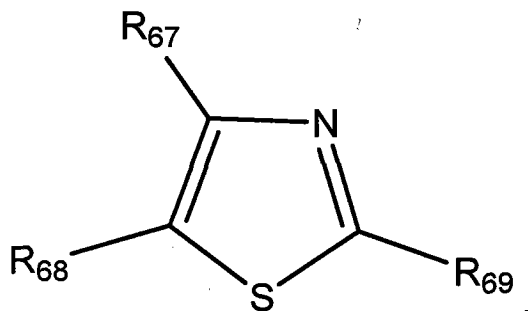
[0271] 变量 R_{44}

[0272] 在某些实施方案中, R_{44} 可以是 C_6-C_{10} 芳基, 其由 1-5 个 R^m 任选地取代。例如, R_{44} 可以是苯基, 其由 1-5 (例如, 1-4、1-3、1-2 或 1) 个 R^m (例如, 卤代 (如氯); C_1-C_6 烷氧基 (例如 OCH_3); 或 C_1-C_6 烷基 (例如 CH_3)) 任选地取代。

[0273] 具有图 3A 中所示的式的化合物包括: CP-0067108、CP-0067246、CP-0068395、CP-0068929、CP-0068961、CP-0070164、CP-0070367、CP-0079642、CP-0104904 和 CP-0130665。

[0274] 在某些实施方案中, 所述化合物可以有图 3U 所示的式:

[0275]



[0276] 在一些实施方案中:

[0277] R_{67} 和 R_{68} 每个独立地是:

[0278] (i) 氢;或

[0279] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^n 任选地取代;或

[0280] (iii) NH_2 ;或

[0281] (iv) $-C(O)(C_1-C_6 \text{ 烷基})$;

[0282] R_{69} 是 NR^oR^p , 其中 R^o 和 R^p 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基;并且 R^o 和 R^p 中的另一个是:

[0283] (i) 氢;或

[0284] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-6 个原子的杂芳基, 由 1-5 个 R^n 任选地取代;或

[0285] (iii) $-C(O)(C_1-C_6 \text{ 烷基})$, 其中 C_1-C_6 烷基由苯氧基取代, 该苯氧基由 1-5 个 R^n 任选地取代;

[0286] R^n 每次出现时, 独立地是:

[0287] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 或氰基; 或

[0288] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基; 或

[0289] (iii) 苯基。

[0290] 实施方案可以包括下述特征中的一个或多个。

[0291] 变量 R_{67} 和 R_{68}

[0292] 在某些实施方案中, R_{67} 和 R_{68} 中的一个为 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^n 任选地取代; 并且另一个是氢。

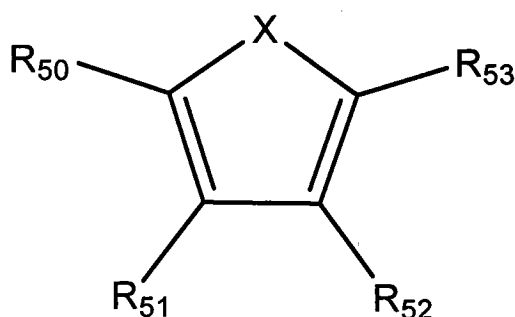
[0293] 变量 R_{69}

[0294] 在某些实施方案中, R^o 和 R^p 中的一个为氢或 C_1-C_3 烷基 (例如氢); 并且 R^o 和 R^p 中的另一个为 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-6 个原子的杂芳基, 其由 1-5 个 R^n 任选地取代。

[0295] 具有图 3U 中所示的式的化合物的例子, 包括: CP-0063182、CP-0071862、CP-0072036、CP-0105343、CP-0122949 和 CP-0134381。

[0296] 在某些实施方案中, 所述化合物可具有图 3E 中所示的式:

[0297]



[0298] 在一些实施方案中:

[0299] X 是 O 或 S;

[0300] R_{50} 和 R_{53} 每个独立地是:

[0301] (i) 氢; 或

[0302] (ii) $-C(O)R^q$; 或

[0303] (iii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^r 任选地取代;

[0304] 只要 R_{50} 和 R_{53} 中至少一个不是氢;

[0305] R_{51} 和 R_{52} 每个独立地是氢或卤;

[0306] R^q 是:

[0307] (i) C_1-C_6 烷基; 或

[0308] (ii) $-NR^sR^t$, 其中:

[0309] (a) R^s 和 R^t 中的一个为氢, 并且另一个为 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^r 任选地取代; 由苯氧基取代的 C_1-C_6 烷基, 该苯氧基由 1-5 个 R^r 任选地取代; 或 $-O-N=C(NH_2)(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中芳基部分由 1-5 个 R^r 任选地取代; 或

[0310] (b) R^s 和 R^t 与各自连接的氮原子一起形成一个包含 5-6 个原子的杂环; 或

[0311] (iii) $-NH-C(O)(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中芳基部分由 1-5 个 R^r 任选地取代; 并且

[0312] R^r 每次出现时, 独立地是:

[0313] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 或氰基; 或

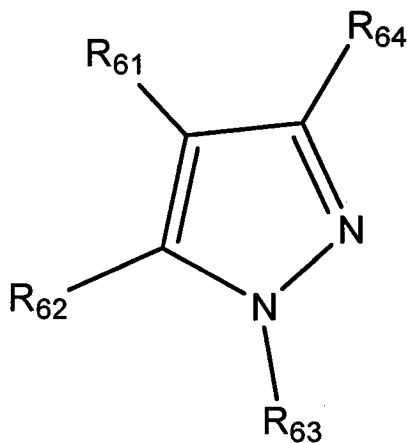
[0314] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基。

[0315] 在某些实施方案中, R_{50} 和 R_{53} 中的一个是一 $-C(O)R^q$; 而且 R_{50} 和 R_{53} 中的另一个是氢或 C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^r 任选地取代。在一些实施方案中, R^q 可以是 $-NR^sR^t$ 。

[0316] 具有图 3E 中所示的式的化合物的实例, 包括: CP-0061777、CP-0066008、CP-0072253、CP-0099289、CP-0008545、CP-0060852、CP-0072156、CP-0072271、CP-0104766 和 CP-0110352。

[0317] 在某些实施方案中, 所述化合物有图 3N 中所示的式:

[0318]



[0319] 在一些实施方案中:

[0320] R_{61} 、 R_{62} 和 R_{64} 每个独立地是:

[0321] (i) 氢;或

[0322] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^u 任选地取代;或

[0323] (iii) $-NH-C(O)(C_6-C_{10} \text{ 芳基})$, 其中芳基部分由 1-5 个 R^u 任选地取代;或

[0324] (iv) $-C(O)NR^vR^w$, 其中 R^v 和 R^w 中的一个为氢;并且 R^v 和 R^w 中的另一个是 C_6-C_{10} 芳基, 其由 1-5 个 R^u 任选地取代;或 C_7-C_{11} 芳烷基由氧代任选地取代;或

[0325] (v) NH_2 或羟甲基;

[0326] R_{63} 是:

[0327] (i) 氢;或

[0328] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个 R^u 任选地取代;或

[0329] (iii) C_1-C_6 烷基;以及

[0330] R^u 每次出现时, 独立地是:

[0331] (i) 卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 或氰基; 或

[0332] (ii) C_1-C_6 烷基或 C_1-C_6 卤代烷基。

[0333] 在某些实施方案中, R_{61} 、 R_{62} 和 R_{64} 中的两个不是氢。

[0334] 具有图 3N 中所示的式的化合物的实例包括: CP-0000477、CP-0063375、CP-0064231、CP-0065105、CP-0070844、CP-0070886 和 CP-0104765。

[0335] 在某些实施方案中, 所述化合物可以具有图 3V 中所示的式。

[0336] 在某些实施方案中, R_{70} 可以是如本文任何地方所述的酰胺 (即具有通式 $-C(O)NRR'$) 或反式酰胺 (即具有通式 $-NR''C(O)R'''$)。

[0337] 在某些实施方案中, R_{71} 可以是氢。

[0338] 在某些实施方案中, R_{72} 可以是:

[0339] (i) C_1-C_6 烷基;或

[0340] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个取代基任选地取代, 该取代基独立地选自卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 氰基; C_1-C_6 烷基; 和 C_1-C_6 卤代烷基。

[0341] 具有图 3V 中所示的式的化合物的实例包括: CP-0065665、CP-0075627 和 CP-0075656。

[0342] 在某些实施方案中, 所述化合物可以具有图 7D 所示的式。

[0343] 在某些实施方案中, 嘧啶环可以由 1-2 个取代基取代, 该取代基独立地选自:

[0344] (i) 包含 5-6 个原子的杂环基;或

[0345] (ii) C_6-C_{10} 芳基或包含 5-10 个原子的杂芳基, 它们每个由 1-5 个取代基任选地取代, 该取代基独立地选自卤代; NH_2 ; $NH(C_1-C_3 \text{ 烷基})$; $N(C_1-C_3 \text{ 烷基})_2$; 羟基; C_1-C_6 烷氧基或 C_1-C_6 卤代烷氧基; 硝基; 氰基; C_1-C_6 烷基; 和 C_1-C_6 卤代烷基。

[0346] 在其他实施方案中, 嘧啶环可以由稠环取代。

[0347] 具有图 7D 中所示的式的化合物的实例包括: CP-0059547、CP-0059563、CP-0059642、CP-0064382、CP-0067053、CP-0072720 和 CP-0079810。

[0348] 在某些实施方案中, 所述化合物可以有图 7A 中所示的式。

[0349] 在某些实施方案中, 吡啶环可以由如本文任何地方所述的酰胺或反式酰胺取代。

[0350] 在其他实施方案中, 嘧啶环可以由一个或多个稠环取代。

[0351] 具有图 7A 中所示的式的化合物的实例包括: CP-0060729、CP-0066751、CP-0069934、CP-0076627、CP-0080276、CP-0089966、CP-0029278 和 CP-0130586。

[0352] 任何本文所述化合物的混合物也可以用于本文所述的任何方法。

[0353] 合成方法

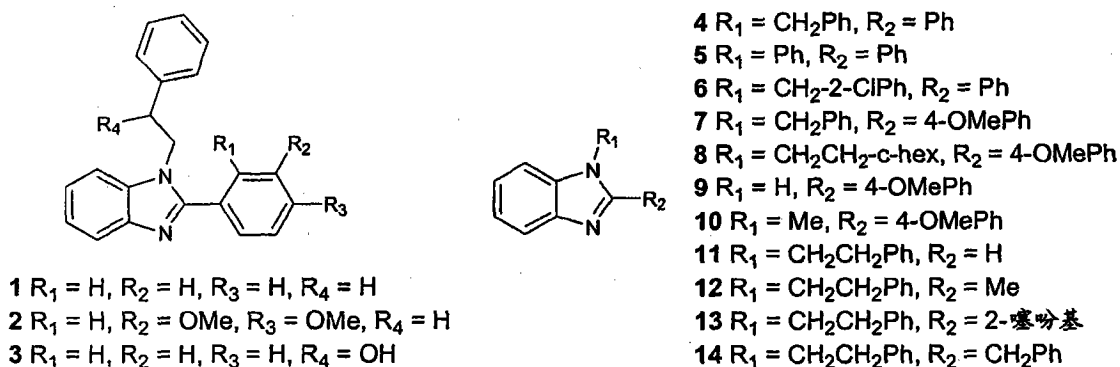
[0354] 本发明的化合物可以通过商业途径从供应商处获得, 所述供应商如 Bionet、Maybridge、Chemdiv、ChemBridge、Peakdale、IFLAB/Life Chemicals、Enamine、Microsource 或 Timtec。可选地或此外, 可根据本文所述的方法 (或其变化方法) 和 / 或传统方法有机化学法合成从商业上可获得的起始原料和试剂, 或可根据传统化学合成方法制备的起始原料和试剂合成本文所述的化合物。此处所述的化合物可以从反应混合物中分离, 并通过如柱色谱法, 高效液相色谱法 (HPLC), 或重结晶进一步纯化。如本领域技术人员所了解, 合成本文的式的化合物的进一步方法对于该领域的技术人员是明显的。此外, 各种合成步骤可能以交替次序或顺序施行以便提供所需的化合物。用于合成本文所述的化合物的合成化学转化和保护基团的方法 (保护和脱保护) 是本领域已知的, 并且包括, 例如, 由下述文献中所描述的那些, Larock, Comprehensive Organic Transformations (综合有机转化), 第 2 版., Wiley-VCH Publishers (1999); Wuts 和 Greene, Protective Groups in Organic Synthesis (有机合成中的保护基), 第 4 版, John Wiley and Sons (2007); Fieser 和 Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis (用于有机

合成的 Fieser 的试剂), John Wiley and Sons(1994); 和 Paquette 等人, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis(有机合成试剂百科全书), John Wiley and Sons(1995), 以及其后续版本。

[0355] 包含苯并咪唑的化合物

[0356] 具有图 6G 所示的式的化合物可以从市场上获得或用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0000489、CP-0000540、CP-0000550、CP-0000553、CP-0000554、CP-0000557、CP-0000571、CP-0047659、CP-0064483、CP-0066829、CP-0069961、CP-0074806、CP-0080773、CP-0091818、CP-0105772 和 CP-0109953 是从表 1 提供的供应商(条目 1-17)处商业获得。本公开内容中所述的其他苯并咪唑 1-14(方案 1)可以从市场上获得。

[0357]



方案 1

[0358] 具有图 6G 中所示的式的其他化合物可以由例如, 用 Kokare 等人, Protein & Peptide Letters, 14:259-263, 2007 所述的化学法得到, 该文献描述了 CP-0000540 的合成。将变化引入到该分子的特定部分的苯并咪唑类似物, 可使用良好建立的化学法根据方案 2 制备。在 1H-苯并咪唑中间体商业上可得到的情况下, 可以实施烷基化反应以引入所述 R_1 取代基(路线 A)。商业化的苯并咪唑的其他加工, 可用于在分子的不同位置装入不同的取代基。然而, 对于不对称取代的 1H-苯并咪唑, 其他两个路线都可以使用。在 R_3 是吸电子基团的情况, 2-氟硝基苯的亲核芳族取代可用于提供 2-氨基硝基苯中间体(路线 B)。对于其他类似物, 可进行引入 R_1 基团的 2-氨基硝基苯(路线 C)的烷基化以提供同样的中间体。从硝基到氨基的还原可以通过已建立好的还原方法实施。这种 1,2-二胺与醛的氧化环化或与羧酸的缩合将提供所需的苯并咪唑类似物。

[0359] 错误! 目标不能通过编辑域代码产生。

[0360] 方案 2: 苯并咪唑类似物的合成

[0361] 包含苯并噻唑的化合物

[0362] 具有图 6L 所示的式的化合物 ($X = S$) 可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0064917、CP-0067233、CP-0068578、CP-0103014、CP-0105777 和 CP-0107060 从表 1 提供的供应商(条目 18-23)处商业获得。例如, 通过用劳森试剂环化邻卤代苯甲酰胺或通过氧化硫代苯胺, 可以得到具有图 6L 所示的式的化合物 ($X = S$)。例如, 用 Song 等人, Eur. J. Med. Chem. 43(7):1519-1524, 2008 所述的化学法, 也可以得到具有图 6L 所示的式的其他化合物 ($X = S$)。

[0363] 包含苯并噁唑的化合物

[0364] 具有图 6L 所示的式的化合物 ($X = O$) 可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0029300、CP-0079983 和 CP-0103978 从表 1 提供的供应商 (条目 24-27) 处商业获得。例如, 用 Boyd, *Sci. Synth.* 11 :481-492, 2002 所述的化学法, 也可以得到具有图 6L 所示的式的其他化合物 ($X = O$)。

[0365] 包含喹唑啉酮的化合物

[0366] 图 2G 中包括的喹唑啉酮衍生物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0034360 和 CP-0036187 从表 1 提供的供应商 (条目 27-28) 处商业获得。例如, 用 Connolly 等人, *Tetrahedron* 61 (43) :10153-10202, 2005 所述的化学法, 也可以得到具有图 2C(G) 所示的式的其他化合物。

[0367] 包含苯并咪唑并嘧啶的化合物

[0368] 具有图 6I 所示的式的苯并咪唑并嘧啶化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0050095 和 CP-0131763 从表 1 提供的供应商 (条目 29-30) 处商业获得。

[0369] 包含苯并呋喃的化合物

[0370] 具有图 6A 所示的式的化合物 ($X = O$) 可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0079175 和 CP-0087336 从表 1 提供的供应商 (条目 31-32) 处商业获得。例如, 用 Hou 等人, *Progress in Heterocyclic Chemistry* 17 :142-171, 2005 所述的化学法, 也可以得到具有图 6A 所示的式的其他化合物 ($X = O$)。

[0371] 包含苯并噻吩的化合物

[0372] 具有图 6A 所示的式的化合物 ($X = S$) 可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0064314、CP-0068577 和 CP-0102404 从表 1 提供的供应商 (条目 33-35) 处商业获得。例如, 用 Bravo 等人, *J. Heterocyclic Chem.*, 7 (4) :967-8, 1970, 或 Rayner 等人, *Sci. Synth.* 10 :155-181, 2005 所述的化学法, 也可以得到具有图 6A 所示的式的其他化合物 ($X = S$)。

[0373] 包含吲哚的化合物

[0374] 具有图 6J 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0010539、CP-0072096、CP-0078448 和 CP-0103978 从表 1 提供的供应商 (条目 36-38) 处商业获得。具有图 6J 所示的式的其他化合物也可以得到, 例如, 使用 Humphrey 等人, *Chem. Rev.*, 106 (7) :2875-2911, 2006 所述的化学法。

[0375] 包含喹啉的化合物

[0376] 图 7E 和 7F 中包括的喹啉衍生物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0072092 和 CP-0087799 从表 1 提供的供应商 (条目 39-40) 处商业获得。其他喹啉化合物也可以得到, 例如, 使用 Larsen 等人, *Sci. Synth.* 15 :389-549, 2005 所述的化学法。

[0377] 包含苯并三唑的化合物

[0378] 具有图 6O 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0009883 和 CP-0070871 从表 1 提供的供应商 (条目 41-42) 处商业获得。具有图 6O 所示的式的其他化合物也可以得到, 例如, 使用 Katritzky 等人, *Chem. Rev.* 98 (2) :

409-548, 1998 所述的化学法。

[0379] 本发明中的包含香豆素、苯并吡喃、四氢喹啉、苯并吡喃酮和苯并吡嗪的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 图 1 中包含的化合物 CP-0063508、CP-0000928、CP-0005069、CP-0096433 和 CP-0045061 从表 1 提供的供应商 (条目 43-47) 处商业获得。包含香豆素、苯并吡喃、四氢喹啉、苯并吡喃酮和苯并吡嗪的其他化合物可以得到, 例如, 使用 Borges 等人., *Curr. Med. Chem.* 12 (8) :887-916, 2005 ;Schweizer 等人, *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 31 :11-139, 1977 ;Katritzky 等人, *Tetrahedron* 52(48) :15031-15070, 1996 ;Williams 等人, *Sci. Synth.* 14 :347-638, 2003 ;Kress 等人, *Progress in Heterocyclic Chemistry* 4 :186-203, 1992 所述的化学法。

[0380] 包含吡啶的化合物

[0381] 具有图 7A 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0060729、CP-0066751、CP-0069934、CP-0076627、CP-0080276、CP-0089966、CP-0029278 和 CP-0130586 从表 1 提供的供应商 (条目 48-55) 处商业获得。具有图 7A 所示的式的其他化合物也可以得到, 例如, 使用 Li 等人, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 17 (8) : 2347-2350, 2007, 或 Spitzner 等人, *Sci. Synth.* 15 :11-255, 2005 中所述的化学法。

[0382] 包含嘧啶的化合物

[0383] 具有图 7D 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0059547、CP-0059563、CP-0059642、CP-0064382、CP-0067053、CP-0072720 和 CP-0079810 从表 1 提供的供应商 (条目 56-62) 处商业获得。具有图 7D 所示的式的其他化合物也可以得到, 例如, 使用 Luo 等人, *Tetrahedron Lett.* 43 (33) , 5739-5742, 2002, 或 von Angerer 等人, *Sci. Synth.* 16 :379-572, 2004 所述的化学法。

[0384] 包含呋喃的化合物

[0385] 具有图 3E (X = O) 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0061777、CP-0066008、CP-0072253 和 CP-0099289 从表 1 提供的供应商 (条目 63-66) 处商业获得。具有图 3E 所示的式的其他化合物 (X = O) 也可以得到, 例如, 使用 Kort 等人, *J. Med. Chem.* 51 (3) :407-416, 2008, 或 Konig 等人., *Sci. Synth.* 9 :183-286, 2001 所述的化学法。

[0386] 包含噻吩的化合物

[0387] 具有图 3E (X = S) 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0008545、CP-0060852、CP-0072156、CP-0072271、CP-0104766 和 CP-0110352 从表 1 提供的供应商 (条目 67-72) 处商业获得。具有图 3E 所示的式的其他化合物 (X = S) 也可以得到, 例如, 使用 Kaizerman 等人, *J. Med. Chem.* 46 (18) :3914-3929, 2003 或 Schatz 等人, *Sci. Synth.* 10 :287-392, 2001 所述的化学法。

[0388] 包含噻唑的化合物

[0389] 具有图 3U 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如, 化合物 CP-0063182、CP-0071862、CP-0072036、CP-0105343、CP-0122949 和 CP-0134381 从表 1 提供的供应商 (条目 73-78) 处商业获得。具有图 3U 所示的式的其他化合物也可以得到, 例如, 使用 Narayana 等人, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements* 181 (6) :1381-1389, 2006, 或 Kikelj 等人, *Sci. Synth.* 11 :627-806, 2002 所述的化学法。

[0390] 包含吡啶的化合物

[0391] 具有图 3N 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如，化合物 CP-0000477、CP-0063375、CP-0064231、CP-0065105、CP-0070844、CP-0070886 和 CP-0104765 从表 1 提供的供应商（条目 79-85）处商业获得。具有图 3N 所示的式的其他化合物也可以得到，例如，使用 McKeown 等人，*Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 16(18) :4767-4771, 2006, 或 Stanovnik 等人，*Sci. Synth.* 12 :15-226, 2003 所述的化学法。

[0392] 包含异噻唑的化合物

[0393] 具有图 3V 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如，化合物 CP-0065665、CP-0075627 和 CP-0075656 从表 1 提供的供应商（条目 86-88）处商业获得。具有图 3V 所示的式的其他化合物也可以得到，例如，使用 Wakefield, *Sci. Synth.* 11 : 229-288, 2002 所述的化学法。

[0394] 包含噁二唑的化合物

[0395] 具有图 3A 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如，化合物 CP-0067108、CP-0067246、CP-0068395、CP-0068929、CP-0068961、CP-0070164、CP-0070367、CP-0079642、CP-0104904 和 CP-0130665 从表 1 提供的供应商（条目 89-98）处商业获得。具有图 3A 所示的式的其他化合物也可以得到，例如，使用 Grant 等人，*J. Org. Chem.* 73(18) :7219-7223, 2008, 或 Hemming 等人，*Sci. Synth.* 13 :127-184, 2004 所述的化学法。

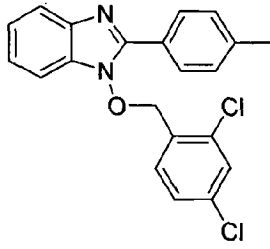
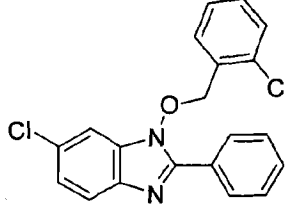
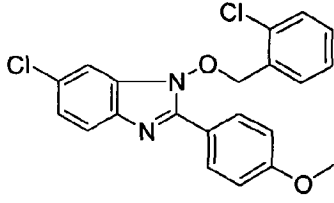
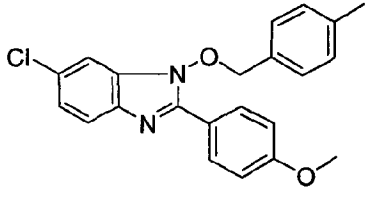
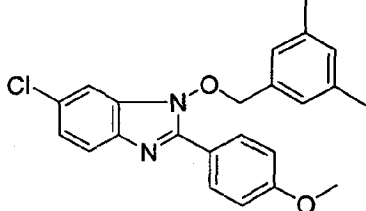
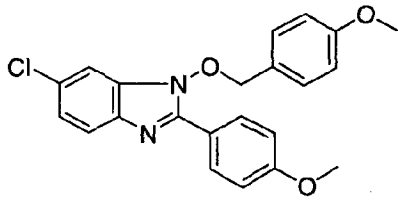
[0396] 包含苯甲酰胺的化合物

[0397] 具有图 2A 所示的式的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如，化合物 CP-0005186、CP-0007991 和 CP-0061566 从表 1 提供的供应商（条目 99-101）处商业获得。具有图 2A 所示的式的其他化合物也可以使用本领域技术人员熟知的方法得到，例如，通过相应的苯甲酸和胺的缩合。

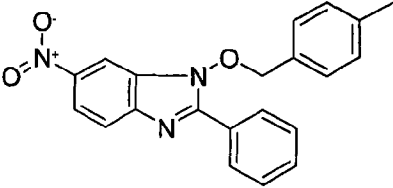
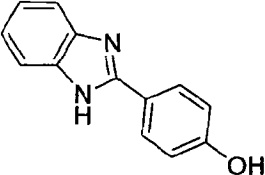
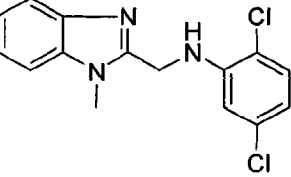
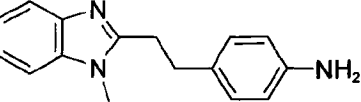
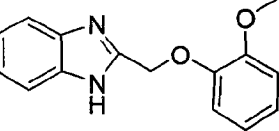
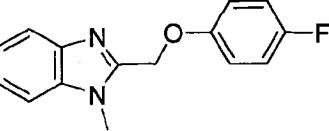
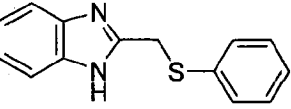
[0398] 包含 1,3,4-噁二唑、三唑啉、吡唑啉、二氢吡啶酮、三唑、吲哚啉和咪唑并三嗪的化合物可以从市场上获得或使用传统合成方法合成。例如，化合物 CP-0062030、CP-0007994、CP-0039073、CP-0004116、CP-0061401、CP-0064286、CP-0110644 和 CP-0051092 从表 1 提供的供应商（条目 102-109）处商业获得。

[0399] 表 1

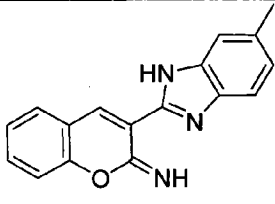
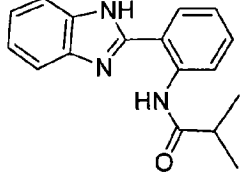
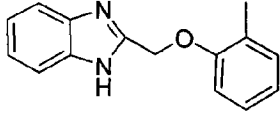
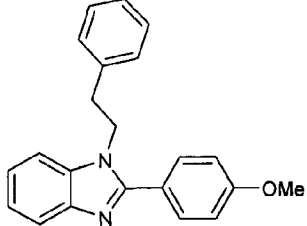
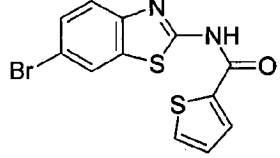
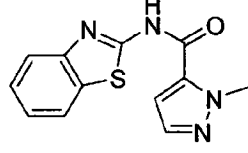
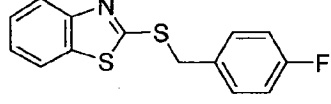
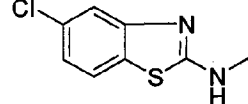
[0400]

化合物	结构	条目编号和命名 ⁴	供应商 (供应商 ID)
CP-00 00489		1. 4-(4-氯苯基)-1-(5H-咪唑并[5,4-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-胺	BIONET (bionet-7F-307 S)
CP-00 00540		2. 6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-9F-327 S)
CP-00 00550		3. 6-氯-1-(2-氯苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-10F-31 0S)
CP-00 00553		4. 6-氯-2-(4-甲氧基苯基)-1-(4-甲基苄氧基)-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-10F-32 4S)
CP-00 00554		5. 6-氯-1-(3,5-二甲基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-10F-32 5S)
CP-00 00557		6. 6-氯-1-(4-甲氧基苄氧基)-2-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-10F-35 0S)

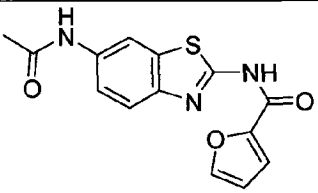
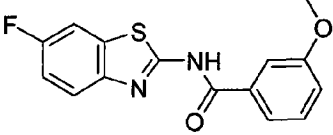
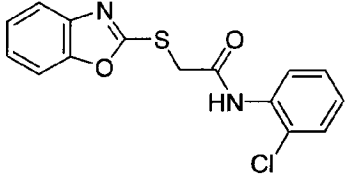
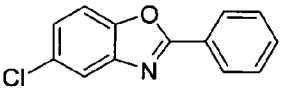
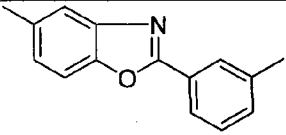
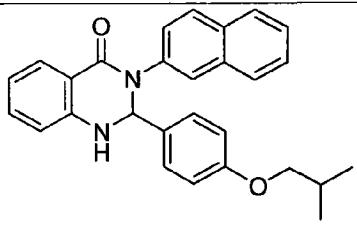
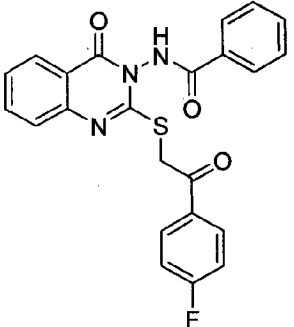
[0401]

		咪唑	
CP-00 00571		7. 1-(4-甲基苄氧基)-6-硝基-2-苯基-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet-11F-314S)
CP-00 47659		8. 4-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯酚	CHEMDIV (4385-2057)
CP-00 64483		9. 2,5-二氯-N-((1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)甲基)苯胺	CHEMDIV (3546-0621)
CP-00 66829		10. 4-(2-(1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)乙基)苯胺	CHEMDIV (4432-2284)
CP-00 69961		11. 2-((2-甲氧基苯氧基)甲基)-1H-苯并[d]咪唑	CHEMDIV (G856-0617)
CP-00 74806		12. 2-((4-氟苯氧基)甲基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑	CHEMDIV (C147-0180)
CP-00 80773		13. 2-(苯基硫代甲基)-1H-苯并[d]咪唑	BIONET (bionet_8J-311S)

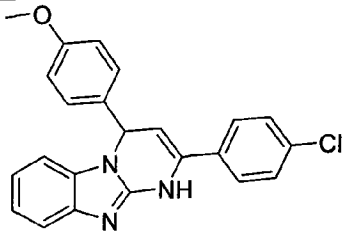
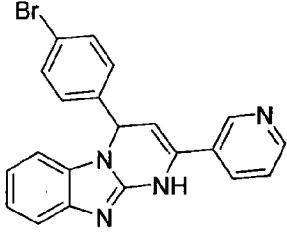
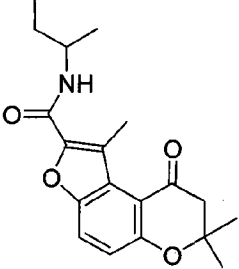
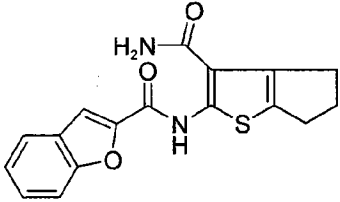
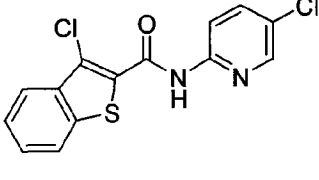
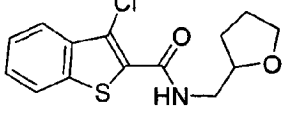
[0402]

CP-00 91818		14. 3-(6-甲基-1H-苯并[d]咪唑-2-基)-2H-色烯-2-亚胺	CHEMDIV (4285-2380)
CP-01 05772		15. N-(2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基)异丁酰胺	IFLAB/LIFEC HEMICALS (F0015-0753)
CP-01 09953		16. 2-(邻甲苯氧基甲基)-1H-苯并[d]咪唑	CHEMDIV (6286-0428)
CP-01 93184		17. 2-(4-甲氧基苯基)-1-苄基-1H-苯并[d]咪唑	LDDN
CP-00 64917		18. N-(6-溴苯并[d]噻唑-2-基)噻吩-2-甲酰胺	CHEMDIV (3769-2060)
CP-00 67233		19. N-(苯并[d]噻唑-2-基)-1-甲基-1H-吡唑-5-甲酰胺	CHEMDIV (4487-0569)
CP-00 68578		20. 2-(4-氟苄基硫代)苯并[d]噻唑	CHEMDIV (5222-1038)
CP-01 03014		21. 5-氯-N-甲基苯并	MAY-BRIDGE (RF04015)

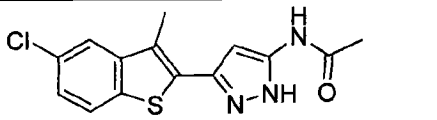
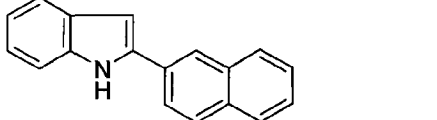
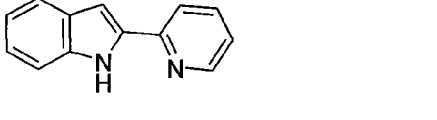
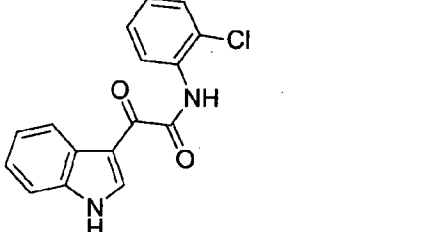
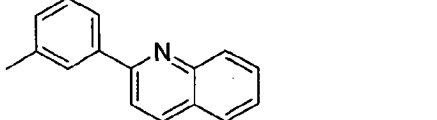
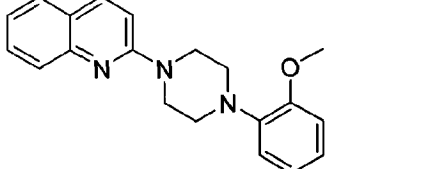
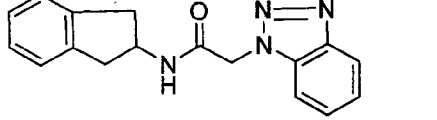
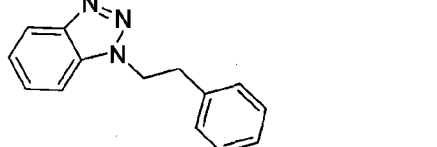
[0403]

		[d]噻唑-2-胺	
CP-01 05777		22. N-(6-乙酰氨基苯并[d]噻唑-2-基)呋喃-2-甲酰胺	IFLAB/LIFE-C HEMICALS (F0018-0056)
CP-01 07060		23. N-(6-氟苯并[d]噻唑-2-基)-3-甲氧基苯甲酰胺	IFLAB/LIFEC HEMICALS (F0412-0020)
CP-00 29300		24. 2-(苯并[d]噻唑-2-基硫代)-N-(2-氯苯基)乙酰胺	CHEMDIV (3627-0019)
CP-00 79983		25. 5-氯-2-苯基苯并[d]噻唑	CHEMDIV (K780-0060)
CP-01 03978		26. 5-甲基-2-间甲苯基苯并[d]噻唑	MAY-BRIDGE (S15553)
CP-00 34360		27. 2-(4-异丁氧基苯基)-3-(萘-2-基)-2,3-二氢喹唑啉-4(1H)-酮	CHEMDIV (8008-6354)
CP-00 36187		28. N-(2-(2-(4-氟苯基)-2-氧代乙基硫代)-4-氧代喹唑啉-3(4H)-基)苯甲酰胺	CHEMDIV (K284-2447)

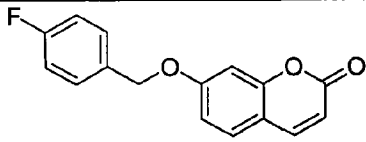
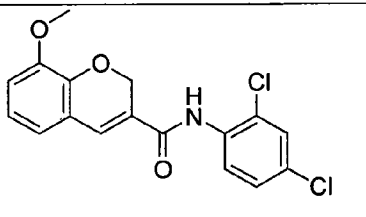
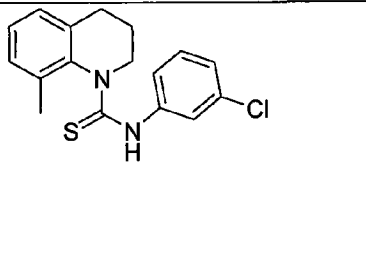
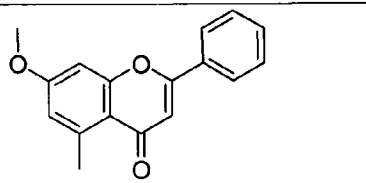
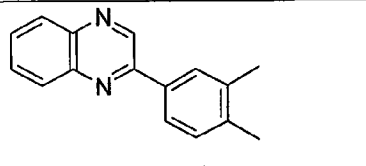
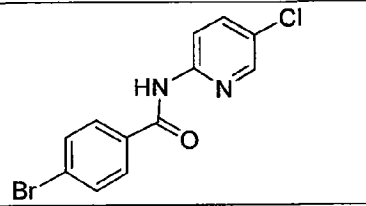
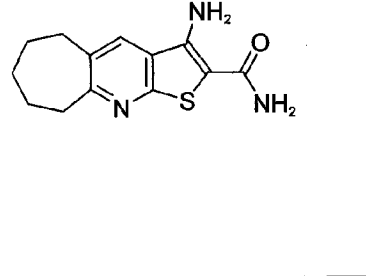
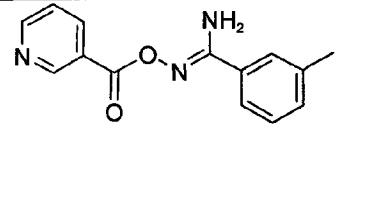
[0404]

CP-00 50095		29. 2-(4-氯苯基)-4-(4-甲氧基苯基)-1,4-二氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]嘧啶	CHEMDIV (K832-2696)
CP-01 31763		30. 2-(3-吡啶基)-4-(4-溴苯基)-1,4-二氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]嘧啶	CHEMDIV (K832-2426)
CP-00 79175		31. N-仲丁基-1,7,7-三甲基-9-氧代-8,9-二氢-7-小时-呋喃并[3,2-f]色烯-2-甲酰胺	CHEMDIV (C795-0478)
CP-00 87336		32. N-(3-氨基甲酰基-5,6-二氢-4H-环戊二烯并[b]噻吩-2-基)吲哚-2-甲酰胺	ENAMINE (T0516-9815)
CP-00 64314		33. 3-氯-N-(5-氯吡啶-2-基)苯并[b]噻吩-2-甲酰胺	CHEMDIV (3616-0520)
CP-00 68577		34. 3-氯-N-((四氢呋喃-2-基)甲基)苯并[b]噻吩-2-甲酰胺	CHEMDIV (5067-0367)

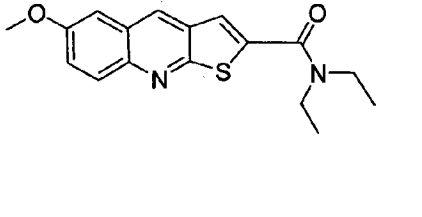
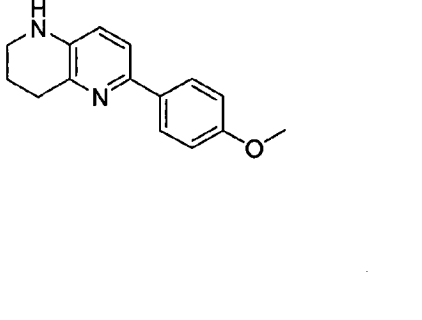
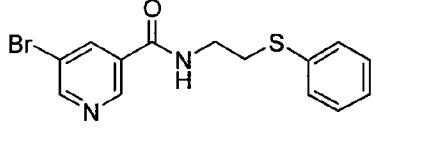
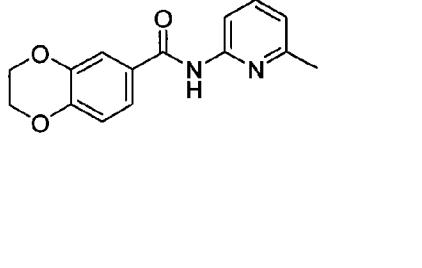
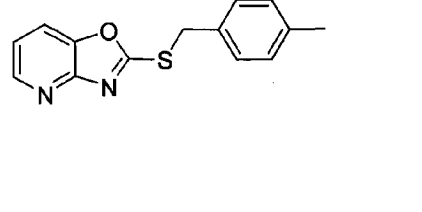
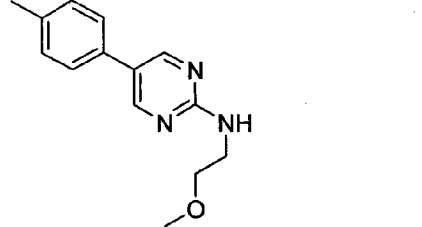
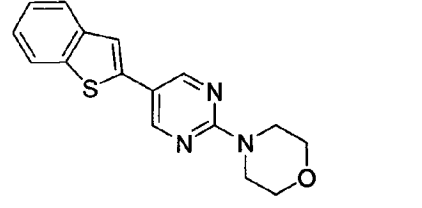
[0405]

CP-01 02404		35. N-(3-(5-氯-3-甲基 苯并[b]噻吩-2- 基)-1H-吡唑-5基) 乙酰胺	MAY-BRIDGE (MWP00596)
CP-00 10539		36. 2-(萘-2-基)-1H-咪 唑	MAY-BRIDGE (RDR01160)
CP-00 72096		37. 2-(吡啶-2-基)-1H- 咪唑	CHEMDIV (8005-4453)
CP-00 78448		38. N-(2- 氯 苯 基)-2-(1H-咪唑-3 基)-2-氧代乙酰胺	CHEMDIV (C730-0133)
CP-00 72092		39. 2-间甲基喹啉	CHEMDIV (8005-4434)
CP-00 87799		40. 2-(4-(2-甲氧基)哌 嗪-1-基)喹啉	ENAMINE (T0503-7528)
CP-00 09883		41. 2-(1H- 苯 并 [d][1,2,3] 三唑 -1- 基)-N-(2,3-二氢 -1H-茛-2-基)乙酰 胺	MAY-BRIDGE (KM10562)
CP-00 70871		42. 1-苯乙基-1H-苯并 [d][1,2,3]三唑	Chem-Bridge (7653692)

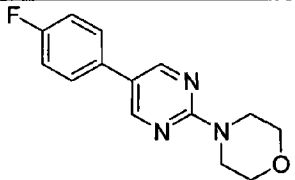
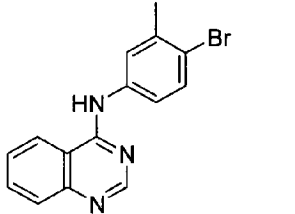
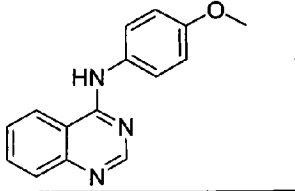
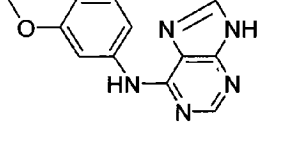
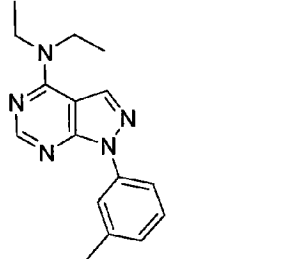
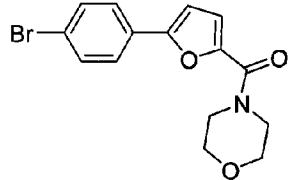
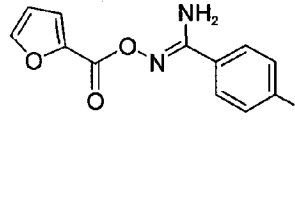
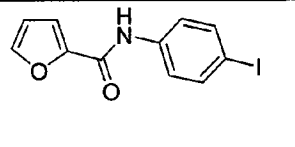
[0406]

CP-00 63508		43. 7-(4- 氟 苄 氧 基)-2H-色烯-2-酮	CHEMDIV (3330-4085)
CP-00 00928		44. N-(2,4- 二 氯 苯 基)-8- 甲 氧 基 -2H- 色-3-甲酰胺	BIONET (bionet-5G-331 S)
CP-00 05069		45. N-(3-氯苯基)-8- 甲 基-3,4-二氢-1(2H)- 碳 硫 代 酰 胺 (carbothioamide)	MAY-BRIDGE (BTB01026)
CP-00 96433		46. 7-甲氧基-5-甲基-2- 苯基-4H-色烯-4-酮	MICRO-SOUR CE (01400666)
CP-00 45061		47. 2-(3,4-二甲苯基)喹 啉	CHEMDIV (3257-1451)
CP-00 60729		48. 4-溴-N-(5-氯吡啶 -2-基)苯甲酰胺	CHEMDIV (0868-0014)
CP-00 66751		49. 3- 氨 基 -6,7,8,9- 四 氢-5H-芳庚并[e]噻 吩并[2,3-b]吡啶-2- 甲酰胺	CHEMDIV (4365-0051)
CP-00 69934		50. (Z)-3- 甲 基 -N'-(烟 酰 氧 基) 苯 甲 亚 胺 酰 胺	CHEMDIV (5906-1071)

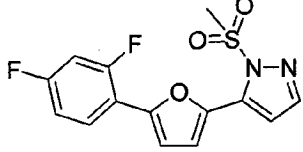
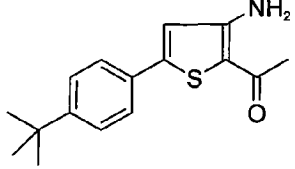
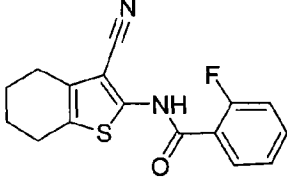
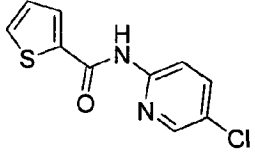
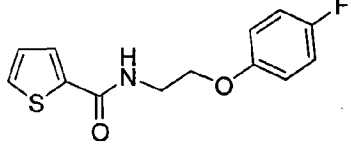
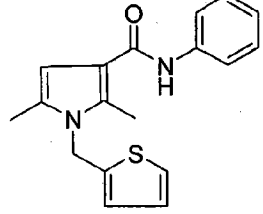
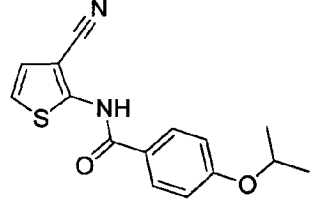
[0407]

CP-00 76627		51. N,N-二乙基-6-甲氧基噻吩[2,3-b]喹啉-2-甲酰胺	CHEMDIV (C303-0565)
CP-00 80276		52. 6-(4-甲氧基苯基)-1,2,3,4-四氢-1,5-萘啶	参 考 :Lahue,B.R 等 人 .J.Org.Chem .2004,69,7171- 7182 合成
CP-00 89966		53. 5-溴-N-(2-(苯硫基)乙基)烟酰胺	CHEMDIV (8011-8572)
CP-00 29278		54. N-(6-甲基吡啶-2-基)-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁烯-6-甲酰胺	CHEMDIV (3617-0256)
CP-01 30586		55. 2-(4-甲基苄基硫代)噁唑并[4,5-b]吡啶	CHEMDIV (G293-0009)
CP-00 59547		56. N-(2-甲氧基乙基)-5-对甲苯基咪唑啉-2-胺	PEAK-DALE (1000119)
CP-00 59563		57. 4-(5-(苯并[b]噻吩-2-基)咪唑啉-2-基)吗啉	PEAK-DALE (1000166)

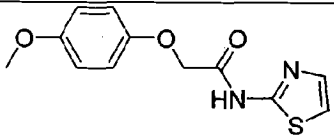
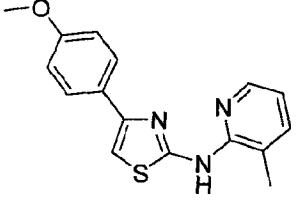
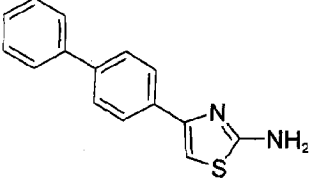
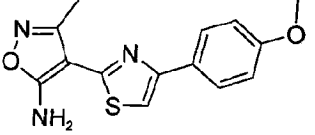
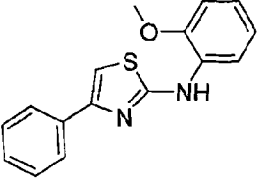
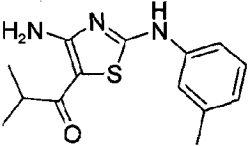
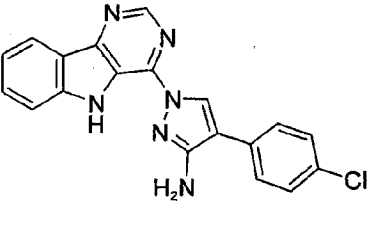
[0408]

CP-00 59642		58. 4-(5-(4-氟苯基)咪唑啉-2-基)吗啉	PEAKDALE (1000143)
CP-00 64382		59. N-(4-溴-3-甲基苯基)喹唑啉-4-胺	CHEMDIV (3651-6031)
CP-00 67053		60. N-(4-甲氧基苯基)喹唑啉-4-胺	CHEMDIV (4491-0691)
CP-00 72720		61. N-(3-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-6-胺	CHEMDIV (8009-2985)
CP-00 79810		62. N,N-二乙基-1-间甲基苯基-1H-吡唑并[3,4-d]咪唑啉-4-胺	CHEMDIV(K4 02-0503) 或 IFLAB/LIFE-C HEMICALS(F 0518-0004)
CP-00 61777		63. (5-(4-溴苯基)呋喃-2-基)(吗啉代)甲酮	CHEMDIV (1975-0198)
CP-00 66008		64. (Z)-4-溴-N'-(呋喃-2-羰氧基)苯甲亚胺酰胺	CHEMDIV (4260-1000)
CP-00 72253		65. N-(4-碘苯基)呋喃-2-甲酰胺	CHEMDIV (8002-5214)

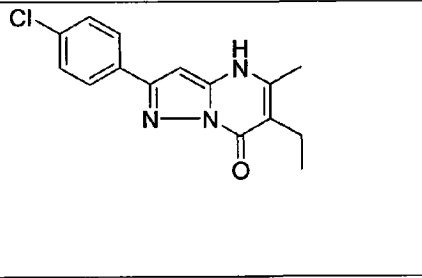
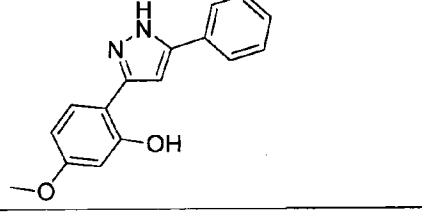
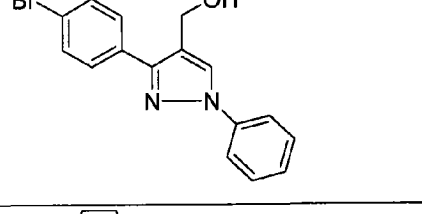
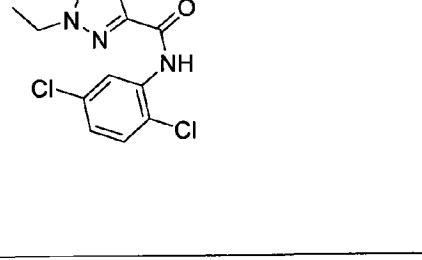
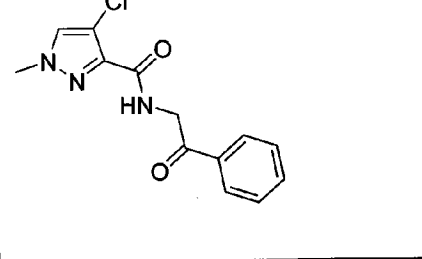
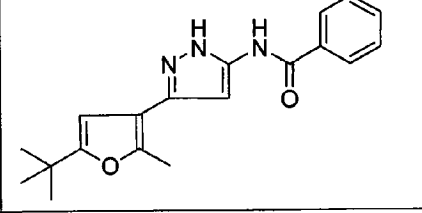
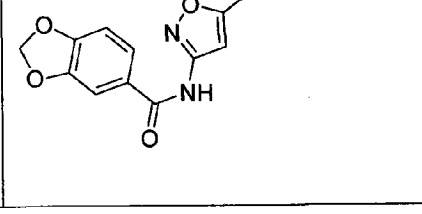
[0409]

CP-00 99289		66. 5-(5-(2,4-二氟苯基)呋喃-2-基)-1-(甲基磺酰)-1H-吡唑	MAY-BRIDGE (CD10941)
CP-00 08545		67. 1-(3-氨基-5-(4-叔丁基苯基)噻吩-2-基)乙酮	MAY-BRIDGE (GK03407)
CP-00 60852		68. N-(3-氰基-4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩-2-基)-2-氟苯甲酰胺	CHEMDIV (1000-0399)
CP-00 72156		69. N-(5-氯吡啶-2-基)噻吩-2-甲酰胺	CHEMDIV (8005-8364)
CP-00 72271		70. N-(2-(4-氟苯氧基)乙基)噻吩-2-甲酰胺	CHEMDIV (8003-7471)
CP-01 04766		71. 2,5-二甲基-N-苯基-1-(噻吩-2-甲基)-1H-吡咯-3-甲酰胺	MAY-BRIDGE (SP00299)
CP-011 0352		72. N-(3-氰基噻吩-2-基)-4-异丙氧基苯甲酰胺	IFLAB/-LIFE-CHEMICALS (F1385-0110)

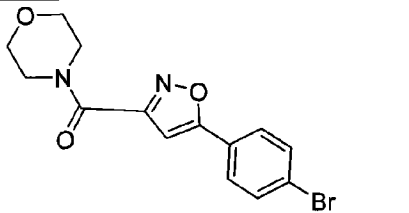
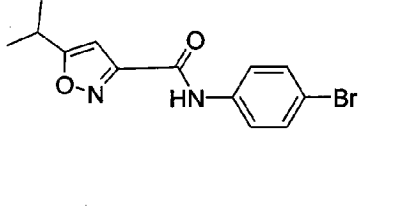
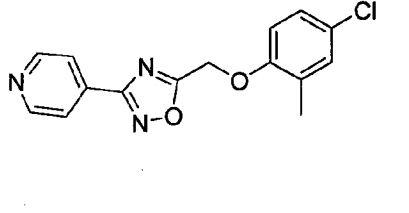
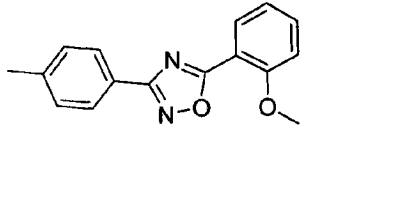
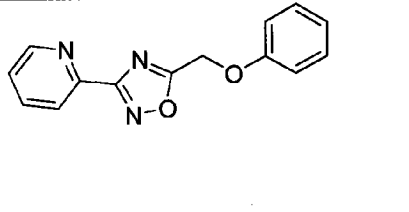
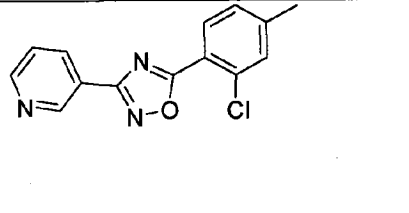
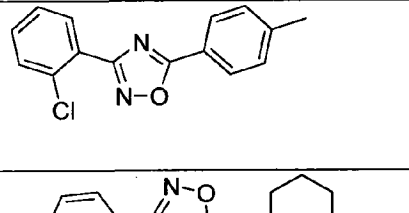
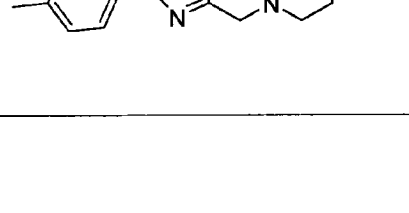
[0410]

CP-00 63182		73. 2-(4-甲氧基苯氧基)-N-(噻唑-2-基)乙酰胺	CHEMDIV (3297-0008)
CP-00 71862		74. 4-(4-甲氧基苯基)-N-(3-甲基吡啶-2-基)噻唑-2-胺	CHEMDIV (7100-0567)
CP-00 72036		75. 4-(联苯-4-基)噻唑-2-胺	CHEMDIV (8005-3411)
CP-01 05343		76. 4-(4-(4-甲氧基苯基)噻唑-2-基)-3-甲基异噁唑-5-胺	MAY-BRIDGE (SPB05463)
CP-01 22949		77. N-(2-甲氧基苯基)-4-苯基噻唑-2-胺	CHEMDIV (0896-3691)
CP-01 34381		78. 1-(4-氨基-2-(间甲基苯基氨基)噻唑-5-基)-2-甲基丙-1-酮	CHEMDIV (F091-0329)
CP-00 00477		79. 4-(4-氯苯基)-1-(5H-咪唑并[5,4-b]吡啶-4-基)-1H-吡唑-3-胺	BIONET (bionet-5F-909)

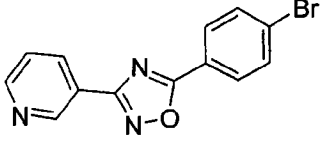
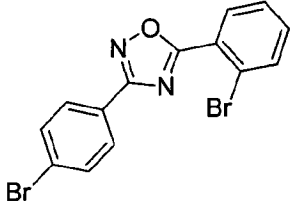
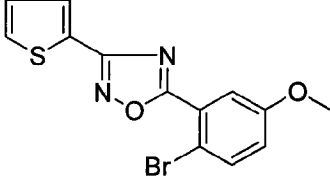
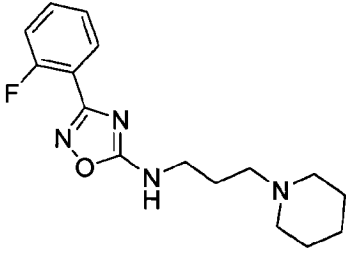
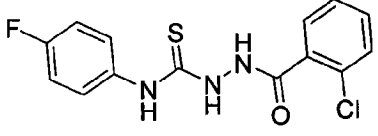
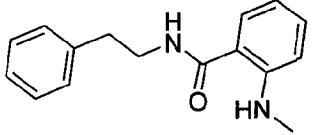
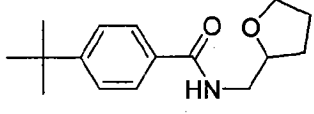
[0411]

CP-00 63375		80. 2-(4-氯苯基)-6-乙基-5-甲基吡唑并[1,5-a]嘧啶-7(4H)-酮	CHEMDIV (3270-0084)
CP-00 64231		81. 5-甲氧基-2-(5-苯基-1H-吡唑-3-基)苯酚	CHEMDIV (3486-0181)
CP-00 65105		82. (3-(4-溴苯基)-1-苯基-1H-吡唑-4-基)甲醇	CHEMDIV (3935-0218)
CP-00 70844		83. N-(2,5-二氯苯基)-1-乙基-1H-吡唑-3-甲酰胺	CHEMDIV (6228-1918)
CP-00 70886		84. 4-氯-1-甲基-N-(2-氧代-2-苯乙基)-1H-吡唑-3-甲酰胺	Chem-Bridge (7528295)
CP-01 04765		85. N-(3-(5-叔丁基-2-甲基-3-基)-1H-吡唑-5-基)苯甲酰胺	MAY-BRIDGE (SP00221)
CP-00 65665		86. N-(5-甲基异噁唑-3-基)苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-	CHEMDIV (4100-3780)

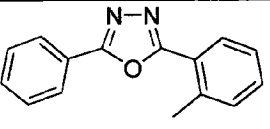
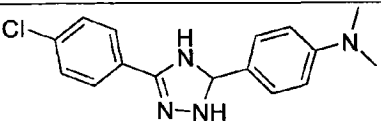
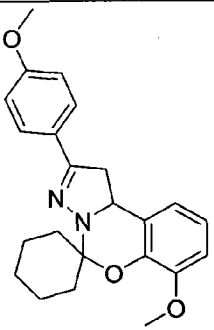
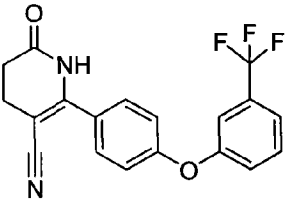
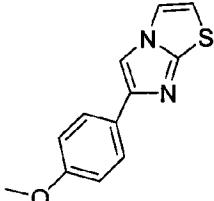
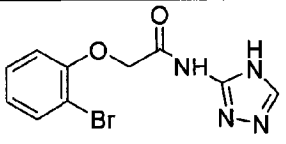
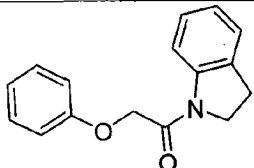
[0412]

		甲酰胺	
CP-00 75627		87. 5-(4-溴苯基)异噁唑-3基)(吗啉)甲酰胺	CHEMDIV (C226-0488)
CP-00 75656		88. N-(4-溴苯基)-5-异丙基异噁唑-3-甲酰胺	CHEMDIV (C226-292)
CP-00 67108		89. 5-((4-氯-2-甲基苯氧基)甲基)-3-(吡啶-4-基)-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (4534-3904)
CP-00 67246		90. 5-(2-甲氧基苯基)-3-对甲苯-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (4534-1114)
CP-00 68395		91. 5-(苯氧基甲基)-3-(吡啶-2-基)-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (4951-0941)
CP-00 68929		92. 5-(2-氯-4-甲基苯基)-3-(吡啶-3-基)-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (5235-0410)
CP-00 68961		93. 3-(2-氯苯基)-5-对甲苯-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (5235-2061)
CP-00 70164		94. 5-(哌啶-1-甲基)-3-对甲苯-1,2,4-噁二	CHEMDIV (5927-0188)

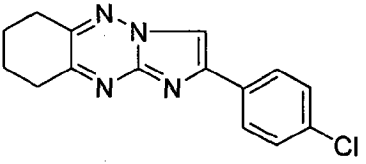
[0413]

		唑	
CP-00 70367		95. 5-(4-溴苯基)-3-(吡啶-3-基)-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (6018-0130)
CP-00 79642		96. 5-(2-溴苯基)-3-(4-溴苯基)-1,2,4-噁二唑	CHEMDIV (K086-0188)
CP-01 04904		97. 5-(2-溴-5-甲氧基苯基)-3-(噻吩-2-基)-1,2,4-噁二唑	MAY-BRIDGE (SP00905)
CP-01 30665		98. 3-(2-氟苯基)-N-(3-(哌啶-1-基)丙基)-1,2,4-噁二唑-5-胺	CHEMDIV (G349-0769)
CP-00 05186		99. 2-(2-氯苯基)-N-(4-氟苯基)脘碳硫代酰胺	MAY-BRIDGE (BTB01235)
CP-00 07991		100. 2-(甲基氨基)-N-苯乙基苯甲酰胺	MAY-BRIDGE (DP01029)
CP-00 61566		101. 4-叔丁基-N-((四氢咪喃-2-基)甲基)苯甲酰胺	CHEMDIV (1786-0077)

[0414]

CP-00 62030		102. 2-苯基-5-邻甲苯基 -1,3,4-噁二唑	CHEMDIV (2089-0007)
CP-00 07994		103. 4-(3-(4-氯苯基)-4,5-二氢-1H-1,2,4-三唑-5-基)-N,N-二甲基苯胺	MAY-BRIDGE (DP01118)
CP-00 39073		104. 7-甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-1,10b-二氢螺[苯并[e]吡唑并[1,5-c][1,3]噁嗪-5,1'-环己烷]	CHEMDIV (K805-0823)
CP-00 04116		105. 6-氧代-2-(4-(3-(三氟甲基)苯氧基)苯基)-1,4,5,6-四氢吡啶-3-脞	BIONET (bionet-8P-057)
CP-00 61401		106. 6-(4-甲氧基苯基)咪唑[2,1-b]噻唑	CHEMDIV (1487-1266)
CP-00 64286		107. 2-(2-溴苯氧基)-N-(4H-1,2,4-三唑-3-基)乙酰胺	CHEMDIV (3643-3466)
CP-011 0644		108. 1-(吲哚啉-1-基)-2-苯氧基乙酮	TIMTEC (ST040751)

[0415]

<p>CP-00 51092</p>		<p>109. 2-(4- 氯 苯 基)-6,7,8,9-四氢苯 并 [e] 咪 唑 并 [1,2-b][1,2,4]三嗪</p>	<p>CHEMDIV (8011-7131)</p>
------------------------	---	---	--------------------------------

[0416] ^A表 1 提供的这些系统名称使用 ChemDraw Ultra 软件 9.0.1 版本如下生成。系统名称通过在 ChemDraw 绘图窗口中输入表 1 中显示的化学结构,选择该化合物,并且选择结构菜单中的“将结构转化为名称”工具生成。

[0417] 治疗方法

[0418] 本发明提供涉及使用本文所述化合物治疗将得益于 Atoh1 表达增加的疾病和 / 或疾患的方法。一般说来,该治疗方法包括使用一个或多个本文所述化合物增加 Atoh1 表达水平,并因此促进靶细胞的部分分化或全分化。可受益于这种治疗的疾病是其中通过提高 Atoh1 表达水平治疗疾病的一种或多种症状的那些疾病,例如,以下那些疾病,其中由于 Atoh1 表达增加引起的全部或部分分化的细胞,(1) 用于替换损失或损坏的细胞或组织,例如,功能细胞如,如听觉毛细胞和 / 或 (2) 防止例如癌细胞的损坏的细胞群体的扩张。

[0419] 一般说来,本发明提供将本文所述的一种或多种化合物施用于患者的步骤。可选地或此外,本发明提供将一种或多种靶细胞,例如,干细胞、iPS 细胞、祖细胞和 / 或支持细胞与本文所述的一种或多种化合物(例如体外)接触,以促进这些细胞完全或部分分化成或趋向于成熟细胞类型(例如,毛细胞)的步骤;将已经与本文所述的一种或多种化合物(例如体外)接触的一种或多种细胞,例如,细胞、祖细胞和 / 或支持细胞施用于患者的步骤;和 / 或将已经与本文所述的一种或多种化合物(例如体外)接触的一种或多种细胞,例如,细胞、祖细胞和 / 或支持细胞与一种或多种化合物组合施用于患者的步骤。

[0420] 听觉毛细胞损失

[0421] 已被广泛接受的是,虽然能够产生毛细胞的细胞出现在内耳中,但是内耳中自然的毛细胞再生是很低的(Li 等人, Trends Mol. Med., 10, 309-315(2004); Li 等人, Nat. Med., 9, 1293-1299(2003); Rask-Andersen 等人, Hear. Res., 203, 180-191(2005))。因此,损失或损坏的毛细胞可能不足以由自然生理过程(例如,细胞分化)替代,因此毛细胞的损失发生。在许多个体中,这样的毛细胞损失可能导致,例如,感音神经性听力损失、听力障碍和不平衡疾患。在内耳中能增加毛细胞数量的治疗策略将有利于毛细胞损失的患者,例如,患有这些病症的一种或多种的患者。

[0422] Atoh1 在毛细胞产生中的重要性已经很好地证明。例如,毛细胞的发育和内耳祖细胞分化为内耳支持细胞和 / 或毛细胞需要 Math1 (Birmingham 等人, Science, 284: 1837-1841, 1999)。此外,在成熟豚鼠的内淋巴中腺病毒介导的 Math1 的过度表达,导致在成熟耳蜗中的非感觉细胞分化未成熟的毛细胞(Kawamoto 等人, J. Neurosci., 23: 4395-4400, 2003)。这些研究的含义是双重的。首先,它们表明成熟耳蜗的非感觉细胞保持分化成感觉细胞,例如毛细胞的能力。第二,它们表明 Math1 的过度表达是必要的,并且足以指导从非感觉细胞分化毛细胞。随后的研究通过表明腺病毒介导的 Atoh1 过度表

达诱导毛细胞再生,并且大幅提高实验耳聋动物模型的听力阈值,从而促进了这些发现。(Izumikawa 等人, Nat. Med. , 11 :271-276, 2005)

[0423] 此处提供的化合物能够增加受治疗者和 / 或细胞或组织的 Atoh1 水平。正如本文所述,这些化合物促进 Atoh1 表达的提高,从而促进了靶细胞或细胞分化成或趋向于内耳感觉细胞或细胞,例如,毛细胞。这些化合物促进了从位于耳中的细胞或有能力分化为毛细胞的细胞分化为毛细胞的用途,通过 Bermingham 等人,同上、Kawamoto 等人,同上、和 Izumikawa 等人,同上描述的实验室数据支持。因此,本文所述的化合物,可用于治疗由患者的毛细胞损失导致的那些疾病和疾患。

[0424] 本发明提供用于治疗患有或有风险发展为毛细胞损失导致的听觉疾患的患者的化合物和方法。在一些实施方案中,治疗方法包括以下步骤:将本文所述一种或多种化合物施用于患者,以例如,在患者的耳中(如内耳)促进听觉毛细胞形成,和 / 或通过促进在患者内耳中自然出现的非毛细胞类型完全或部分地分化为听觉毛细胞,增加在患者耳中(如内耳)听觉毛细胞数目。

[0425] 在一些实施方案中,治疗方法包括以下步骤:将本文所述的一种或多种化合物施用于患者以促进患者内耳中听觉毛细胞形成(例如,内部和 / 或外部听觉毛细胞)和 / 或通过促进患者内耳中自然出现的非毛细胞类型完全或部分地分化为听觉毛细胞增加患者内耳中的听觉毛细胞的数目(例如,内部和 / 或外部听觉毛细胞)。

[0426] 能够分化为毛细胞的细胞(例如,内部和 / 或外部毛细胞)的实例,包括但不限于:内耳干细胞、iPS 细胞、祖细胞和 / 或支持细胞(如,Deiters 细胞、柱细胞、内指状细胞、顶盖细胞和 Hensen 细胞)。

[0427] 本发明也包括将具有完全或部分地分化为毛细胞能力的一种或多种细胞与本文所述的一种或多种化合物(例如,在体外)接触,以促进这些细胞完全或部分地分化为或趋向于内耳的成熟细胞类型,例如,毛细胞(如,内部和 / 或外部毛细胞)的步骤。具有分化成毛细胞的示例细胞,包括,包括但不限于:干细胞(如内耳干细胞、成体干细胞、源于骨髓的干细胞、胚胎干细胞、间质干细胞、皮肤干细胞、iPS 细胞和源于脂肪的干细胞)、祖细胞(如,内耳祖细胞)、支持细胞(如,Deiters 细胞、柱细胞、内指状细胞、顶盖细胞和 Hensen 细胞),和 / 或生殖细胞。

[0428] 可选地或此外,该方法包括将具有分化为毛细胞能力并且已经和一种或多种本文所述的化合物(例如,在体外)接触的一种或多种细胞(例如,内部和 / 或外部毛细胞),施用于患者耳部(例如,内耳)的步骤(细胞疗法)。最后,该方法包括将具有分化为毛细胞能力并且已经和一种或多种本文所述的化合物(例如,在体外)接触的一种或多种细胞(例如,内部和 / 或外部毛细胞)与一种或多种化合物组合施用于患者耳部(例如,内耳)的步骤(结合疗法)。

[0429] 本发明可用于治疗由耳内细胞的损失产生的毛细胞损失以及任何疾患,例如,出现听力障碍、耳聋和前庭疾患,这是通过例如,促进一种或多种细胞分化为(例如,完全或部分分化)具有如耳内感觉细胞功能的一种或多种细胞,如毛细胞。

[0430] 在一些实施方案中,所述方法包括选择具有毛细胞损失风险和 / 或具有毛细胞损失的患者的步骤。可选地或此外,所述方法包括选择具有患感音神经性听力损失风险和 / 或患有感音神经性听力损失的患者的步骤。例如,任何正在经历或有风险发展为听力损失

的人,是本文所述治疗方法的候选人。患有或有风险发展为听力损失的人听力可能低于正常人的平均水平,或低于经历听力损失前的人。例如,听力可能减少至少 5%、10%、30%、50%或更多。

[0431] 受治疗者可以是与任何原因或任何事件类型的结果引起的毛细胞损失有关的听力损失。例如,人可以由遗传或先天性缺陷引起的耳聋;例如,人可以自从出生就是耳聋,或可以是由于遗传或先天性缺陷导致的逐渐丧失听力所造成的耳聋或听力困难。在另一个实例中,人可以是创伤事件造成的耳聋或听力困难,所述创伤事件例如,耳部结构受到物理创伤、或突然的大音量噪声、或长期暴露于大音量噪声中。例如,长期暴露于演唱会场地、机场跑道和建筑区域,可引起内耳损坏以及随后的听力损失。人可能经历了化学品引发的耳毒性,其中耳毒剂 (ototoxin) 包括:包含抗肿瘤剂、水杨酸类、醌类、氨基糖苷类抗生素的治疗药物,食物或药物中的污染物、以及环境或工业污染物。人可能具有衰老引发的听力疾患,或人可能具有耳鸣(特点在于耳中的鸣响)。

[0432] 适合于使用本发明描述的化合物和方法治疗的人包括患有前庭功能障碍,包括双侧和单侧前庭功能障碍的人。前庭功能障碍是一种内耳功能障碍,症状特征包括头晕、失衡、眩晕、恶心和视力模糊,并可能伴随听力问题、疲劳和认知功能的变化。前庭功能障碍可能是由于遗传或先天缺陷;感染,如病毒或细菌感染;或损伤,如创伤性或非创伤性损伤。前庭功能障碍最常见的检测是通过检测疾患的个别症状(例如,眩晕、恶心和视力模糊)。

[0433] 可选地或此外,本发明所述的化合物和方法可以预防性地使用,如预防、减少或延缓听力损失、耳聋或与内耳功能损失有关的其他听觉疾患的进展。例如,包含一种或多种化合物的组合物可以与第二疗法一起(例如,之前、之后或同时)施用,该第二疗法如可以影响听觉疾患的疗法。这些耳毒性药物包括抗生素,如新霉素、卡那霉素、阿米卡星、紫霉素、庆大霉素、妥布霉素、红霉素、万古霉素和链霉素;化疗剂,如顺铂;非甾体抗炎药(NSAID),如三水杨酸胆碱镁、双氯芬酸、二氟尼柳、非诺洛芬、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、甲氯灭酸盐、萘丁美酮、萘普生、奥沙普秦、保泰松、吡罗昔康、双水杨酯、舒林酸和托美丁;利尿剂;水杨酸酯,如阿斯匹林;以及某些疟疾治疗,诸如奎宁和氯喹。例如,接受化疗的人可以使用本文所述的化合物和方法治疗。例如,已知化疗剂顺铂导致听力损失。因此,包含一种或多种化合物的组合物可与顺铂治疗一起(例如,之前、之后或同时)施用,以防止或减轻顺铂的副作用的严重性。该组合物可以在第二治疗剂之前、之后和/或同时施用。这两种药剂可以通过不同施用途径施用。

[0434] 本发明描述的化合物和方法适用于治疗由感音神经性毛细胞损失引发的听力疾患。感音神经性毛细胞损失的患者经历耳蜗毛细胞的退化,该退化常常引起毛细胞损失的区域中螺旋神经节神经元的损失。这些患者也可能遇到 Corti 器中支持细胞的损失,以及颞骨物质中缘、螺旋韧带和血管纹的退化。这些患者可以获得使用引发细胞分化为毛细胞的药剂的治疗,或使用移植或注射入内耳的包括毛细胞的组织移植物的治疗。

[0435] 以下提供了产生内耳细胞的方法。耳细胞或耳细胞祖细胞可以由从哺乳动物如,小鼠或人中分离到的干细胞产生,而且该细胞可以是胚胎干细胞或取自成熟(如,成年)组织的干细胞,该组织如内耳、中枢神经系统、血液、皮肤、眼或骨髓。任何下文所述的用于培养干细胞和诱导其分化成为耳细胞(如,毛细胞)的方法,都可以使用。

[0436] 一般来说,本文所述的化合物和方法可用于产生耳中毛细胞的生长和/或增加耳

中毛细细胞的数目（如，在内耳、中耳和 / 或外耳）。例如，相比于治疗前毛细细胞的数目，耳中毛细细胞数目可以增加越 2、3、4、6、8、10 倍或更多。所述新的毛细细胞生长可以有效地恢复受治疗者的听力，或确立至少部分地改善受治疗者的听力。例如，药剂的施用可以改善听力损失约 5%、10%、15%、20%、40%、60%、80%、100% 或更多。

[0437] 在适当情况下，治疗后，可检测到听力或内耳疾患相关的其它症状的改善。检测听力的方法是熟知的，并且包括纯音测听、空气传导和骨传导测试。这些检查测量人可以听到的响度（强度）和音高（频率）的界限。人的听力测试，包括行为观察听力检查（对于至 7 个月德婴儿）、视觉强化定向听力检查（对于 7 个月至 3 岁的儿童）和对于 3 岁以上儿童进行的游戏测听。耳声发射测试可以用于测试耳蜗毛细细胞的功能，并且耳蜗电图描记提供关于耳蜗功能和进入大脑的神经通路的第一部分的信息。在一些实施方案中，可以继续具有或没有改良的治疗，也可以停止治疗。

[0438] 异常细胞增殖

[0439] 细胞增殖通常是通过多个检验点和保障措施进行控制的受到严格调节的过程。当这些检验点或保障措施中的一个或多个被绕过或被破坏时，例如，通过遗传突变，异常细胞增殖发生。异常细胞增殖的结果是形成癌性生长或肿瘤。最具侵略性的癌性生长通常是侵入和转移。少数侵略性的良性生长不是侵入性的或转移性的，尽管它们往往保留了转移的可能性。

[0440] 在一些实施方案中，本发明涉及用于治疗会得益于 Atoh1 表达增加的异常细胞增殖和 / 或癌症的方法和组合物。得益于 Atoh1 表达增加的异常增殖细胞或癌细胞的鉴别可以通过例如，使用实时 PCR 和本领域技术人员容易进行的其他技术测定细胞内 Atoh1 表达水平。这种测定的执行可以通过从受治疗者处获得异常增殖细胞或癌细胞的样品；从样本中分离出遗传物质（如，DNA 和 RNA）；从样本反向转录 mRNA；并使用寡核苷酸扩增 Atoh1 序列，该寡核苷酸已经被设计用于杂交到 Atoh1 序列。得益于 Atoh1 表达增加的异常增殖细胞或癌细胞，在细胞样本中具有无法检测到的 Atoh1 表达。可选地或此外，将使用非癌细胞对照重复上述测定。然后将在对照中的 Atoh1 表达与癌变样本中 Atoh1 表达比较。能得益于 Atoh1 表达增加的异常增殖细胞或癌细胞的 Atoh1 表达低于非癌对照。一般来说，能得益于 Atoh1 表达增加的异常增殖细胞或癌细胞，将具有低的或无法检测到的 Atoh1 表达水平。

[0441] 在一些实施方案中，本发明涉及治疗胃肠系统中异常细胞增殖和 / 或癌症的方法和组合物。示例性癌症包括但不限于食道癌、胆囊癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、小肠癌、大肠癌（结肠癌）和直肠癌。

[0442] 使用本发明治疗胃肠系统的异常细胞增殖和 / 或癌症，由下述研究提供支持：通常情况下，肠上皮包括四种主要细胞类型，它们源自胚胎发生期间的多能干细胞。第一种细胞类型是吸收性肠上皮细胞或柱状细胞；第二种细胞类型是黏液分泌杯状细胞；第三种细胞类型是分泌调节肽的肠内分泌细胞；并且第四细胞类型是分泌抗微生物肽的潘氏细胞。健康的动物具有这四种细胞类型中的每一种。然而，无 Math1 转基因小鼠具有匮乏的杯状细胞、肠内分泌细胞和潘氏细胞。这项观察产生如下结论：在肠发育中针对这三种细胞类型的细胞命运确定（例如，分化）需要 Math1 (Yang 等人, Science, 294 :2155-2158, 2001)。还证明，相比于正常胃黏膜，五种胃癌细胞系中缺少 Hath1 表达。这些支持了以下事实：Hath1

表达的缺失可能在胃癌发生中发挥作用 (Sekine 等人, *Biochem. Biophys. , Res. Comm. ,* 344 :1166-1171, 2006)。在结肠癌细胞系中 *Hath1* 和 *Math1* 表达的减少也另外报导 (Leow 等人, *Cancer Res. ,* 64 :6050-6057, 2004 和 Leow 等人, *Ann. N. Y. Acad. Sci. ,* 1059 :174-183, 2005)。然而, 这些研究也表明, 侵略性结肠癌细胞系中 *Hath1* 过度表达导致细胞增殖的明显抑制, 并且这种增殖降低的发生是由于侵略性结肠癌细胞分化为或趋向于非癌性的杯状细胞。因此, 这些数据清楚地表明胃肠癌将受益于 *Atoh1* 表达的增加, 例如, 通过促进这些细胞分化为或趋向于成为肠上皮的非癌性细胞, 从而减少增殖胃癌细胞的数目。因此, 胃肠癌症患者可以用本文所述的一个或多种化合物治疗。

[0443] 一般而言, 本发明提供了治疗患有或有风险发展为胃肠癌的患者的一种或多种化合物和方法。分辨这种患者的方法如下所述。治疗方法包括, 将本文所述的一种或多种化合物施用于患者以治疗胃肠癌的步骤 (直接疗法)。

[0444] 在一些实施方案中, 所述方法包括选择有风险患胃肠癌和 / 或已患胃肠癌患者的方法。

[0445] 分辨胃肠癌症患者的方法是本领域熟知的。例如, 筛选还可包括使用内窥镜检查 (例如, 口腔和 / 或直肠)。筛选还可以包括检测各种免疫组织化学标志物的检验, 所述标志物包括但不限于: 例如, *CK20*、*MUC2*、*MUC5A*、*MUC6*、*DAS-1* 和 *CDX2*。

[0446] 本发明使用本文所述的一种或多种化合物, 用于为患有或有风险发展为胃肠癌的患者提供治疗。治疗方法包括将本文所述的一种或多种化合物施用于患者, 以促进胃癌细胞完全或部分地分化的步骤。

[0447] 在一些实施方案中, 本发明涉及用于治疗直肠结肠癌的方法和组合物。用于分辨患有直肠结肠癌的个体的筛选是本领域熟知的。例如, 用于直肠结肠癌的筛选包括: 粪便潜血试验 (FOBT), 其检测粪便中的血液; 直肠指检 (DRE), 其检查在直肠中的触觉异常; 乙状结肠镜检查, 其查看直肠和结肠的较低部分中的视觉异常; 结肠镜检查, 其提供直肠和整个结肠的可视化; 和双重对比钡剂灌肠法 (DCBE), 其提供直肠和结肠的 X 光检查。通常, 检查异常直肠结肠组织的活组织检查或息肉切除术, 来确认该组织是癌性的。

[0448] 患有直肠结肠癌的个体可根据癌症期分级进行分类, 如 *Dukes*、*Astler-Coller*、和 *AJCC/TNM* 分级。个体的癌症等级表示所经历的癌细胞去分化的程度, 即, 仍保留结肠或直肠细胞特征的肿瘤细胞的数量。阶段分组指示个人整体疾病阶段。在某些系统中, 阶段分组表示为从 0 (最早期) 至 IV (最晚期) 的罗马数字。在第 0 期, 癌症只能在结肠或直肠的衬里发现。在第 I 期, 癌症已经扩散到更多的结肠或直肠的内壁。在第 II 期, 癌症已经扩散到结肠或直肠外部, 至附近的组织, 但还没有扩散到淋巴结。在第 III 期, 癌症已经扩散到附近的淋巴结, 但没有到身体的其他部位。在第 IV 期, 癌症已经扩散到身体的其他部位。直肠结肠癌趋于蔓延到肝脏和 / 或肺部。(刚刚描述的第 0 期和第 IV 期, 分别对应 *Duke* 分级中的 A 期和 D 期)。关于直肠结肠癌的筛查、诊断和分期的进一步信息可以参见 *Frei* 等人, *Cancer Medicine*, *BC Decker Inc. , Hamilton, Ontario* (2003)。

[0449] 本发明使用本文所述的一种或多种化合物, 用于为患有 (如, 第 0 期至第 IV 期) 或有风险发展为直肠结肠癌的患者提供治疗。治疗方法包括将本文所述的一种或多种化合物施用于患者以促进直肠结肠癌细胞完全或部分地分化的步骤。

[0450] 在一些实施方案中, 例如, 可能使用上述方法重新评估接受治疗或已经完成对结

肠癌的治疗的患者,以测定治疗的效果。在一些实施方案中,可以继续进行具有或不具有改良的治疗,也可以停止治疗。

[0451] 其他病症

[0452] 还报道了,在小脑和背侧脊髓中的 Atoh1 表达,以及其在例如,在发育中具有重要作用 (Bermingham 等人,同上和 Helms 等人,同上)。显然地, Atoh1 在神经细胞和组织中起到的促进细胞分化的作用,超过其在内耳中的作用。因此,本文所述的化合物和药物组合,也可用于用于治疗将受益于 Atoh1 表达增加的该组织的疾病和 / 或疾患。

[0453] 可选地或此外,本发明可用于治疗小脑颗粒神经元缺乏、关节病和骨关节炎。

[0454] 可以受益于 Atoh1 表达增加的病症的鉴别可以通过使用,例如上述 RT-PCR 方法测定细胞内 Atoh1 表达水平。一般来说,可以受益于 Atoh1 表达增加的病症具有低的或不可检测的 Atoh1 表达水平。

[0455] 用于治疗听觉细胞损失的施用途径

[0456] 直接疗法

[0457] 施用途径将依据正在治疗的疾病而不同。毛细胞损失和 / 或感觉神经性听力损失,可使用直接疗法,使用全身施用和 / 或局部施用来治疗。在一些实施方案中,施用途径可通过患者的健康护理提供者或临床医师,例如,依据对该患者的评估来确定。在一些实施方案中,个体患者的治疗可以定制,例如,一种或多种化合物、施用途径以及施用频率,都可以是个体化。可选地,治疗可是采用标准疗程施行,例如,使用一种或多种预先选定的化合物和预先选定的施用途径和施用频率。

[0458] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种化合物可使用全身施用途径施用于患者,例如,鉴别为需要毛细胞损失治疗的患者。全身施用途径,可包括但不限于:肠胃外途径施用,例如,静脉内注射、肌内注射和腹膜内注射;肠内施用途径,例如,口服途径施用、锭剂、压制片、丸剂、片剂、胶囊、滴剂(如耳滴剂)、糖浆、悬浮液和乳液;直肠施用,如,直肠栓剂或灌肠剂;阴道栓剂;尿道栓剂;透肤途径施用;和吸入(如,鼻喷雾剂)。

[0459] 可选地或此外,本文所述的一种或多种化合物可使用局部施用途径施用于患者,例如,鉴别为需要毛细胞损失治疗的患者。这种局部施用途径包括,将本文所述的一种或多种化合物例如,通过注射和 / 或使用泵施用于患者的耳部和 / 或患者的内耳。

[0460] 在一些实施方案中,药物组合物可例如,使用注射器(如,单剂量注射器)注射入耳(如耳施用),如注射入耳蜗腔(例如,蜗管、Sc 前庭和 Sc 鼓室)。例如,本文所述的一种或多种化合物的施用可以通过鼓室内注射(如,注射入中耳),和 / 或注射入外耳、中耳和 / 或内耳。本领域中通常使用这种方法,用于例如,将类固醇和抗生素施用于人耳。注射可以,例如,通过耳圆窗或通过蜗囊。其他内耳施用方法是本领域所熟知的(见,例如, Salt 和 Plontke, Drug Discovery Today, 10 :1299-1306, 2005)。

[0461] 在另一种施用模式中,通过导管或泵,可将药物组合物施原位。例如,导管或泵入耳可以将组合物导入耳蜗腔、或耳圆窗、和 / 或结肠腔。适用于将本文所述的一种或多种化合物施用于耳(如,人耳)的示例药物递送装置和方法,由 McKenna 等人(美国公开号 2006/0030837)和 Jacobsen 等人(美国专利号 7206639)描述。在一些实施方案中,导管或泵在外科手术期间可置于,例如,患者的耳中(如,外耳、中耳、和 / 或内耳)。在一些实施方案中,无需外科手术时,导管或泵可置于,例如,患者的耳中(例如,外耳,中耳,和 / 或内

耳)。

[0462] 可选地或此外,本文所述的一种或多种化合物可以结合医疗设备施用,所述医疗设备如耳蜗植入物或助听器,它们在外耳磨损。适合于本发明使用的示例性耳蜗植入物由 Edge 等人(美国公开号 2007/0093878)描述。

[0463] 在一些实施方案中,上述施用模式可以任何顺序结合,并且可同时或穿插施用。

[0464] 可选地或此外,本发明可根据食品和药物监督管理局批准的任何方法施用,如 CDER 数据标准手册,版本号 004 所述(可以在 fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm 得到)。

[0465] 细胞治疗

[0466] 一般来说,本文所述的细胞治疗方法可以用于促进细胞在体外完全或部分地分化成或趋向于内耳的成熟细胞类型(例如,毛细胞)。然后,该方法收获的细胞可再移植或植入需要该治疗的患者。以下描述了需要实践这些方法的细胞培养物方法,这些方法包括鉴别和选择合适的细胞类型的方法、促进选定细胞的完全或部分分化的方法、鉴别完全或部分分化了的细胞类型的方法、以及植入完全或部分地分化的细胞的方法。

[0467] 细胞的选择

[0468] 适用于本发明的细胞包括但不限于,当与本文所述的一种或多种化合物(如,在体外)接触后,能够完全或部分地分化为内耳成熟细胞(例如,毛细胞,如,内部和/或外部毛细胞)的细胞。能够分化为毛细胞的示例细胞,包括但不限于,干细胞(如,内耳干细胞、成体干细胞、源自骨髓的干细胞、胚胎干细胞、间质干细胞、皮肤干细胞、iPS 细胞和脂肪干细胞)、祖细胞(如,内耳祖细胞)、支持细胞(如 Deiters 细胞、柱细胞、内指状细胞、顶盖细胞和 Hensen 细胞)和/或生殖细胞。Li 等人,(美国公开号 2005/0287127)和 Li 等人,(美国专利号 11/953,797)描述了干细胞用于替换内耳感觉细胞的用途。Edge 等人,PCT/US2007/084654,描述了源自骨髓的干细胞用于替换内耳听觉细胞的用途。iPS 细胞描述于例如,在 Takahashi 等人,Cell,第 131 卷,第 5 期,第 861-872 页(2007);Takahashi 和 Yamanaka,Cell 126,663-76(2006);Okita 等人,Nature 448,260-262(2007);Yu, J. 等人,Science 318(5858):1917-1920(2007);Nakagawa 等人,Nat. Biotechnol. 26:101-106(2008);和 Zaehres 和 **Schöler**, Cell 131(5):834-835(2007)。

[0469] 这种合适的细胞可以通过分析(例如,定性或定量)一种或多种组织特异性基因的存在来鉴别。例如,通过检测一种或多种组织特异性基因的蛋白产物,可检测基因的表达。蛋白质检测技术包括使用抗适当抗原的抗体对蛋白质染色(例如,使用细胞提取物或完整细胞)。在这种情况下,适当的抗原是组织特异性基因表达的蛋白质产物。虽然,理论上,第一抗体(即,结合抗原的抗体)可以标记,更常见的是(并且提高其可视性)使用针对第一抗体的第二抗体(例如,抗-IgG)。该第二个抗体结合荧光染料,或结合用于比色反应的适合的酶、或结合(电子显微镜的)金珠、或结合生物素-亲和素系统,以至可识别主要抗体的位置,并因此该抗体。

[0470] 组织特异性基因表达也可通过检测从基因转录而来的 RNA 进行检测。RNA 的检测方法包括逆转录耦合聚合酶链反应(RT-PCR)、RNA 印迹分析、RNA 酶保护测定。

[0471] 可用于鉴别干细胞(例如,未分化的细胞)的示例组织特异性基因,包括但不限于,例如,nestin、sox1、sox2、或 musashi、NeuroD、Atoh1、和 neurogenin 1。可选地或此

外,干细胞可以根据在体外该细胞类型出现的独有特征中的一种或多种进行选择。例如,在体外,干细胞通常表现出通过单个细胞的增殖形成球体的独特潜力。因此,球体的识别和分离,可以帮助,从用于制造内耳的分化细胞的成熟组织中分离出干细胞的过程。例如,干细胞可在无血清的 DMEM/ 高糖和 F12 培养基 (1 : 1 混合) 中培养,并且补充 N2 和 B27 溶液和生长因子。已证明生长因子,如 EGF、IGF-1 和 bFGF,增加培养物中的球体形成。

[0472] 可用于鉴别祖细胞和 / 或内耳祖细胞 (例如,低于完全分化或部分分化的细胞) 的示例组织特异性基因,包括但不限于,例如, nestin、sox2 和 musashi,以及某些内耳特异性标志物基因,如, Brn3c、islet1 和 Pax2。

[0473] 可用于鉴别完全分化的细胞 (如,支持细胞) 的示例组织特异性基因包括但不限于,如 p27kip、p75、S100A、Jagged-1 和 Prox1,。

[0474] 可用于鉴别完全分化的细胞 (能起内耳感觉细胞的作用) 的示例组织特异性基因,包括但不限于,如肌球蛋白 VIIa、Math1、 $\alpha 9$ 乙酰胆碱受体、espin 细小白蛋白 3、和 F- 肌动蛋白 (次毒蕈环肽)。

[0475] 可选地或此外,疑为完全分化的细胞 (如,能作起内耳感觉细胞作用的细胞) 可能受到生理测试,以确定在成熟毛细胞中存在的传导通道 (conductance channel) 是否存在或具有活性。

[0476] 可选地或此外,可通过分析标志物的表达,从内耳的其它完全分化的细胞 (如,螺旋神经节) 中区分出内耳毛细胞,该标志物对螺旋神经节具有特异性,所述标志物包括但不限于 ephrinB2、ephrinB3、trkB、trkC、GATA3 和 BF1。

[0477] 在一些实施方案中,合适的细胞可以源自哺乳动物,如人类、小鼠、大鼠、猪、绵羊、山羊或非人类的灵长类。例如,干细胞已从小鼠椭圆囊中鉴定并分离 (Li 等人, Nature Medicine 9 :1293-1299, 2003)。这些细胞也可从患者处获得,随后该患者将被重新施用。

[0478] 在一些实施方案中,合适的细胞 (例如,干细胞、祖细胞和 / 或支持细胞) 可从动物内耳中分离出来。更具体地,合适的细胞可获自耳蜗 Corti 器、耳蜗的蜗轴 (中心)、耳蜗螺旋神经节、囊状斑的前庭感觉上皮细胞、椭圆囊或半规管的嵴。然而,干细胞、祖细胞和 / 或支持细胞,也可获得自其他组织,如骨髓、血液、皮肤或眼。使用的细胞可以获得自单一来源 (例如,耳、或耳内的结构或组织)、或来源组合 (例如,耳和一种或多种周围组织 (如骨髓、血液、皮肤或眼))。

[0479] 可选地或此外,方法包括获得从动物内耳获得组织,其中该组织至少包括椭圆囊的一部分。该动物可以是哺乳动物,如小鼠、大鼠、猪、兔、山羊、马、牛、狗、猫、灵长类或人类。分离出的组织可以悬浮在中性缓冲液,如磷酸盐缓冲盐水 (PBS),随后暴露于组织消化酶 (如胰蛋白酶、亮抑酶肽、糜蛋白酶等)、或酶的组合、或机械 (如,物理) 力,如研磨,以将组织打碎成较小片。可选地或此外,这两个组织破坏机制都可以使用。例如,该组织可以在大约 0.05% 酶 (例如,约 0.001%、0.01%、0.03%、0.07% 或 1.0% 的酶) 中孵育约 5、10、15、20 或 30 分钟,孵育后,机械性地破坏这些细胞。破坏了的组织可以经过从已分化的细胞或细胞碎片中分离出干细胞或祖细胞的装置,如过滤器或孔移液管 (bore pipette)。细胞的分离可包括细胞穿过具有逐渐减小的孔径的一系列过滤器。例如,过滤孔径范围可以是约 80 μm 或更小、大约 70 μm 或更小、大约 60 μm 或更小、大约 50 μm 或更小、大约 40 μm 或更小、大约 30 μm 或更小、大约 35 μm 或以更小、或约 20 μm 或更小。

[0480] 获得的细胞可能构成丰富的干细胞和 / 或祖细胞群体 ; 从组织内的所有 (或几乎所有) 已分化的细胞或其他细胞物质中分离, 可以达到, 但不需要与“已分离”的定义吻合。不需要绝对的纯度。本发明包含通过本文所述的分离过程获得的细胞。该细胞可能和冷冻保护剂混合并储存、或包装入试剂盒。一旦获得, 干细胞和 / 或祖细胞可在培养物中扩展。

[0481] 如果使用混合的细胞群体, 测试群体中的干细胞比例可变。例如, 该群体可以包含少量干细胞 (例如, 约 1-10%)、中等比例的干细胞 (例如, 约 10-90% (如, 约 20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80% 或 85% 的干细胞)) 或大量干细胞 (例如, 至少 90% 的群体 (如, 92%、94%、96%、97%、98% 或 99%) 可以是干细胞)。这些细胞有分化为内耳中的完全或部分分化的细胞的潜力 (如, 细胞可以是多能性干细胞, 其分化为表达一种或多种听觉蛋白的细胞)。部分分化的细胞在治疗方法中是起作用的 (无论是治疗性的还是预防性的), 只要它们表达足够数量和类型的听觉特异性蛋白质, 以给予患者益处 (如, 听力提高)。

[0482] 分化方法

[0483] 一般来说, 分化的促进可以通过将合适的靶细胞和 / 或细胞群体与本文所述的一种或多种化合物接触足以促进该细胞完全或部分地分化为或趋向于内耳中的成熟感觉细胞 (例如, 毛细胞) 的时间。

[0484] 例如, 根据上述方法鉴别的合适的细胞, 可以在体外培养。普遍来说, 本文所述的方法使用标准培养方法。适当的培养基已在本领域作出描述, 如在 Li 等人, *Nature Medicine* 9 :1293-1299, 2003 种。用于培养的干细胞的生长培养基, 可以包含一种或多种生长因子或生长因子的任意组合。例如, 生长培养基可以包含白血病生长抑制因子 (LIF), 该因子将阻止干细胞的分化。

[0485] 可将细胞分入培养皿的各个孔中并将其培养。可以监测到从分离的细胞中形成球体 (克隆漂浮集落), 并且球体可以通过破坏以分离该细胞 (如, 通过物理方式) 从而扩增, 并且这些细胞可以重复培养以便形成其他的球体。然后, 这些培养的细胞可以与本文所述的一种或多种化合物接触。

[0486] 可选地或此外, 细胞可接触本文所述的一种或多种化合物, 并且结合附加的诱导程序。存在许多本领域熟知的诱导程序, 用于诱导具有神经发生潜能的干细胞分化为神经祖细胞, 包括生长因子治疗 (例如, 用 EGF、FGF 和 IGF 治疗, 如本文所述) 和神经营养因子治疗 (如, 用 NT3 和 BDNF 治疗, 如本文所述)。其他分化程序是本领域熟知的 ; 见, 例如, Corrales 等人, *J. Neurobiol.* 66(13) :1489-500 (2006) ; Kim 等人, *Nature* 418 :50-6 (2002) ; Lee 等人, *Nat. Biotechnol.* 18 :675-9 (2000) ; 和 Li 等人, *Nat. Biotechnol.* 23 :215-21 (2005)

[0487] 作为附加的诱导程序的一个实例, 适合的细胞在诱导分化为祖细胞的补充生长因子存在下生长。将这些补充生长因子添加到培养基中。调节补充生长因子的类型和浓度, 以调节该细胞的生长特征 (例如, 以刺激细胞分化或使其对分化敏感), 并允许分化的细胞存活, 所述如分化的细胞如神经元、胶质细胞、支持细胞或毛细胞。

[0488] 示例补充生长因子包括但不限于, 基本成纤维细胞生长因子 (bFGF)、胰岛素样生长因子 (IGF) 和表皮生长因子 (EGF)。可选地, 补充生长因子可包括神经营养因子神经营养素 3 (NT3) 和脑源性神经营养因子 (BDNF)。生长因子的示例浓度范围可以是, 例如, 从大

约 100ng/mL 到约 0.5ng/mL (例如,从约 80ng/mL 到约 3ng/mL, 如约 60ng/mL、约 50ng/mL、约 40ng/mL、约 30ng/mL、约 20ng/mL、约 10ng/mL 或约 5ng/mL)。

[0489] 可选地或此外,可将培养基更换为缺乏生长因子的培养基。例如,培养基可以是补充 N2 和 B27 溶液的无血清的 DMEM/ 高糖和 F12 培养基 (1 : 1 混合)。也可以使用等效的可选培养基和营养素。用本领域熟知的方法,可以优化培养条件。

[0490] 在一些实施方案中,可以使用设计用于表达报告基因的干细胞,来测试化合物促进分化的能力,该报告基因促进检测细胞转化为内耳细胞。这些工程干细胞构成了报告细胞系。报告基因是可以检测到其表达的任何基因;该基因包括但不限于,绿色荧光蛋白 (GFP)、 α -葡糖醛酸酶 (GUS)、荧光素酶、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)、辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶和 β -半乳糖苷酶。其他可选的荧光报告基因包括但不限于,红色荧光蛋白 (RFP)、蓝绿色荧光蛋白 (CFP) 和蓝色荧光蛋白 (BFP)、或其中任何配对组合,条件是配对蛋白在可分辨的波长内发光。

[0491] 报告基因可以由启动子控制,该启动子在内耳的细胞 (包括祖细胞和不同程度分化的细胞) 中具有活性但在干细胞中无活性。理想情况下,启动子在分化的细胞或祖细胞中被稳定地上调,以便评估部分或完全分化的表现型 (例如,该报告基因的表达和对已知在内耳细胞中表达的基因的进一步鉴别)。

[0492] 分析完全或部分分化的方法

[0493] 可分析已与本文公开的一种或多种化合物接触的细胞,以测定是否发生完整的部分分化。该测定可以通过分析组织特异性基因的存在与否来施行,如上文所述 (见,细胞选择)。可选地或此外,毛细胞可通过生理测试来鉴别,以测定细胞是否产生成熟毛细胞或螺旋神经节细胞的传导通道特征。使用上文所述的标志物,可将该细胞从螺旋神经节细胞中区分出来。

[0494] 第二测定可用于证明细胞已经分化成为内耳细胞,或为此提供附加证据。例如,用作鉴别内耳细胞的标志物的基因,可以仅在特定细胞类型中表达 (例如,仅在毛细胞中或仅在螺旋神经节的细胞中),或该细胞也可在少数其他细胞类型中表达 (最好不超过一种、二种、三种、四种或五种其他细胞类型)。例如, ephrinB1 和 ephrinB2 在螺旋神经节细胞中表达,并也在视网膜细胞中表达。因而 ephrinB1 或 ephrinB2 表达的检测无法决定性地证明干细胞已经分化为螺旋神经节细胞。第二测定可以用来确认细胞已经发育成为螺旋神经节细胞。该测定包括检测已知在可疑细胞类型中表达的多个基因。例如,对于表达 ephrinB1 和 / 或 ephrinB2 的细胞,可以检测 GATA3、trkB、trkC、BF1、FGF10、FGF3、CSP、GFAP 和 Islet1 中的一个或多个的表达。表达这些附加基因的测定是干细胞已分化为螺旋神经节细胞的补充证据。

[0495] 第二测定也包括检测基因表达的缺失或在毛细胞中通常不表达的蛋白的缺失。该阴性标志物包括全细胞角蛋白基因,该基因在成熟毛细胞中不表达但在内耳的支持细胞中表达 (Li 等人, Nat. Med. 9 :1293-1299, 2003)。

[0496] 被证实已经经历完全或部分地分化为内耳感觉细胞 (例如,毛细胞) 的细胞可以移植或植入患者。

[0497] 植入方法

[0498] 例如,通过上述方法生成的部分和 / 或完全分化的细胞可以如以细胞悬浮液的形式

式,通过注射移植或植入耳,如移植或植入耳蜗腔。注射可以,例如,通过耳圆窗或通过耳蜗周围的骨囊 (bony capsule)。这些细胞可以通过耳圆窗注射到内耳道的听觉神经干或注射到鼓阶。

[0499] 为了提高移植或植入的细胞的移入能力,可以在分化前改良细胞。例如,可以设计细胞在祖细胞或分化的细胞中过度表达一种或多种抗凋亡基因。FAK 酪氨酸激酶或 Akt 基因是可用于该目的的候选抗凋亡基因;FAK 或 Akt 的过度表达可以阻止螺旋神经节细胞中的细胞死亡,并且当移植到另一组织,如外植的 Corti 器时促进移入(见,例如,见 Mangi 等人, Nat. Med. 9 :1195-201, 2003)。过度表达 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的神经祖细胞,可能具有增强的将轴突延伸进入组织外植体的能力,因为整合素已被证明介导轴突从螺旋神经节神经元延伸到层粘连蛋白基质上 (Aletsee 等人, Audiol. Neurootol. 6 :57-65, 2001)。在另一个实例中,如通过 RNAi 沉默或通过外源性表达的 cDNA 的过度表达,可以改变 ephrinB2 和 ephrinB3 的表达,从而改良 EphA4 信号传导事件。已显示,螺旋神经节神经元是由来自于 EphA4 的信号引导, EphA4 由 ephrin-B2 和 -B3 的细胞表面表达介导 (Brors 等人, J. Comp. Neurol. 462 :90-100, 2003)。该引导信号的失活会增加在成人内耳中到达神经元靶标的神经元的数目。可以将外源性因子(如神经营养因子 BDNF 和 NT3) 和 LIF 添加到组织移植,以提高在体内和离体组织培养物中轴突的延伸及其向靶组织的生长。感觉神经元的轴突延伸可以通过加入神经营养因子 (BDNF、NT3) 和 LIF 来提高 (Gillespie 等人, NeuroReport 12 :275-279, 2001)。

[0500] 在一些实施方案中,本文所述的细胞可在耳蜗植入物中使用,例如,如 Edge 等人 (美国公开 2007/0093878) 所述。耳蜗植入物是一种用以提高患有听力损失(特别严格到重度听力损失)的人的听力的电子装置。这些设备通常包括“外部”和“内部”部分。外部部分包括麦克风,可放在耳后,检测环境中的声音。然后,将声音由称为语音处理器的小型计算机数字化并加工。可将外部元件称为处理器元件。除了麦克风和语音处理器,植入物的外部部分可以包括电源,如电池,和外部天线发射器线圈。内部部分是置于耳部附近的皮肤下的电子装置,并通常称为刺激器/接收元件(见图 1)。通过语音处理器输出的编码信号皮下传输到位于植入者 (implantee) 的颞骨槽的植入的刺激器/接收元件。这种经皮传输通过使用感应耦合 (inductive coupling) 发生,该电感耦合由定位于与刺激器/接收元件一起提供的植入天线接收线圈通信的外部天线发射器线圈之间提供。该通信是通常是由无线电频率 (RF) 链接提供,但也建议使用其他该类链接,并以不同程度成功地植入。

[0501] 植入的刺激器/接收元件通常包括接收来自外部处理器元件的编码信号和能量的天线接收线圈,以及处理编码信号并向电极部件输出刺激信号的刺激器,该处理器根据原始检测到的声音,向产生听觉的听觉神经直接地使用电刺激。

[0502] 连接到电子装置上的电极插入内耳。电极可以是一束电线,其沿着耳蜗的长度开放地接触并且表现不同的声音频率。电极的数目可以从 1 到约 30 个电极变化,如大约 5、10、15、18、20、22、24、26 或 28 个电极。

[0503] 组合疗法

[0504] 在一些实施方案中,本发明提供,用本文所述的一种或多种化合物使用直接施用和上述的细胞疗法治疗患者的方法。

[0505] 用于治疗异常细胞增殖的施用途径

[0506] 施用途径将依据治疗的疾病而变化。异常细胞增殖和 / 或癌症是可以使用直接疗法治疗, 例如, 使用根据食品和药品监督管理局批准的一种或多种方法全身施用和 / 或局部施用, 所述方法如 CDER 数据标准手册, 版本号 004 (可从 fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm 处获得) 中描述。

[0507] 在一些实施方案中, 施用途径可由患者的健康护理提供者或临床医师例如, 依据对患者的评价来决定。在一些实施方案中, 个体患者的治疗是可定制的, 例如, 一种或多种化合物、施用途径、以及施用频率可以个体化。可选地, 治疗可使用标准治疗疗程施行, 例如, 使用一种或多种预先选定的化合物以及预先选定的施用途径和施用频率。

[0508] 在一些实施方案中, 本文所述的一种或多种化合物可以使用全身施用施用于患者, 例如, 鉴定为需要治疗毛细胞损失的患者。全身施用途径可以包括但不限于, 肠胃外施用途径, 如静脉内注射、肌肉注射和腹膜内注射; 肠施用途径, 如口服途径施用、锭剂、压制片、丸剂、片剂、胶囊、滴剂、糖浆、悬浮液和乳液; 直肠施用, 如直肠栓剂或灌肠剂; 阴道栓剂; 尿道栓剂; 透皮施用途径; 以及吸入 (如鼻喷雾剂)。

[0509] 可选地或此外, 本文所述的一种或多种化合物可以使用局部施用途径施用于患者, 例如, 鉴定为需要治疗毛细胞损失的患者。例如, 一种或多种化合物可在例如切除肿瘤的手术中施用, 并可以通过注射施用或在癌性部位内和其周围的一个或多个部位局部施行。

[0510] 药物制剂

[0511] 包含本文所述的一种或多种化合物 (即, 作为有效成分) 的药物组合物, 将根据期望的施用方法配制。

[0512] 本文所述的一种或多种化合物, 可配制为药物组合物以直接施用于受治疗者。包含本文所述的一种或多种化合物的药物组合物, 可以以常规方式使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂配制。例如, 药物组合物可以配制用于局部施用或全身施用, 例如, 通过滴或注射入耳部、吹入 (如进入耳)、静脉内、局部或口服来施用。

[0513] 施用的药物组合物的性质基于施用模式, 并且能够容易地被本领域技术人员确定。在一些实施方案中, 药物组合物是无菌的或可灭菌的。本发明中描述的药物组合物可包括载体或赋形剂, 其中很多是本领域技术人员熟知的。可用的赋形剂包括缓冲液 (例如, 柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、醋酸缓冲液和碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、多肽 (例如, 血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露醇、山梨醇、水和甘油。核酸、多肽、小分子和本发明描述的其他调节化合物, 可以通过任何标准的施用途径施用。例如, 可施用可以是肠胃外、静脉内、皮下或口服。调节化合物可以根据对应的施用途径, 以多种方式配制。例如, 可配制液体溶液, 用于通过滴剂施用于耳、用于注射或用于服食; 可配制用于服食或局部使用的凝胶或粉末。制作该制剂的方法是熟知的, 并且可以参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药学), 第 18 版, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990。

[0514] 本文所述的一种或多种化合物可例如, 作为药物组合物通过注射或通过手术放置直接地和 / 或局部地施用于例如, 内耳和 / 或结肠。可将该药物组合物的量描述为有效量, 或可将基于细胞的组合物的量描述为治疗有效量。如果作用一段时间是适当的或期望的, 本发明的组合物可以置于缓释制剂或可植入设备 (如, 泵) 中。

[0515] 可选地或此外,药物组合物可配制用于通过注射,例如通过推注或连续滴注的全身肠胃外施用。该制剂可与附加的防腐剂以单位剂量形式提供,例如,在安瓿瓶或在多剂量容器中。该组合物可采取如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并可包含配制剂(formulatory agent),如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选地,活性成分可是用于在使用前用合适的媒介物(例如,无菌无热原水)构建的粉状形式,。

[0516] 除了先前介绍的制剂,该组合物也可以配制为储存制剂。这种长效作用制剂可通过植入(皮下)施用。因此,例如,该组合物可以与合适的聚合或疏水材料(例如,可接受的油中的乳液)或离子交换树脂一起配制,或配制为略溶衍生物,例如,略溶的盐。

[0517] 用于全身口服施用的药物组合物可采取以传统方法用药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊的形式,该赋形剂如结合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或硅石);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠);或润湿剂(例如,十二烷基硫酸钠)。该片剂可以本领域熟知的方法包衣。用于口服施用的液体制剂可采取,例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或者可以提供为用于在使用前与水或其他合适的媒介物一起构建的干燥产品。这种液体制剂可以传统方式,用药学上可接受的添加剂制备,所述添加剂如悬浮剂(例如,山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂肪);乳化剂(如,卵磷脂或阿拉伯树胶);非水溶性载体(例如,杏仁油、油酯、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、或山梨酸)。必要时,制剂还可包含缓冲盐、调味剂、着色剂、和甜味剂。用于口服施用的制剂可适当配制以提供活性化合物的控释。

[0518] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物可以包括按任何上述方法配制的一种或多种化合物,以及从本文所述的方法获得的一种或多种细胞。

[0519] 有效/治疗剂量

[0520] 本文所述化合物和药物组合物的毒性和疗效可以通过标准药物程序,使用培养物的细胞或实验动物来测定以确定 LD_{50} (群体的50%的致死剂量)和 ED_{50} (在体的50%中的治疗有效剂量)。毒性效应和疗效之间的剂量比是治疗指数,可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 的比。优选表现出较大的治疗指数的多肽或其他化合物。

[0521] 从细胞培养测定和进一步的动物研究中获得的数据,可用于配制人类使用的剂量范围。该化合物的剂量优选地位于循环浓度的范围内,包括相当少或无毒性的 ED_{50} ,并且对于人的听力有相当少副作用或无副作用。根据使用的剂量形式和使用的施用途径,剂量会在该范围内变化。对于本文所述的方法中使用的任何化合物而言,治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定中评估。可以在动物模型中配制剂量,以达到并包括在细胞培养中测定的 IC_{50} (即,达到症状的半数最大抑制时的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。该信息可用于更准确地确定对人的使用剂量。分化剂的示例剂量是从至少每千克每天大约0.01mg到3000mg,例如,至少每千克每天大约0.00001mg、0.0001mg、0.001mg、0.01mg、0.1mg、1mg、2mg、5mg、10mg、25mg、50mg、100mg、200mg、500mg、1000mg、2000mg或3000mg或更多。

[0522] 制剂和施用途径可以适合于正在治疗的疾病或疾患,并且适合于受治疗的特定的人。受治疗者可以接受每天一次或两次或更多次的剂量,持续一周、一个月、六个月、一年或更久。治疗可以无限期地继续,如人的整个寿命。治疗可以以规律的或不规律的时间间隔(每隔一天或一周两次)施用,并且施用的剂量或时间可以在治疗全程中调整。剂量可以在

整个治疗方案中保持不变,或可以在治疗过程中减少或增加。

[0523] 一般来说,该剂量有利于预防和治疗的预期目的,且没有不期望的副作用,如毒性、刺激性或过敏性反应。虽然个体需求可能不同,但是制剂的有效量的最佳范围的确定,是本领域技术人员所熟知的。人的剂量可以很容易地从动物实验外推(Katocs 等人 Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药理学) 第 27 章,第 18 版, Gennaro 编, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990)。一般来说,提供制剂的有效量的所需剂量,可以由本领域技术人员调整,该剂量根据若干因素变化,所述因素包括接受者的年龄、健康、身体状况、体重、疾病或疾患的类型和程度、治疗频率、必要时同时治疗的性质以及预期的效果的性质和范围(Nies 等人, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics(治疗的药理学基础) 第 3 章,第 9 版, Hardman 等人编, McGraw-Hill, New York, N. Y., 1996)。

[0524] 试剂盒

[0525] 本文所述的化合物和药物组合物,可在试剂盒中提供,已经诱导分化的细胞(例如,已分化为如毛细胞或毛发样细胞的干细胞、祖细胞、和/或支持细胞)和/或有能力分化为毛细胞的细胞也在可试剂盒中提供。该试剂盒还可以包括本文所述的化合物和药物组合物和所述细胞的组合。该试剂盒可以包括:(a) 一种或多种化合物,比如在含有所述化合物的组合物中,(b) 已诱导分化的细胞(例如,已分化为如毛细胞或毛发样细胞的干细胞、祖细胞和/或支持细胞)和/或有能力分化为毛细胞的细胞,(c) 信息材料、以及(a)-(c)的任何组合。在一些实施方案中,(a)和/或(b)可在适合于将(a)和/或(b)直接施用于患者的耳部(例如,中耳或内耳)注射器(如,预装的一次性单剂量注射器)中提供。在一些实施方案中,(a)和/或(b)可以在如上所述的适用于将(a)和/或(b)直接施用于患者的耳部(例如,中耳或内耳)导管和泵系统中提供。信息材料可以是描述性材料、说明性材料、市场材料或其他材料,其涉及本文所述的方法和/或用于本文所述方法的药剂的使用。例如,信息材料涉及使用化合物治疗受治疗者,该受治疗者患有或有风险发展为听觉毛细胞损失和/或异常细胞增殖。该试剂盒还可包括向细胞(培养物中或体内)施用分化剂和/或向患者施用细胞的附件。

[0526] 在一个实施方案中,信息材料可以包括以适合的治疗人方式,例如,以合适的剂量、剂型或施用模式(例如,本文所述的剂量、剂型、或施用模式)施用该药物组合物和/或细胞的说明书。在另一个实施方案中,信息材料可以包括将药物组合物施用于适合的受治疗者的说明书,所述受治疗者例如,人,如,患有或有风险发展为听觉毛细胞损失和/或异常细胞增殖的人。

[0527] 该试剂盒中的信息材料形式不限。在许多情况下,信息材料(例如,说明书)以印刷品形式提供,如印刷的文本、图、和/或照片,如标签或印刷页。然而,信息材料,也可以其他形式提供,如点字、计算机可读材料、影像记录或音像记录。当然,信息材料也可以任何形式的组合提供。

[0528] 除了分化剂,该试剂盒的组合物可以包括其他成分,如溶剂或缓冲液、稳定剂、防腐剂、香料或其他化妆品成分、和/或用于治疗本文所述的病症或疾患的第二药剂。此外,其他成分可以包含在该试剂盒中,但在不同于该药剂所在的组合物和容器中。在这样的实施方案中,该试剂盒可以包括混合该药剂和其他成分的说明书,或将一种或多种化合物与

其他成分一起使用的说明书。

[0529] 该试剂盒可以包含用于药物组合物的一种或多种容器。在一些实施方案中,该试剂盒包含用于组合物和信息材料的独立的容器、隔板或隔间。例如,组合物可以包含在瓶中(例如,滴管瓶,如用于将滴剂施用于耳)、小瓶或注射器,并且信息材料可以包含在塑料套或塑料包中。在其它实施方案中,试剂盒的不同单元都包含在一个不可分割的容器中。例如,组合物包含在一个瓶子、小瓶或注射器中,其贴有标签形式的信息材料。在一些实施方案中,该试剂盒包含多个(如,大量)单独容器,每个包含药物组合物的一个或多个单位剂量形式(例如,本文所述剂量形式)。例如,该试剂盒可以包括多个注射器、安瓿瓶、铝箔包或泡罩包装,每个包含药物组合物的单一单位剂量。该试剂盒的容器可以是气密的和/或防水的,并且容器可以标记特殊用途。例如,容器可以标记用于治疗听力疾患。

[0530] 如上所述,该试剂盒任选地包括适用于该组合物施用的装置(例如,注射器、吸管、镊子、滴管(如,耳滴管)、拭子(例如,棉签或木制棉签)、或任何这种递送装置)。

[0531] 实施例

[0532] 本发明在以下实施例作进一步描述,所述实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0533] 实施例 1. 高通量筛选优化

[0534] 将稳定地表达由 Math1 增强子和最小启动子调控的荧光素酶基因的人类胚胎肾(HEK)细胞系用于 144,000 个小分子的高通量筛选(HTS)以鉴定增加 Math1 表达的化合物(即,转录和/或翻译)。这些化合物可以用于增加干细胞、祖细胞和支持细胞转化为或者趋向于毛细胞。鉴定这些化合物的筛选,在 Li 等人(美国公开号 2005/0287127)和 Li 等人,(美国申请号 11/953,797)中描述。

[0535] 使用 1 μ M 视黄酸作为活化 Math1-荧光素酶报道分子构建体的阳性对照优化 HTS。视黄酸是熟知的向成熟细胞类型分化的通用诱导剂。

[0536] 将稳定表达 Math1-荧光素酶报道分子的 HEK 细胞置于 384 孔板上并且在含有 10% 胎牛血清(FCS)的培养基中培养过夜。通过加入荧光素酶检测剂后,从读板器上荧光的增加来测量 Math1 增强子的活性。优化了该测定的细胞数目、孵育时间、培养基体积、细胞裂解试剂和荧光素酶试剂。比较具有和没有视黄酸(1 μ M)时具有 Math1-荧光素酶构建体的细胞的发光水平,和/或具有和没有 Math1 增强子和最小启动子区时具有荧光素酶构建体的细胞的发光水平。

[0537] 数据显示 Math1-荧光素酶报道分子对视黄酸敏感,而且这个测定具有低背景。用 1 μ M 视黄酸处理过的细胞的荧光素酶活性,相较于未处理的细胞稳定地增长 1.8 倍。无增强子的启动子的发光水平低。

[0538] 为了提高检测的灵敏度,并且降低变异系数(CV),使用了更灵敏的荧光素酶试剂(BriteLite 荧光素酶报道分子检测试剂,Perkin Elmer),而且在裂解试剂中加入了 Triton-X-100,以保证细胞充分裂解。这些改变后,记录到 CV 是 4.2%。将这些条件用于所有的高通量筛选。定义阳性化合物的荧光阈值为高于对照(例如,暴露于 DMSO 的细胞)两倍的增加。

[0539] 对在化合物中的暴露时间和细胞密度进行如下优化。测定的最佳暴露时间以提供 Math1 活性最大并且细胞损失最少的时间。这使用不同视黄酸浓度来施行。

[0540] 在存在视黄酸时孵育 60 小时后,观察到最大发光,然而,在 72 小时时间点,观测到信号明显降低到 50%。在 48 小时的时间点,发光接近极大值,而且具有所有检测的时间的最高信号背景比。所以,将 48 小时选定为测定的终点。

[0541] 最优细胞密度是通过细胞滴定实验来确定的,其中比较 384 孔板中每孔接种 2000 到 40000 个细胞的孔中的 Math1- 荧光素酶报道分子的活性。之后比较了暴露在视黄酸的细胞和没有暴露在视黄酸中的细胞。还采用了细胞存活测定确定表达 Math1- 荧光素酶报道分子的细胞的存活。

[0542] 细胞存活测定显示在每孔 2000 到 10000 个细胞的范围内,细胞数量呈线性增长。在每孔 8000 到 15000 个细胞的孔内产生的信号没有差异,这说明可能在密度超过每孔 10000 个细胞的实验过程中细胞的存活减少。未处理的和视黄酸处理的细胞的最大区别在每孔 8000 个细胞的密度下观测到。基于这些结果,选择测定参数为每孔 8000 个细胞,以及测试化合物或已知活化剂存在和不存在的条件下孵育 48 个小时。

[0543] 实施例 2:鉴定 Atoh-1 表达的活化子的高通量筛选

[0544] 将细胞接种在 384 孔板上,并且可以在缺乏生长因子时 37 摄氏度和 5% CO₂ 浓度下附着过夜。Math1 的活化是通过加入荧光素酶检测试剂后读板器上发光的增加来测量。在 24 小时、48 小时、72 小时评估发光。这些条件用于对 144,000 个化合物进行筛选,所述化合物包含于哈佛大学的神经发育药物开发实验室 (LDDN) 中的小分子库中。

[0545] 使用接种在 384 孔板中的 HEK-Math1 细胞施行 HTS。使用针转移器将化合物添加到每个孔中。每个化合物的最终浓度是 100 μM。细胞在化合物存在于 5% CO₂ 中和 37 摄氏度时孵育 48 小时。然后,收集细胞裂解物,并测量生物发光。发光值相对 DMSO 进行标准化比较。

[0546] 每周在 50 个具有自动系统 (Beckman Biomek FX) 辅助的 384 孔板中筛选大约 20000 个化合物。化合物的筛选是在平均最终浓度为 0.7 μM (在 0.04% DMSO 中),每一块板子包括 16 孔的 1 μM 视黄酸作为阳性对照、16 孔的 0.04% DMSO 作为媒介物对照。通过该化合物处理后的细胞和 DMSO 处理后的细胞的对比来测定测试化合物的发光活化百分数。

[0547] 初始的筛选使用重复板进行以检测超过 10,000 个化合物的文库。如图 117B 所示,相比较于观察到的 DMSO 中 Math1 表达水平,观察到 40 个化合物将 Math1 增强子的活性增强至少两倍 (即,40 个化合物是阳性的)。具有阳性对照的不同孔之间变化的 Z 因子显示在图 117A 中。Z 因子是一个基于阳性对照和阴性对照之间信号窗的量值的,反映每个测定板的数据质量的 HTS 的统计数据。还计算了对照组之间的变化。(Zhang 等人, J. Biomol. Screen. 4 :67-73, 1999)。重复具有 Z 值小于 0.4 的任何板。

[0548] 如图 118A 和 118B 中显示,在重复的双重实验中观察到类似的结果。这说明了 HTS 方法的可靠性和可重复性。

[0549] 筛选的 144,000 个化合物中,发现有 921 个促进 Math1 荧光素酶报道分子表达增加超过 60%。命中率是 0.47%。观察到的最高活化是 160% (例如,与 DMSO 比较)。

[0550] 然后,这些化合物的每一个重新检测在最终测定浓度为 0.1 μM、1 μM 和 5 μM 时对反应的剂量依赖性。在鉴别的 921 个阳性化合物中,789 个可以在浓度为 0.1 μM、1 μM、10 μM 时诱发增加的剂量反应。这一观察结果支持了命中的特异性。总的说来,在测试的 921 个化合物中,82%可重复地活化 Math1 荧光素酶报道分子,且 29%显示有部分毒性。

[0551] 在这些实验之后,对这些化合物再评估,并且进一步研究具有良好的生理化学特性的化合物(即,低分子量、缺少具反应功能的侧链基团或者其他的不需要的分子基序),该化合物展现出 Math1 荧光素酶的强效活化而且无毒性。

[0552] 选择做进一步评估的化合物的总数是 110 个化合物。这些化合物的结构如图 1 到图 8 所示。这些化合物对 Math1 表达的促进的增加在图 9-116 中显示。

[0553] 实施例 3. 通过 RT-PCR 评价阳性化合物

[0554] 进一步评估从实施例 2 鉴定的 110 个化合物中随机挑选的 10 个化合物,如下所示。HEK 细胞以 100000 个细胞每孔的密度接种在 96 孔板上。铺板后一天,将在有 10% 的胎牛血清 (FBS) DMEM 溶液中的 0.1 μ M、1 μ M 和 5 μ M 的阳性化合物加入到每个孔。细胞在加入化合物后裂解 48 小时,并用如上所述的荧光素酶报告分子和实时 PCR 分析 Math1 表达。

[0555] 如图 119 所示,10 个随机选择的化合物中的 4 个促进 Math1 的表达增长超过两倍。

[0556] 如图 120A 所示,和 HTS 一样,所有 4 个随机挑选的化合物促进 Math1 的表达增长超过两倍,如使用荧光素酶报告分子测定所测量。

[0557] 还分离出了 RNA,并且用高通量 RT-PCR 扩增 Math1 转录子。如图 120C 所示,与 DMSO 对照相比,所有 4 个随机挑选的化合物促进 Math1 mRNA 表达提高至少两倍。CP. -0193184 和 CP. -0000540 促进 Math1 mRNA 表达的最大增加。图 120B 显示 4 个随机挑选样品的结构。

[0558] 这些数据证实了实施例 2 中提供的数据。

[0559] 实施例 4:通过毛细胞分化评价阳性化合物

[0560] 将内耳干细胞暴露于实施例 2 中所述 110 个阳性化合物组中随机挑选出的化合物 CP. -0000540。

[0561] 如图 121B 所示,与如图 121A 中所示的未暴露于 CP. -0000540 中的细胞相比,CP. -0000540 增加了用毛细胞特异性标志物 Math1-GFP 和肌凝蛋白 7a 共标记的细胞的数目。相比于对照的 1.6%,毛细胞的分化增加到全部细胞的 5.1%。

[0562] 实施例 5:阳性化合物的第二阶段评估

[0563] 评估所有的阳性化合物上调 Math1 mRNA 的能力,以确认实施例 2 中做出的观察结果。

[0564] Math1 mRNA 表达水平使用实施例 3 中所述的 RT-PCR 分析。

[0565] 实施例 6:阳性化合物的第三阶段评估

[0566] 评估阳性化合物增加来自小鼠内耳的源自干细胞的毛细胞产率的能力。还在感觉神经疾病小鼠模型的内耳中体内评估阳性化合物。

[0567] 在体外,分离的细胞暴露于 0.1 μ M、1 μ M 和 5 μ M 的实施例 3,4,5 中鉴定的每个阳性化合物。

[0568] 还将化合物加到内耳损伤的小鼠模型的内耳中,比如,庆大霉素处理的小鼠模型和 / 或 flox 半胱天冬酶转基因小鼠模型。这些模型用来测试在如人类耳聋中发生的由毒性损伤导致的损失后,该化合物再生毛细胞的能力。

[0569] 体外结果的评估是通过检测毛细胞特异性标志物肌凝蛋白 VIIa、Math1、espin、Brn3.1、F-肌动蛋白(鬼笔环肽)、 α -9-乙酰胆碱受体和 / 或 p27kip1 中的一种或多种。抗体和培养的细胞一起孵育,并通过结合偶联于 FITC 和罗丹明的第二抗体检测。个体细胞的荧光用共聚焦显微镜观察,并定量阳性细胞百分比。还确定了每个化合物的三种不同浓

度的影响。

[0570] 细胞还接受生理测试,以鉴别应存在于成熟毛细胞中的通道是(1)存在的和(2)活化的。

[0571] 体内结果在第4、8和12周的时间点评估。毛细胞的再生使用免疫细胞化学来评估,如上所述。功能恢复使用小动物生理学的专门程序中常规进行的方法来评估。

[0572] 实施例7:内耳祖细胞分化的评估

[0573] 评估选定数量的阳性化合物促进源自骨髓的内耳祖细胞分化为毛细胞的能力。实验最初使用源自骨髓的内耳祖细胞(例如间质干细胞(MSC))和荧光素酶报道分子构建体来执行,其中荧光素酶表达受肌凝蛋白VII1增强子区和启动子驱动。这是毛细胞中一个很强的启动子。肌凝蛋白VIIa增强子区域和启动子还可操作地连接到GFP。使用实施例3到6所述的调整用于肌凝蛋白VIIa的方法,使用RT-PCR和免疫细胞化学法,确定阳性结果。

[0574] 实施例8:所述化合物的药理特性

[0575] 使用标准实验室技术,测量实施例2中鉴定的化合物的每一个的半数最大抑制浓度(IC₅₀)以及中间致死剂量或致死剂量50%(LD50)。IC₅₀是化合物抑制生物或者生物化学功能的效果的测量值。LD50是化合物杀死测试群体的一半成员所需的剂量。

[0576] 每一个化合物IC₅₀和LD50的值都显示在表2中。

[0577] 表2

[0578]

化合物	IC50 (μM)	最大值 (倍数 DMSO)	LD50 (μM)
CP-0000477	2	2	>30
CP-0000489	0.1	2.1	>30
CP-0000540	1.3	2	>30
CP-0000550	0.03	2	> 30
CP-0000553	0.01	2	> 30
CP-0000554	0.4	2	> 30
CP-0000557	0.02	2.6	30
CP-0000571	0.3	2	> 30
CP-0000928	0.3	2	> 10
CP-0005186	1	1.8	> 10
CP-0007991	0.6	2	> 10
CP-0007994	1	1.9	> 10

CP-0008545	0.4	2.5	> 10
CP-0009883	2.5	2.3	> 10
CP-0010539	0.5	2.1	> 10
CP-0029278	0.5	1.9	> 10
CP-0029300	1.6	2	> 10
CP-0034360	1	2	> 10
CP-0036187	1	2.3	> 10
CP-0039073	1.5	2.4	> 10
CP-0045061	3	1.9	> 10
CP-0047659	1.3	2.3	> 10
CP-0050095	1.5	2.6	> 10
CP-0059547	1	2	> 10
CP-0059563	> 10	1.9	> 10
CP-0059642	1	2.2	> 10
CP-0060729	0.2	1.6	> 10
CP-0060852	2.5	1.8	> 10
CP-0061401	0.6	1.8	> 10
CP-0061566	0.2	2	> 10
CP-0061777	> 10	2.1	> 10
CP-0062030	2	1.6	> 10
CP-0063182	0.2	1.7	> 10
CP-0063375	2.2	1.9	> 10
CP-0063508	> 10	1.7	> 10
CP-0064231	1	1.5	> 10

CP-0064314	> 10	1.7	> 10
CP-0064917	> 10	2	> 10
CP-0065665	0.8	1.7	> 10
CP-0066751	1	1.9	> 10
CP-0066829	1	1.8	> 10
CP-0067108	3	1.8	> 10
CP-0067233	2	1.8	> 10
CP-0067246	1.8	1.5	> 10
CP-0068395	3	1.6	> 10
CP-0068577	1	1.6	> 10
CP-0068929	0.4	2	> 10
CP-0069934	2	1.7	> 10
CP-0069961	2	1.7	> 10
CP-0070164	1.6	1.7	> 10
CP-0070367	2	1.7	> 10
CP-0070844	2	1.7	> 10
CP-0070871	3	2	> 10
CP-0070886	1	2.1	> 10
CP-0071862	0.7	1.8	> 10
CP-0072036	1.5	1.7	> 10
CP-0072092	1	1.7	> 10
CP-0072096	6	2.2	> 10
CP-0072156	2	2	> 10
CP-0072253	1.3	2	> 10

CP-0072271	1	2.2	> 10
CP-0072720	3	1.8	> 10
CP-0074806	0.7	1.8	> 10
CP-0075627	8	2	> 10
CP-0076627	5	2.2	> 10
CP-0078448	> 10	1.9	> 10
CP-0079810	3	2.3	> 10
CP-0079983	3	1.8	> 10
CP-0080276	0.3	2	> 10
CP-0080773	> 10	2.2	> 10
CP-0087336	0.08	2.2	> 10
CP-0087799	1	2.1	> 10
CP-0089966	> 10	2.2	> 10
CP-0091818	0.9	2.1	> 10
CP-0096433	3	2	> 10
CP-0099289	> 10	1.6	> 10
CP-0102404	> 10	1.6	> 10
CP-0103978	1	2	> 10
CP-0104765	0.4	2	> 10
CP-0104766	3	3	> 10
CP-0104904	> 10	2.2	> 10
CP-0105343	3	2	> 10
CP-0105777	0.3	2	> 10
CP-0107060	0.1	2.2	> 10

CP-0109953	0.1	1.8	> 10
CP-0110352	0.05	1.8	> 10
CP-0110644	1	1.8	> 10
CP-0130586	0.5	2.2	> 10
CP-0130665	0.3	2	> 10
CP-0131763	2	2.4	> 10
CP-0134381	2	2.2	> 10
CP-0193184	> 10	N/A	> 30

[0579] 实施例 9 :使用从小鼠耳蜗分离的内耳祖细胞表征化合物

[0580] 检测实施例 2 中所述方法鉴定的化合物促进小鼠耳蜗分离出的小鼠内耳祖细胞分化为毛细胞的能力。

[0581] 耳蜗干细胞从 Atoh1-nGFP 小鼠中分离出来,如前文所述 (Oshima 等人,同上)。如上所述,当 Atoh1 增强子元件被活化后,这些动物表达增强的绿色荧光蛋白 (GFP) 的核版本 (Chen 等人和 Lumpkin 等人,上述)。因此,可将从这些动物中获得的细胞用于使用荧光显微镜追踪内耳祖细胞到毛细胞的分化。

[0582] 简单而言,内耳祖细胞是从二代或者三代动物中,且其年龄为 1 到 3 天时获得。然后,将细胞以每孔 300 个球体的密度接种 (Oshima 等人, JAssoc Res Otolaryngol 8 : 18-31, 2007, 和 Martinez-Monedero 等人, JNeurobiol 66 :319-331, 2008), 并且允许贴在 6 孔板的表面上,且在生长因子存在下培养。将在包含 N2 和 B27 但无生长因子的 DMEM 培养基中培养的细胞暴露于所述化合物中并保持培养 3 到 10 天。细胞分化的监测,是通过检测来自 Atoh1 报道分子的核 GFP 表达绿色荧光,以及通过在化合物处理过的培养物中用成熟毛细胞标志物肌凝蛋白 VIIa 和 espin 染色,并且与在 24、72m、108 小时的时间点上的对照比较。

[0583] 使用实施例 3-6 和 7 中所述的方法,使用 RT-PCR 和免疫细胞化学,对阳性结果确认。

[0584] 实施例 10 :使用小鼠 Corti 器外植体表征化合物

[0585] 检测实施例 2 中鉴定出的化合物在小鼠 Corti 器外植体中促进新毛细胞形成的能力。

[0586] 简单地说,外植体是通过从 Atoh1-GFP 小鼠中解剖得到。Corti 器培养在胶原涂层板上,并在含有血清的培养基中培养过夜。将化合物在植入时加入到培养物中,如前文所述 (Shi 等人,和 Martinez-Monedero 等人,上述)。在分析前,在含有 B27 补充剂 (Invitrogen) 的 DMEM 培养基中保持培养物 3 到 10 天。

[0587] 毛细胞是从培养物中毛细胞行的外侧的上皮细胞形成,使用自动化系统和定量免疫组织化学监测该毛细胞,以检测 GFP 阳性细胞的出现。

[0588] 实施例 11:化合物的优化

[0589] 优化化合物,以提供纳摩尔范围的功效和减少的细胞毒性。

[0590] 化合物使用如上所述的药物化学方法进行修饰。进行吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 研究,以评估 Log P 测定、水溶性评估,小鼠肝微粒体稳定性测定和血浆蛋白结合分析,如以下所述。

[0591] 随后的测试是使用合成或纯化的化合物执行,经 ^1H NMR 测定该化合物纯度至少为 95%。其他的分析技术 (即 ^{13}C NMR、IR、熔点、MS 和 / 或元素分析) 也应用于确定结构和纯度。光学纯的物质也通过手性固定相高效液相色谱评估。化合物结构使用 2-D NMR 和 X 射线晶体学来评估。

[0592] 化合物的 Log P 值的测定是通过在测试管中将 15mL 化合物的储存液中 (10mM DMSO 中) 加入到 750 毫升 1-辛醇缓冲液 (pH 7.4) 中。使用 3mL 睾酮 (50mM DMSO 中) 作为对照。样品在室温震荡一个小时,然后,使样品静置一个小时让不同层分离。每层 400ml 转移并放置在不同的容器中。然后,用 50% 甲醇对每一个样品进行连续稀释。用 50% 甲醇制备的化合物和睾酮的标准曲线,随后,使用 LC/MS 监测分析样品。使用符合两次重复实验的每一个标准曲线的每相中最小稀释样品稀释来独立计算每相中的测试化合物的计算浓度比。通过采用 2 个计算的比值的平均值的 Log_{10} 来计算 Log P。

[0593] 通过将 pH 值调整到 7.4 的 1mL 0.07M NaH_2PO_4 缓冲溶液与至少 1 毫克每个测试的化合物组合,来测定化合物水溶性的评估。然后,将样品震荡 2 小时后,在室温静置 12 小时。然后样品通过孔径为 0.45 微米样品饱和的尼龙注射器过滤器过滤。产生的滤液使用电喷雾通过 LC/MS 检测 ($N = 2$)。

[0594] 化合物化学代谢稳定性使用混合的小鼠肝微粒测定。将结合了 1mg/mL 肝微粒蛋白和 1mM NADPH 的化合物孵育 0、15、30 和 60 分钟。睾酮和普萘洛尔用作阳性对照。不存在 NADPH 的化合物和微粒体作为阴性对照。样品用乙腈猝灭,以 10,000RPM 离心 10 分钟以沉淀蛋白质。样品上清液用 LC/MS 分析 ($N = 3$)。产生 4 个浓度的标准曲线 (100%, 30%, 10% 和 3%), 并且剩余的检测化合物的余量在 4 个时间点上测定。

[0595] 通过制备包含化合物 (5 μm , 0.5% 最终 DMSO 浓度)、缓冲液和 10% 血浆 (缓冲液的体积比) 的溶液来进行血浆蛋白结合研究。装配 96 孔透析板,其中每个孔中都半透纤维素膜将其一分为二 (分子量截流值是 10,000)。将缓冲液加在膜的一侧,另一边加入血浆溶液。然后,密封所述板,并将其放置在定轨摇床上,在 37 摄氏度孵育。在血浆和缓冲液中制备的标准品与透析板一起在 37 摄氏度孵育。每个化合物相对应的溶液在暗盒中用串联质谱法 (LC-MS-MS) 检测。每个化合物重复测试一次。

[0596] 平衡之后,取出膜两侧样品。每一批化合物的溶液都合并为成两组 (无血浆的和含血浆的),使用无血浆 (6 个点) 和有血浆 (7 个点) 两种校准标准品通过 LC-MS-MS 分析暗盒。量化样品,以用等价基质中制备的标准曲线来测定结合的化合物的量。

[0597] 实施例 12:体内药代动力学、毒性和制剂研究

[0598] 使用脑室内 (icv) 注射到小鼠的大脑中来施用化合物,进行剂量研究以测定可通过此途径施用的化合物的最大剂量。

[0599] 使用腹膜内 (IP) 或耳蜗内部施用 3mg/kg 化合物进行药代动力学研究以测定耳蜗,相关组织中该化合物的剂量和浓度。在血浆和耳蜗组织中的,在跨越 24 个小时的九个

时间点测量化合物水平。

[0600] 口服施用的化合物溶解在如 2%羟丙基- β -环糊精的制剂中,浓度是 3mg/kg 体重。耳蜗内施用的化合物如前文所述施用 (Chen 等人, *J. Neurosci. Methods*, 150 :67-73, 2006)。简单地说,小鼠麻醉后,将一个管子插入蜗切开术处,以提供进入鼓阶的通道。然后通过注射泵在 6 小时中以 1 μ L 每小时的流速递送化合物溶液。然后缝合手术部位并在不同时间点检测动物。

[0601] 实施例 13:使用动物耳聋模型的体内研究

[0602] 将 10 周鼠龄的小鼠暴露于~ 116dB SPL 的八音度-波段 (8-16 千赫) 噪声中 2 小时。在 CBA/CaJ 小鼠中,该噪音剂量可以破坏耳蜗底层半部分的外毛细胞,而且破坏了在耳蜗中部更有限的区域的内毛细胞和支持细胞。(Wang 等人, *J. Ass. Res. Otolaryngol.*, 3 : 248-268, 2002)。此外,在内毛细胞受损的区域,神经会在 7 天内退化。恢复阶段之后,测试这些小鼠的 ABR 和 DPOAE。解剖耳蜗,在切割冰冻部分或者全标本包埋之后免疫染色。通过注射 BrdU 和抗体染色冰冻切片,在动物中评估细胞分裂。细胞死亡通过 TUNEL 来评估。对毛细胞、支持细胞和螺旋神经节神经元的数目计数。

[0603] 在噪音处理一周之后,对噪音处理的小鼠注射化合物 (1mg/10g 体重)。样品在第 4、8、14 和 21 天的时间点上进行分析,对耳蜗螺旋的整个长度施行毛细胞计数。

[0604] 功能评估通过使用 DPOAE 和 ABR 的振幅与水平函数的测量值来实现,如前文所述 (Kujawa 和 Liberman, *J. Neurophysiol*, 78 :3095-3106, 1997; 和 Maison 等人, *J. Neurophysiol*, 90 :2941-2949, 2003)。

[0605] 其他实施方案

[0606] 应理解,尽管本发明已经结合其详尽的描述进行了描述,但之前的描述旨在说明性,而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面,优点和改良包括在以下权利要求的范围内。

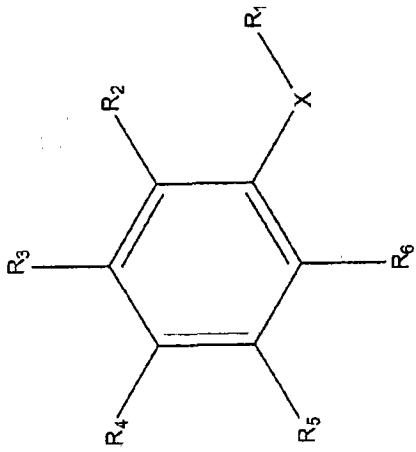


图 1A

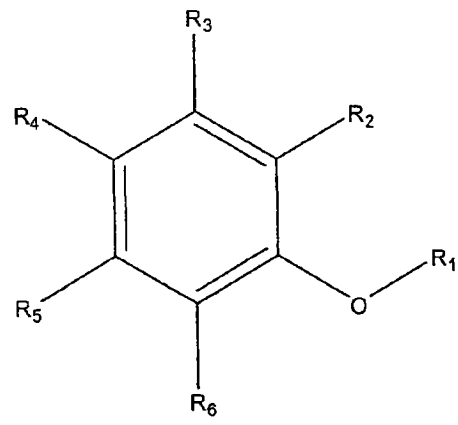


图 1B

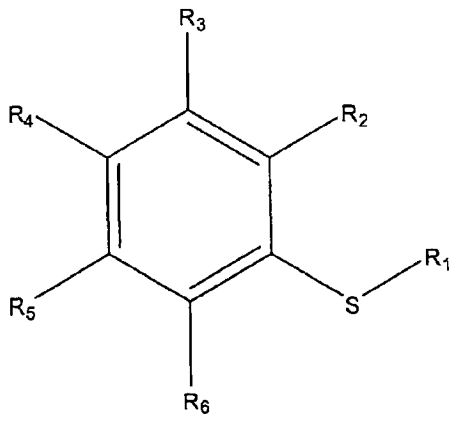


图 1C

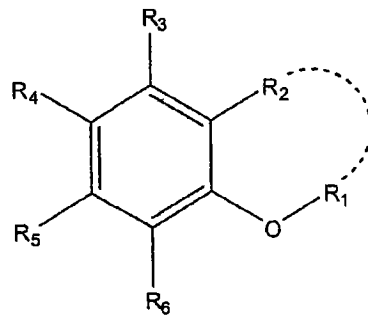


图 1D

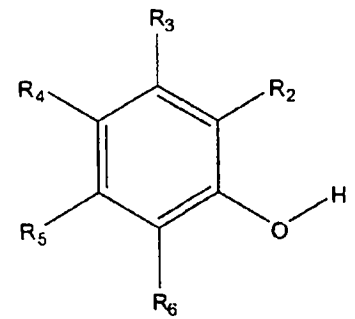


图 1E

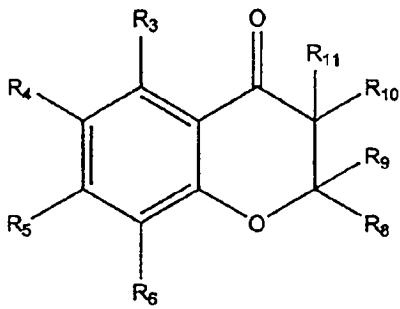


图 1F

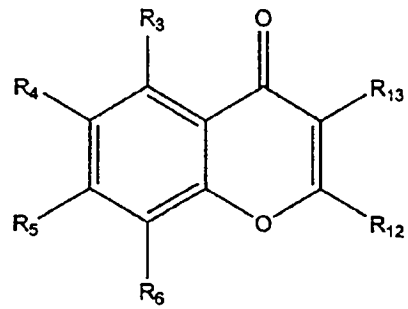


图 1G

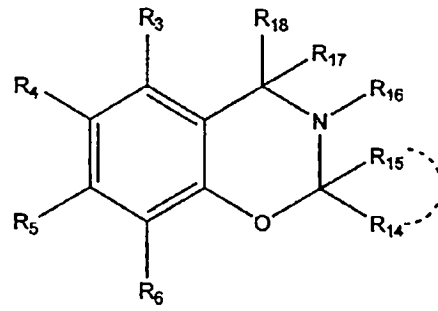
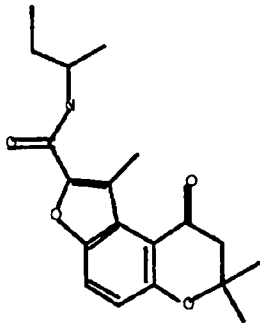
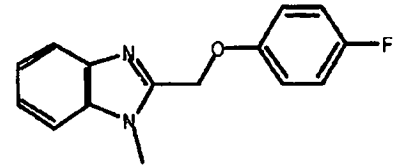


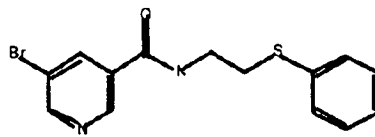
图 1H



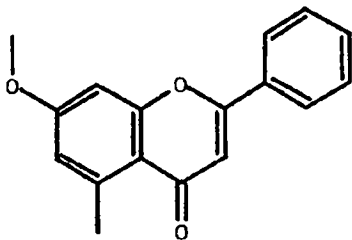
MEEI-0079175



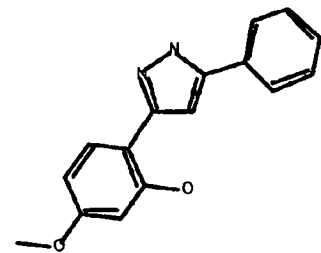
MEEI-0074806



MEEI-0089966



MEEI-0096433



MEEI-0064231

图 1I

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

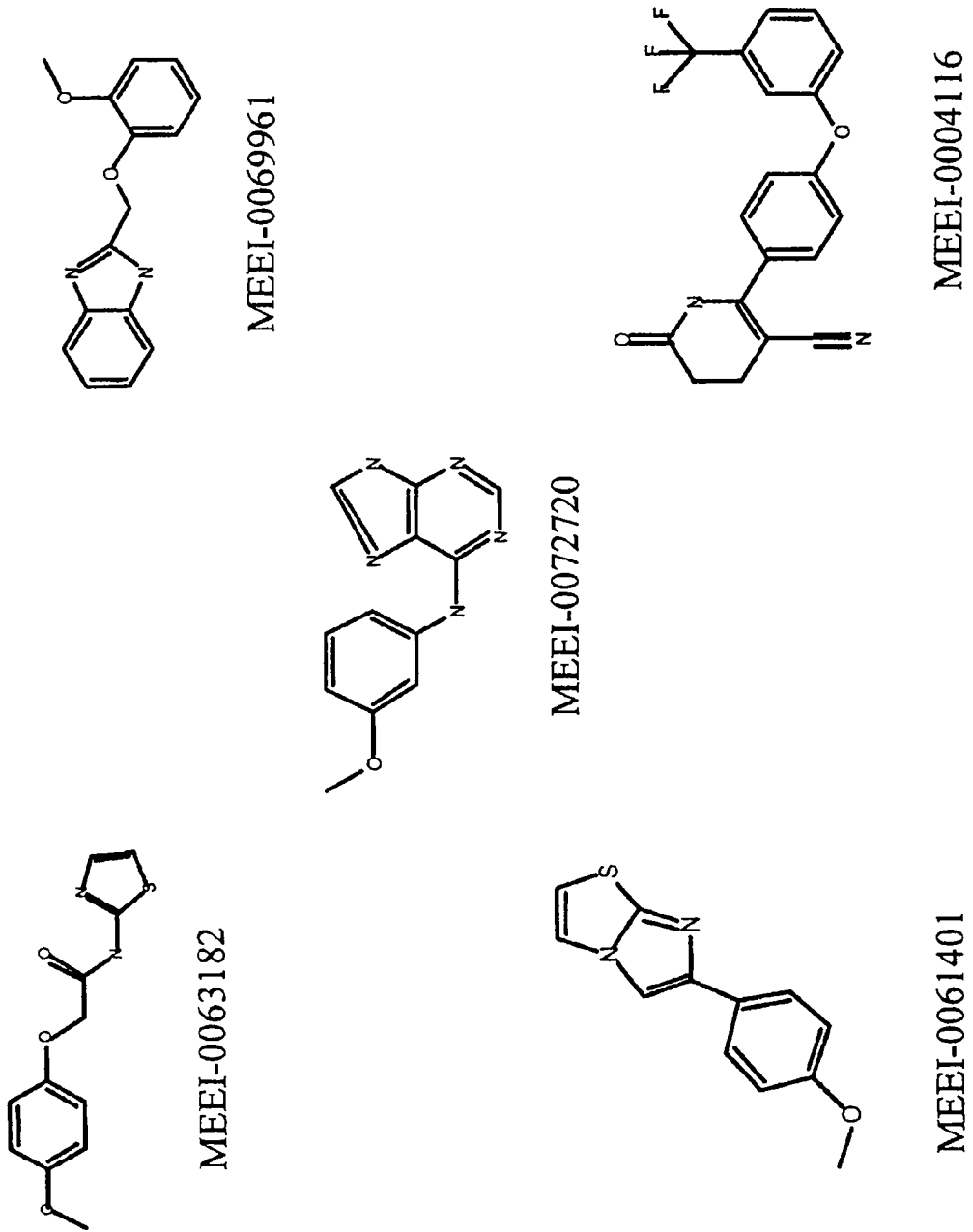


图 1J

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

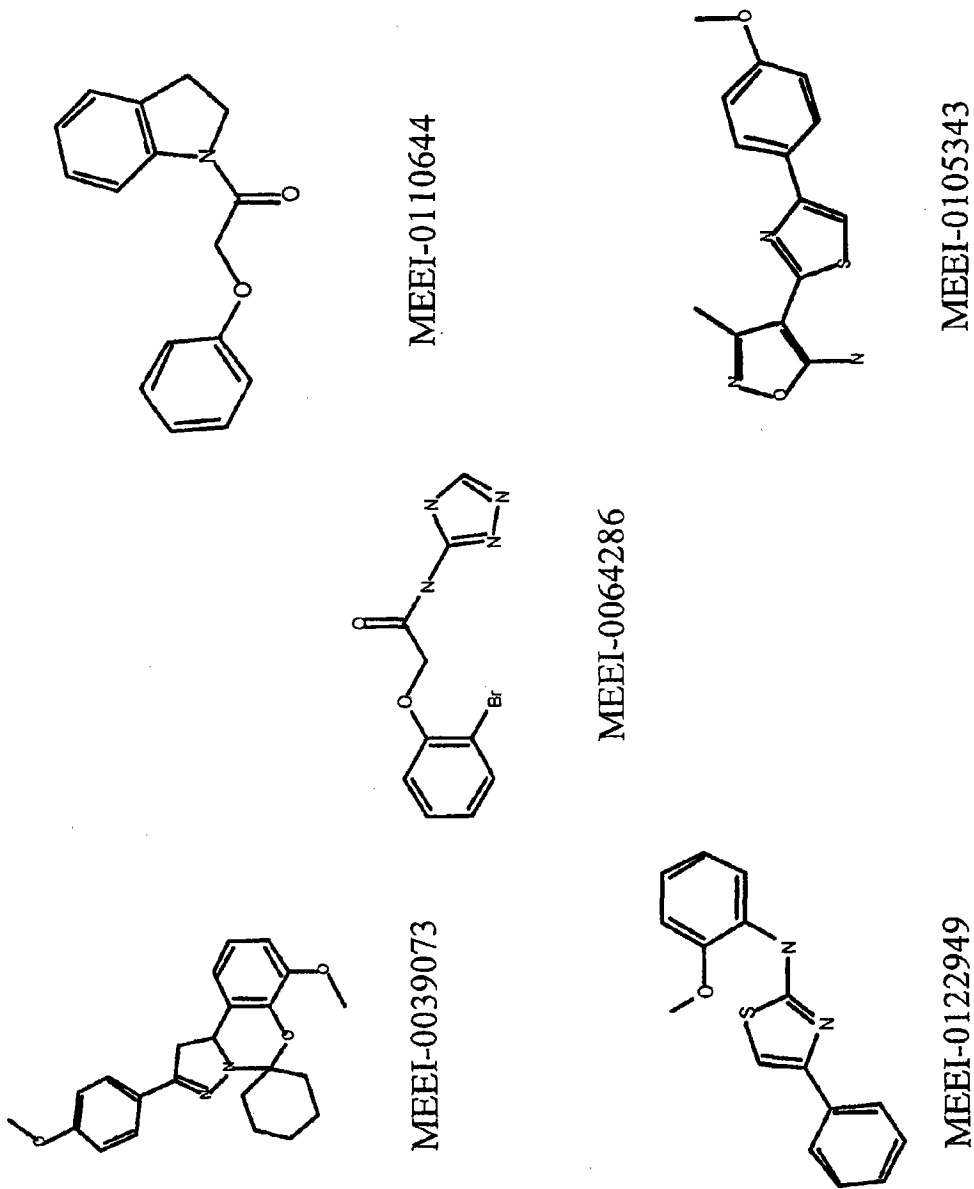


图 1K

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

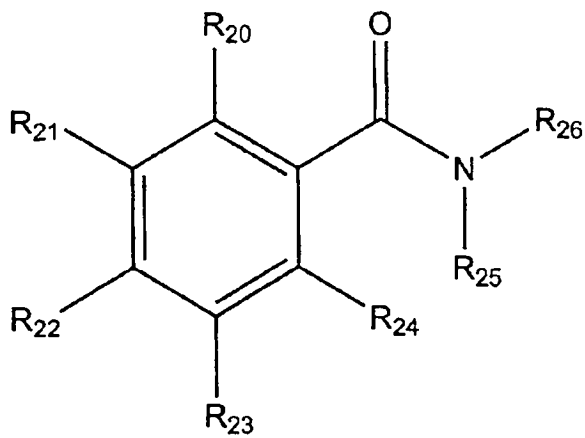


图 2A

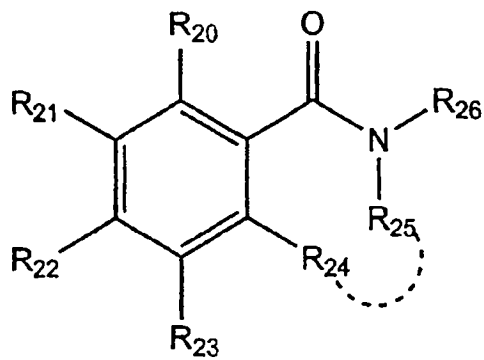


图 2B

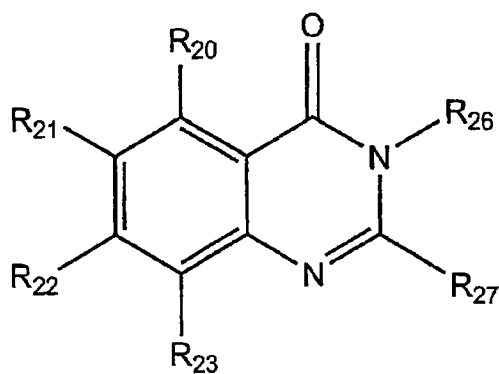


图 2C

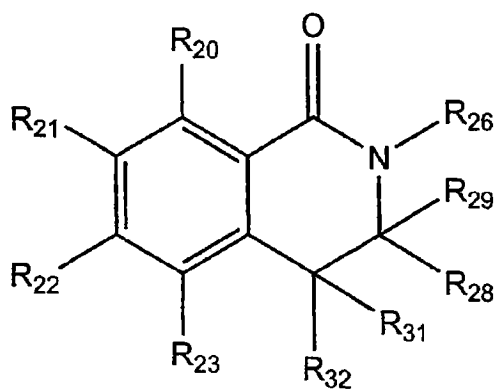


图 2D

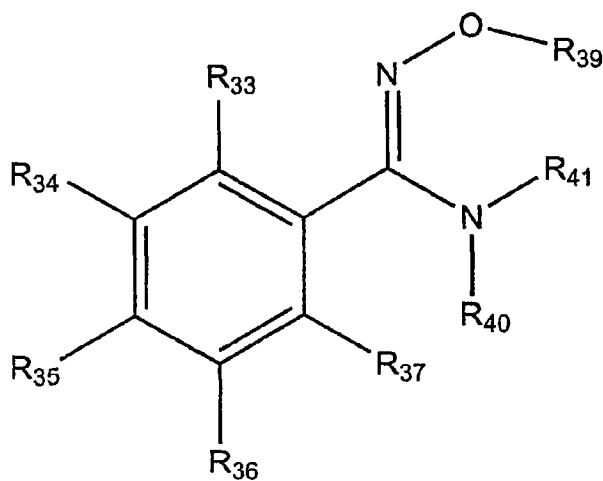


图 2E

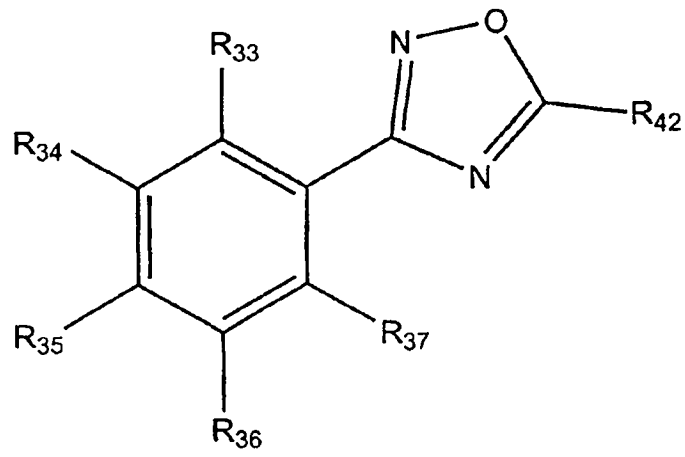
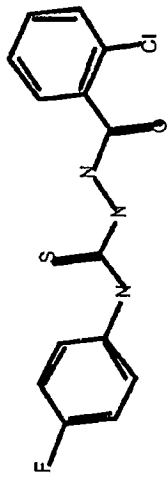
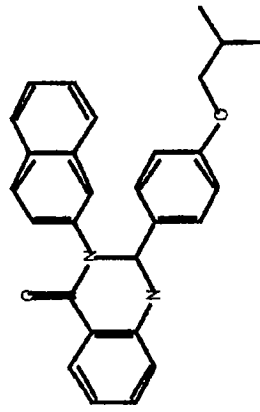


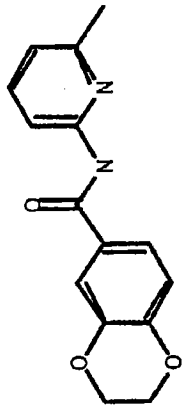
图 2F



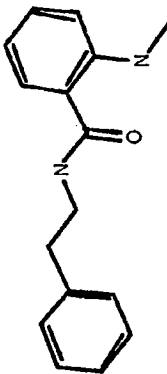
MEEI-0005186



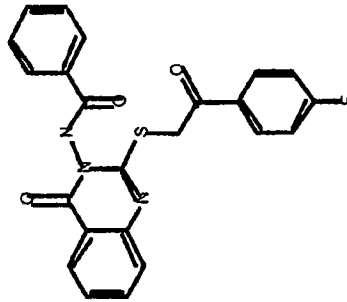
MEEI-0034360



MEEI-0029278



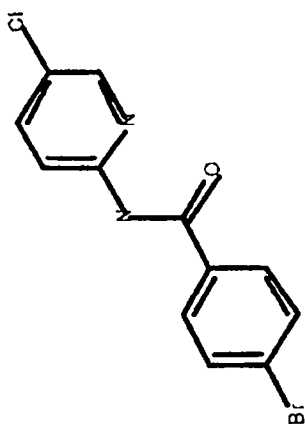
MEEI-0007991



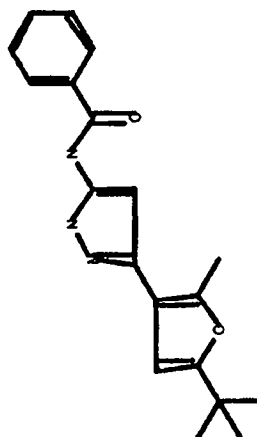
MEEI-0036187

图 2G

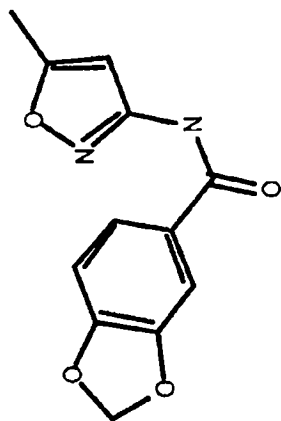
注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



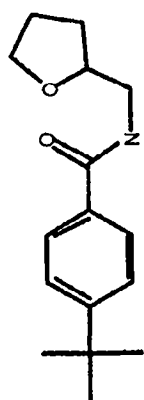
MEEI-0060729



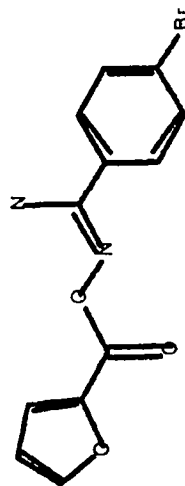
MEEI-0104765



MEEI-0065665



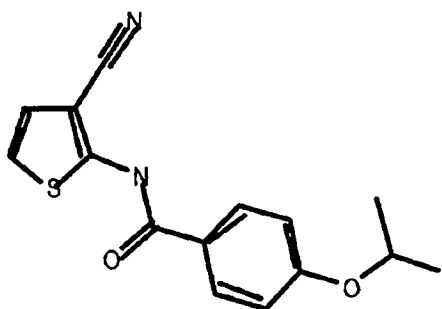
MEEI-0061566



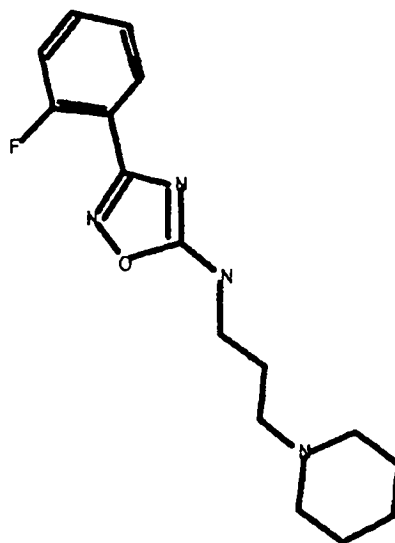
MEEI-0066008

图 2H

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



MEEI-0110352



MEEI-0130665

图 2I

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

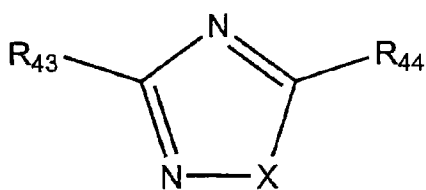


图 3A

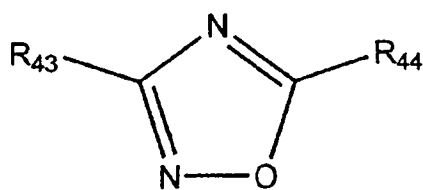


图 3B

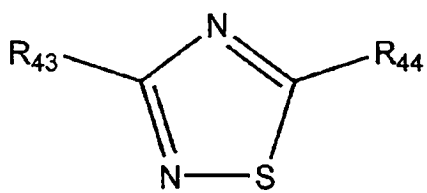


图 3C

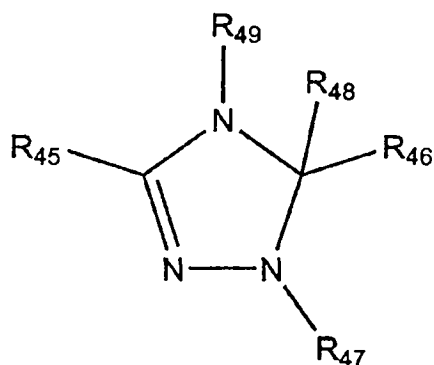


图 3D

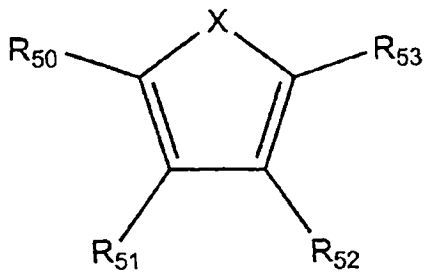


图 3E

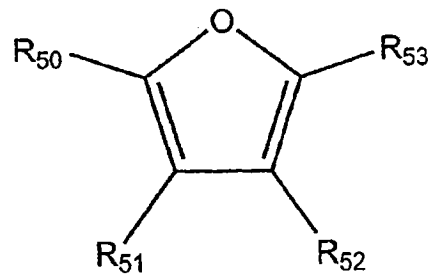


图 3F

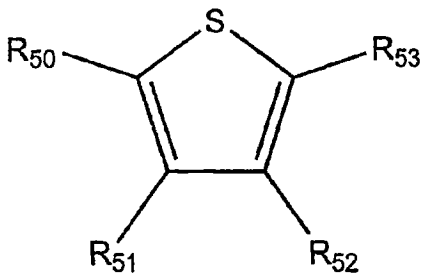


图 3G

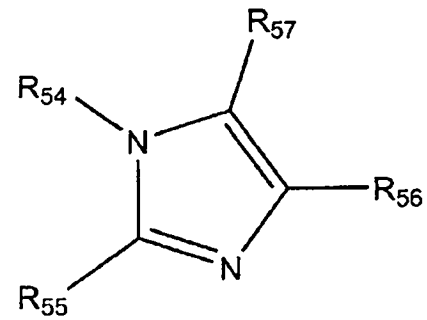


图 3H

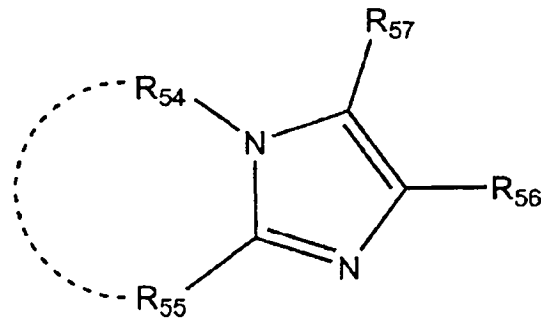
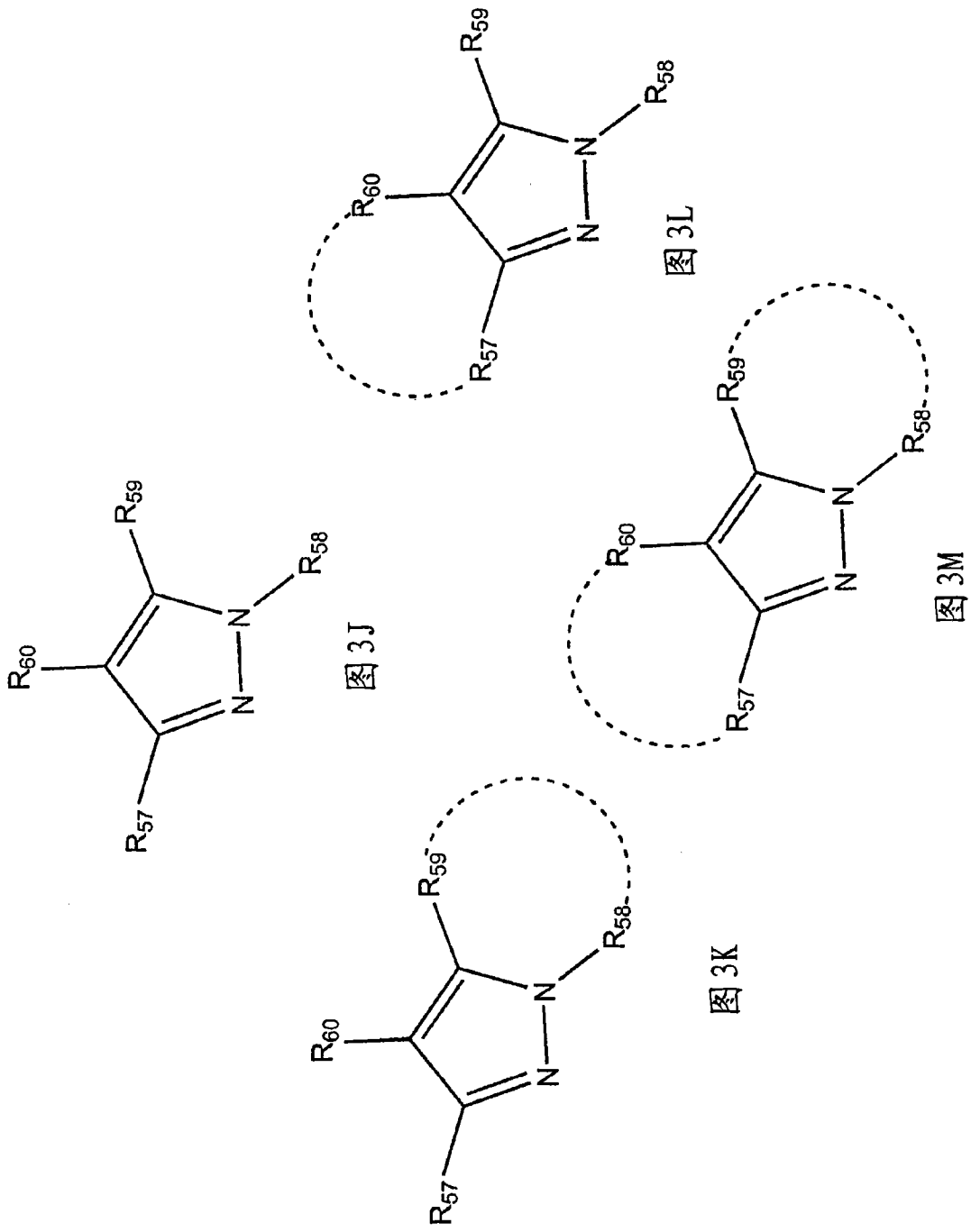


图 3I



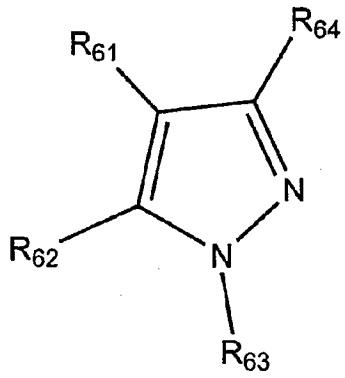


图 3N

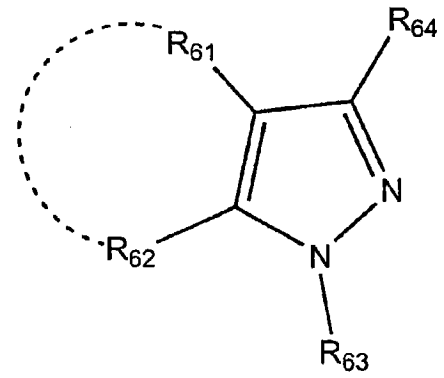


图 30

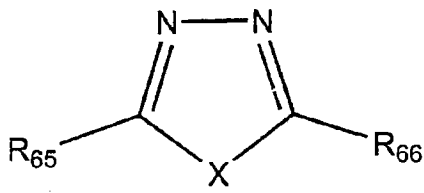


图 3P

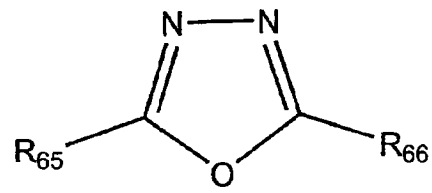


图 3Q

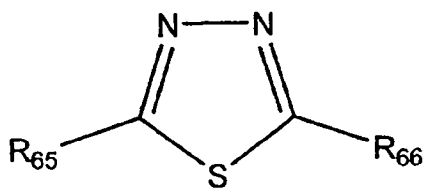


图 3R

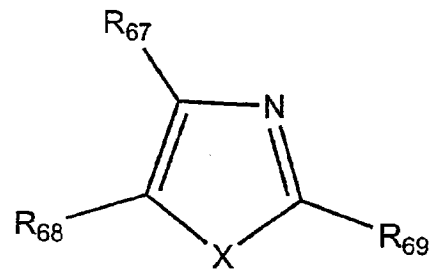


图 3S

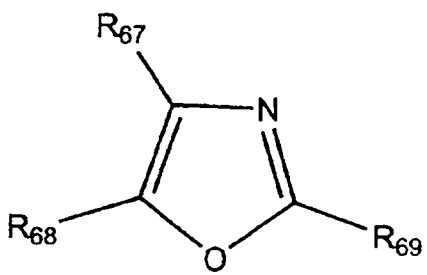


图 3T

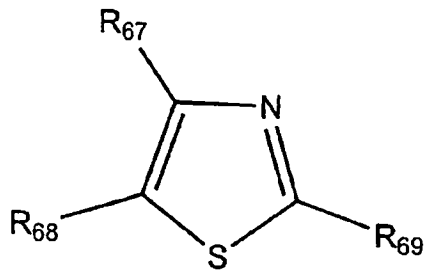


图 3U

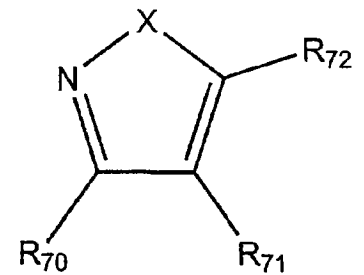


图 3V

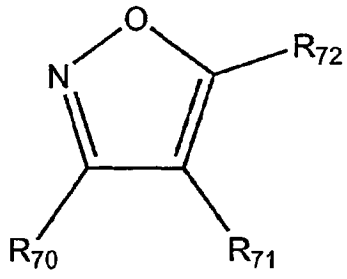


图 3W

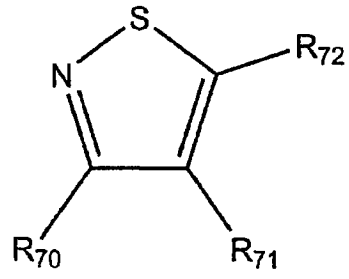


图 3X

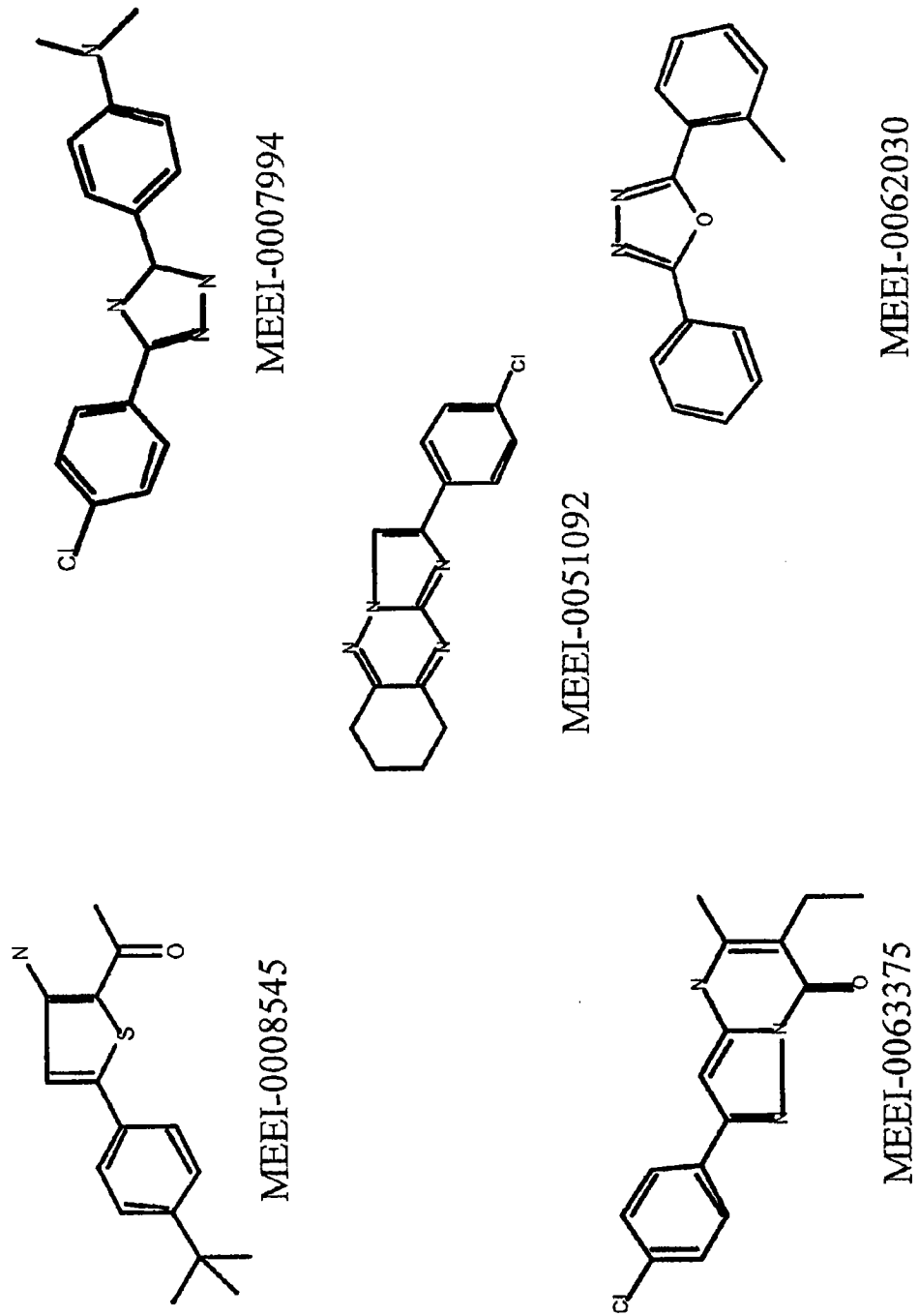


图 3Y

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

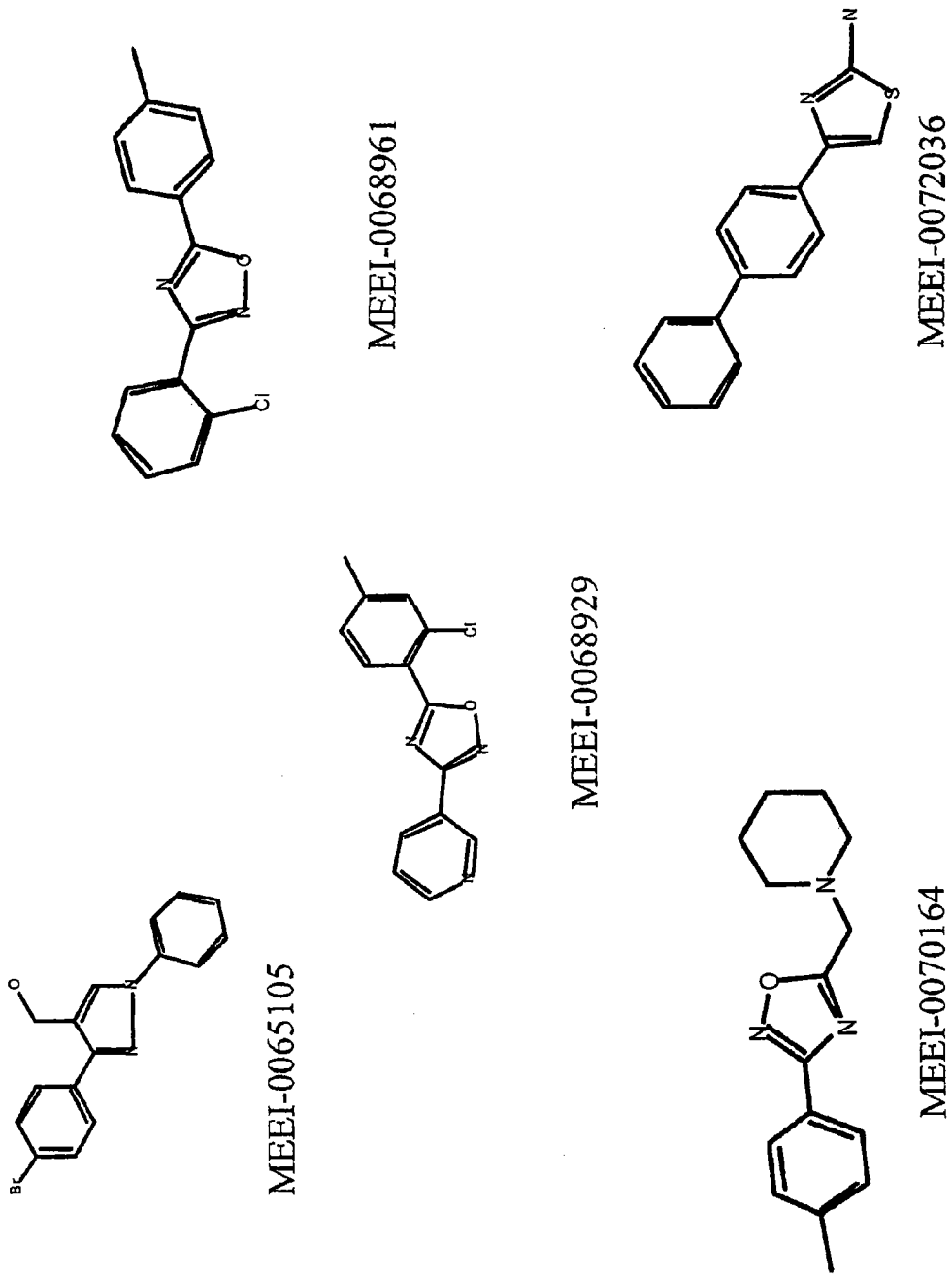
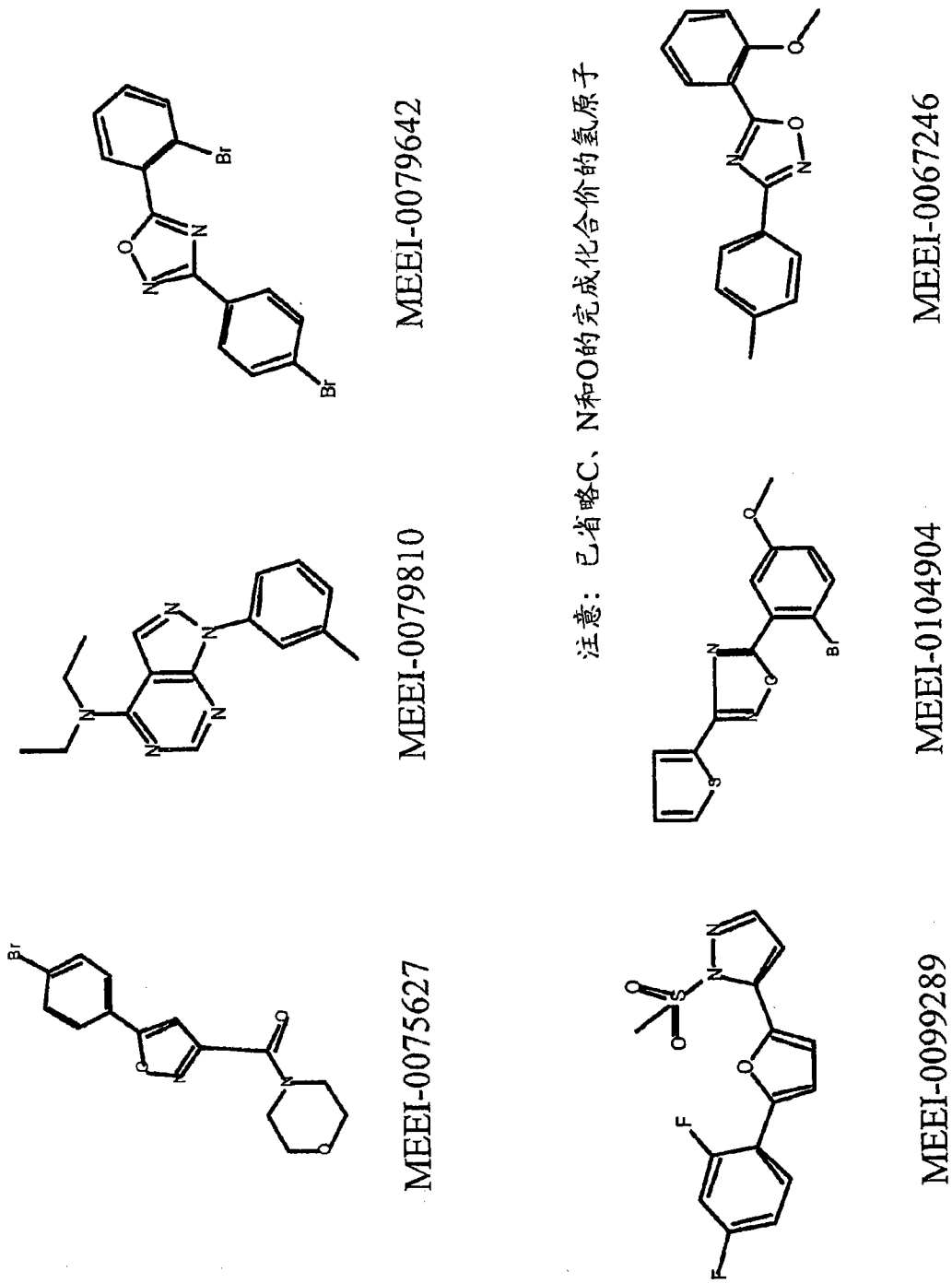


图 3Z

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



注意：已省略C、N和O的完成化合价的氢原子

图 3ZZ

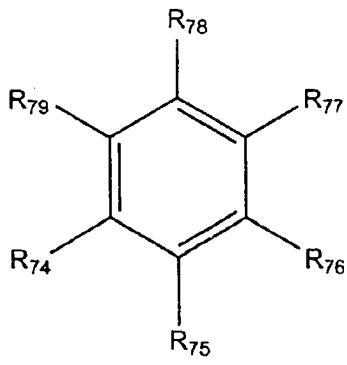


图 4A

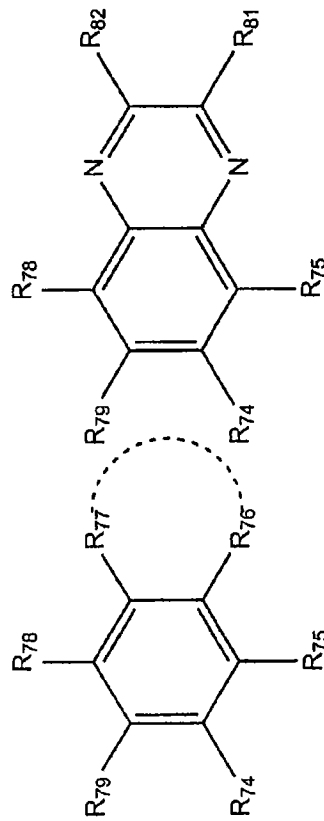


图 4C

图 4B

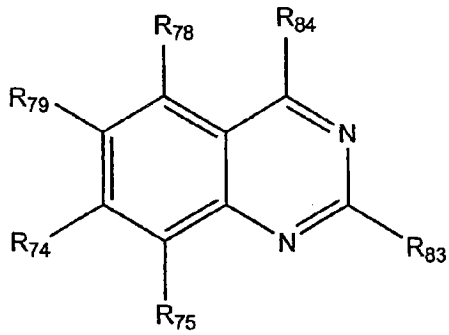


图 4D

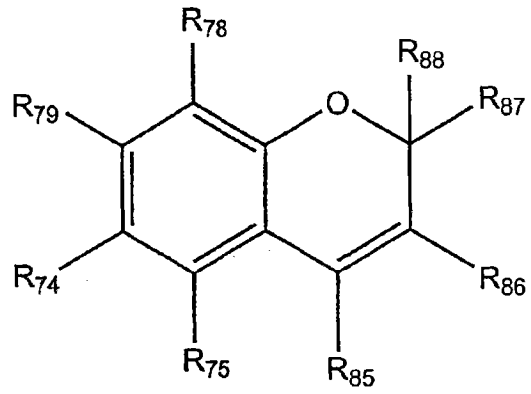


图 4E

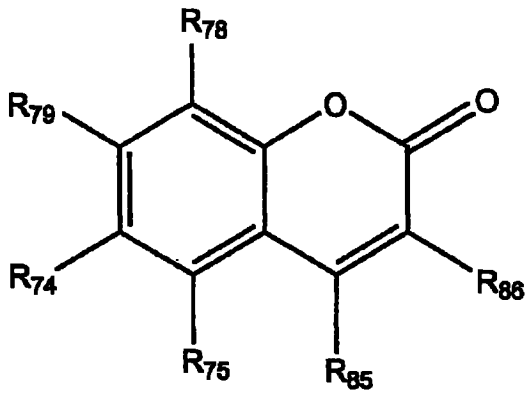


图 4F

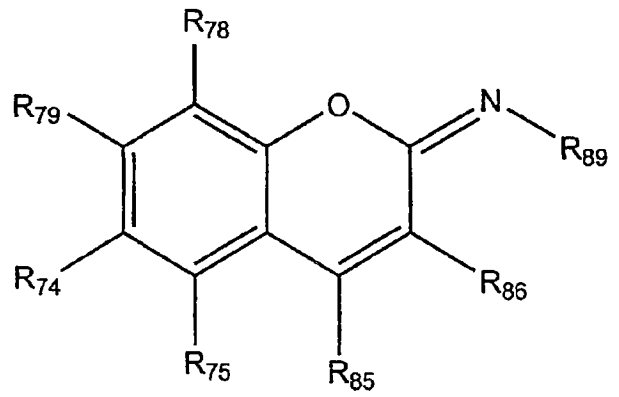
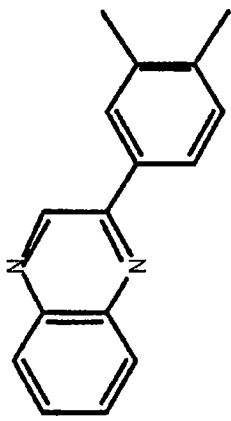
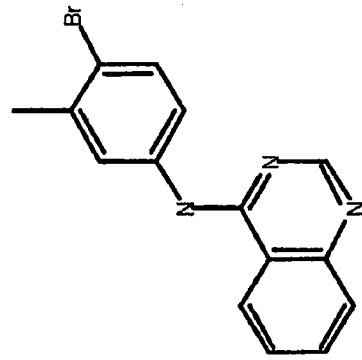


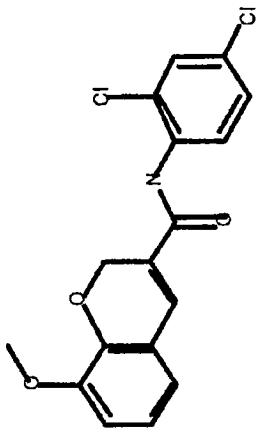
图 4G



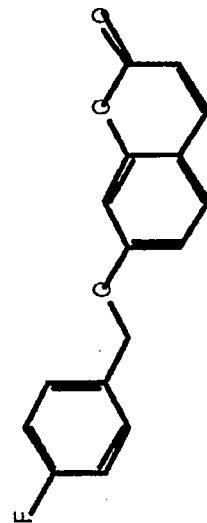
MEEI-0045061



MEEI-0064382



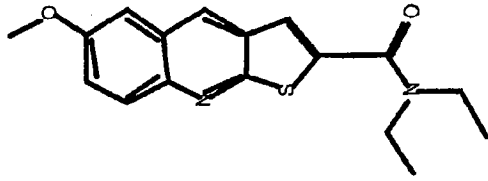
MEEI-0000928



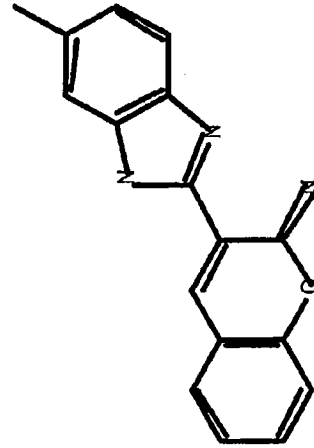
MEEI-0063508

图 4H

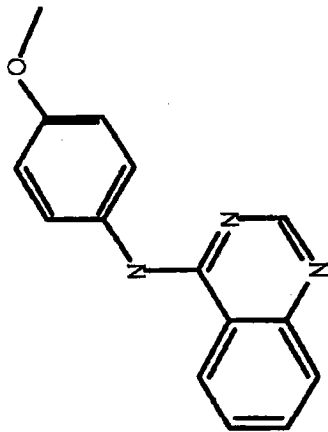
注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



MEEI-0076627



MEEI-0091818



MEEI-0067053

图 4I

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

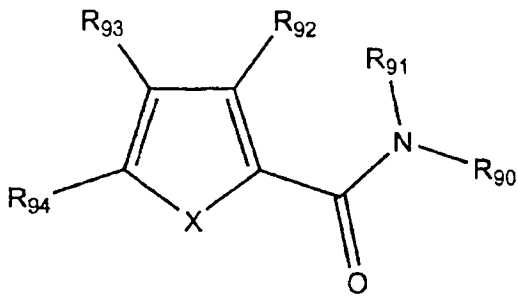


图 5A

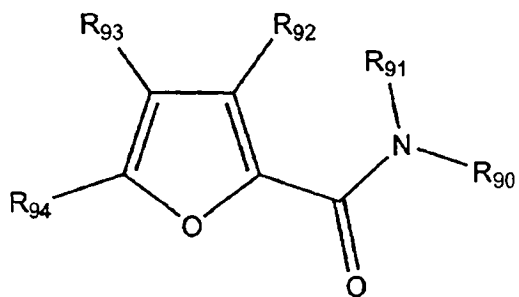


图 5B

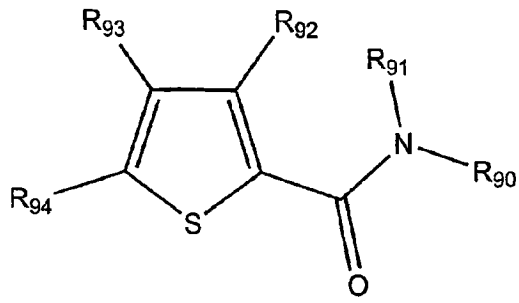


图 5C

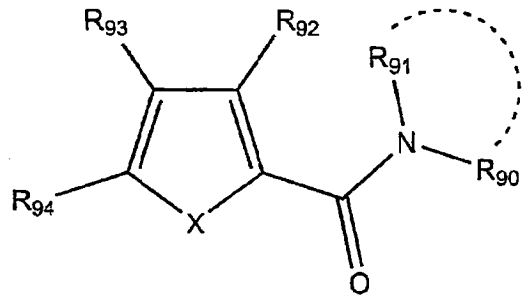


图 5D

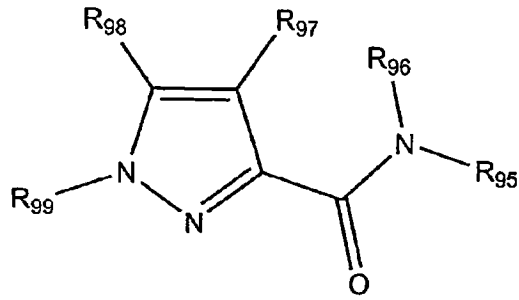


图 5E

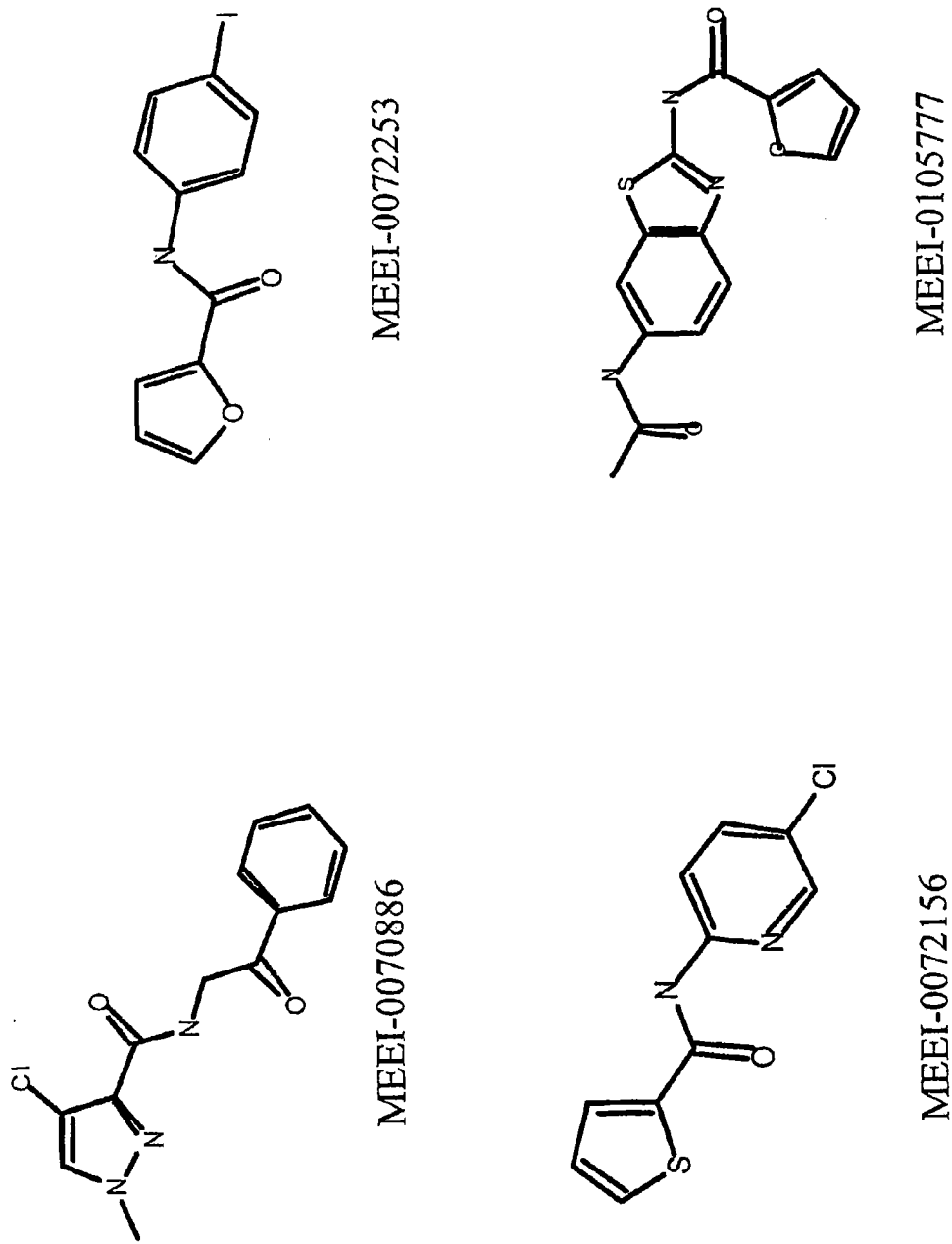
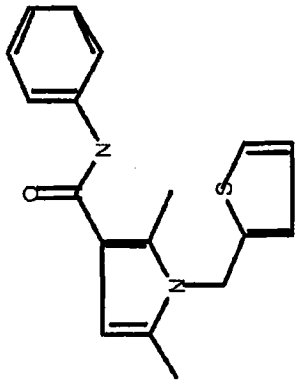
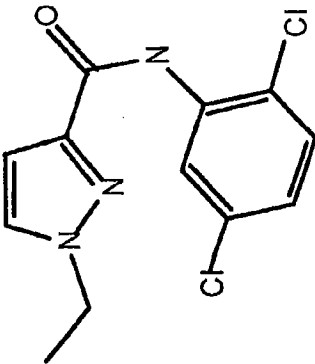


图 5F

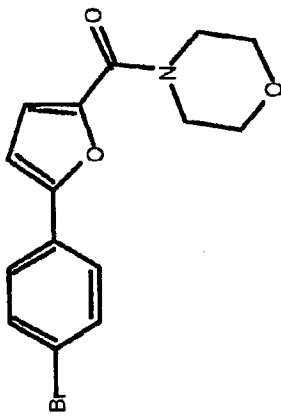
注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



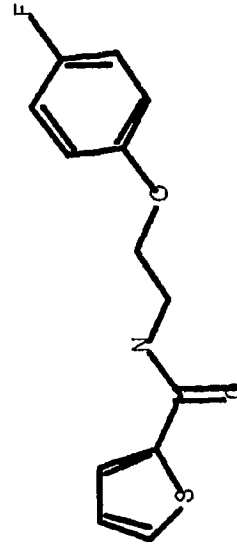
MEEI-0104766



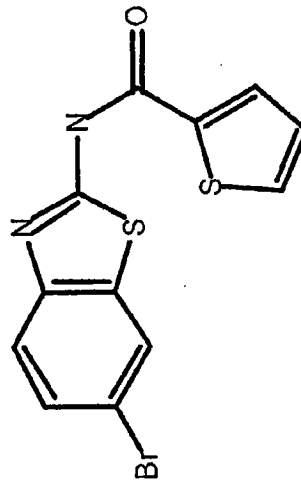
MEEI-0070844



MEEI-0061777



MEEI-0072271



MEEI-0064917

图 5G

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

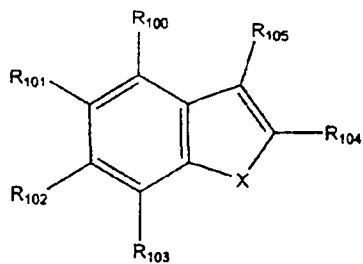


图 6A

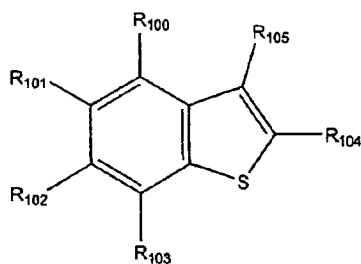


图 6B

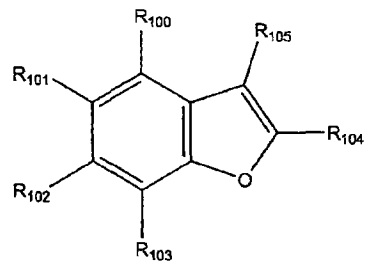


图 6C

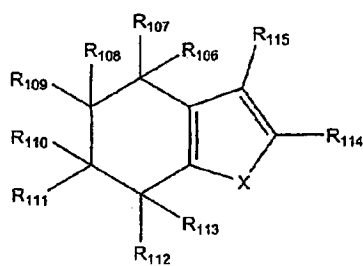


图 6D

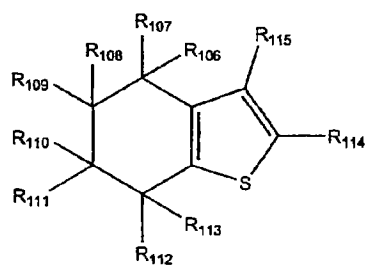


图 6E

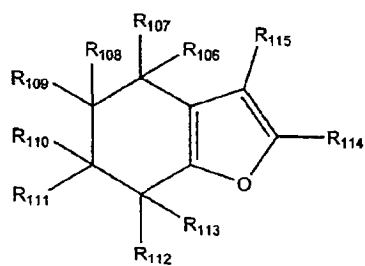


图 6F

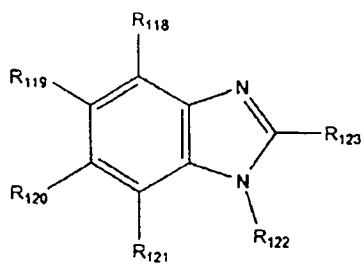


图 6G

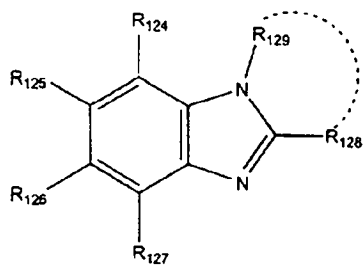


图 6H

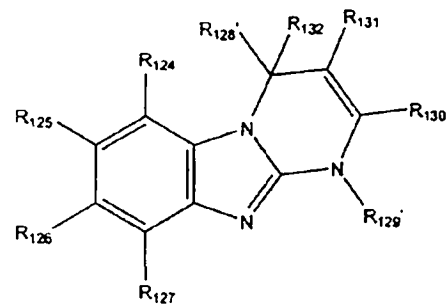


图 6I

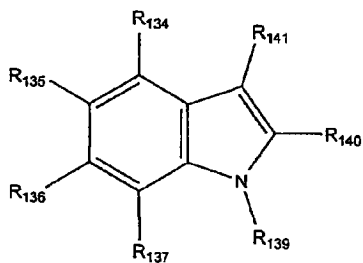


图 6J

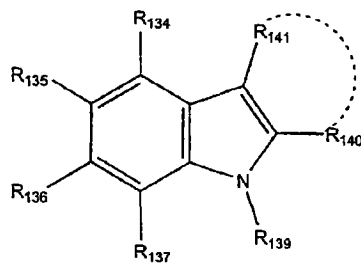


图 6K

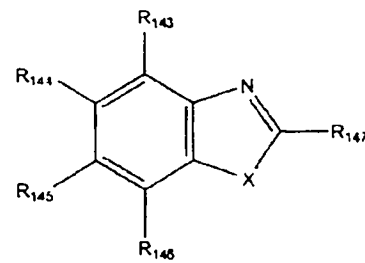


图 6L

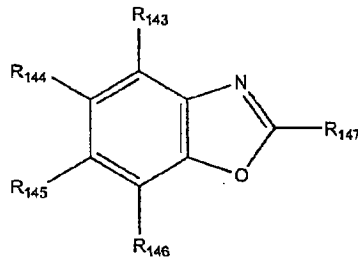


图 6M

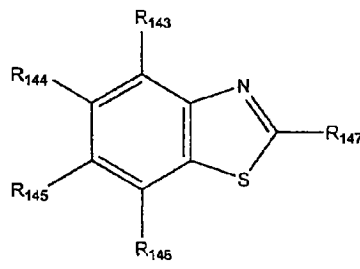


图 6N

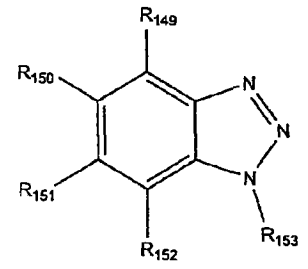
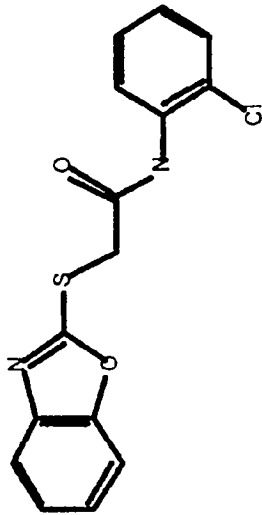
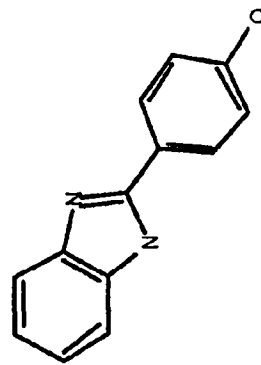


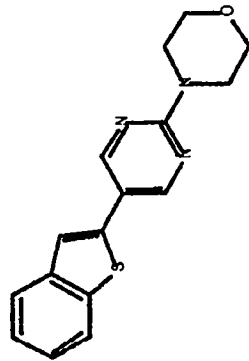
图 60



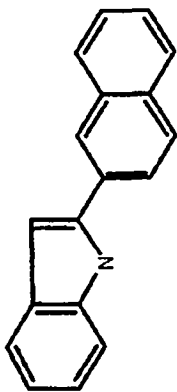
MEEI-0029300



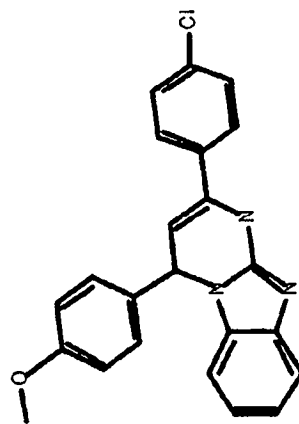
MEEI-0047659



MEEI-0059563



MEEI-0010539



MEEI-0050095

图 6P

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

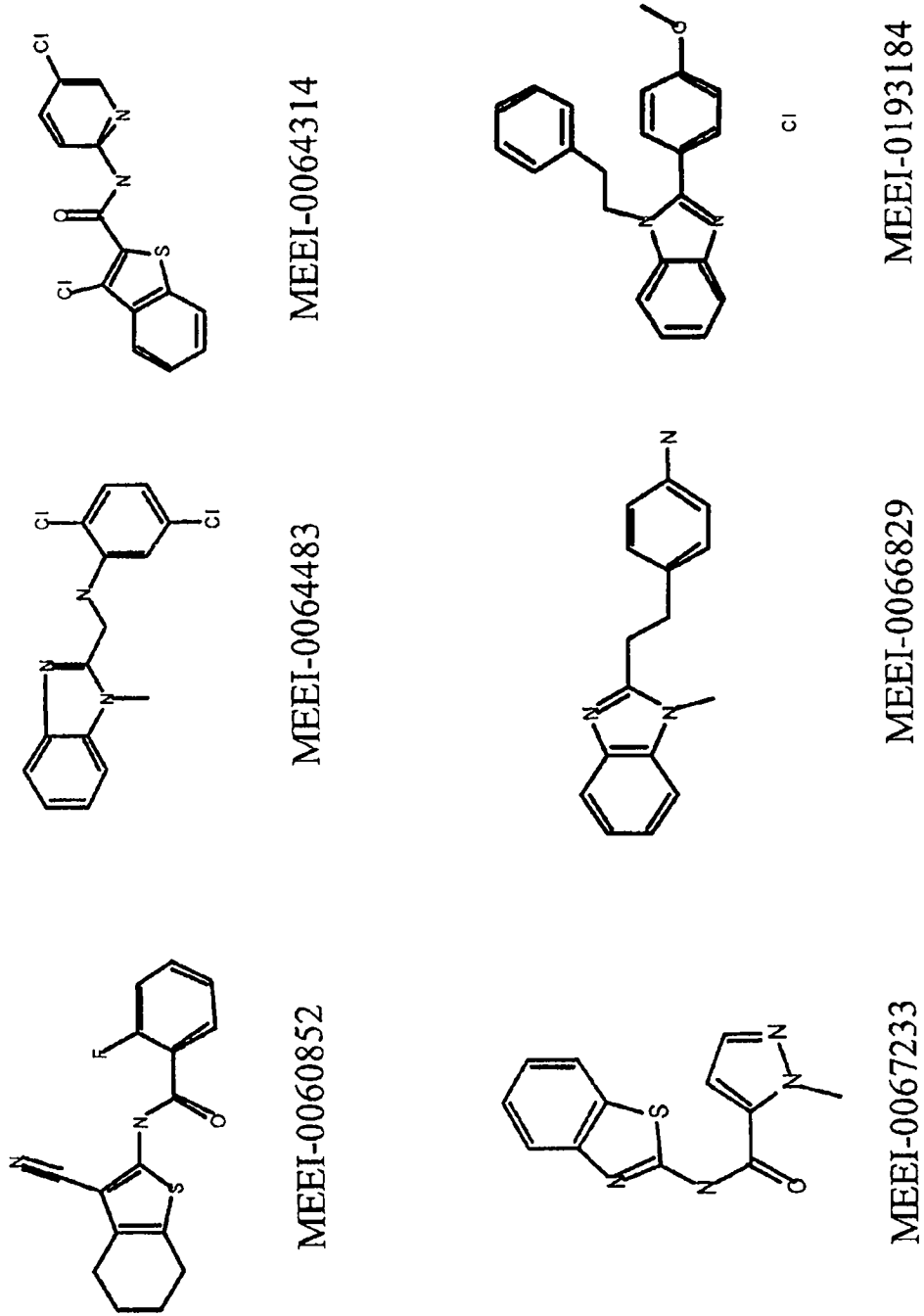
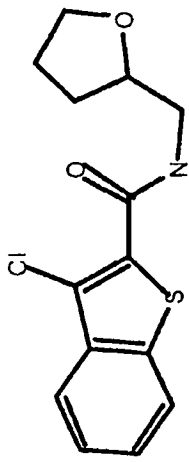
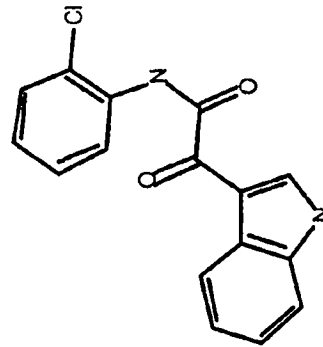


图 6Q

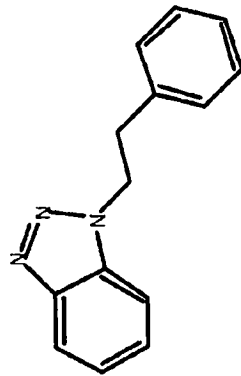
注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



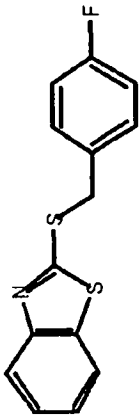
MEEI-0068577



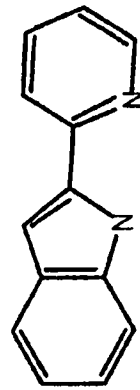
MEEI-0078448



MEEI-0070871



MEEI-0068578



MEEI-0072096

图 6R

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

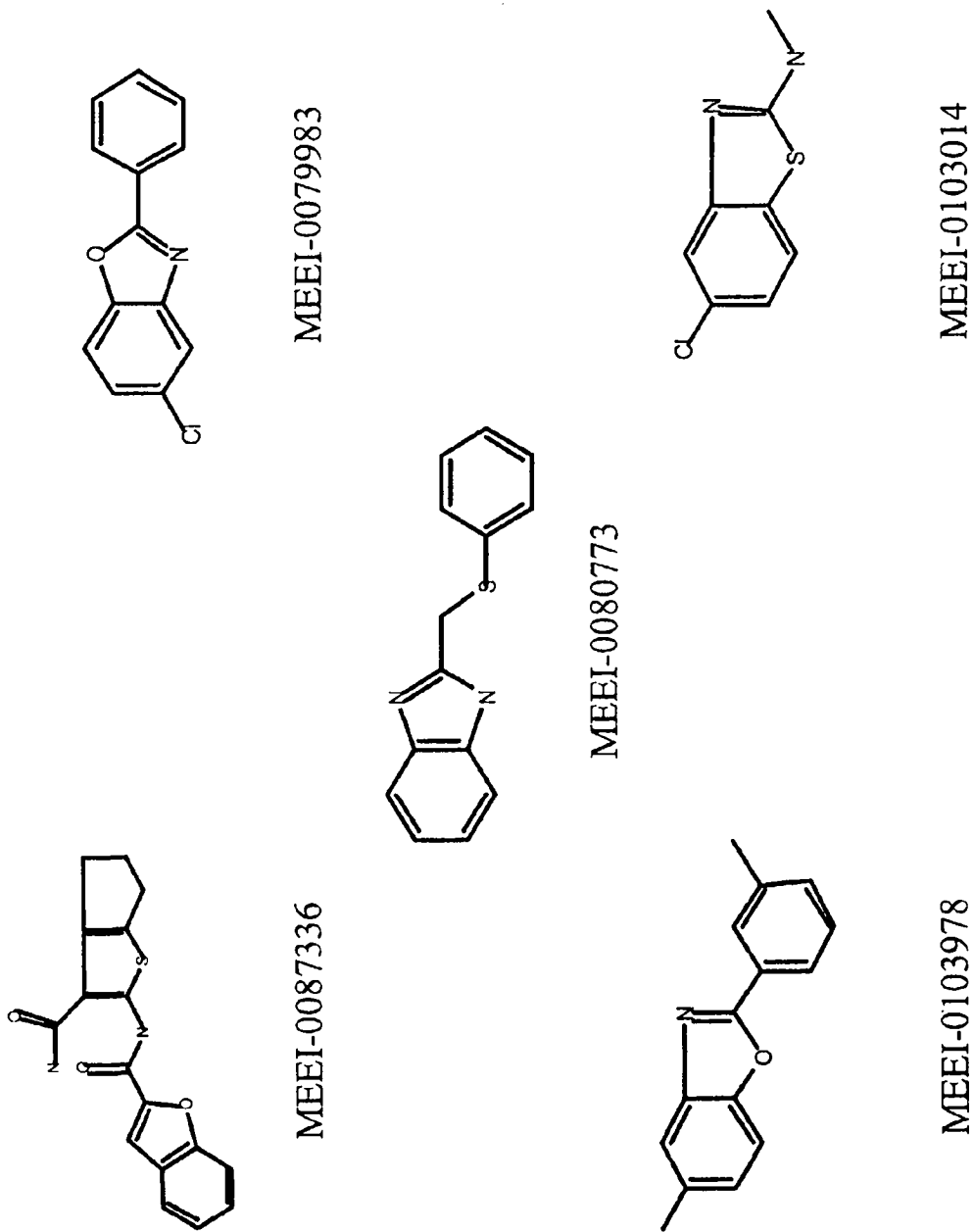


图 6S

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

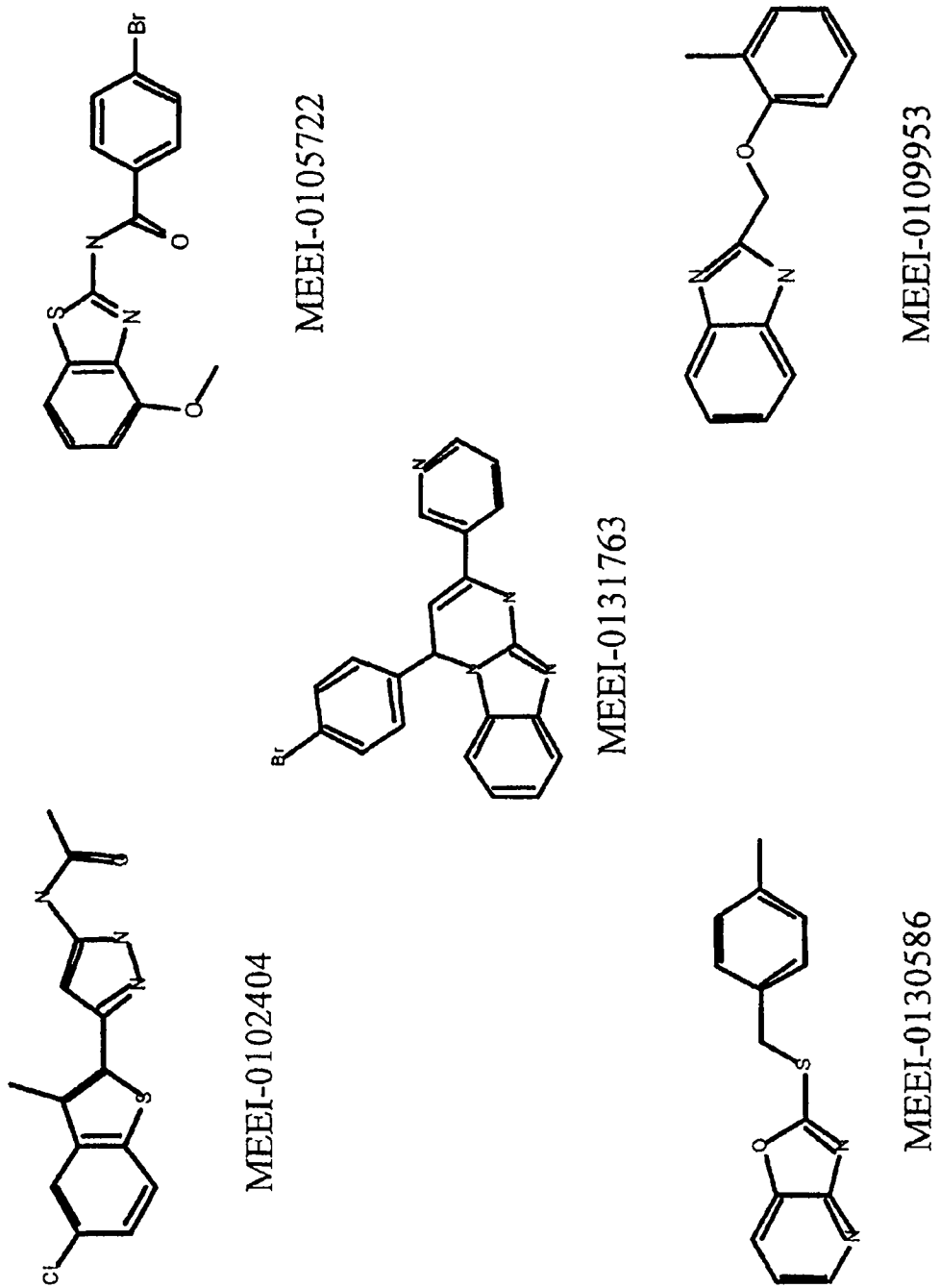


图 6T

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

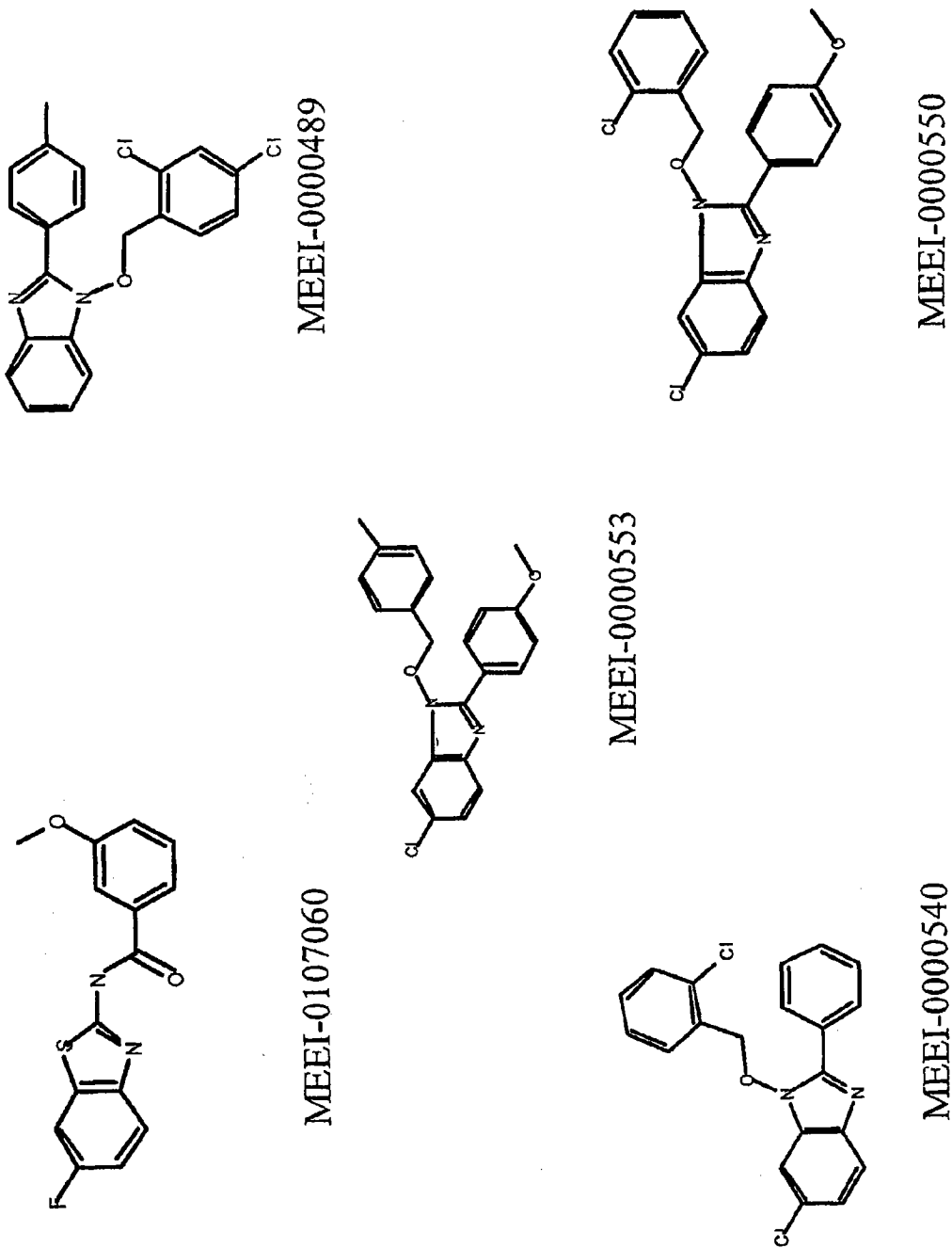
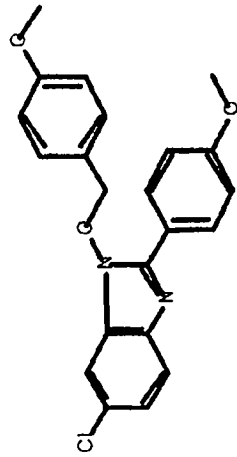
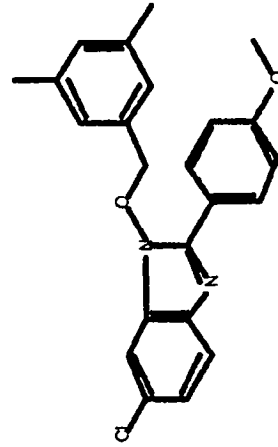


图 6U

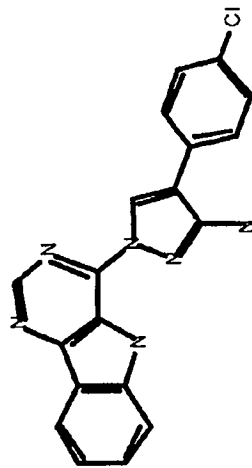
注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子



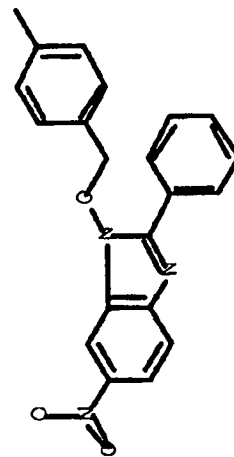
MEEI-0000557



MEEI-0000554



MEEI-0000477



MEEI-0000571

图 6V

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

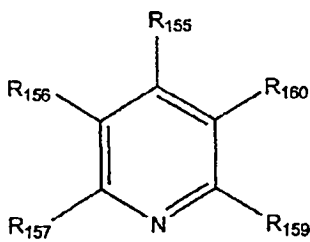


图 7A

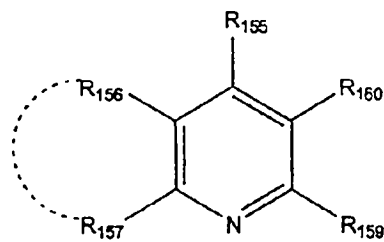


图 7B

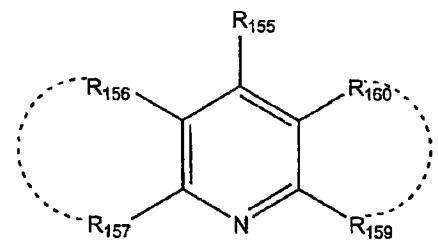


图 7C

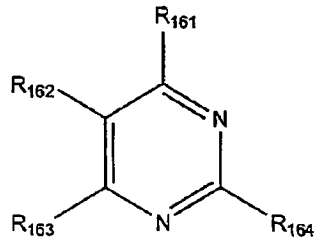


图 7D

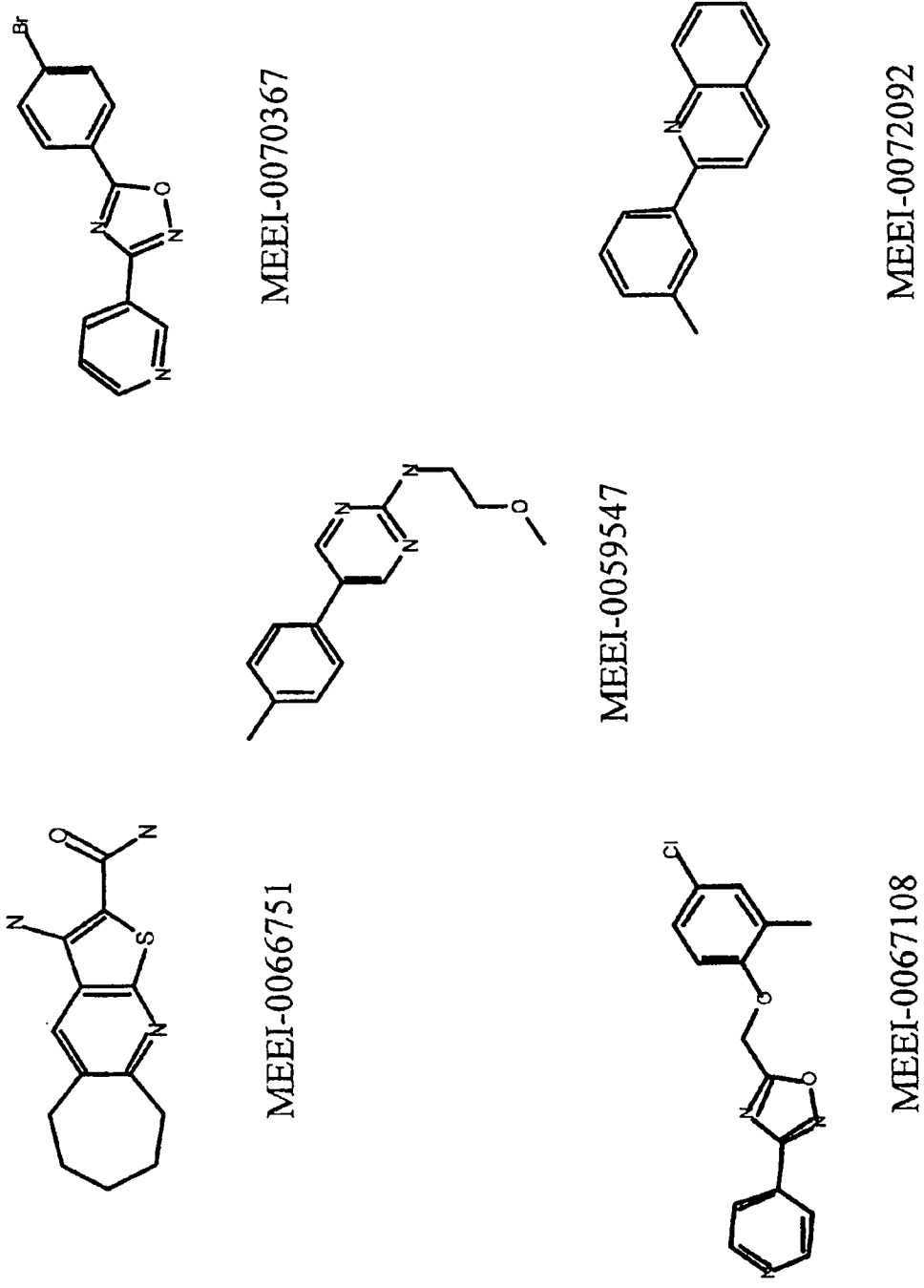


图 7E

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

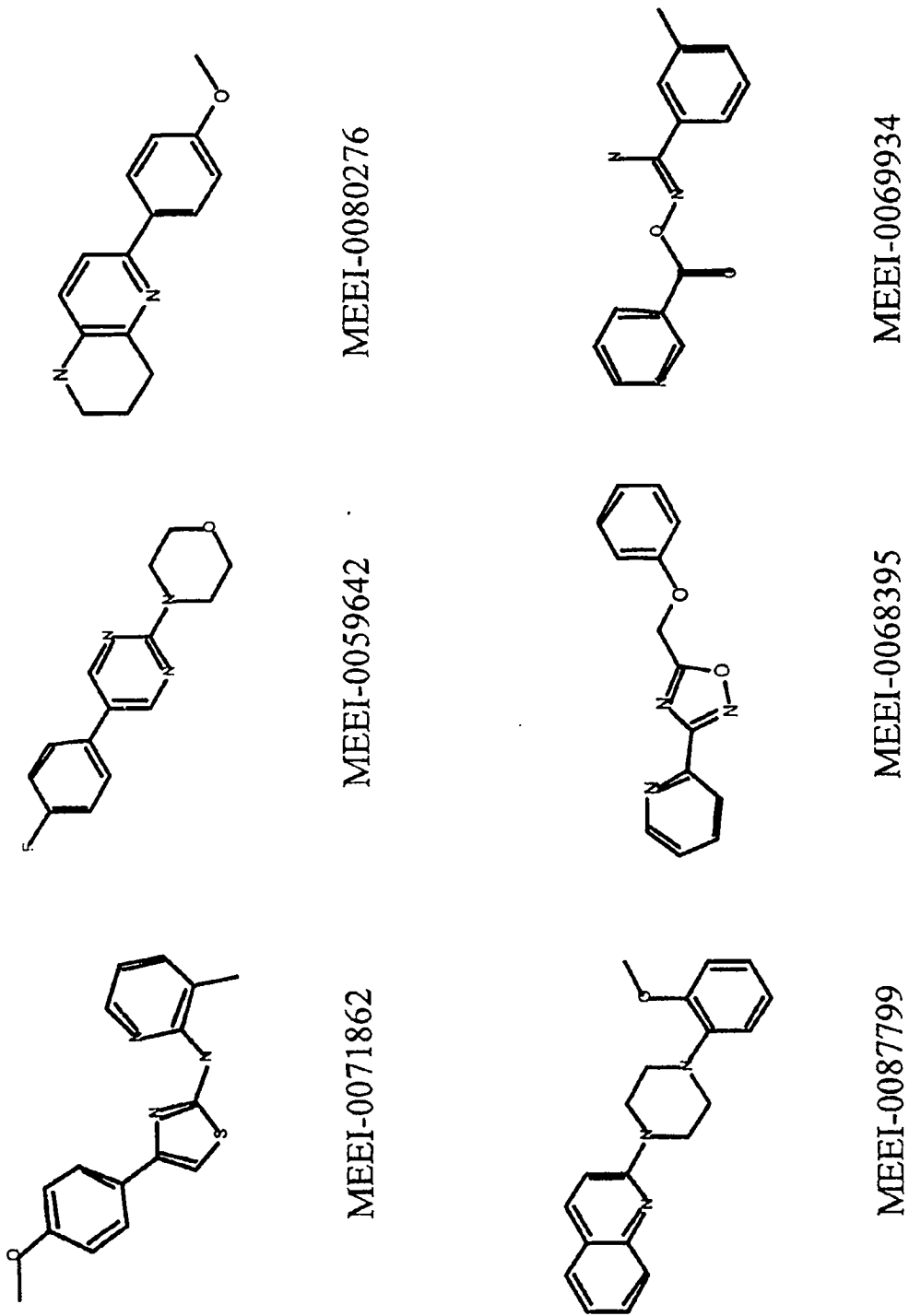


图 7F

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

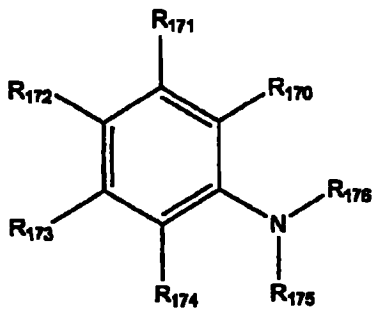


图 8A

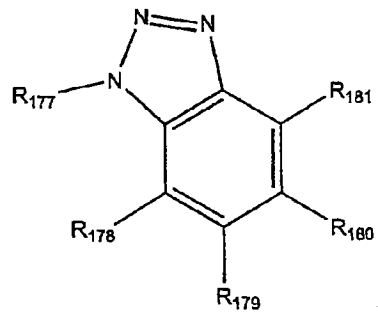
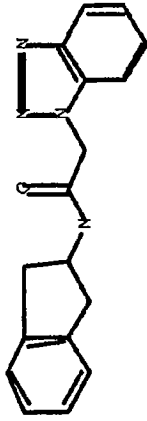
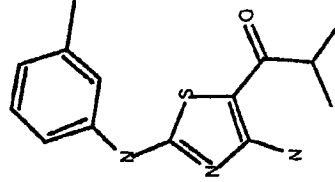


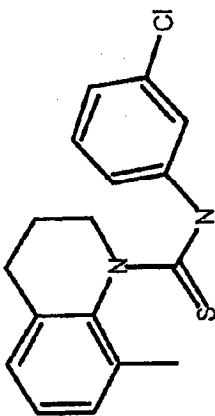
图 8B



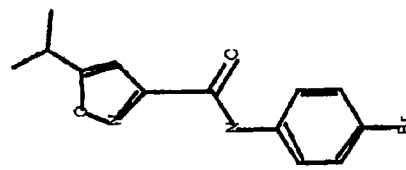
MEEI-0009883



MEEI-0134381



MEEI-0005069



MEEI-0075656

图 8C

注意：已省略 C、N 和 O 的完成化合价的氢原子

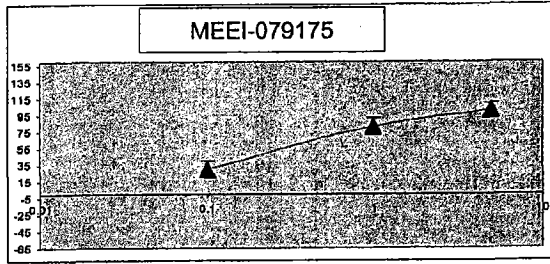


图 9

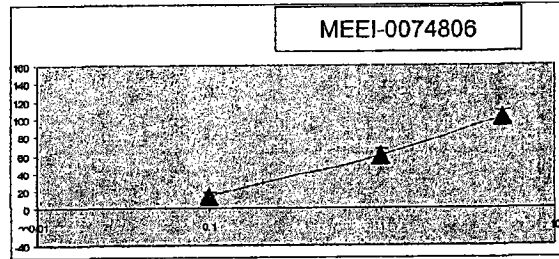


图 10

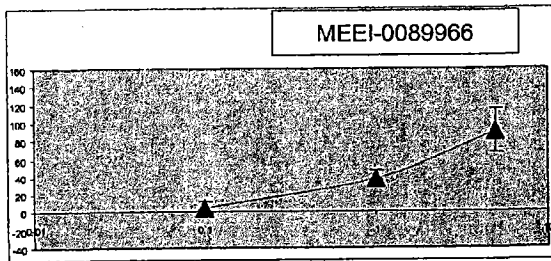


图 11

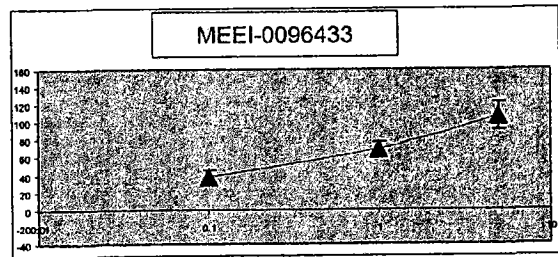


图 12

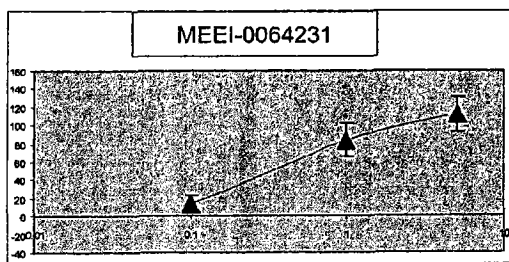


图 13

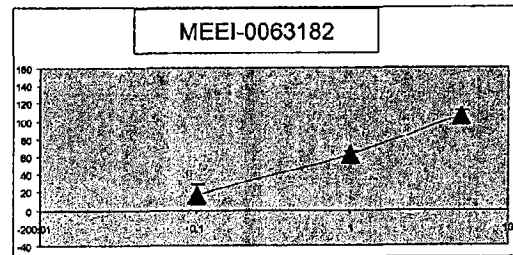


图 14

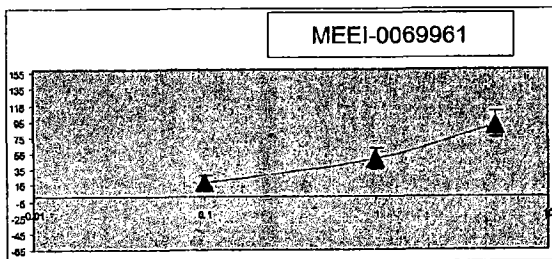


图 15

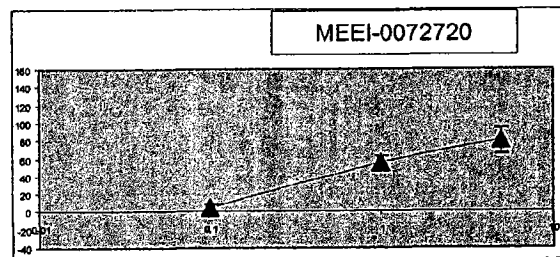


图 16

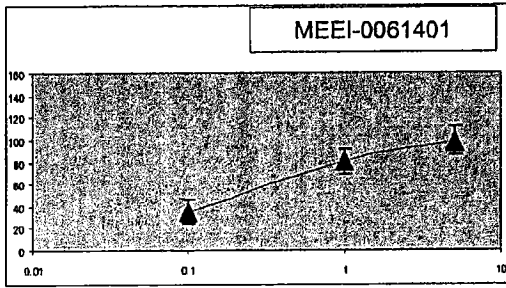


图 17

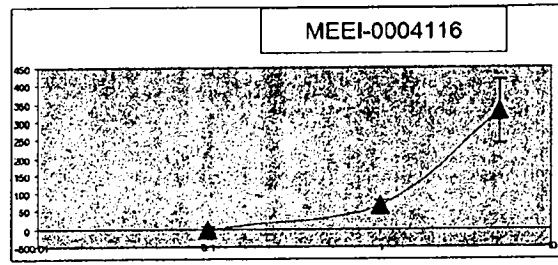


图 18

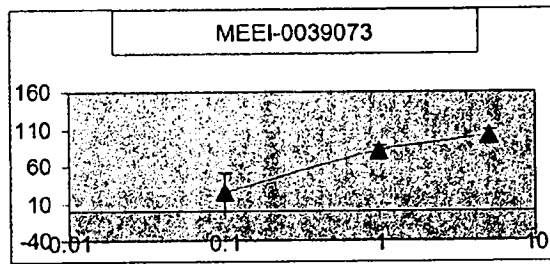


图 19

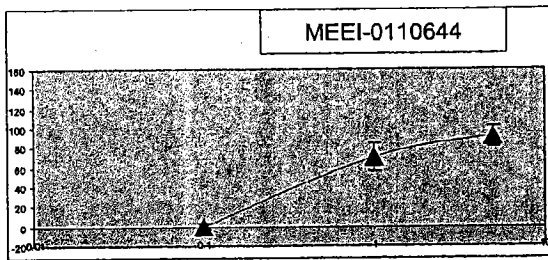


图 20

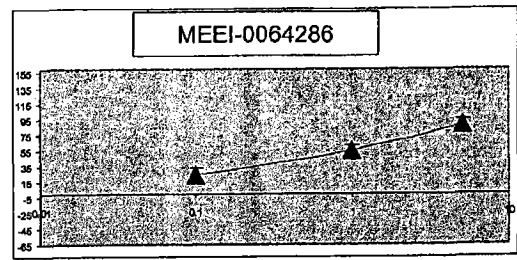


图 21

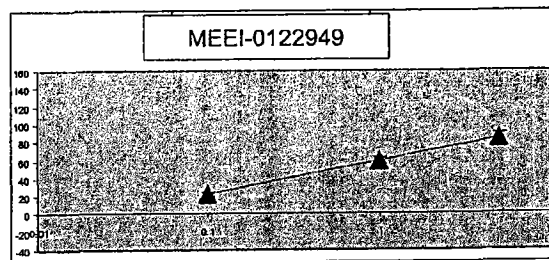


图 22

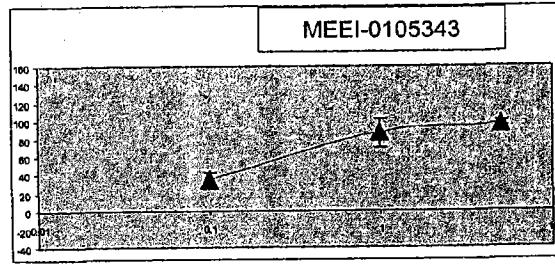


图 23

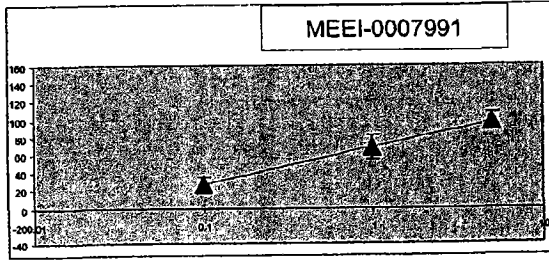


图 24

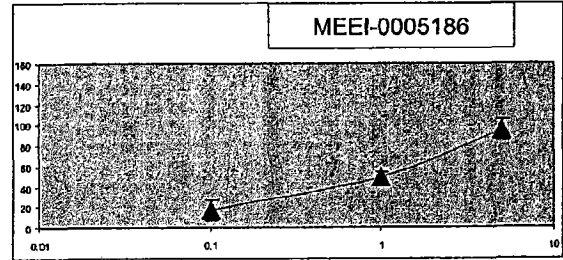


图 25

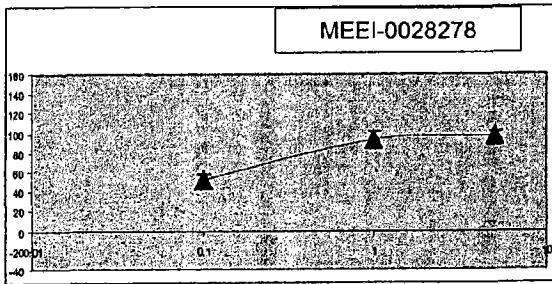


图 26

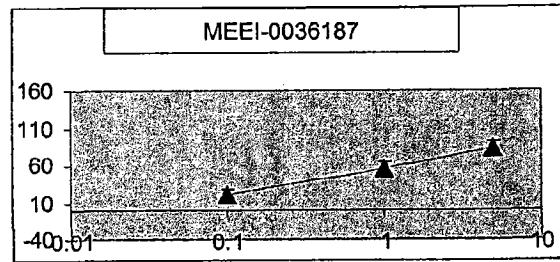


图 27

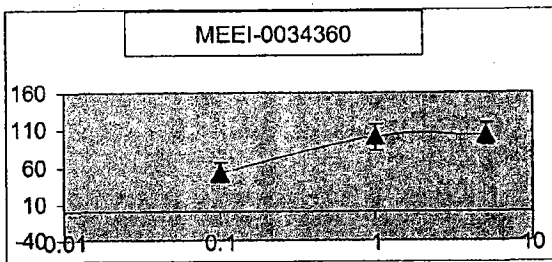


图 28

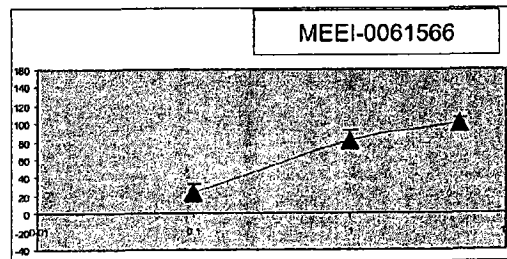


图 29

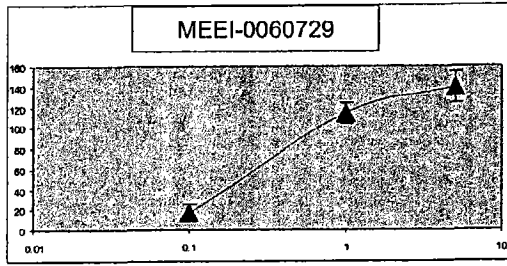


图 30

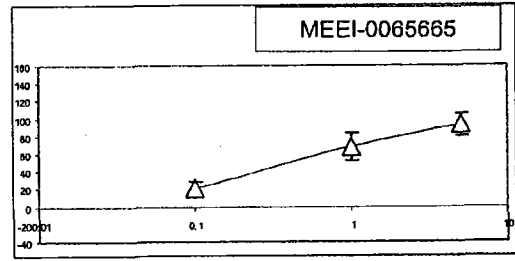


图 31

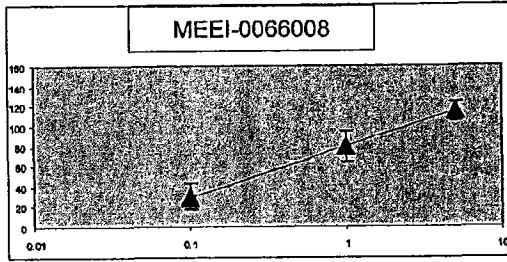


图 32

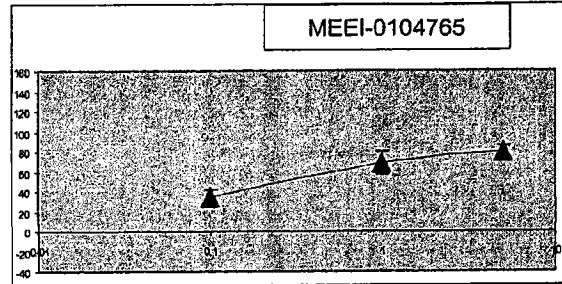


图 33

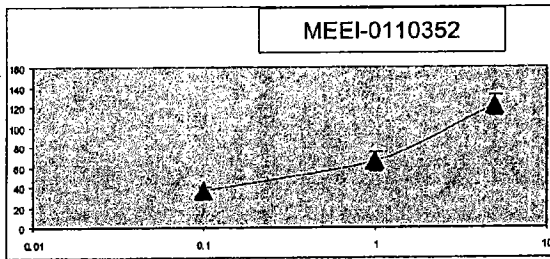


图 34

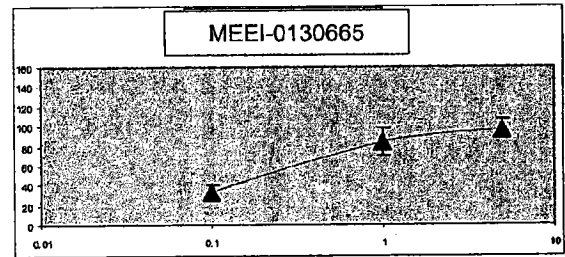


图 35

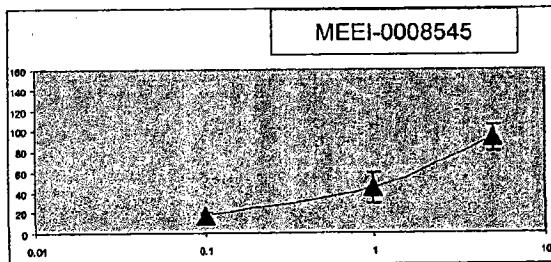


图 36

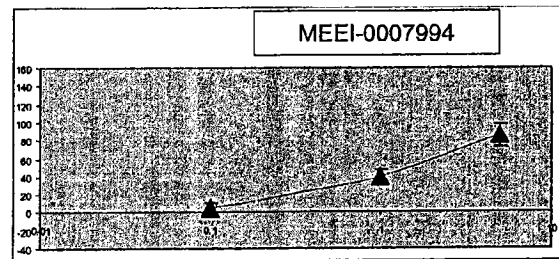


图 37

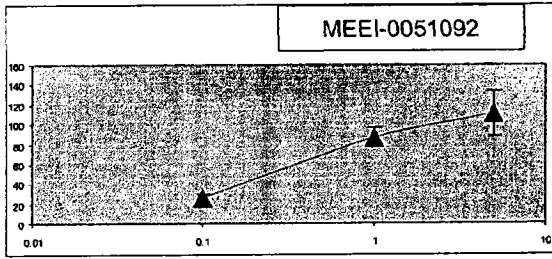


图 38

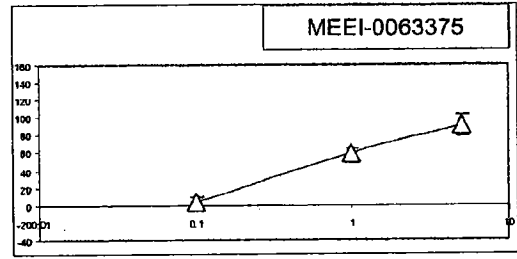


图 39

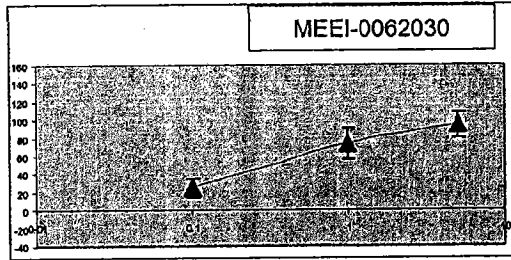


图 40

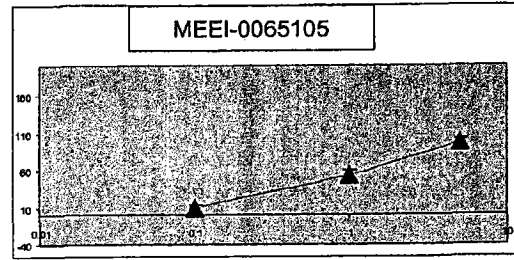


图 41

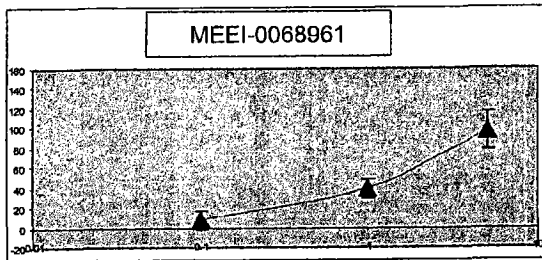


图 42

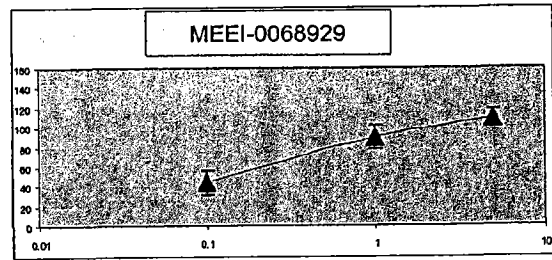


图 43

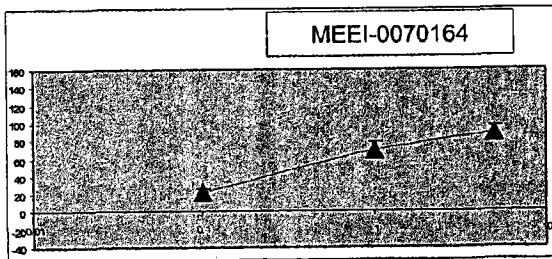


图 44

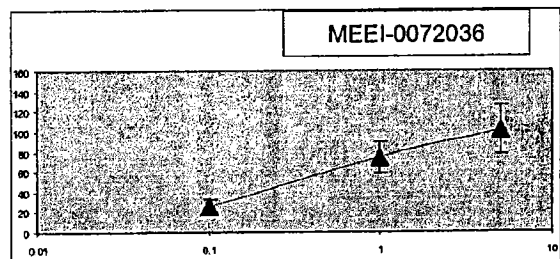


图 45

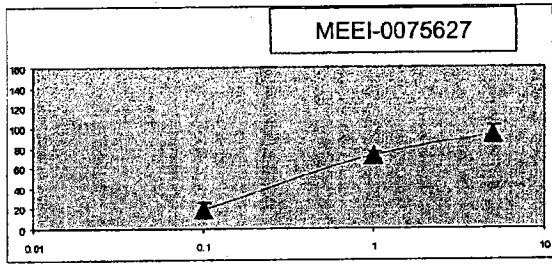


图 46

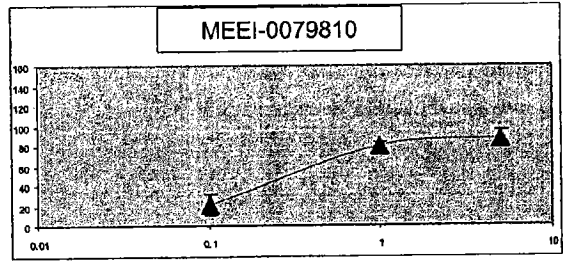


图 47

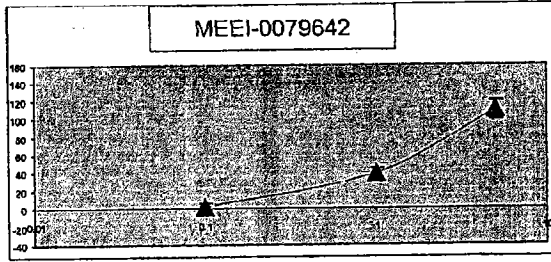


图 48

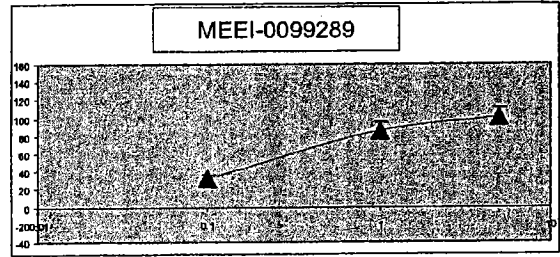


图 49

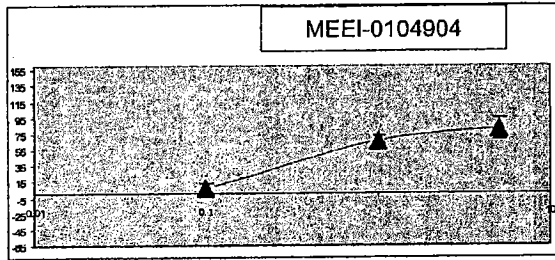


图 50

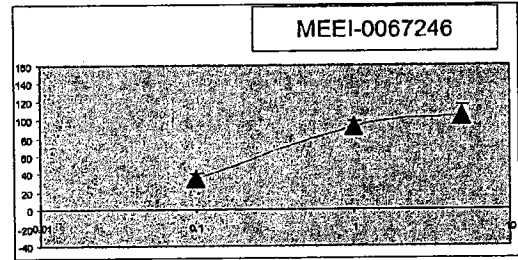


图 51

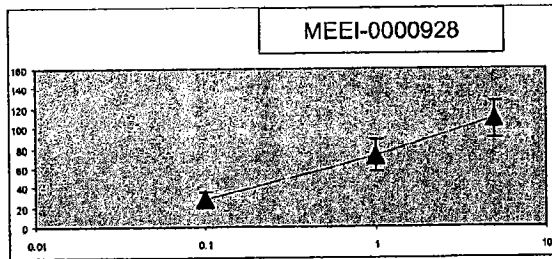


图 52

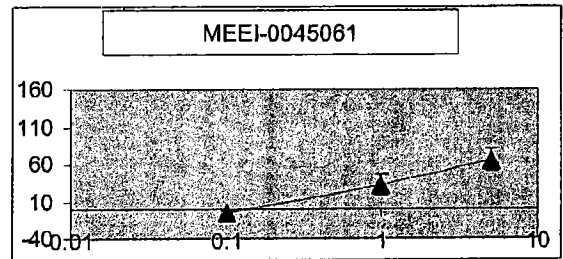


图 53

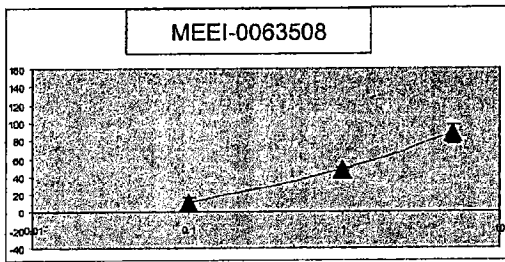


图 54

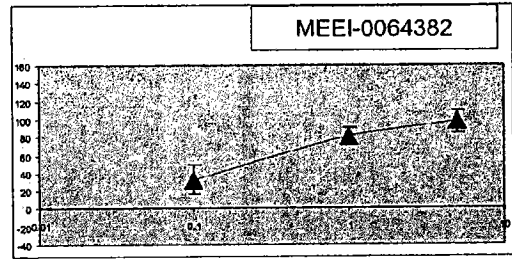


图 55

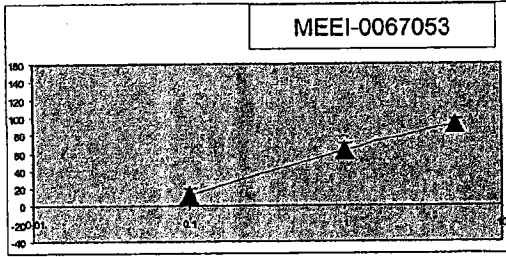


图 56

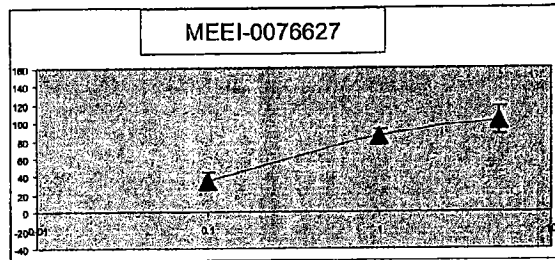


图 57

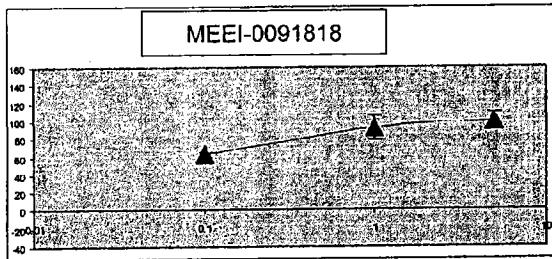


图 58

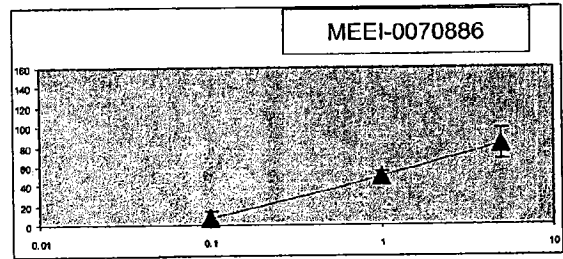


图 59

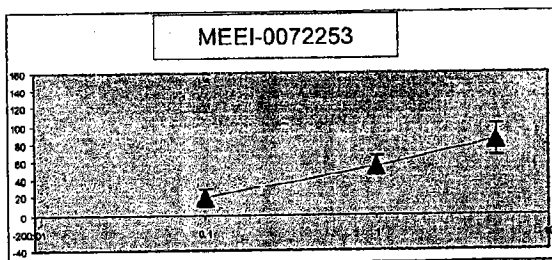


图 60

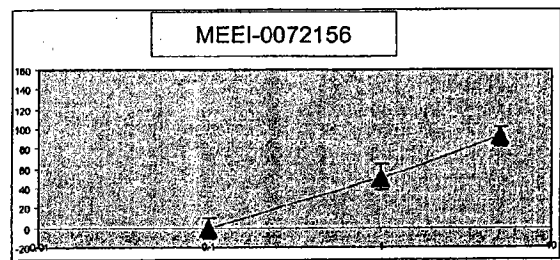


图 61

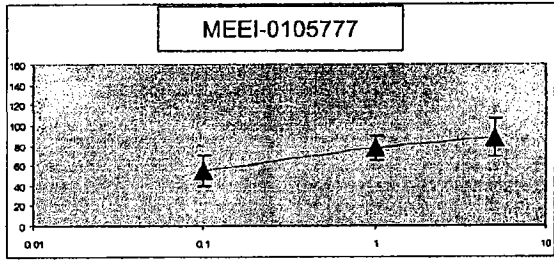


图 62

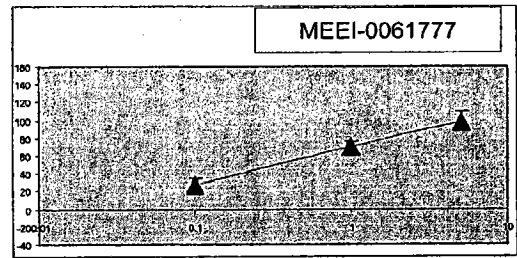


图 63

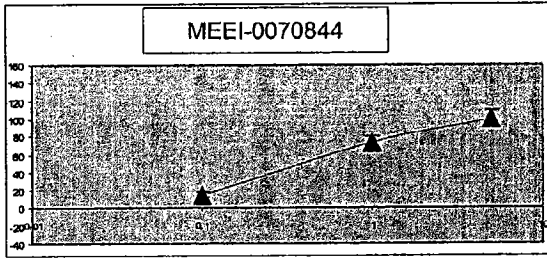


图 64

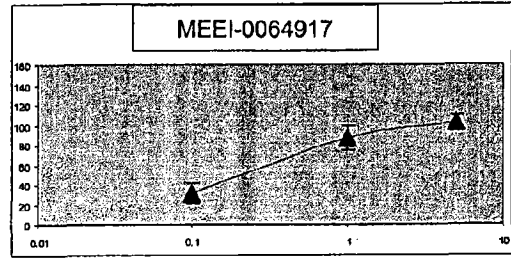


图 65

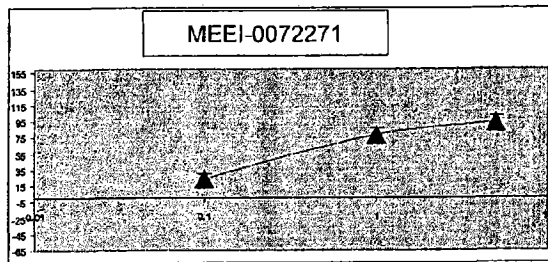


图 66

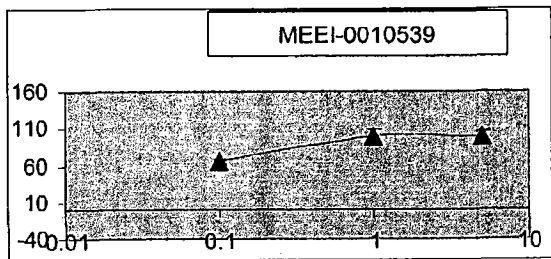


图 67

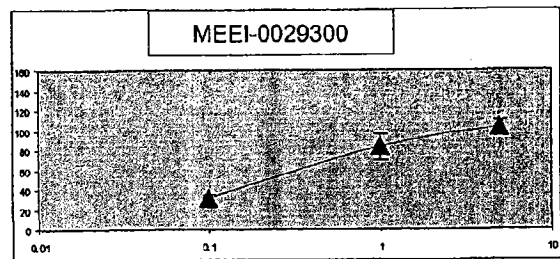


图 68

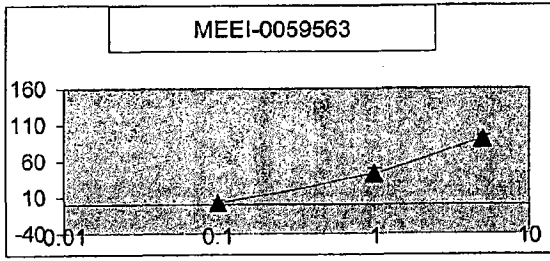


图 69

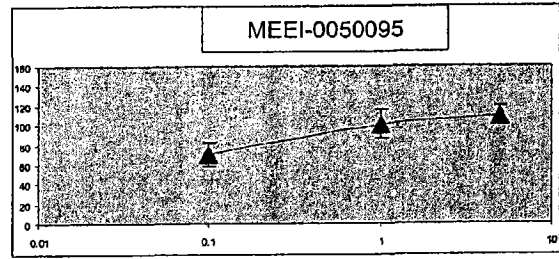


图 70

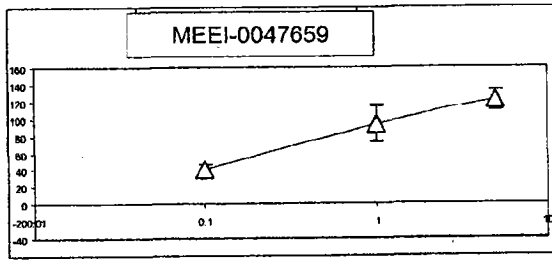


图 71

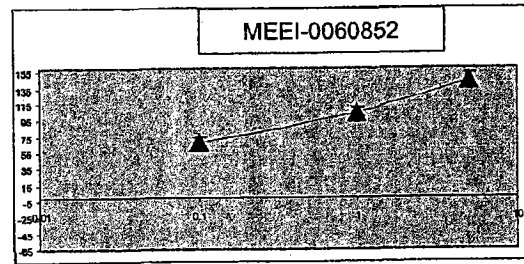


图 72

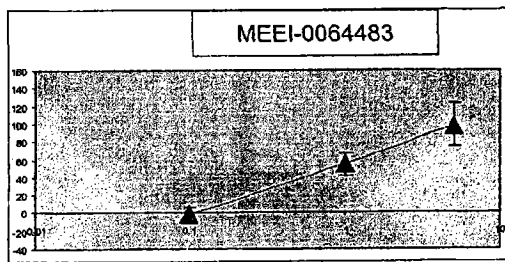


图 73

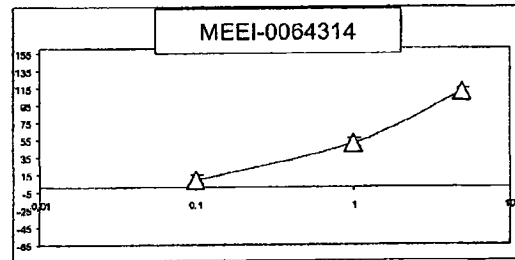


图 74

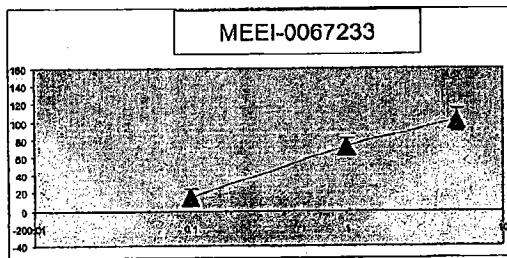


图 75

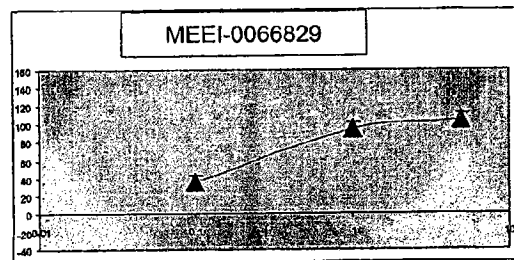


图 76

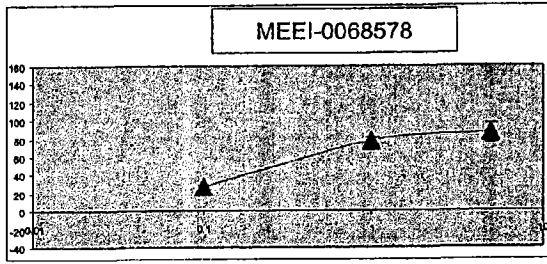


图 77

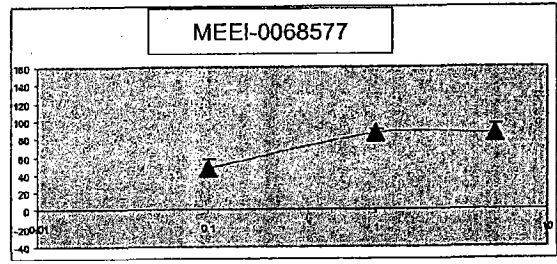


图 78

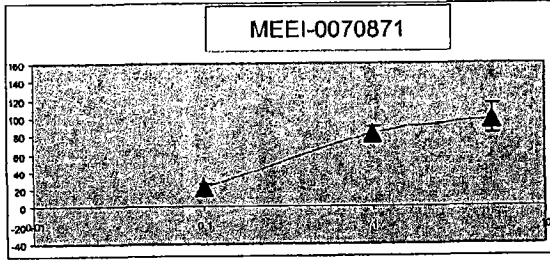


图 79

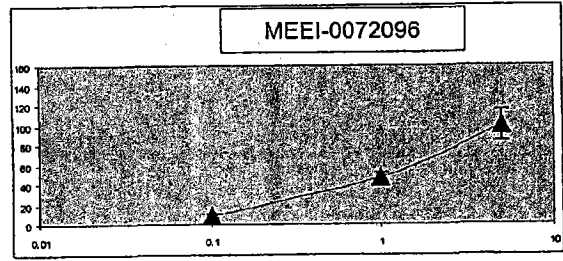


图 80

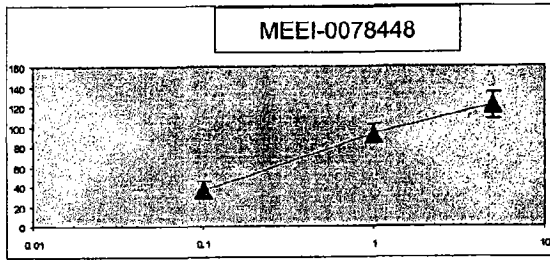


图 81

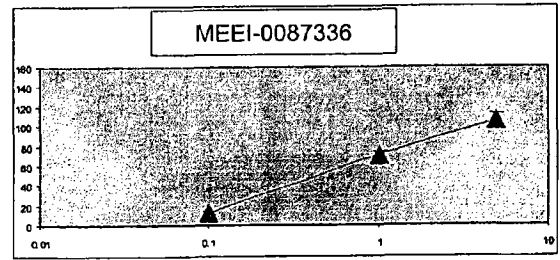


图 82

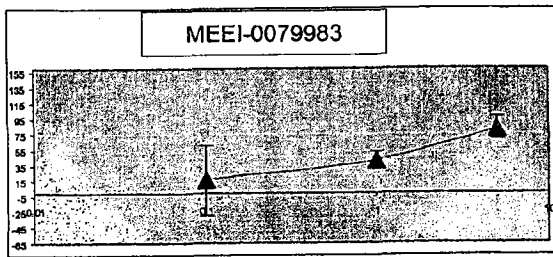


图 83

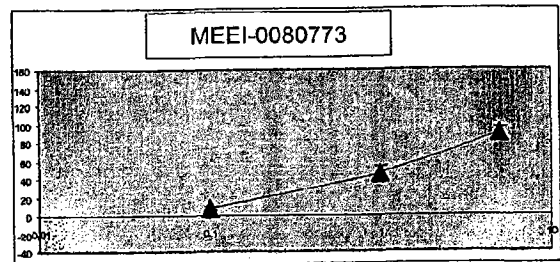


图 84

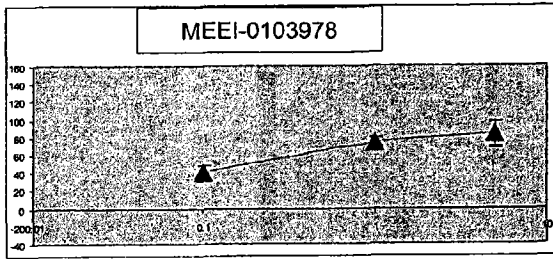


图 85

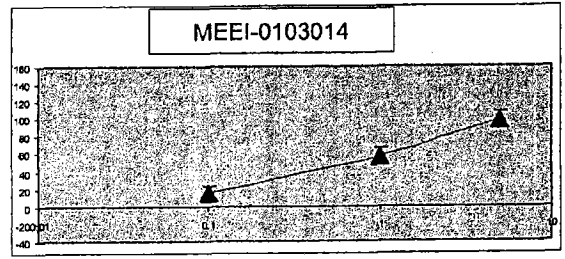


图 86

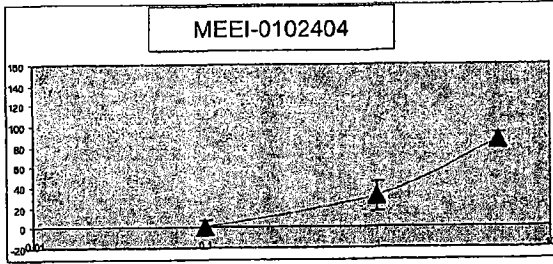


图 87

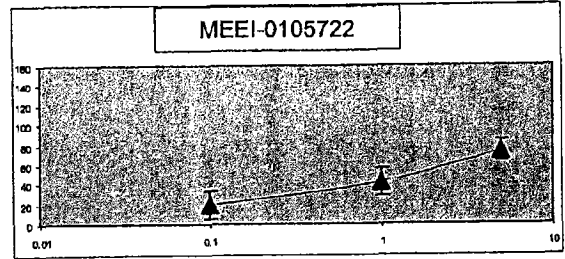


图 88

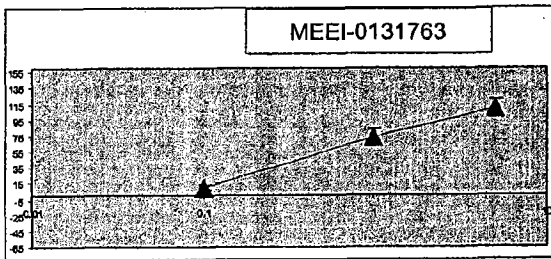


图 89

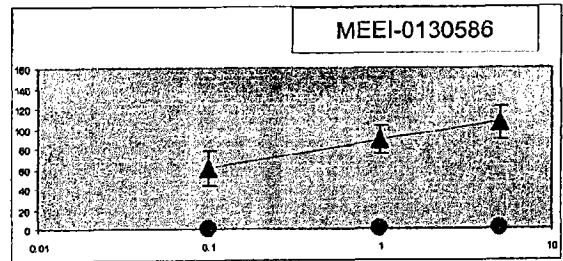


图 90

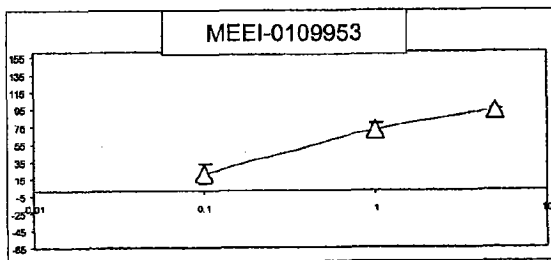


图 91

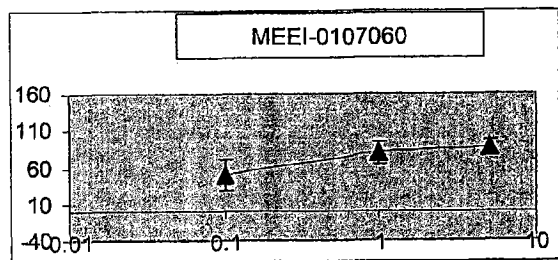


图 92

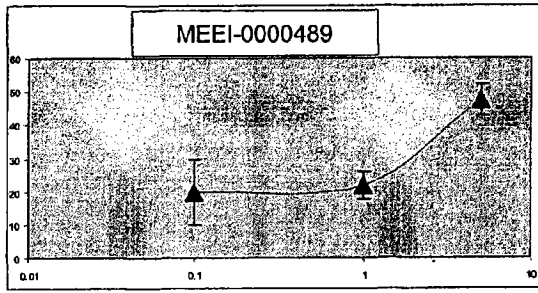


图 93

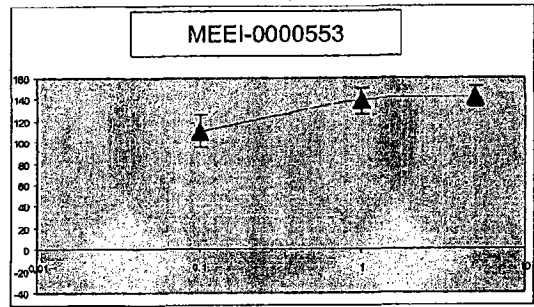


图 94

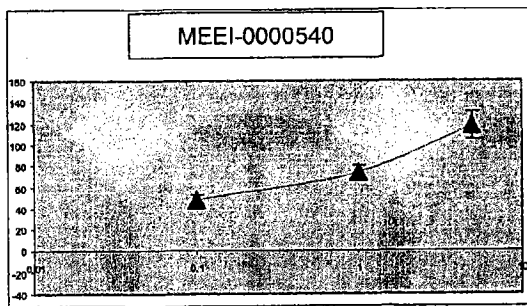


图 95

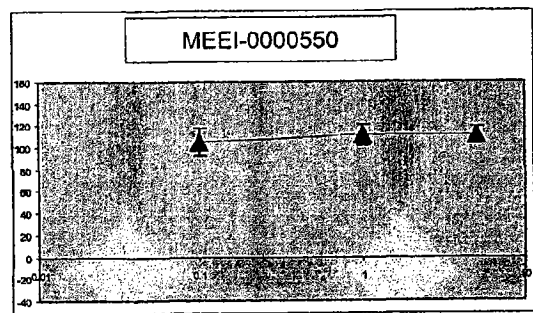


图 96

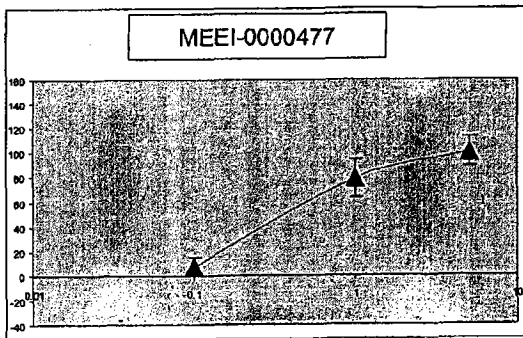


图 97

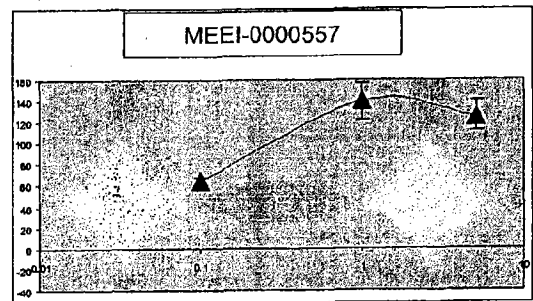


图 98

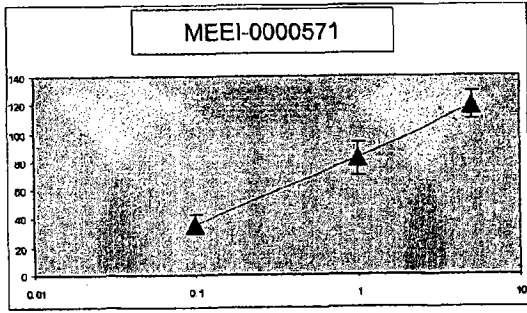


图 99

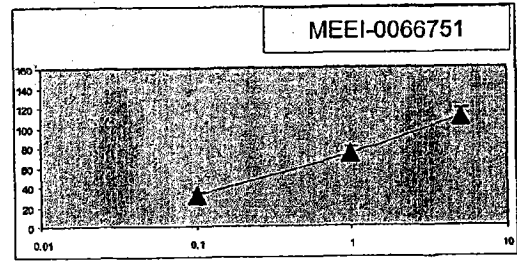


图 100

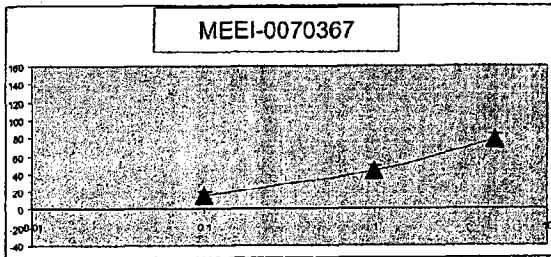


图 101

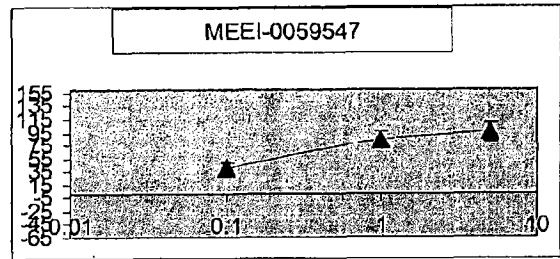


图 102

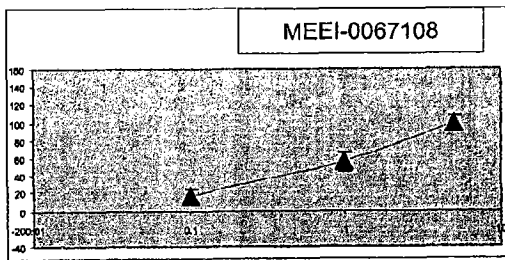


图 103

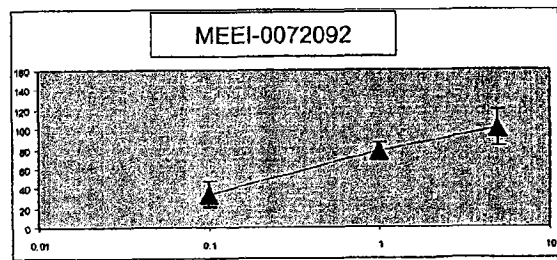


图 104

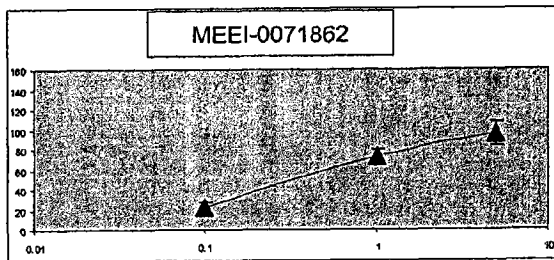


图 105

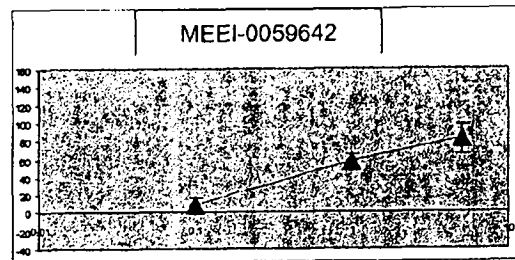


图 106

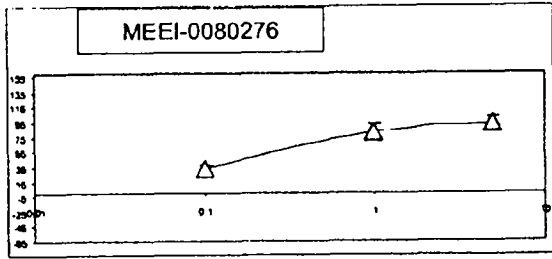


图 107

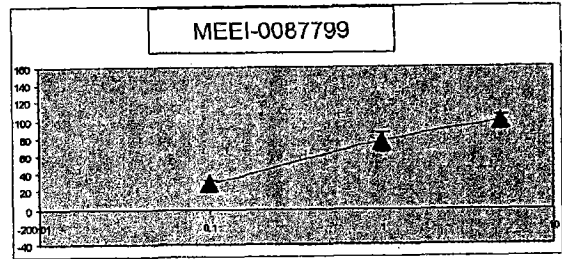


图 108

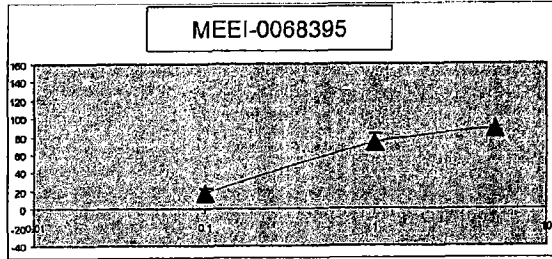


图 109

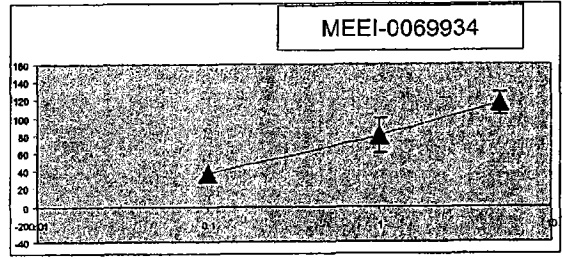


图 110

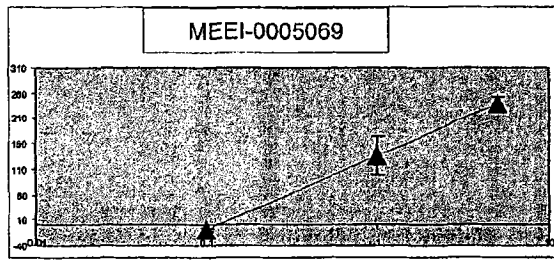


图 111

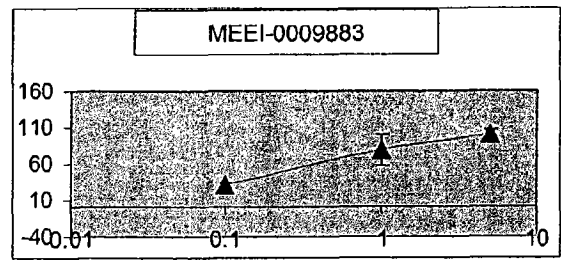


图 112

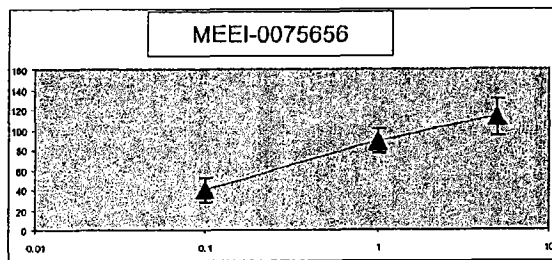


图 113

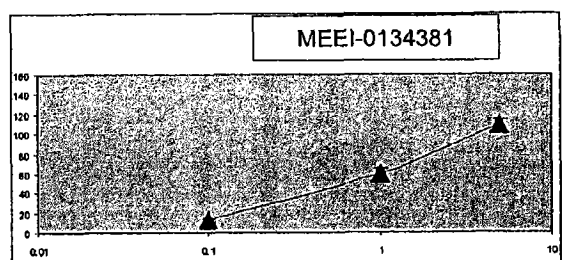


图 114

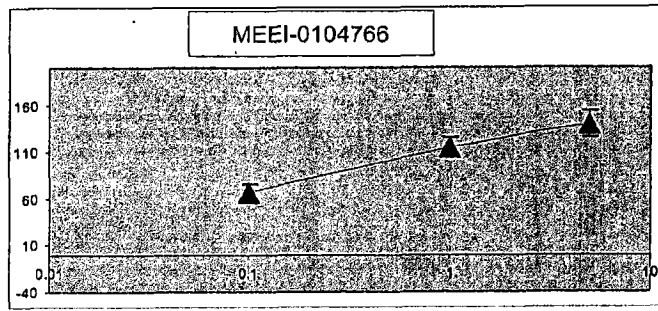


图 115

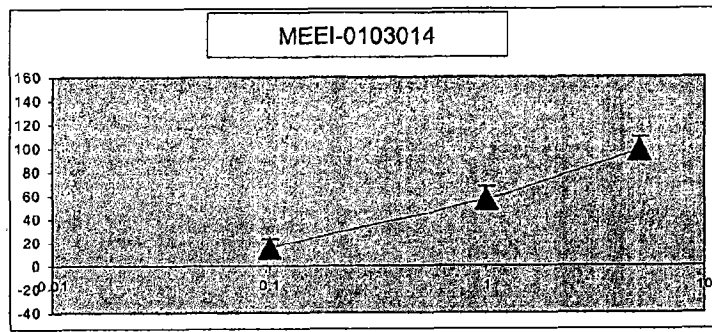


图 116

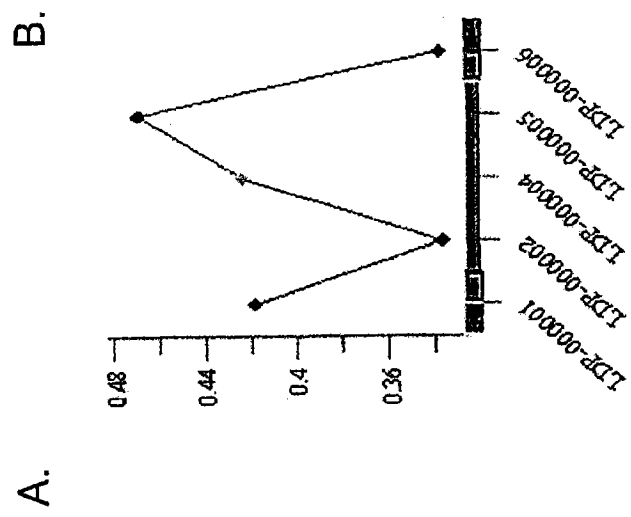
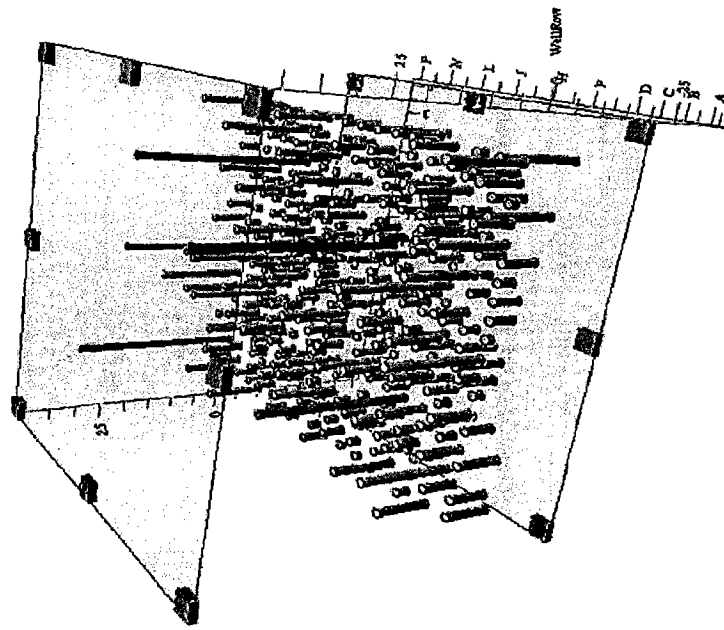


图 117A-117B

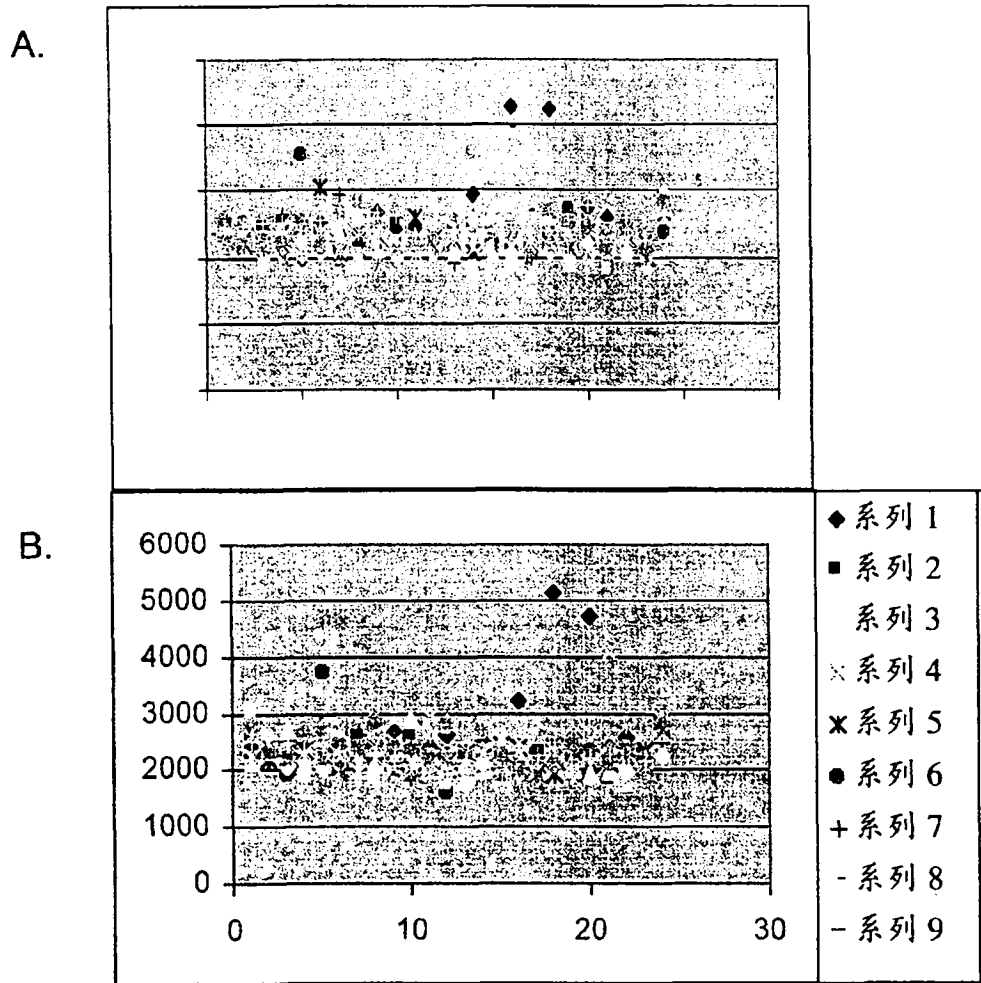


图 118A-118B

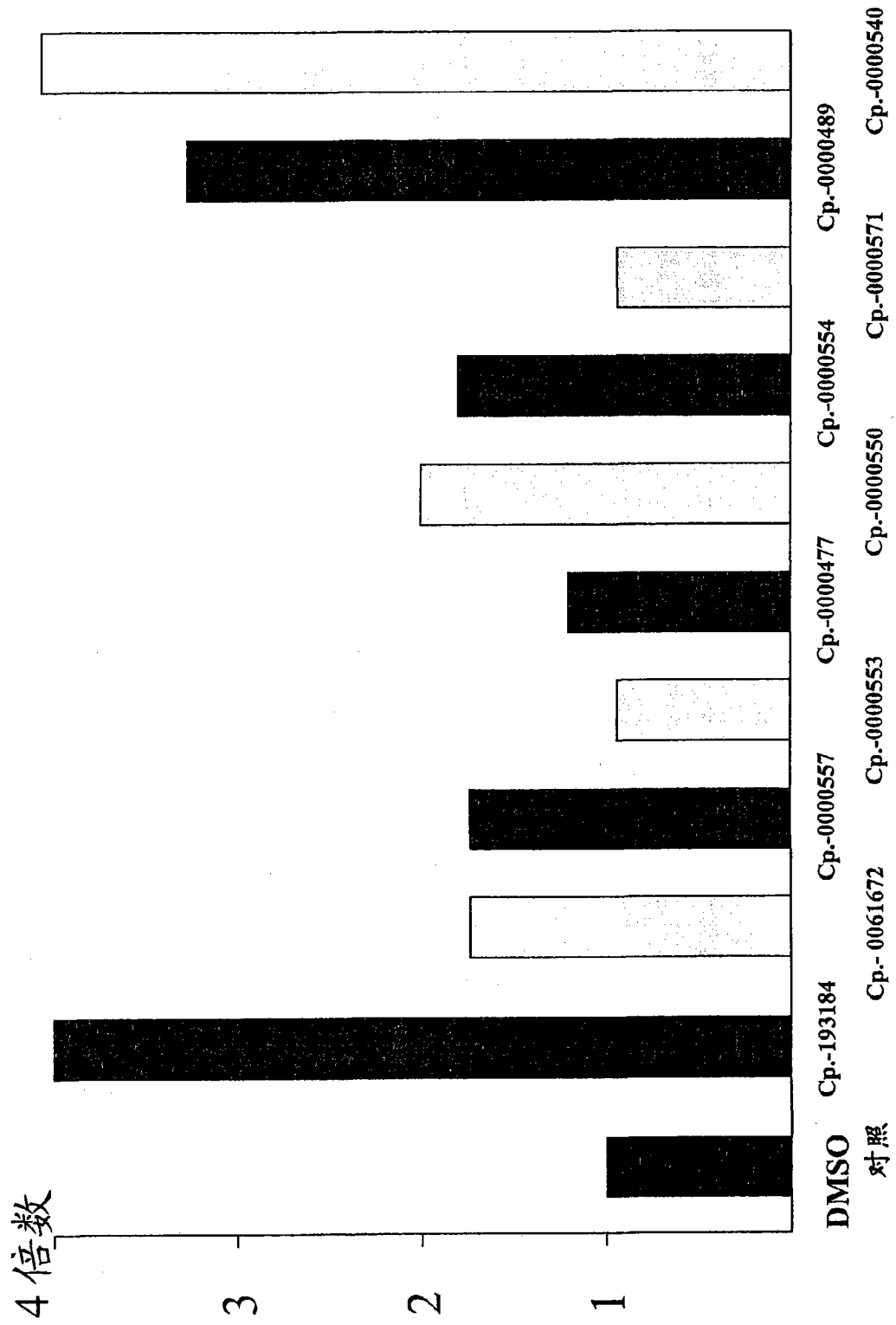


图 119

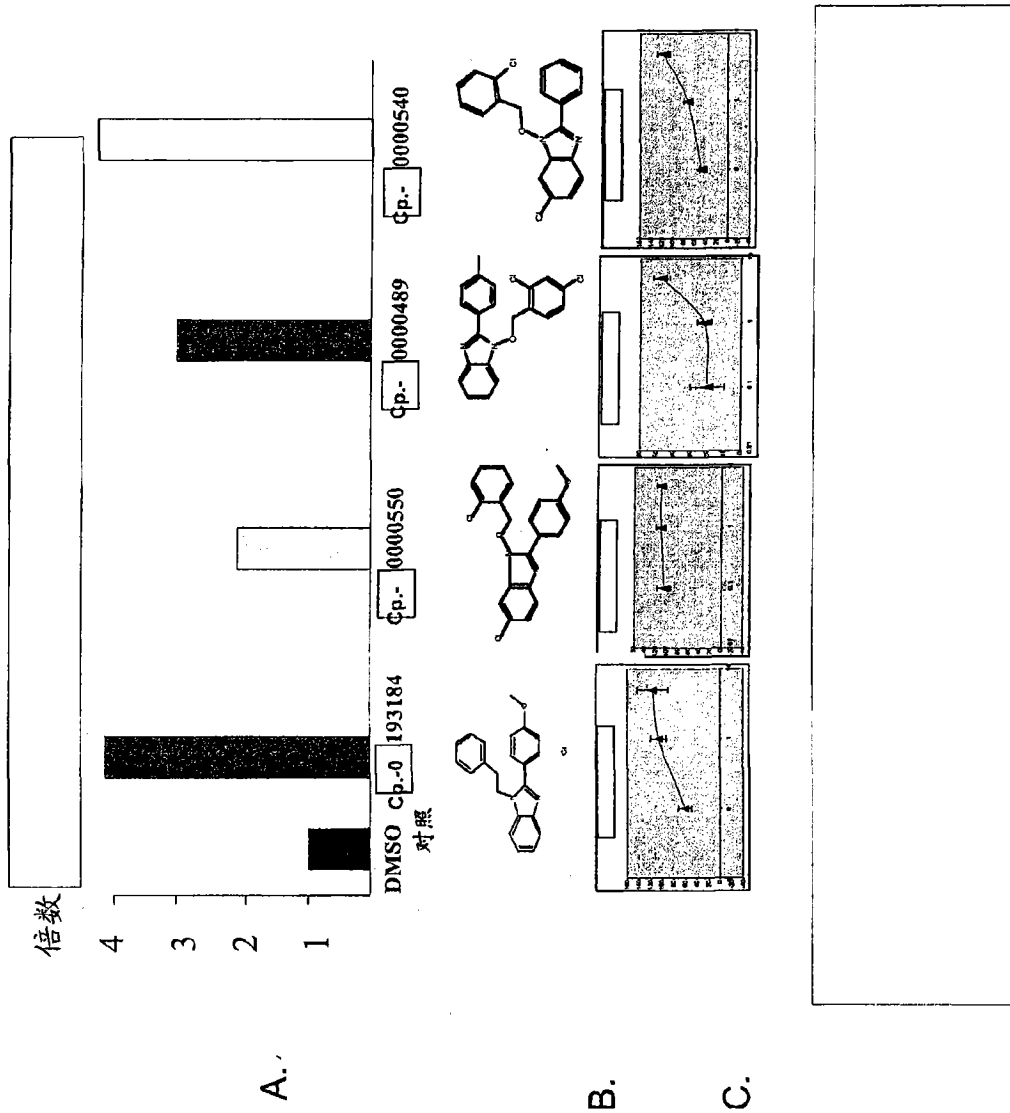


图 120A-120C

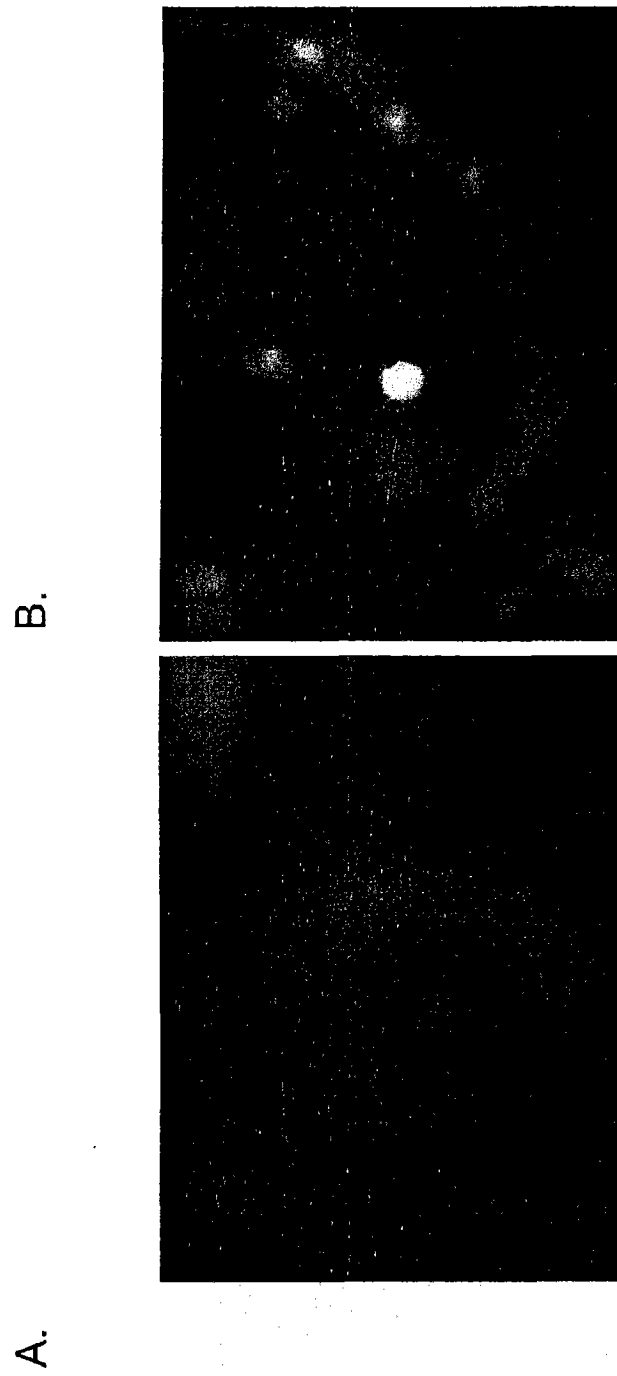


图 121A-121B