



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110392686 A

(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201780087768.9

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2017.12.21

代理人 罗文锋 李志强

(30)优先权数据

62/441060 2016.12.30 US

62/484282 2017.04.11 US

(51)Int.Cl.

G07D 487/04(2006.01)

A61K 31/437(2006.01)

A61K 31/5517(2006.01)

G07D 519/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.30

A61P 1/04(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/067885 2017.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/125746 EN 2018.07.05

(71)申请人 频率治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 C.卢斯 B.泰特 R.曼钱达

W.麦克莱恩

权利要求书16页 说明书116页

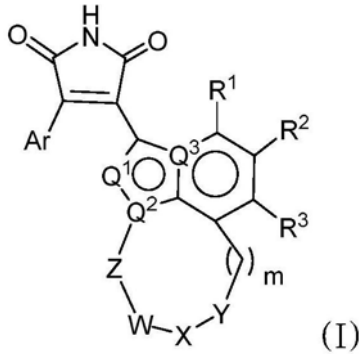
(54)发明名称

1H-吡咯-2,5-二酮化合物以及使用它们来诱导干/祖支持细胞自我更新的方法

(57)摘要

本公开涉及1H-吡咯-2,5-二酮化合物以及使用它们来诱导干/祖支持细胞自我更新的方法,包括诱导所述干/祖细胞增殖而同时在子代细胞中维持分化成组织细胞的能力。

1. 一种式 (I) 化合物:



或者其药学上可接受的盐或互变异构体, 其中:

Q¹是CH或N;

Q²是C或N;

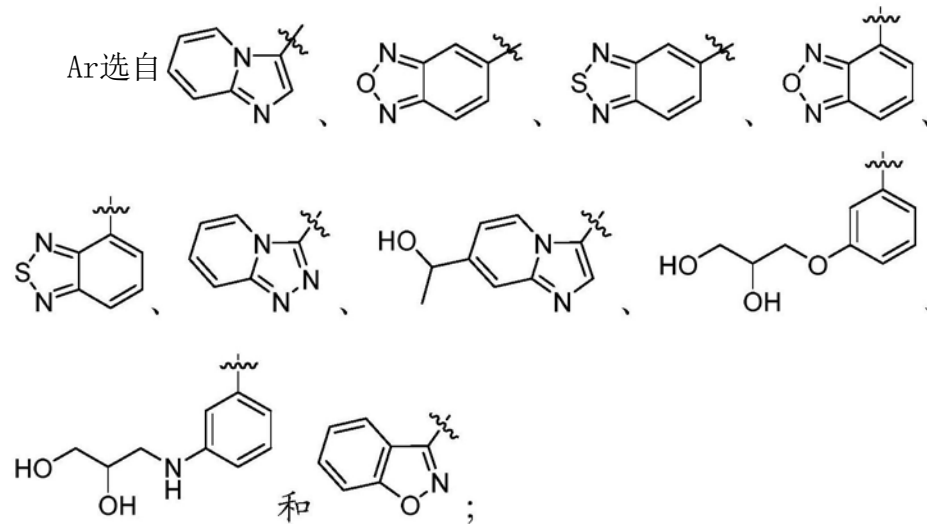
Q³是C或N;

其中Q¹、Q²和Q³中的至少一者是N;

R¹选自氢、卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NHC(O)R^{1a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并且其中R^{1a}是C₁-C₄烷基;

R²选自卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)、-N(C₁-C₄烷基)₂、-NHC(O)R^{2a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并且其中R^{2a}是C₁-C₄烷基;

R³选自氢、卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NHC(O)R^{3a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并且其中R^{3a}是C₁-C₄烷基;



-Z-W-X-Y-是-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-N(R^X)-C(R^Y)₂-、-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-或C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-;

每个R^Z独立地选自氢、氘、卤基和C₁-C₄烷基, 或者两个R^Z基团一起形成C₃-C₆环烷基或氧代基;

每个 R^W 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基,或者两个 R^W 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基;

或者 R^Z 和 R^W 与它们连接的碳原子合在一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

R^X 选自 $-COR^{X1}$ 、 $-SO_2R^{X1}$ 、杂芳基和 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基),并且其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基)在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用1至4个卤基取代;

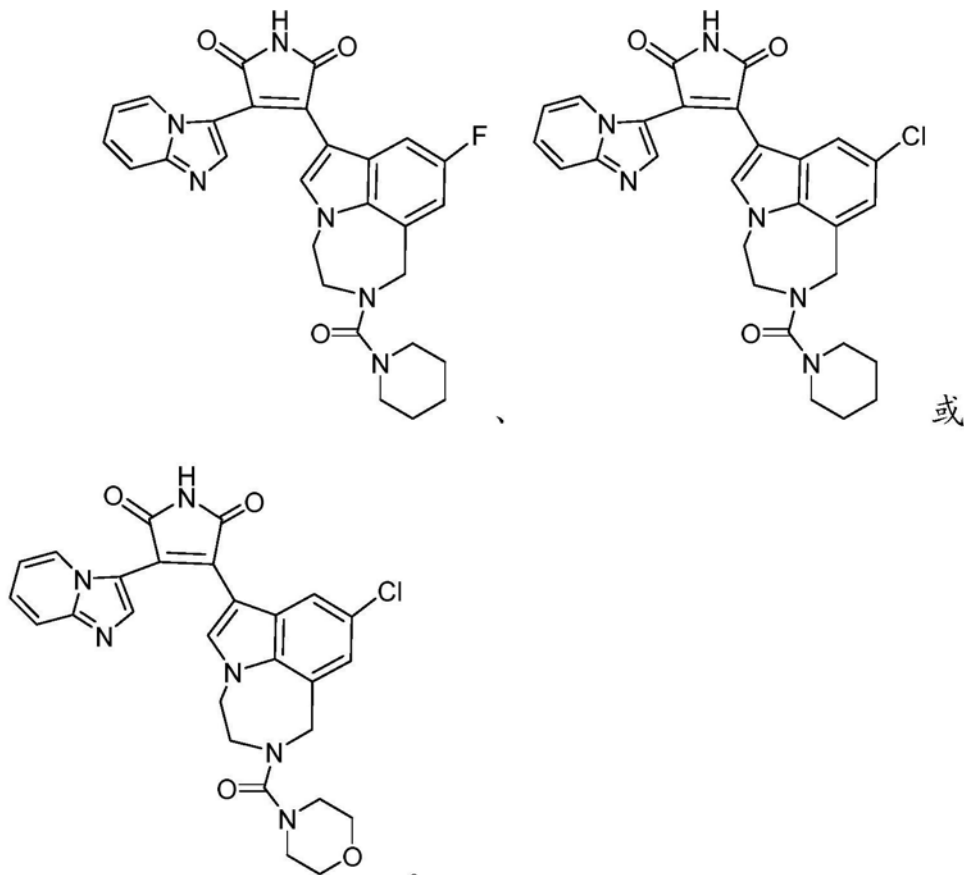
其中 R^{X1} 是杂环基,其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代:氘、卤基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-CN$ 、 $-CF_3$ 、 C_1-C_4 烷基、 $-(CH_2)_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NHCOC_1-C_4$ 烷基、 $-CONHC_1-C_4$ 烷基、 $-COH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-COO-C_1-C_4$ 烷基、 $-(CH_2)_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$;其中 p 是0、1、2或3;其中每个 R^{X1a} 独立地选自氢、氘、卤基、 $-CF_3$ 和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基;

或者 R^{X1} 是 $N(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 独立地选自氢、烷基、取代的烷基,其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环;

每个 R^Y 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^Y 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基或氧代基;并且

m 是0、1或2;

前提条件是所述化合物不是



2. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^X 是 $-COR^{X1}$ 。

3. 根据权利要求2所述的化合物,其中 R^{X1} 是吡啶、2,8-二氮杂螺[4,5]癸烷、2,5-二氮杂双环[2,2,1]庚烷或8-氧杂-3-氮杂双环[3.2.1]辛烷,它们每一者任选用1至12个独立选自

以下的取代基取代: 氘、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 $-[C(RX^{1a})_2]_p-OH$ 、 $-(CH_2)_p-NMe_2$ 、 $-(CH_2)_p-NHMe$ 、 $-(CH_2)_p-NH_2$; 其中 p 是0、1、2或3。

4. 根据权利要求3所述的化合物, 其中 R^{X1} 是哌啶, 任选用1至6个卤基取代基取代。

5. 根据权利要求4所述的化合物, 所述哌啶任选用 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-(CH_2)_p-NMe_2$ 取代。

6. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 R^X 是杂芳基。

7. 根据权利要求6所述的化合物, 其中所述杂芳基是单环的或双环的。

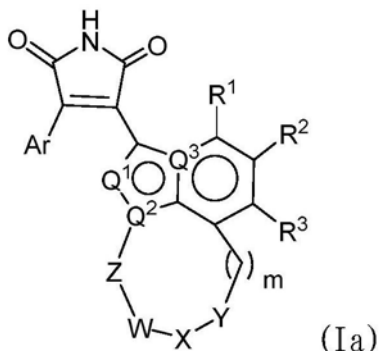
8. 根据权利要求6所述的化合物, 其中所述杂芳基含有1至3个氮。

9. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 R^X 是 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基)。

10. 根据权利要求9所述的化合物, 其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基) 在所述 C_1-C_4 亚烷基上用一或两个卤素取代。

11. 根据权利要求9所述的化合物, 其中所述 C_3-C_8 环烷基是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

12. 一种式 (Ia) 化合物:



或者其药学上可接受的盐或互变异构体, 其中:

Q^1 是CH或N;

Q^2 是C或N;

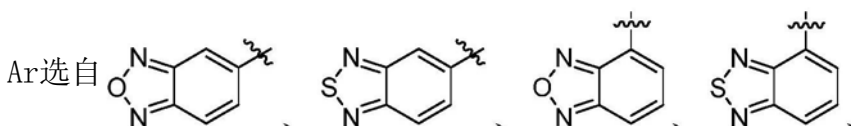
Q^3 是C或N;

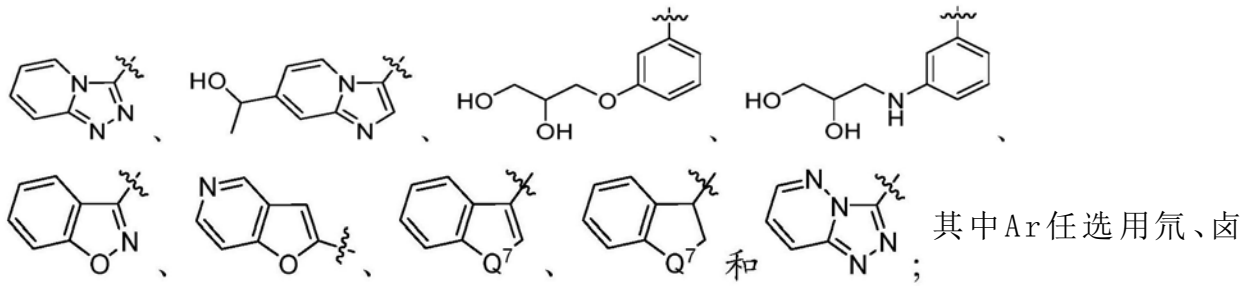
其中 Q^1 、 Q^2 和 Q^3 中的至少一者是N;

R^1 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(O)R^{3a}$ 和 $-S(O)_2NH_2$; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和 $-OH$ 的取代基取代; 并且其中 R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基;

R^2 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_4$ 烷基)、 $-N(C_1-C_4$ 烷基) $_2$ 、 $-NHC(O)R^{2a}$ 和 $-S(O)_2NH_2$; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和 $-OH$ 的取代基取代; 并且其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基;

R^3 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NH_2$ 、 $-NHC(O)R^{3a}$ 和 $-S(O)_2NH_2$; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和 $-OH$ 的取代基取代; 并且其中 R^{3a} 是 C_1 - C_4 烷基;





基、烷基、烷氧基和CN取代；

Q^7 选自S、O、 CH_2 和 NR^{Q7} ；其中 R^{Q7} 是氢或任选取代的 C_1 - C_4 烷基；

-Z-W-X-Y-是 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-N(R^X)-C(R^Y)_2-$ 、 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$ 或 $C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$ ；

每个 R^Z 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基，或者两个 R^Z 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基；

每个 R^W 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基，或者两个 R^W 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基；

或者 R^Z 和 R^W 与它们连接的碳原子合在一起形成 C_3 - C_6 环烷基；

R^X 选自氢、 R^{X1} 、 $-COR^{X1}$ 、 $-SO_2R^{X1}$ 、 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ ，并且其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 任选在所述 C_1 - C_4 亚烷基上用1至4个卤基取代；

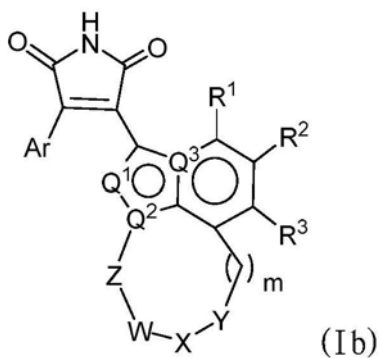
其中 R^{X1} 是 C_3 - C_8 环烷基、杂芳基或杂环基，其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代： $-\text{氘}$ 、 $-\text{卤基}$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-CN$ 、 $-CF_3$ 、 C_1 - C_4 烷基、 $-(CH_2)_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NHCOC_1-C_4$ 烷基、 $CONHC_1-C_4$ 烷基、 COH 、 $-CO_2H$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-COO-C_1-C_4$ 烷基、 $-(CH_2)_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$ ；其中p是0、1、2或3；其中每个 R^{X1a} 独立地选自氢、氘、卤基、 $-CF_3$ 和 C_1 - C_4 烷基，或者两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基；

或者 R^{X1} 是 $N(R^{X2})_2$ ，其中 R^{X2} 独立地选自氢、烷基、取代的烷基，其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环；

每个 R^Y 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基，或者两个 R^Y 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基；并且

m是0、1或2。

13. 一种式(Ib)化合物：



或者其药学上可接受的盐或互变异构体，其中：

Q^1 是CH或N；

烷基、 $-(CH_2)_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$ ；其中p是0、1、2或3；其中每个 R^{X1a} 独立地选自氢、氘、卤基、 $-CF_3$ 和 C_1-C_4 烷基，或者两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基；

或者 R^{X1} 是 $N(R^{X2})_2$ ，其中 R^{X2} 独立地选自氢、烷基、取代的烷基，其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环；

每个 R^Y 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1-C_4 烷基，或者两个 R^Y 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基或氧代基；并且

m是0、1或2。

14. 根据权利要求1-12中任一项所述的化合物，其中 Q^1 是CH； Q^2 是N；并且 Q^3 是C。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的化合物，其中 Q^1 是N； Q^2 是C；并且 Q^3 是N。

16. 根据权利要求1-13中任一项所述的化合物，其中 Q^1 是CH； Q^2 是C；并且 Q^3 是N。

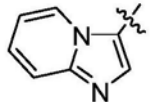
17. 根据权利要求1-13中任一项所述的化合物，其中 Q^1 是N； Q^2 是N；并且 Q^3 是C。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的化合物，其中 R^1 是氢或卤基。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的化合物，其中 R^2 是卤基。

20. 根据权利要求1-18中任一项所述的化合物，其中 R^2 选自卤基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-C\equiv CH$ 、 $-NH_2$ 和 $-NHC(O)CH_3$ 。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的化合物，其中 R^3 是氢或卤基。

22. 根据权利要求1和13-21中任一项所述的化合物，其中Ar是 。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的化合物，其中 $-Z-W-X-Y-$ 是 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-N(R^X)-C(R^Y)_2-$ 。

24. 根据权利要求1-22中任一项所述的化合物，其中 $-Z-W-X-Y-$ 是 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$ 。

25. 根据权利要求23-24中任一项所述的化合物，其中每个 R^Z 独立地选自氢和卤基。

26. 根据权利要求23-24中任一项所述的化合物，其中两个 R^Z 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基。

27. 根据权利要求1-24中任一项所述的化合物，其中 R^Z 和 R^W 与它们连接的碳合在一起形成 C_3-C_6 环烷基。

28. 根据权利要求1-22中任一项所述的化合物，其中 $-Z-W-X-Y-$ 是 $C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$ 。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的化合物，其中每个 R^W 独立地选自氢和卤基。

30. 根据权利要求1-28中任一项所述的化合物，其中两个 R^W 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的化合物，其中每个 R^Y 独立地选自氢和卤基。

32. 根据权利要求1-30中任一项所述的化合物，其中两个 R^Y 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基。

33. 根据权利要求12-32中任一项所述的化合物，其中 R^X 是 R^{X1} ，其中 R^{X1} 是杂芳基。

34. 根据权利要求12-32中任一项所述的化合物，其中 R^X 是 $-COR^{X1}$ 。

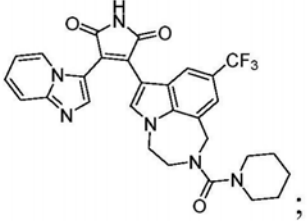
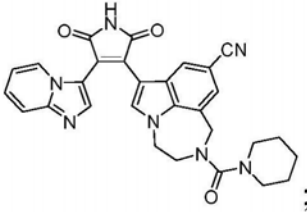
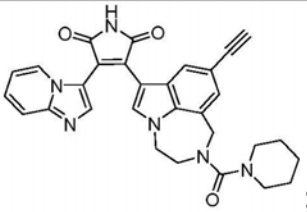
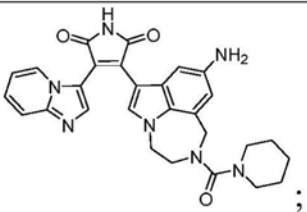
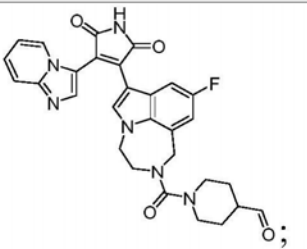
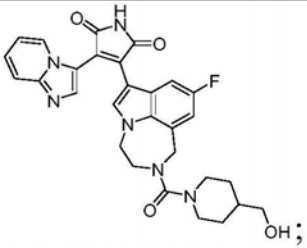
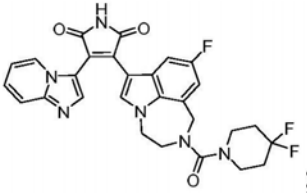
35. 根据权利要求12-32中任一项所述的化合物，其中 R^X 是 $-SO_2R^{X1}$ 。

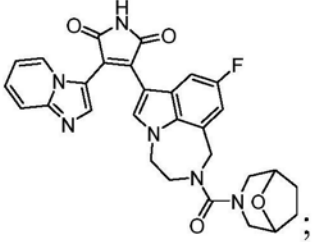
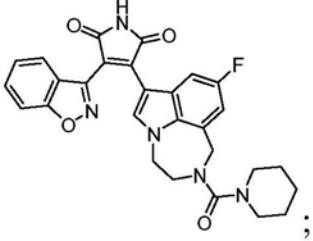
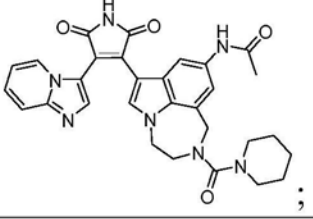
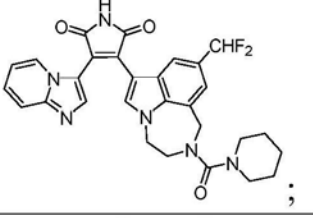
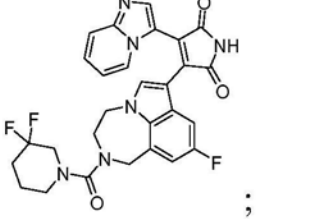
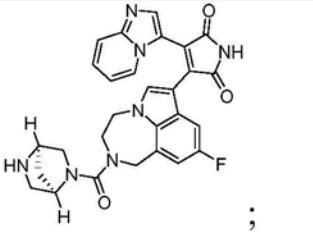
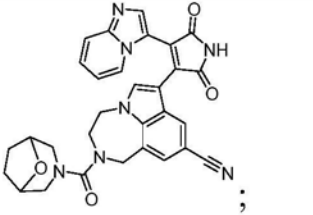
36. 根据权利要求12-32中任一项所述的化合物，其中 R^X 是 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 。

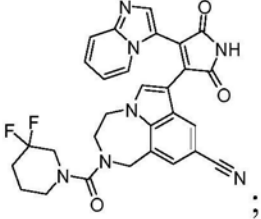
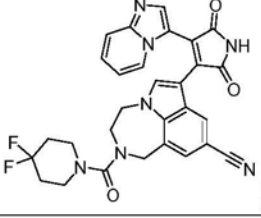
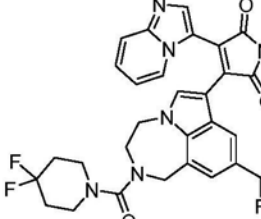
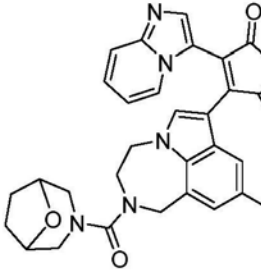
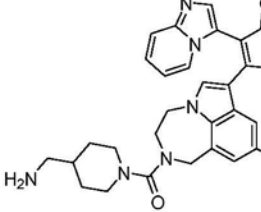
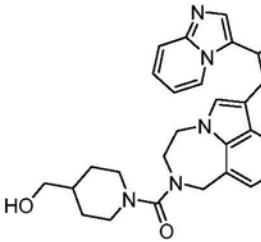
37. 根据权利要求34-36中任一项所述的化合物，其中 R^{X1} 是 C_3-C_8 环烷基。

38. 根据权利要求34-36中任一项所述的化合物,其中R^{X1}是杂环基,其中所述杂环基任选用1至12个卤基取代基取代。

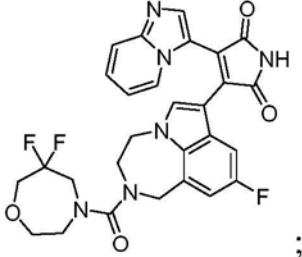
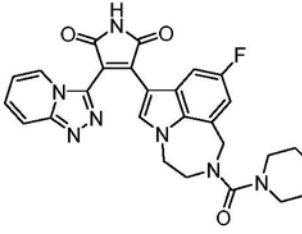
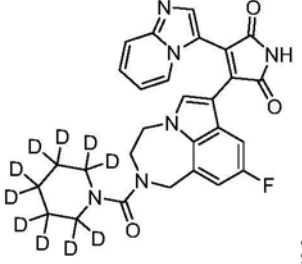
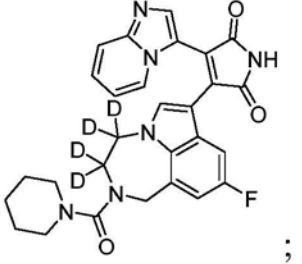
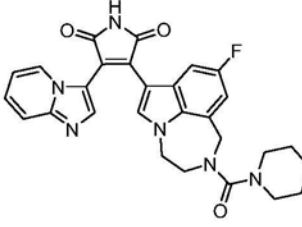
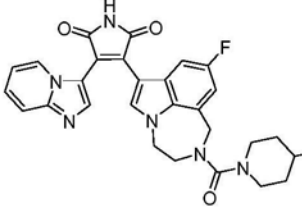
39. 一种化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体,选自

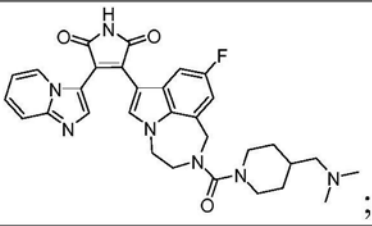
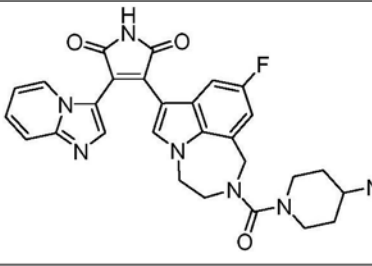
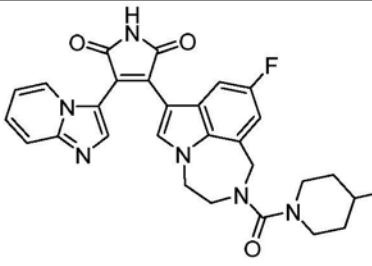
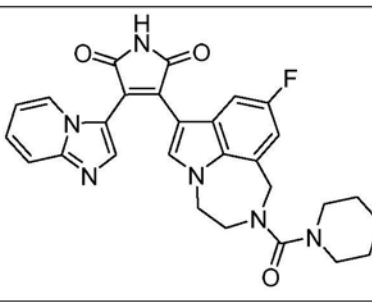
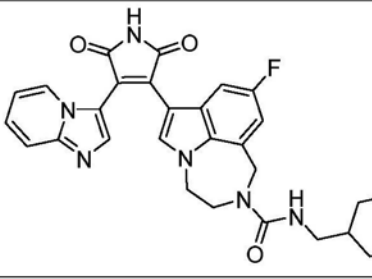
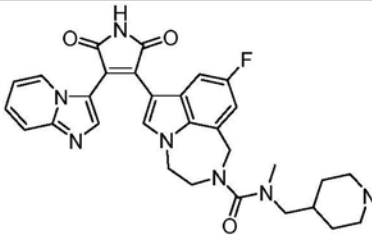
化合物 I-1	
化合物 I-2	
化合物 I-3	
化合物 I-4	
化合物 I-5	
化合物 I-6	
化合物 I-7	

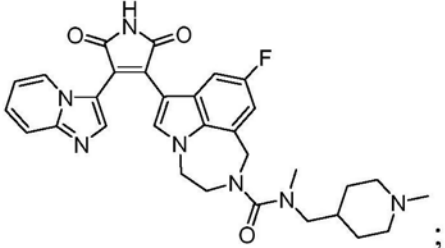
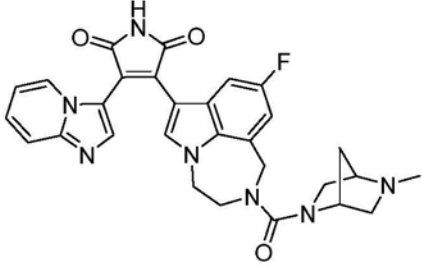
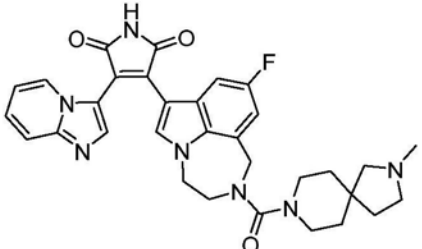
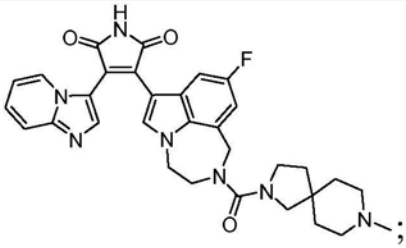
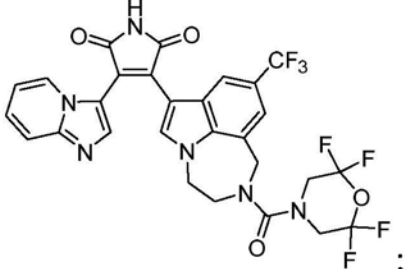
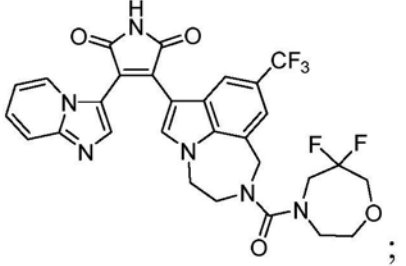
化合物 I-8	
化合物 I-9	
化合物 I-10	
化合物 I-11	
化合物 I-12	
化合物 I-13	
化合物 I-14	

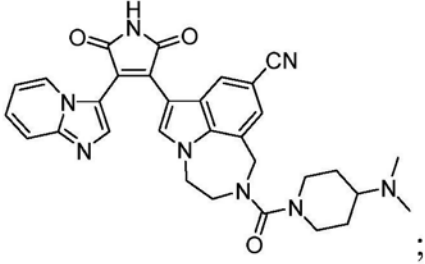
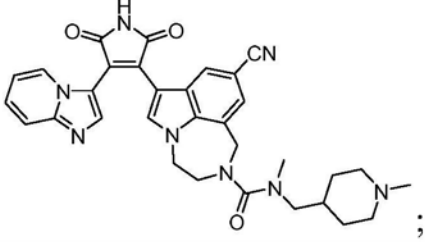
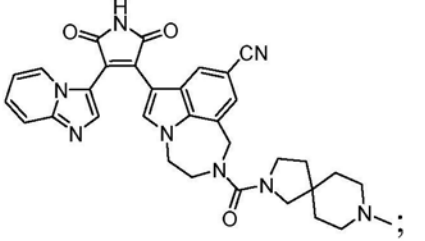
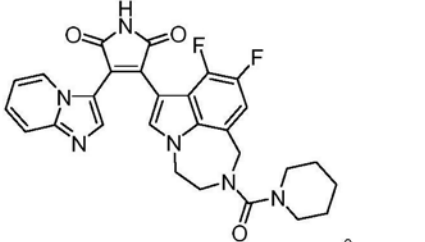
化合物 I-15	
化合物 I-16	
化合物 I-17	
化合物 I-18	
化合物 I-19	
化合物 I-20	

化合物 I-21	
化合物 I-22	
化合物 I-23	
化合物 I-24	
化合物 I-25	
化合物 I-26	

化合物 I-27	
化合物 I-28	
化合物 I-29	
化合物 I-30	
化合物 I-31	
化合物 I-32	

化合物 I-33	
化合物 I-34	
化合物 I-35	
化合物 I-36	
化合物 I-37	
化合物 I-38	

化合物 I-39	
化合物 I-40	
化合物 I-41	
化合物 I-42	
化合物 I-43	
化合物 I-44	

化合物 I-45	
化合物 I-46	
化合物 I-47	
化合物 I-48	

40. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体,以及药学上可接受的载体。

41. 根据权利要求40所述的药物组合物,其还包含HDAC抑制剂。

42. 根据权利要求40所述的药物组合物,其还包含TGFβ抑制剂。

43. 根据权利要求40所述的药物组合物,其还包含BMP抑制剂。

44. 根据权利要求40-43中任一项所述的药物组合物,其还包含泊洛沙姆。

45. 一种扩增包含亲本群体的耳蜗组织中的耳蜗细胞群体的方法,所述方法包括使所述耳蜗组织与根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体或根据权利要求40-44中任一项所述的药物组合物接触。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述耳蜗组织是在受试者中。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中使所述耳蜗组织与所述组合物接触通过向所述受试者经鼓膜施用所述组合物来实现。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中使所述耳蜗组织与所述组合物接触导致所述受试者的听觉功能改善。

49. 一种促进组织细胞产生的方法,所述方法包括向干细胞群体施用或造成其被施用根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体或根据权

利要求40-44中任一项所述的药物组合物。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述组织细胞是耳蜗细胞。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中所述组织细胞是内耳毛细胞。

52. 一种治疗患有或有风险发展与缺失在或缺乏某些组织细胞相关的疾病的受试者的方法,所述方法包括向干细胞群体施用或造成其被施用根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体或根据权利要求40-44中任一项所述的药物组合物。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述组织细胞是耳蜗细胞。

54. 根据权利要求52所述的方法,其中所述组织细胞是内耳毛细胞。

55. 一种治疗患有或有风险发展听力损失的受试者的方法,所述方法包括施用根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体或根据权利要求40-44中任一项所述的药物组合物。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中将所述化合物经鼓膜施用给所述受试者的耳蜗组织。

57. 一种促进内耳毛细胞产生的方法,所述方法包括:施用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,以扩增耳蜗组织的干细胞群体。

58. 一种在哺乳动物中再生听力的方法,所述方法包括施用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体。

59. 根据权利要求57或58所述的方法,其中所述施用是施用至体内受试者的干细胞群体。

60. 一种产生内耳毛细胞的方法,所述方法包括施用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体,其中所述方法使体内初始群体中的LGR5+细胞增殖,从而导致扩增的LGR5+细胞群体,从而导致内耳毛细胞的产生。

61. 一种促进肠细胞产生的方法,所述方法包括:施用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,以扩增肠上皮的干细胞群体。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述肠上皮得以再生。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述方法是用于促进与化疗诱导的胃肠粘膜炎症、移植物抗宿主病(Graph Versus Host Disease)、胃溃疡、克罗恩病或溃疡性结肠炎相关的受损粘膜的修复的治疗。

64. 一种扩增肠上皮的Lgr5+细胞群体的方法,所述方法包括:施用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

65. 一种使用单独的或与HDAC抑制剂组合的根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体来再生哺乳动物中的Lgr5+细胞群体肠细胞的方法。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述方法是用于促进与化疗诱导的胃肠粘膜炎症、移植物抗宿主病(Graph Versus Host Disease)、胃溃疡、克罗恩病或溃疡性结肠炎相关的受损粘膜的修复的治疗。

67. 一种使体内Lgr5+上皮细胞增殖的方法,所述方法包括:施用根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

68. 一种用于扩增前庭组织中的前庭细胞群体的方法,所述方法包括使所述前庭组织与(i) 根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐和(ii) TGF- β 抑制剂接触以在所述前庭组织中形成扩增的细胞群体。

69. 一种用于治疗患有或有风险发展与缺失或缺乏某些组织细胞相关的疾病的受试者的系统,所述系统包括施用:

根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体;和经鼓膜施用装置。

70. 根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体,其用于治疗患有或有风险发展与缺失或缺乏某些组织细胞相关的疾病的受试者。

71. 根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体,其用于治疗患有或有风险发展听力损失的受试者。

72. 根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗患有或有风险发展与缺失或缺乏某些组织细胞相关的疾病的受试者。

73. 根据权利要求1-39中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或互变异构体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗患有或有风险发展听力损失的受试者。

1H-吡咯-2,5-二酮化合物以及使用它们来诱导干/祖支持细胞自我更新的方法

[0001] 相关的专利申请

[0002] 本申请要求于2017年4月11日提交的美国申请No.62/484,282和2016年12月30日提交的美国申请No.62/441,060的优先权,它们中的每一篇通过引用整体并入。

技术领域

[0003] 本公开涉及1H-吡咯-2,5-二酮化合物以及使用它们来诱导干/祖支持细胞自我更新的方法,包括诱导所述干/祖细胞增殖而同时在子代细胞中维持分化成组织细胞的能力。

背景技术

[0004] 干细胞在体内展现出惊人的产生多种细胞类型的能力。除了胚胎干细胞外,组织特异性的干细胞在发育期间以及在成人的体内稳态和损伤修复中发挥关键作用。干细胞通过增殖而自我更新,以及通过分化而产生组织特异性的细胞类型。不同干细胞的特性随组织不同而变化,并且由其固有的遗传状态和表观遗传状态决定。但是,不同干细胞在自我更新和分化之间的平衡都受到严格控制。失控的自我更新可能导致干细胞的过度生长,并可能导致肿瘤形成,而失控的分化可能耗尽干细胞库,从而导致维持组织体内稳态的能力受损。因而,干细胞持续地感知它们的环境并适当地以增殖、分化或细胞凋亡做出应答。通过控制干细胞增殖和分化的时机和程度来驱动再生将是合乎需要的。用随时间推移被清除的小分子来控制增殖,将允许控制干细胞增殖和分化的时机和程度。值得注意的是,来自不同组织的组织干细胞共享有限数量的调节其自我更新和分化的信号传递途径,但是以非常依赖于环境的方式。这些途径中的一些是Wnt和GSK3途径。

[0005] Lgr5在多种组织中表达,并且已被鉴定为多种组织诸如肠上皮(Barker等人,2007年)、肾、毛囊和胃(Barker等人,2010年;Haegbarth和Clevers,2009年)中的成体干细胞的生物标志物。例如,在2011年首次公开了哺乳动物内耳毛细胞源自LGR5⁺细胞(Chai等人,2011年;Shi等人,2012年)。Lgr5是Wnt/ β -连环蛋白途径的已知组分,其已经被证实在分化、增殖和诱导干细胞特征中起主要作用(Barker等人,2007年)。

[0006] 内耳毛细胞的永久性损伤会导致感音神经性听觉丧失,从而在大比例的人群中造成交流困难。毛细胞是转换听觉刺激的感受细胞。受损的毛细胞的再生为目前除了假体装置以外再无其它疗法的病症的治疗提供了途径。尽管毛细胞在哺乳动物耳蜗中不会再生,但是在低等脊椎动物中的新毛细胞由环绕毛细胞的上皮细胞(被称作支持细胞)产生。

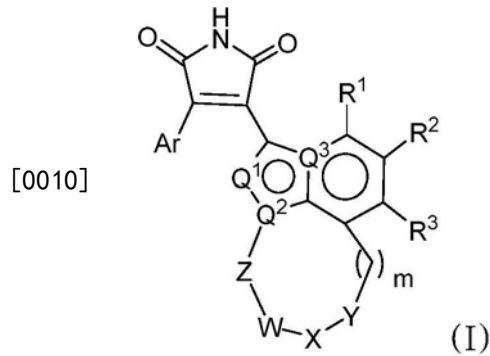
[0007] 先前的工作已经聚焦于通过导致毛细胞形成的基因的活化或强制表达而使支持细胞转分化为毛细胞,特别聚焦于增强Atoh1的表达的机制(Birmingham等人,1999年;Zheng和Gao,2000年;Izumikawa等人,2005年;Mizutari等人,2013年)。令人感兴趣的是,已经证实用Atoh1载体转导的细胞会获得前庭表型(Kawamoto等人,2003;Huang等人,2009;Yang等人,2012、2013),并且缺乏完整的发育。如提及的,已经证实通过基因插入而上调Atoh1会产生非耳蜗细胞类型,其行为方式在天然耳蜗中未发现。另外,这些方法会增加毛

细胞数目,但减少支持细胞数目。由于已知支持细胞具有专门作用 (Ramirez-Camancho 2006; Dale和Jagger 2010),这些细胞的损失将对适当的耳蜗功能带来问题。

[0008] 因而,对能够在损伤后保持/促进现有细胞的功能的新化合物仍然存在长期感觉到的需求。

发明内容

[0009] 本公开提供了式 (I) 化合物,



[0011] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体,其中:

[0012] Q^1 是CH或N;

[0013] Q^2 是C或N;

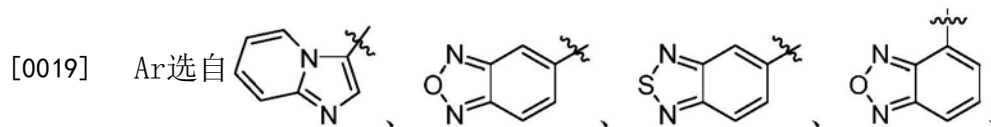
[0014] Q^3 是C或N;

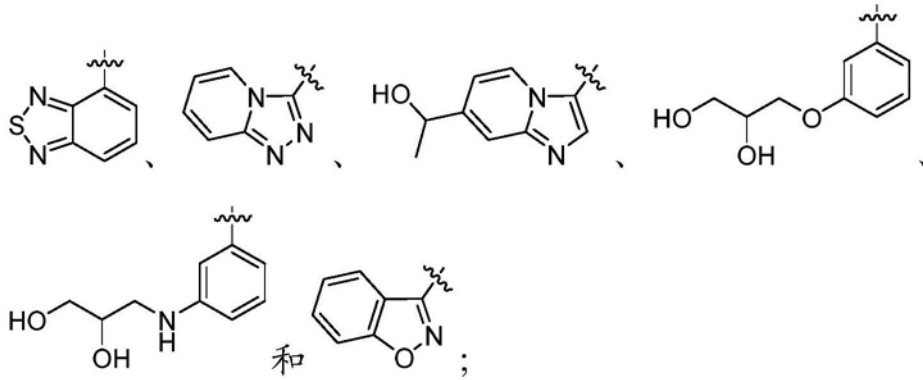
[0015] 其中 Q^1 、 Q^2 和 Q^3 中的至少一者是N;

[0016] R^1 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NHC(O) R^{1a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基;

[0017] R^2 选自卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NH(C_1 - C_4 烷基)、-N(C_1 - C_4 烷基)₂、-NHC(O) R^{2a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基;

[0018] R^3 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NHC(O) R^{3a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{3a} 是 C_1 - C_4 烷基;





[0020] $-Z-W-X-Y-$ 是 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-N(R^X)-C(R^Y)_2-$ 、 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$ 或 $C(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$;

[0021] 每个 R^Z 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^Z 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基或氧代基;

[0022] 每个 R^W 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^W 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基或氧代基;

[0023] 或者 R^Z 和 R^W 与它们连接的碳合在一起形成 C_3-C_6 环烷基;

[0024] R^X 选自 $-COR^{X1}$ 、 $-SO_2R^{X1}$ 、杂芳基和 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基),并且其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-(C_3-C_8$ 环烷基)在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用1至4个卤基取代;

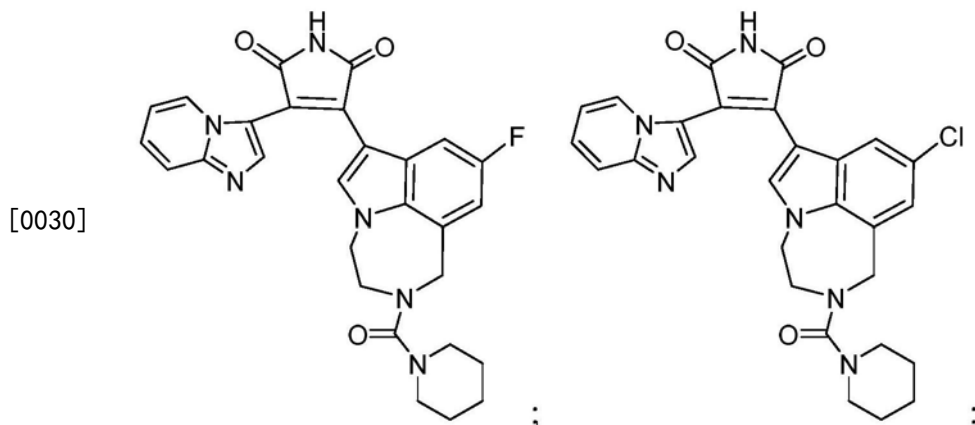
[0025] 其中 R^{X1} 是杂环基,其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代:氘、卤基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-CN$ 、 $-CF_3$ 、 C_1-C_4 烷基、 $-(CH_2)_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NHCOC_1-C_4$ 烷基、 $-CONHC_1-C_4$ 烷基、 $-COH$ 、 $-CO_2H$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-COO-C_1-C_4$ 烷基、 $-(CH_2)_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$;其中 p 是0、1、2或3;其中每个 R^{X1a} 独立地选自氢、氘、卤基、 $-CF_3$ 和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基;

[0026] 或者 R^{X1} 为 $N(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 独立地选自氢、烷基、取代的烷基,其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环;每个 R^Y 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1-C_4 烷基,或者两个 R^Y 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基或氧代基;并且

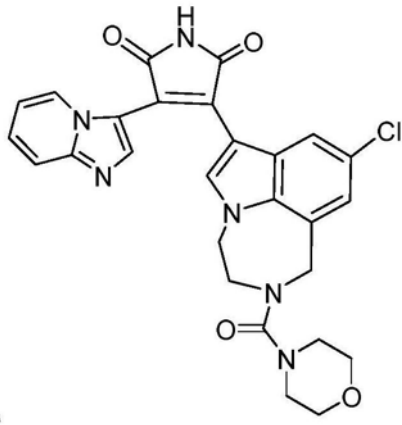
[0027] m 是0、1或2。

[0028] 在一些实施方案中,式(I)化合物具有以下特征中的一者或多者:

[0029] a) 前提条件是所述化合物不是

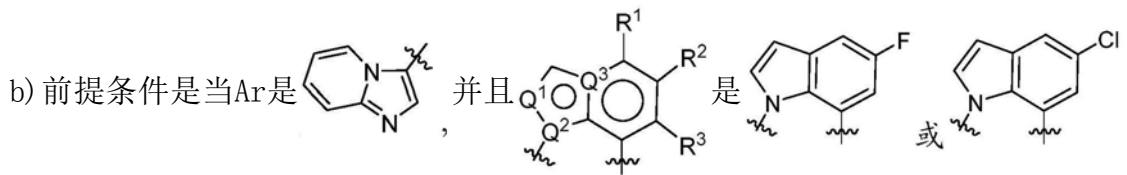


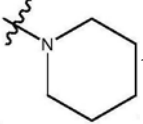
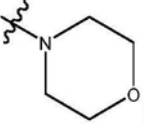
[0031]



或

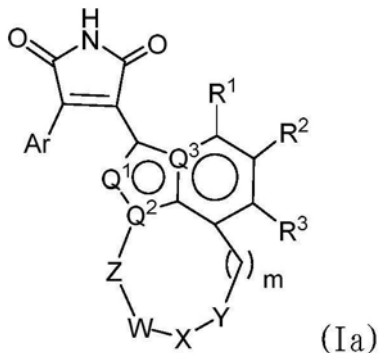
[0032]



时, 则R¹不是  也不是 

[0033] 本公开提供了式 (Ia) 化合物:

[0034]



[0035] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体, 其中:

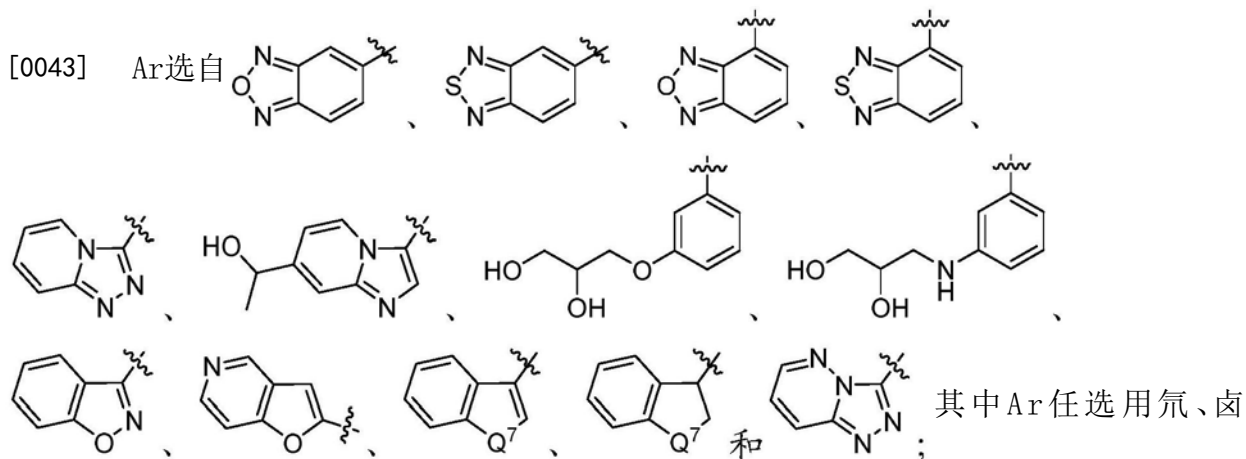
[0036] Q¹是CH或N;[0037] Q²是C或N;[0038] Q³是C或N;[0039] 其中Q¹、Q²和Q³中的至少一者是N;

[0040] R¹选自氢、卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NHC(O)R^{3a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并且其中R^{1a}是C₁-C₄烷基;

[0041] R²选自氢、卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)、-N(C₁-C₄烷基)₂、-NHC(O)R^{2a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并且其中R^{2a}是C₁-C₄烷基;

[0042] R³选自氢、卤基、C₁-C₄烷基、C₁-C₄烯基、C₁-C₄炔基、-CN、-OH、-O-C₁-C₄烷基、-NH₂、-NHC(O)R^{3a}和-S(O)₂NH₂; 其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代; 并

且其中R^{3a}是C₁-C₄烷基;



基、烷基、烷氧基和CN取代;

[0044] Q⁷选自S、O、CH₂和NR^{Q7};其中R^{Q7}是氢或任选取代的C₁-C₄烷基;

[0045] -Z-W-X-Y-是-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-N(R^X)-C(R^Y)₂-、-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-或C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-;

[0046] 每个R^Z独立地选自氢、氘、卤基和C₁-C₄烷基,或者两个R^Z基团一起形成C₃-C₆环烷基或氧代基;

[0047] 每个R^W独立地选自氢、氘、卤基和C₁-C₄烷基,或者两个R^W基团一起形成C₃-C₆环烷基或氧代基;

[0048] 或者R^Z和R^W与它们连接的碳合在一起形成C₃-C₆环烷基;

[0049] R^X选自氢、R^{X1}、-COR^{X1}、-SO₂R^{X1}、-(C₁-C₄亚烷基)-R^{X1},并且其中所述-(C₁-C₄亚烷基)-R^{X1}任选在所述C₁-C₄亚烷基上用1至4个卤基取代;

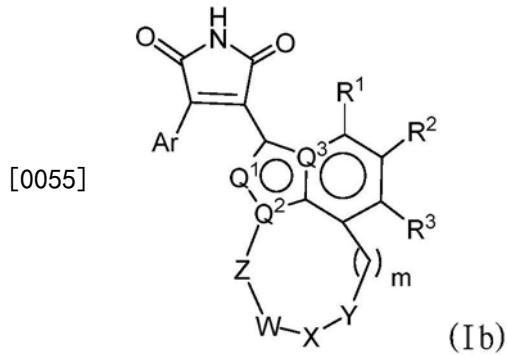
[0050] 其中R^{X1}是C₃-C₈环烷基、杂芳基或杂环基,其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代:氘、卤基、-[C(R^{X1a})₂]_p-CN、-CF₃、C₁-C₄烷基、-(CH₂)_p-OH、-[C(R^{X1a})₂]_p-OH、-[C(R^{X1a})₂]_p-O-C₁-C₄烷基、-NHCOC₁-C₄烷基、CONHC₁-C₄烷基、COH、-CO₂H、-[C(R^{X1a})₂]_p-COO-C₁-C₄烷基、-(CH₂)_p-NH₂、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH₂、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH-C₁-C₄烷基、-[C(R^{X1a})₂]_p-N-(C₁-C₄烷基)₂;其中p是0、1、2或3;其中每个R^{X1a}独立地选自氢、氘、卤基、-CF₃和C₁-C₄烷基,或者两个R^{X1a}基团一起形成C₃-C₆环烷基;

[0051] 或者R^{X1}是N(R^{X2})₂,其中R^{X2}独立地选自氢、烷基、取代的烷基,其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环;

[0052] 每个R^Y独立地选自氢、氘、卤基和C₁-C₄烷基,或者两个R^Y基团一起形成C₃-C₆环烷基或氧代基;并且

[0053] m是0、1或2。

[0054] 本公开提供了式(Ib)化合物:



[0056] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体,其中:

[0057] Q^1 是CH或N;

[0058] Q^2 是C或N;

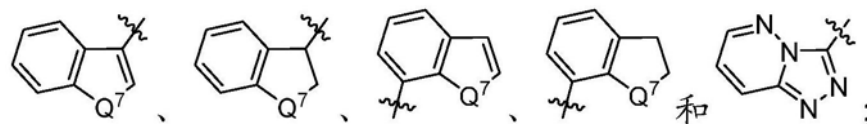
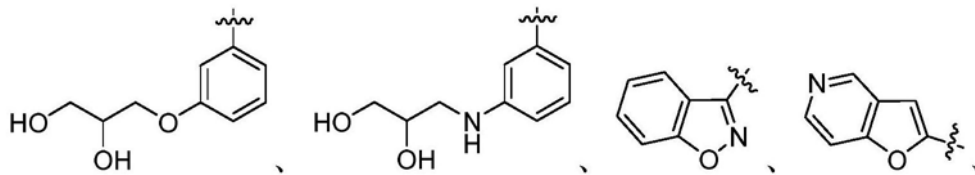
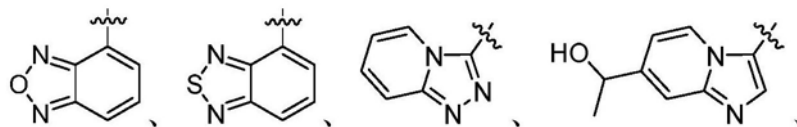
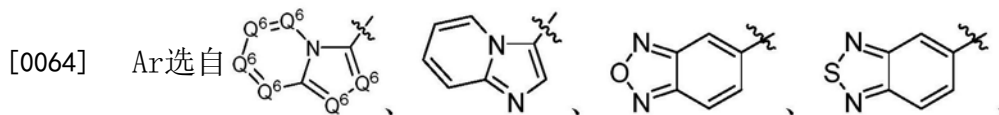
[0059] Q^3 是C或N;

[0060] 其中 Q^1 、 Q^2 和 Q^3 中的至少一者是N;并且前提条件是当 Q^1 是CH并且 Q^3 是C时, Q^2 不是N;

[0061] R^1 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NHC(O) R^{3a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基;

[0062] R^2 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NH(C_1 - C_4 烷基)、-N(C_1 - C_4 烷基)₂、-NHC(O) R^{2a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基;

[0063] R^3 选自氢、卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NHC(O) R^{3a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{3a} 是 C_1 - C_4 烷基;



其中Ar任选用氘、卤基、烷基、烷氧基和CN取代;

[0065] 每个 Q^6 独立地选自 CR^{Q6} 和N;其中 R^{Q6} 是氢、卤基、-CN、低级烷基或取代的烷基;

[0066] Q^7 选自S、O、CH₂和NR^{Q7};其中 R^{Q7} 是氢或任选取代的 C_1 - C_4 烷基;

[0067] -Z-W-X-Y-是-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-N(R^X)-C(R^Y)₂-、-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-或C

$(R^W)_2-CH(R^X)-C(R^Y)_2-$;

[0068] 每个 R^Z 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基,或者两个 R^Z 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基;

[0069] 每个 R^W 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基,或者两个 R^W 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基;

[0070] 或者 R^Z 和 R^W 与它们连接的碳合在一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

[0071] R^X 选自氢、 R^{X1} 、 $-COR^{X1}$ 、 $-SO_2R^{X1}$ 、 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$,并且其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 任选在所述 C_1 - C_4 亚烷基上用1至4个卤基取代;

[0072] 其中 R^{X1} 是 C_3 - C_8 环烷基、杂芳基或杂环基,其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代:氘、卤基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-CN$ 、 $-CF_3$ 、 C_1 - C_4 烷基、 $-(CH_2)_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NHCOC_1-C_4$ 烷基、 $CONHC_1-C_4$ 烷基、 COH 、 $-CO_2H$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-COO-C_1-C_4$ 烷基、 $-(CH_2)_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$;其中 p 是0、1、2或3;其中每个 R^{X1a} 独立地选自氢、氘、卤基、 $-CF_3$ 和 C_1 - C_4 烷基,或者两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

[0073] 或者 R^{X1} 是 $N(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 独立地选自氢、烷基、取代的烷基,其中所述烷基取代可以是卤基、杂环和取代的杂环;

[0074] 每个 R^Y 独立地选自氢、氘、卤基和 C_1 - C_4 烷基,或者两个 R^Y 基团一起形成 C_3 - C_6 环烷基或氧代基;并且

[0075] m 是0、1或2。

[0076] 在一个方面,本公开提供了干细胞增殖的方法,包括向细胞群体施用有效量的本文提供的组合物。在一些实施方案中,增殖是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。

[0077] 因此,在本公开的不同方面,可以注意到一种用于在细胞群体中活化Wnt途径以增加该群体的自我更新能力(即,重复产生具有相同增殖和“细胞命运指定”潜能的子代细胞的能力)和分化能力(即,产生被指定用于分化的子代细胞的能力)的方法。在一个实施方案中,所述细胞群体是耳蜗支持细胞群体。优选地,在该群体成员中的 $c-myc$ 基因上游活化Wnt途径,而不对该群体进行任何遗传修饰。作为替代,优选用瞬时诱导这种活性的小分子活化Wnt途径。另外,所述支持细胞群体优选包括对柯蒂氏器官而言内源性的LGR5⁺支持细胞。

[0078] 本公开的另一个方面是一种用于诱导耳蜗细胞群体所包含的干/祖支持细胞的自我更新的方法。也就是说,诱导干/祖支持细胞增殖(即,分裂并形成子代细胞),同时在子代细胞中保持分化为毛细胞的能力。相反,如果仅诱导干/祖支持细胞增殖(而不保持多潜能性),则子代细胞将缺乏分裂为毛细胞的能力。此外,仅增强预先存在的干/祖细胞群体的分化具有耗尽干细胞库的可能。优选用瞬时诱导这种活性的小分子活化增殖。另外,在某些实施方案中,所述支持细胞群体优选包括对柯蒂氏器官而言内源性的LGR5⁺支持细胞。

[0079] 在第一方面,提供了使用1H-吡咯-2,5-二酮化合物诱导干/祖支持细胞自我更新的方法。在一些实施方案中,1H-吡咯-2,5-二酮化合物是式(I)化合物。

[0080] 因此,在某些实施方案中,本公开提供了通过活化已知参与诱导干细胞特性的途径和机制(诸如用于产生“诱导的多能干细胞”的那些)来诱导支持细胞群体的自我更新的方法。优选地,用小分子活化所述途径。例如,当在体外施加至支持细胞群体时,化合物在干

细胞增殖测定中诱导该群体以高程度和高纯度增殖,并且在干细胞分化测定中也允许该群体分化为高纯度的组织细胞群体。在一个这样的实施方案中,所述化合物通过增殖而产生干细胞来诱导和保持干细胞特性,所述干细胞可以分裂许多代并保持使高比例的所产生的细胞分化为组织细胞的能力。此外,增殖中的干细胞表达干细胞标志物,这些标志物可以包括Lgr5、Sox2、Opem1、Phex、lin28、Lgr6、cyclin D1、Msx1、Myb、Kit、Gdnf3、Zic3、Dppa3、Dppa4、Dppa5、Nanog、Esrrb、Rex1、Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt3l、Utf1、Tcl1、Oct4、Klf4、Pax6、Six2、Zic1、Zic2、Otx2、Bmi1、CDX2、STAT3、Smad1、Smad2、smad2/3、smad4、smad5和smad7中的一种或多种。

[0081] 在某些实施方案中,本公开提供了一种在包含亲本细胞群体的耳蜗组织中扩增耳蜗细胞群体的方法。在该实施方案中,该方法包括使所述耳蜗组织与干细胞增殖剂接触以在所述耳蜗组织中形成扩增的细胞群体,其中

[0082] 所述干细胞增殖剂能够(i)在干细胞增殖测定中经历增殖测定时间段从增殖测定初始细胞群体形成增殖测定最终细胞群体,和(ii)在干细胞分化测定中经历分化测定时间段从分化测定初始细胞群体形成分化测定最终细胞群体,其中:

[0083] (a) 所述增殖测定初始细胞群体具有:(i)增殖测定初始细胞总数,(ii)增殖测定初始Lgr5⁺细胞数,(iii)增殖测定初始毛细胞数,(iv)增殖测定初始Lgr5⁺细胞比例,其等于增殖测定初始Lgr5⁺细胞数与增殖测定初始细胞总数之比,和(v)增殖测定初始毛细胞比例,其等于增殖测定初始毛细胞数与增殖测定初始细胞总数之比;

[0084] (b) 所述增殖测定最终细胞群体具有:(i)增殖测定最终细胞总数,(ii)增殖测定最终Lgr5⁺细胞数,(iii)增殖测定最终毛细胞数,(iv)增殖测定最终Lgr5⁺细胞比例,其等于增殖测定最终Lgr5⁺细胞数与增殖测定最终细胞总数之比,和(v)增殖测定最终毛细胞比例,其等于增殖测定最终毛细胞数与增殖测定最终细胞总数之比;

[0085] (c) 所述分化测定初始细胞群体具有:(i)分化测定初始细胞总数,(ii)分化测定初始Lgr5⁺细胞数,(iii)分化测定初始毛细胞数,(iv)分化测定初始Lgr5⁺细胞比例,其等于分化测定初始Lgr5⁺细胞数与分化测定初始细胞总数之比,和(v)分化测定初始毛细胞比例,其等于分化测定初始毛细胞数与分化测定初始细胞总数之比;

[0086] (d) 所述分化测定最终细胞群体具有:(i)分化测定最终细胞总数,(ii)分化测定最终Lgr5⁺细胞数,(iii)分化测定最终毛细胞数,(iv)分化测定最终Lgr5⁺细胞比例,其等于分化测定最终Lgr5⁺细胞数与分化测定最终细胞总数之比,和(v)分化测定最终毛细胞比例,其等于分化测定最终毛细胞数与分化测定最终细胞总数之比;

[0087] (e) 所述增殖测定最终Lgr5⁺细胞数比增殖测定初始Lgr5⁺细胞数大至少10倍;并且

[0088] (f) 所述分化测定最终毛细胞数是非零数字。

[0089] 上述测定法不包括施加notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0090] 在某些实施方案中,本公开提供了一种增加耳蜗细胞群体中的支持细胞的细胞密度的方法。所述方法包括:活化所述支持细胞中的诱导干细胞特性的途径和机制,使活化的支持细胞增殖(同时在新形成的子代细胞中保持所述支持细胞的多潜能特征),并随后允许(或甚至诱导)扩增的群体分化为毛细胞以形成扩增的耳蜗细胞群体,其中所述扩增的耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度大于原始的(未扩增的)耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度。在一些实施方案中,这种增殖是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。

在某些实施方案中,所述支持细胞群体是体外支持细胞群体。在某些实施方案中,所述支持细胞群体是体内支持细胞群体。此外,优选控制所述增殖阶段以基本上保持耳蜗结构的天然构造。通过可瞬时诱导这种活性的本文所述化合物来诱导增殖,而不是通过诱导c-myc来诱导增殖,且不对该群体进行任何遗传修饰。在一些实施方案中,这种增殖是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。另外,在某些实施方案中,所述支持细胞群体优选包括对柯蒂氏器官而言内源性的LGR5⁺支持细胞。

[0091] 在某些实施方案中,本公开提供了一种增加耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度的方法所述方法包括:活化Lgr5⁺支持细胞中的诱导或保持干细胞特性的途径和机制,使活化的Lgr5⁺支持细胞增殖(同时保持这种干细胞特性),并随后允许(或甚至诱导)扩增的群体分化为毛细胞以形成扩增的耳蜗细胞群体,其中所述扩增的耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度大于原始的(未扩增的)耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度。在用于增加耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度的一些实施方案中,这种细胞密度的增加是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。在一些实施方案中,所述Lgr5⁺支持细胞群体是体外Lgr5⁺干细胞群体。在其它实施方案中,所述Lgr5⁺支持细胞群体是体内支持细胞群体。另外,在某些实施方案中,优选控制所述增殖阶段以基本上保持耳蜗结构的天然构造。

[0092] 在某些实施方案中,本公开提供了一种增加初始耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度的方法,所述初始群体(其可以是体内或体外群体)包含毛细胞、Lgr5⁻支持细胞和Lgr5⁺支持细胞。在用于增加初始耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度的一些实施方案中,这种细胞密度的增加是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。该方法包括给所述初始群体施用本文所述的化合物。

[0093] 在某些实施方案中,该方法在干细胞增殖测定中产生表达干细胞标志物Lgr5⁺的干细胞。在某些实施方案中,如果将Lgr5⁺和非Lgr5⁺干细胞的混合群体置于干细胞增殖测定中,那么所述方法增加该群体中的Lgr5⁺细胞的比例。在一些实施方案中,干细胞增殖测定中干细胞的这种产生是在不存在notch激活剂或HDAC抑制剂的情况下发生。

[0094] 将支持细胞群体扩增至破坏所述耳蜗结构的天然构造的程度可能会抑制耳蜗功能。与使用基因递送相比,用小分子信号驱动现有支持细胞的增殖可以实现更加受控的毛细胞再生,所述基因递送不能靶向特定细胞类型且会永久地改变细胞的遗传信息。在所需的接近正常的耳蜗结构中,各排毛细胞之间是支持细胞,且毛细胞不接触其它毛细胞。另外,合乎需要的是,避免使用遗传修饰来驱动增殖以在耳蜗中产生可破坏器官解剖学构造的大的细胞聚集体。

[0095] 在某些实施方案中,本公开提供了一种增加包含毛细胞和支持细胞的初始耳蜗细胞群体中的毛细胞的细胞密度的方法。所述方法包括选择性地扩增所述初始群体中的支持细胞的数量以形成中间耳蜗细胞群体,其中所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞的数量比大于所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞的数量比。所述方法还包括在所述中间耳蜗细胞群体中产生毛细胞以形成扩增的耳蜗细胞群体,其中所述扩增的耳蜗细胞群体中的毛细胞与支持细胞的数量比大于所述中间耳蜗细胞群体中的毛细胞与支持细胞的数量比。在一些实施方案中,该方法不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0096] 在某些实施方案中,本公开提供了一种在初始耳蜗细胞群体中增加Lgr5⁺支持细

胞的数量或增加Lgr5⁺活性的方法,其中所述初始群体包含支持细胞和毛细胞。例如,在一种这样的方法中,形成中间群体,其中Lgr5⁺支持细胞的数量相对于所述初始群体扩增。备选地,在一种这样的方法中,形成中间群体,其中所述支持细胞的Lgr5⁺活性相对于所述初始群体增加。备选地,有如下方法:通过在通常缺乏Lgr5⁺或具有非常低水平的Lgr5⁺的细胞类型中活化Lgr5⁺表达,使Lgr5⁺细胞的数量相对于所述初始细胞群体增加。在一些实施方案中,这些备选方法不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。再例如,形成中间群体,其中相对于所述初始耳蜗细胞群体,Lgr5⁺支持细胞的数量扩增且Lgr5活性增加。此后,可以在所述中间耳蜗细胞群体中产生毛细胞以形成扩增的耳蜗细胞群体,其中所述扩增的耳蜗细胞群体中的毛细胞与支持细胞的数量比大于所述中间耳蜗细胞群体中的毛细胞与支持细胞的数量比。

[0097] 在本公开的每个前述实施方案中,通过活化Wnt或抑制GSK3活性来诱导干性。在一些实施方案中,诱导干性不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0098] 在某些实施方案中,本公开提供了预防和治疗听觉功能障碍的方法。例如,在某些实施方案中,本公开提供了预防或治疗受试者的听觉受损的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的本文所提供的化合物。

[0099] 在某些实施方案中,本公开还涉及本文所述的细胞的离体应用。例如,本文所述的方案可用于高通量筛选和用于发现目的。例如,本公开的某些实施方案可用于鉴别使毛细胞祖细胞增殖和/或增加毛细胞数量的试剂以及保护支持细胞和/或毛细胞(例如,支持它们的存活)的试剂,还可用于鉴别对支持细胞或分化的子代(包括毛细胞)具有毒性或没有毒性的试剂。

[0100] 在某些实施方案中,本公开提供了抑制受试者的听觉系统细胞的损失或死亡的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的本文所述的化合物或其衍生物或其药学上可接受的盐和可接受的载体或赋形剂,由此抑制受试者的听觉系统细胞的损失或死亡。在一些实施方案中,该方法不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0101] 在某些实施方案中,本公开提供了保持或促进受试者的听觉系统细胞的生长的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的本文所述化合物或其衍生物或其药学上可接受的盐,由此保持或促进所述受试者的听觉系统细胞的生长。

[0102] 本文还描述了一种扩增包含亲本细胞群体的耳蜗组织中的耳蜗细胞群体的方法,所述亲本群体包括支持细胞和许多Lgr5⁺细胞,所述方法包括:使所述耳蜗组织与干细胞增殖剂接触以在所述耳蜗组织中形成扩增的细胞群体,其中所述干细胞增殖剂能够(i)在干细胞增殖测定中将干细胞增殖测定细胞群体中的Lgr5⁺细胞的数量增加至少10倍,和(ii)在干细胞分化测定中从包含Lgr5⁺细胞的细胞群体形成毛细胞。在扩增耳蜗细胞群体一些实施方案中,该方法不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0103] 本文还描述了一种扩增包含亲本细胞群体的耳蜗组织中的耳蜗细胞群体的方法,所述亲本群体包括支持细胞,所述方法包括:使所述耳蜗组织与干细胞增殖剂接触以在所述耳蜗组织中形成扩增的细胞群体。所述干细胞增殖剂能够(i)在干细胞增殖测定中经历增殖测定时间段从增殖测定初始细胞群体形成增殖测定最终细胞群体,和(ii)在干细胞分化测定中经历分化测定时间段从分化测定初始细胞群体形成分化测定最终细胞群体,其中:(a)所述增殖测定初始细胞群体具有:(i)增殖测定初始细胞总数,(ii)增殖测定初始

Lgr5⁺细胞数, (iii) 增殖测定初始毛细胞数, (iv) 增殖测定初始Lgr5⁺细胞比例, 其等于增殖测定初始Lgr5⁺细胞数与增殖测定初始细胞总数之比, 和 (v) 增殖测定初始毛细胞比例, 其等于增殖测定初始毛细胞数与增殖测定初始细胞总数之比; (b) 所述增殖测定最终细胞群体具有: (i) 增殖测定最终细胞总数, (ii) 增殖测定最终Lgr5⁺细胞数, (iii) 增殖测定最终毛细胞数, (iv) 增殖测定最终Lgr5⁺细胞比例, 其等于增殖测定最终Lgr5⁺细胞数与增殖测定最终细胞总数之比, 和 (v) 增殖测定最终毛细胞比例, 其等于增殖测定最终毛细胞数与增殖测定最终细胞总数之比; (c) 所述分化测定初始细胞群体具有: (i) 分化测定初始细胞总数, (ii) 分化测定初始Lgr5⁺细胞数, (iii) 分化测定初始毛细胞数, (iv) 分化测定初始Lgr5⁺细胞比例, 其等于分化测定初始Lgr5⁺细胞数与分化测定初始细胞总数之比, 和 (v) 分化测定初始毛细胞比例, 其等于分化测定初始毛细胞数与分化测定初始细胞总数之比; (d) 所述分化测定最终细胞群体具有: (i) 分化测定最终细胞总数, (ii) 分化测定最终Lgr5⁺细胞数, (iii) 分化测定最终毛细胞数, (iv) 分化测定最终Lgr5⁺细胞比例, 其等于分化测定最终Lgr5⁺细胞数与分化测定最终细胞总数之比, 和 (v) 分化测定最终毛细胞比例, 其等于分化测定最终毛细胞数与分化测定最终细胞总数之比; (e) 所述增殖测定最终Lgr5⁺细胞数比增殖测定初始Lgr5⁺细胞数大至少10倍; 并且 (f) 所述分化测定最终毛细胞数是非零数字。在上述测定的实施方案中, 该测定不包括使用notch激活剂或HDAC抑制剂。

[0104] 所述增殖测定最终Lgr5⁺细胞数可以比增殖测定初始Lgr5⁺细胞数大至少50倍或至少100倍。所述耳蜗组织中扩增的细胞群体可以包括比亲本群体更大数目的毛细胞。所述增殖测定最终Lgr5⁺细胞比例可以比分化测定初始Lgr5⁺细胞比例大至少2倍。所述分化测定最终毛细胞比例可以比增殖测定初始毛细胞比例大至少2倍。所述增殖测定最终毛细胞比例可以比增殖测定初始毛细胞比例小至少25%。所述增殖测定最终Lgr5⁺细胞比例可以比增殖测定初始Lgr5⁺细胞比例大至少10%。可以保持耳蜗组织的多种形态学特征之一。可以保持天然形态。所述干细胞增殖剂可以分散在生物相容的基质中, 所述基质可以是生物相容的凝胶或泡沫。所述耳蜗组织可以是体内耳蜗组织或离体耳蜗组织。所述方法可以产生处于s期的Lgr5⁺细胞群体。所述耳蜗组织可以是在受试者中, 并且使所述耳蜗组织与所述化合物接触可以通过向所述受试者经鼓膜施用所述化合物来实现。使所述耳蜗组织与所述化合物接触可以导致所述受试者的听觉功能改善。

[0105] 本文还描述了治疗患有或有风险发展听力损失的受试者的方法。所述方法可以包括向所述受试者的耳蜗组织经鼓膜施用本文提供的化合物。

[0106] 本文还描述的是产生Myo7a+耳蜗细胞的方法。所述方法可以包括使Lgr5+耳蜗细胞与本文提供的化合物接触, 由此产生扩增的Lgr5+细胞群体, 由此产生Myo7a+耳蜗细胞。

[0107] 将在下文中部分地明白和在下文中部分地指出其它目的和特征。

[0108] 定义

[0109] 在本申请中, 除非另外说明, 否则“或”的使用意指“和/或”。如在本申请中使用的, 术语“包含”和该术语的变形 (诸如“包括”和“含有”) 不意图排除其它添加剂、组分、整数或步骤。如在本申请中使用的, 术语“约”和“大约”等同地使用。在本申请中使用的任何数字, 不论有没有约/大约, 都意在覆盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施方案中, 术语“大约”或“约”是指在所述参考值的任一个方向 (大于或更小) 落在25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、

4%、3%、2%、1%或更少之内的值的范围,除非另有说明或另外从上下文中显而易见(这种数字会超过可能值的100%的情况除外)。

[0110] “施用”是指将物质引入受试者中。在一些实施方案中,施用是耳部、耳内、耳蜗内、前庭内或经鼓膜施用,例如通过注射。在一些实施方案中,施用是直接施用至内耳,例如通过圆窗或卵圆窗、耳囊或前庭管注射。在一些实施方案中,经由耳蜗植入递送系统直接施用进内耳。在一些实施方案中,将所述物质经鼓膜地注射至中耳。在某些实施方案中,“造成……被施用”是指在已经施用了第一组分之后施用第二组分(例如,在不同时间和/或由不同的操作者)。

[0111] “抗体”是指具有免疫原结合能力的免疫球蛋白多肽或其片段。

[0112] 如本文所用的,“激动剂”是分别造成靶基因、蛋白质的表达或途径的活性增加的试剂。因此,激动剂可以以某种方式结合并活化其同源受体,这直接地或间接地给靶基因或蛋白质带来该生理学影响。激动剂还可以通过调节途径组分的活性(例如,通过抑制途径的负调节剂的活性)而增加途径的活性。因此,“Wnt激动剂”可以定义为增加Wnt途径的活性的试剂,其可以通过细胞中增加的TCF/LEF介导的转录来测量。因此,“Wnt激动剂”可以是结合并活化卷曲受体家族成员(包括任何和所有的Wnt家族蛋白)的真正Wnt激动剂、细胞内 β -连环蛋白降解的抑制剂和TCF/LEF的活化剂。

[0113] “拮抗剂”是指结合受体并继而减少或消除其它分子的结合的试剂。

[0114] “反义”是指与核酸序列的编码链或mRNA互补的核酸序列,不论长度。可以将反义RNA引入单个细胞、组织或类器官。反义核酸可以含有经修饰的主链,例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或本领域已知的其它经修饰的主链,或者可以含有非天然的核苷间键。

[0115] 如本文提及的,“互补核酸序列”是能够与另一个核酸序列杂交的由互补核苷酸碱基对组成的核酸序列。“杂交”意指在合适的严格条件下,互补核苷酸碱基之间配对以形成双链分子(例如DNA中腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)形成碱基对,同样鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)形成碱基对)。(参见,例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399; Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0116] “耳部施用”是指使用导管或管芯针装置跨鼓膜将组合物施用至受试者的内耳的方法。为了便于管芯针或导管的插入,可以使用适当尺寸的注射器或移液器穿过鼓膜。还可使用本领域技术人员已知的任何其它方法来插入所述装置,例如手术植入该装置。在特定实施方案中,所述管芯针或导管装置可以是独立装置,这意味着将它插入受试者耳中,并然后将所述组合物可控地释放至内耳。在其它特定实施方案中,所述管芯针或导管装置可以连接或偶联至泵或允许施用额外组合物的其它装置。所述泵可以自动地程序化递送剂量单位,或可以由受试者或医学专业人员控制。

[0117] 本文所用的“生物相容性基质”是对于向人施用以释放治疗剂而言可接受的聚合物载体。生物相容性基质可为生物相容性凝胶或泡沫。

[0118] 本文所用的“细胞聚集体”应意指柯蒂氏器中的细胞实体(body),其已增殖而形成直径大于40微米的给定细胞类型的簇且/或产生其中多于3个细胞层垂直于基底膜而驻留的形态。“细胞聚集体”还可指这样的过程:其中细胞分裂产生细胞实体,其使一种或更多种细胞类型突破网状板或内淋巴与外淋巴之间的边界。

[0119] 本文中结合特定细胞类型所用的“细胞密度”是在“代表性显微术样品”中单位面

积上的该细胞类型的平均数量。所述细胞类型可以包括但不限于Lgr5⁺细胞、毛细胞或支持细胞。可以用给定器官或组织(包括但不限于耳蜗或柯蒂氏器官)中的给定细胞类型来评估所述细胞密度。例如,柯蒂氏器官中的Lgr5⁺细胞密度是整个柯蒂氏器官上测得的Lgr5⁺细胞的细胞密度。通常,将通过截取柯蒂氏器官的横截面来对支持细胞和Lgr5⁺细胞进行计数。虽然在某些情况下可以使用横截面,但是通常通过在柯蒂氏器官的表面向下观看来对毛细胞进行计数,如在“代表性显微术样品”中描述的。通常,将如下测量Lgr5⁺细胞的细胞密度:分析柯蒂氏器官的整个封片制备物,并沿着上皮表面在给定距离上对Lgr5⁺细胞的数量进行计数,如在“代表性显微术样品”中描述的。通过其形态学特征诸如束状物或毛细胞特异性染料(例如,肌球蛋白VIIa、Prestin、vGlut3、Pou4f3、Espn、缀合的鬼笔环肽、PMCA2、Ribeye、Atoh1等),可以鉴别毛细胞。通过特异性染料或抗体(例如,Lgr5-GFP转基因报告基因、抗Lgr5抗体等),可以鉴别Lgr5⁺细胞。

[0120] 本文所用的“耳蜗浓度”将是通过对耳蜗液采样而测得的给定试剂的浓度。除非另外指出,否则所述样品应当含有基本上足够的耳蜗液部分,使得它近似代表耳蜗中试剂的平均浓度。例如,可以从前庭管抽出样品,并且依次抽取一系列的体液样品,使得各个样品包含耳蜗的特定部分的耳蜗液。

[0121] “互补核酸序列”是指能够与另一条由互补核苷酸碱基对构成的核酸序列杂交的核酸序列。

[0122] 本文结合特定细胞类型所用的“横截面细胞密度”是“代表性显微术样品”中穿过组织的单位横截面面积上该细胞类型的平均数量。柯蒂氏器官的横截面也可以用于确定给定平面中的细胞数。通常,将如下测量毛细胞横截面细胞密度:分析柯蒂氏器官的整个封片制备物,并在沿着上皮部分切取的横截面中在给定距离上对毛细胞的数量进行计数,如在代表性显微术样品中描述的。通常,将如下测量Lgr5⁺细胞的横截面细胞密度:分析柯蒂氏器官的整体封片制备物,并在沿着上皮部分切取的横截面中在给定距离上对Lgr5⁺细胞的数量进行计数,如在“代表性显微术样品”中描述的。通过其形态学特征诸如束状物或毛细胞特异性染料(合适的染料包括例如,肌球蛋白VIIa、Prestin、vGlut3、Pou4f3、缀合的鬼笔环肽、PMCA2、Atoh1等),可以鉴别毛细胞。通过特异性染料或抗体(合适的染料和抗体包括Lgr5mRNA的荧光原位杂交、Lgr5-GFP转基因报告基因系统、抗Lgr5抗体等)可以鉴别Lgr5⁺细胞。

[0123] “减少”是指例如与参照水平相比,减少至少5%,例如5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。

[0124] “减少”还意指例如与参照水平相比,减少至少1倍,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍或更多。

[0125] 本文所用的“分化期”是其中存在有效干性驱动剂浓度而没有有效分化抑制浓度的时间持续期。

[0126] “有效浓度”可以是对干性驱动剂而言的有效干性驱动剂浓度,或对扩散抑制剂而言的有效扩散抑制浓度。

[0127] “有效分化抑制浓度”是分化抑制剂的最低浓度,所述最低浓度不允许干细胞增殖测定结束时与干细胞增殖测定开始相比,毛细胞在细胞总数中的比例增加超过50%。在测

量有效分化抑制浓度时,细胞的毛细胞染料可以与流式细胞术一起使用,以定量非Atoh1-GFP小鼠的小鼠品系的毛细胞。备选地,也可以使用Atoh1-GFP小鼠品系。

[0128] 本文所用的“有效释放速率”(质量/时间)是有效浓度(质量/体积)*30uL/小时。

[0129] “有效干性驱动剂浓度”是干性驱动剂的最低浓度,与未使用干性驱动剂进行的且所有其它组分以相同浓度存在的干细胞增殖测定中的Lgr5+细胞的数量相比,所述最低浓度在干细胞增殖测定中诱导Lgr5+细胞的数量增加至少1.5倍。

[0130] “消除”意指降低到不可检测的水平。

[0131] “植入”或“移植物植入”是指通过与体内目标组织的现有细胞接触而将干细胞或祖细胞掺入该组织的过程。“上皮祖细胞”是指具有变成局限于产生上皮细胞的细胞谱系的潜力的多潜能细胞。

[0132] “上皮干细胞”是指具有变成定型为多个细胞谱系(包括产生上皮细胞的细胞谱系)的潜力的多潜能细胞。

[0133] “片段”是指多肽或核酸分子的一部分。该部分优选含有参照核酸分子或多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片段可以含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个核苷酸或氨基酸。

[0134] “GSK3抑制剂”是抑制GSK3、GSK-3 α 和/或GSK-3 β 的活性的组合物。

[0135] 可在本文中互换使用的“GSK3beta”、“GSK3 β ”和“GSK3B”是糖原合酶激酶3 β 的首字母简略词。

[0136] “GSK3 β 抑制剂”是抑制GSK3 β 的活性的组合物。

[0137] “杂交”是指在合适的严格条件下,互补的核苷酸碱基之间配对以形成双链分子(例如,在DNA中,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)形成碱基对,鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)形成碱基对)。(参见,例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0138] “抑制剂”是指分别造成靶基因或蛋白质的表达或活性减少的试剂。“拮抗剂”可以是抑制剂,但更具体地是与受体结合并继而减少或消除其它分子的结合的试剂。

[0139] 如本文所用,“抑制性核酸”是双链RNA、RNA干扰、miRNA、siRNA、shRNA或反义RNA或其部分或其模拟物,其当施用给哺乳动物细胞时导致靶基因的表达下降。通常,核酸抑制剂包含靶核酸分子的至少一部分或其直系同源物,或包含靶核酸分子的互补链的至少一部分。通常,使靶基因的表达减少10%、25%、50%、75%或甚至90-100%。

[0140] “体外Lgr5活性”是指体外细胞群体中的Lgr5的表达水平或活性。它可以如下例如在源自表达Lgr5-GFP的小鼠(诸如B6.129P2-Lgr5^{tm1}(cre/ERT2)C1e/J小鼠(也称作Lgr5-EGFP-IRES-creERT2或Lgr5-GFP小鼠,Jackson Lab公司,原种号:008875))的细胞中测量:将细胞解离为单细胞,用碘化丙啶(PI)染色,并使用流式细胞术针对Lgr5-GFP表达来分析细胞。经过相同培养和分析程序的野生型(非Lgr5-GFP)小鼠的内耳上皮细胞可以用作阴性对照。通常,将两个细胞群体显示在双变量图中(其中GFP/FITC作为一个变量),其包括GFP阳性群体和GFP阴性群体。通过门控GFP阳性细胞群体来鉴别Lgr5阳性细胞。通过相对于GFP阴性群体和阴性对照二者门控GFP阳性细胞群体,测量Lgr5阳性细胞的百分比。通过将细胞总数乘以Lgr5阳性细胞的百分比来计算Lgr5阳性细胞的数量。对于源自非Lgr5-GFP小鼠的

细胞,可以使用抗Lgr5抗体或对Lgr5基因的定量PCR来测量Lgr5活性。

[0141] 本文所用的“体内Lgr5活性”是受试者中的Lgr5的表达或活性水平。可以例如通过移出动物的内耳并测量Lgr5蛋白或Lgr5 mRNA来测量它。可以如下测量Lgr5蛋白产量:使用抗Lgr5抗体测量荧光强度(如通过对耳蜗样品成像所测定的),其中使用荧光强度作为Lgr5存在的量度。可以将蛋白质印迹与抗Lgr5抗体一起使用,其中可以从经处理的器官收获细胞以测定Lgr5蛋白的增加。可将定量PCR或RNA原位杂交用于测量Lgr5 mRNA产量的相对变化,其中可以从内耳收获细胞以测定Lgr5 mRNA的变化。备选地,可以使用Lgr5启动子驱动GFP报告基因转基因系统来测量Lgr5表达,其中可利用流式细胞术、成像直接检测GFP荧光的存在或强度,或使用抗GFP抗体间接检测。

[0142] “增加”还意指例如与参照标准的水平相比,增加至少1倍,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500、1000倍或更多。

[0143] “增加”是指例如与参照的水平相比,增加至少5%,例如,5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%或更多。

[0144] “耳内施用”是指通过直接注射组合物将所述组合物施用至受试者的中耳或内耳。

[0145] “耳蜗内”施用是指穿过鼓膜和穿过圆窗膜或卵圆窗膜将组合物直接注射进耳蜗。

[0146] “前庭内”施用是指穿过鼓膜和穿过圆窗膜或卵圆窗膜将组合物直接注射进前庭器官。

[0147] “分离的”是指与在其天然状态下存在的通常伴随它的组分不同程度地分离的物质。“分离”表示与原始来源或环境分离的程度。

[0148] “Lgr5”是含有富亮氨酸重复序列的G-蛋白偶联受体5的首字母简略词,也被称作G-蛋白偶联受体49(GPR49)或G-蛋白偶联受体67(GPR67)。它是在人类中由Lgr5基因编码的蛋白质。

[0149] “Lgr5活性”被定义为细胞群体中的Lgr5的活性水平。在体外细胞群体中,可以在体外Lgr5活性测定中测量Lgr5活性。在体内细胞群体中,可以在体内Lgr5活性测定中测量Lgr5活性。

[0150] 本文所用的“Lgr5⁺细胞”或“Lgr5阳性细胞”是表达Lgr5的细胞。本文所用的“Lgr5⁻细胞”是非Lgr5⁺的细胞。

[0151] 本文所用的“谱系示踪”是使用小鼠系,其使得能对在报告基因诱导时表达靶基因的任何细胞进行命运追踪。这可以包括毛细胞或支持细胞基因(Sox2、Lgr5、肌球蛋白VIIa、Pou4f3等)。例如,谱系示踪可以使用与报告基因小鼠杂交的Lgr5-EGFP-IRES-creERT2小鼠,其在诱导后允许人们跟踪在诱导时表达Lgr5的细胞的命运。再例如,可以将Lgr5细胞分离成单细胞并在干细胞增殖测定中培养以产生集落,然后在分化测定中使其分化,并如下分析细胞命运:对毛细胞和/或支持细胞蛋白质染色,并确定报告基因与毛细胞或支持细胞染色的共定位以确定Lgr5细胞的命运。另外,可以在耳蜗外植体中进行谱系示踪以跟踪治疗时在完整器官内的支持细胞或毛细胞命运。例如,通过从与报告小鼠杂交的Lgr5-EGFP-IREScreERT2小鼠分离出耳蜗并在治疗之前或治疗期间诱导在Lgr5细胞中的报告基因,可以确定Lgr5细胞命运。然后可以如下分析所述器官的细胞命运:将毛细胞和/或支持细胞蛋白质染色,并确定所述报告基因与毛细胞或支持细胞染色的共定位以确定Lgr5细胞的命

运。此外,可以在体内进行谱系示踪以跟踪治疗后在完整器官内的支持细胞或毛细胞命运。例如,通过与报告小鼠杂交的Lgr5-EGFP-IRES-creERT2小鼠中诱导报告基因,处理所述动物,然后分离出耳蜗,可以确定Lgr5细胞命运。然后可以如下分析所述器官的细胞命运:将毛细胞和/或支持细胞蛋白质染色,并确定所述报告基因与毛细胞或支持细胞染色的共定位以确定Lgr5细胞的命运。可以使用本领域中的标准的备选目标报告基因进行谱系示踪。

[0152] “哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、绵羊、猴、山羊、兔、仓鼠、马、奶牛或猪。

[0153] 本文所用的“平均释放时间”是在释放测定中一半试剂从载体释放到磷酸盐缓冲盐水中的时间。

[0154] 本文所用的“天然形态”意指该组织构造在很大程度上反映了健康组织中的构造。

[0155] 本文所用的“非人哺乳动物”是指非人类的任何哺乳动物。

[0156] 如在本文的有关上下文中使用的,术语细胞的“数量”可以是0、1或更多个细胞。

[0157] 本文所用的“柯蒂氏器官”是指位于耳蜗中的听觉器官的感觉细胞(内毛细胞和外毛细胞)。

[0158] “类器官”或“上皮类器官”是指与器官或器官的一部分类似并且具有与该特定器官相关的细胞类型的细胞簇或聚集体。

[0159] 细胞的“群体”是指大于1的任何细胞数量,但优选至少 1×10^3 个细胞、至少 1×10^4 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 1×10^7 个细胞、至少 1×10^8 个细胞、至少 1×10^9 个细胞或至少 1×10^{10} 个细胞。

[0160] 本文所用的“祖细胞”是指这样的细胞:其像干细胞一样,具有分化成特定细胞类型的趋势,但是已经比干细胞更特化,并被驱使分化成其“靶”细胞。

[0161] “参照”意指标准或对照条件(例如,未用测试试剂或测试试剂的组合处理)。

[0162] 本文所用的“释放测定”是这样测试:其中测量试剂从生物相容性基质透过透析膜释放到盐水环境中的速率。示例性的释放测定可如下进行:将30微升组合物放入具有适当截留值的盐水透析袋内的1ml磷酸盐缓冲盐水中,并将该透析袋置于37°C的10ml磷酸盐缓冲盐水内。可以基于试剂大小来选择透析膜大小以允许待评估的试剂离开所述膜。对于小分子释放,可以使用3.5-5kDa的截留值。组合物的释放速率可以随时间推移而变化,并且可以以1小时增量进行测量。

[0163] 本文所用的“代表性显微术样品”描述了在细胞培养系统、提取的组织的一部分、或整个提取的器官内的足够数目的视野,其使被测量的平均特征大小或数目可以合理地被认为代表测量全部相关视野时的平均特征大小或数目。例如,为了评估柯蒂氏器官上在某个频率范围的毛细胞计数,可以使用ImageJ软件(NIH)来测量耳蜗整体封片样品的总长度和各个计数区段的长度。内毛细胞、外毛细胞和支持细胞的总数可以在1200-1400 μ m的四个耳蜗区段(顶段、中顶段、中底段和底段)中任意一个的全部或部分中计数,100 μ m视野大小的至少3个视野将被合理地视为代表性显微术样品。代表性显微术样品可以包括在视野内的测量值,其可以测量为每给定距离的细胞数。代表性显微术样品可以用于评估形态学,诸如细胞-细胞接触、耳蜗体系结构和细胞组分(例如,束、突触)。

[0164] “玫瑰样图案”是耳蜗中的特征性细胞排列,其中<5%的毛细胞与其它毛细胞相

邻。

[0165] 术语“样品”是指获得的、提供的和/或经受分析的体积或质量。在某些实施方案中,样品是或包含组织样品、细胞样品、流体样品等。在某些实施方案中,样品取自(或是)受试者(例如,人或动物受试者)。在某些实施方案中,组织样品是或包含脑、毛发(包括毛发根)、口腔拭子、血液、唾液、精液、肌肉,或来自任何内脏器官,或者与这些中的任一种相关联的癌细胞、癌前细胞或肿瘤细胞。流体可以是但不限于尿、血液、腹水、胸膜液、脊髓液等。身体组织可以包括但不限于脑、皮肤、肌肉、子宫内膜、子宫和宫颈组织,或与这些中的任何一种相关的癌细胞、癌前细胞或肿瘤细胞。在一个实施方案中,身体组织是脑组织或脑肿瘤或癌症。本领域普通技术人员会理解,在某些实施方案中,“样品”是“初级样品”,因为其从来源(例如,受试者)获得;在某些实施方案中,“样品”是处理初级样品的结果,例如以移除某些潜在污染性组分和/或分离或纯化某些目标组分。

[0166] “自我更新”是指干细胞分裂以产生一个(不对称分裂)或两个(对称分裂)子代细胞的过程,所述子代细胞具有与亲代细胞无差别的发育潜能。自我更新涉及增殖和未分化状态维持二者。

[0167] “siRNA”是指双链RNA。最佳地,siRNA是18、19、20、21、22、23或24个核苷酸的长度,并且在其3'端具有2个碱基的悬突。可以将这些dsRNA引入单个细胞或培养系统中。这样的siRNA用于下调mRNA水平或启动子活性。

[0168] “干细胞”是指具有自我更新并分化成多个细胞谱系的能力的多潜能细胞。

[0169] 本文所用的“干细胞分化测定”是确定干细胞的分化能力的测定。在示例性的干细胞分化测定中,通过分离柯蒂氏器官感觉上皮、将上皮解离成单细胞并使所述细胞穿过40um细胞过滤网,从3日龄至7日龄的Atoh1-GFP小鼠获取初始细胞群体的细胞数目。将大约5000个细胞包在40μl培养基质(例如:Matrigel(Corning公司,生长因子减少型))中,并置于24孔板的具有500μl适当培养基、生长因子和待测试剂的孔的中心。适当的培养基和生长因子包括Advanced DMEM/F12,其含有培养基补充剂(1×N2、1×B27、2mM Glutamax、10mM HEPES、1mM N-乙酰半胱氨酸和100U/ml青霉素/100μg/ml链霉素)和生长因子(50ng/ml EGF、50ng/ml bFGF和50ng/ml IGF-1),以及将待测试剂添加至每孔中。将细胞在37°C和5% CO₂的标准细胞培养箱中培养10天,每2天更换培养基。然后通过除去干细胞增殖测定试剂并用基础培养基和驱动分化的分子替换,来培养这些细胞。适当的基础培养基是Advanced DMEM/F12,其补充有1×N2、1×B27、2mM Glutamax、10mM HEPES、1mM N-乙酰半胱氨酸和100U/ml青霉素/100μg/ml链霉素,适当的驱动分化的分子是3μM CHIR99021和5μM DAPT,持续10天,每2天更换培养基。可通过使用针对GFP的流式细胞术来测量群体中的毛细胞数目。可使用qPCR来测量毛细胞标志物(例如Myo7a)表达水平(用合适的且未经调节的参照或持家基因(如Hprt)归一化)来进一步评估毛细胞分化水平。还可通过针对毛细胞标志物(例如肌球蛋白7a、vGlut3、Espn、PMCA、Ribeye、缀合的鬼笔环肽、Atoh1、Pou4f3等)的免疫染色来评估毛细胞分化水平。还可通过针对肌球蛋白7a、vGlut3、Espn、PMCA、Prestin、Ribeye、Atoh1、Pou4f3的蛋白质印迹来评估毛细胞分化水平。

[0170] 本文所用的“干细胞测定”是其中对细胞或细胞群体测试一系列标准,以确定该细胞或细胞群体是否是干细胞或富含干细胞或干细胞标志物的测定。在干细胞测定中,测试细胞/细胞群体的干细胞特征诸如干细胞标志物的表达,并进一步任选测试干细胞功能,包

括自我更新和分化的能力。

[0171] 本文所用的“干细胞增殖剂”是诱导具有自我更新和分化能力的细胞群体的增加的化合物。

[0172] 本文所用的“干细胞增殖测定”是确定试剂诱导从起始细胞群体产生干细胞的能力的测定。在示例性的干细胞增殖测定中,通过分离柯蒂氏器官感觉上皮并将所述上皮解离成单细胞,从3日龄至7日龄的Lgr5-GFP小鼠诸如B6.129P2-Lgr5^{tm1}(cre/ERT2)C1e/J小鼠(也称为Lgr5-EGFP-IRES-creERT2或Lgr5-GFP小鼠, Jackson Lab公司,原种号:008875)获得初始细胞群体的细胞数目。将大约5000个细胞包在40 μ l培养基质(例如:Matrigel (Corning公司,生长因子减少型))中,并置于24孔板的具有500 μ l适当培养基、生长因子和待测试剂的孔的中心。适当的培养基和生长因子包括Advanced DMEM/F12,其含有培养基补充剂(1 \times N2、1 \times B27、2mM Glutamax、10mM HEPES、1mM N-乙酰半胱氨酸和100U/ml青霉素/100 μ g/ml链霉素)和生长因子(50ng/ml EGF、50ng/ml bFGF和50ng/ml IGF-1),以及将待测试剂添加至每孔中。将细胞在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的标准细胞培养箱中培养10天,每2天更换培养基。通过对在体外Lgr5活性测定中被鉴别为Lgr5⁺的细胞的数量进行计数来定量Lgr5⁺细胞的数量。通过将细胞群体中被鉴别为Lgr5⁺的细胞的数量除以所述细胞群体中存在的细胞总数量来定量Lgr5⁺细胞的比例。通过测量群体的Lgr5的平均mRNA表达水平(使用合适的且未经调节的参照或持家基因(例如Hprt)归一化)来定量该群体的平均Lgr5⁺活性。可通过用毛细胞标志物(例如肌球蛋白VIIa)染色,或使用毛细胞基因的内源报告基因(例如Pou4f3-GFP、Atoh1-nGFP)并使用流式细胞术进行分析,来测量群体中的毛细胞的数量。通过将细胞群体中被鉴别为毛细胞的细胞的数量除以所述细胞群体中存在的细胞总数量来定量毛细胞的细胞比例。可通过qPCR测量Lgr5活性。

[0173] 本文所用的“干细胞标志物”可以定义为在干细胞中特异性表达的基因产物(例如蛋白质、RNA等)。一种类型的干细胞标志物是直接且特异性地支持干细胞身份的维持的基因产物。实例包括Lgr5和Sox2。可以使用文献中描述的测定来鉴别另外的干细胞标志物。为了确定基因是否是维持干细胞身份所需的,可以使用功能获得和功能丧失研究。在功能获得研究中,特定基因产物(干细胞标志物)的过表达将有助于维持干细胞身份。而在功能丧失研究中,干细胞标志物的除去将造成干细胞身份的丧失或诱导干细胞的分化。另一种类型的干细胞标志物是仅在干细胞中表达但不一定具有维持干细胞身份的特定功能的基因。可通过以下方式来鉴定这种类型的标志物:通过诸如微阵列和qPCR之类的测定,将分选的干细胞与非干细胞的基因表达特征进行比较。这类干细胞标志物可以在文献中找到。(例如Liu Q.等人,Int J Biochem Cell Biol.2015年3月;60:99-111。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25582750>)。潜在的干细胞标志物包括Ccnc121、Gdf10、Opcml、Phex等。可使用诸如qPCR、免疫组织化学、蛋白质印迹和RNA杂交之类的测定,来测量给定细胞或细胞群体中的干细胞标志物诸如Lgr5或Sox2的表达。还可使用可指示给定干细胞标志物的表达的转基因细胞表达报告基因(例如Lgr5-GFP或Sox2-GFP),来测量干细胞标志物的表达。然后可以使用流式细胞术分析来测量报告基因表达的活性。还可以使用荧光显微术直接使报告基因的表达可视化。可使用用于全基因表达谱分析的微阵列分析来进一步确定干细胞标志物的表达。可以将给定的细胞群体或纯化的细胞群体的基因表达谱与干细胞的基因表达谱进行对比来确定两个细胞群体之间的相似性。可通过集落形成测定或球

体形成测定、自我更新测定和分化测定来测量干细胞功能。在集落(或球体)形成测定中,当在适当的培养基中培养时,所述干细胞应当能够在细胞培养表面(例如细胞培养皿)上形成集落或嵌入细胞培养基质(例如Matrigel)中,或能够在悬浮培养时形成球体。在集落/球体形成测定中,将单个干细胞以低细胞密度接种在适当的培养基中,并允许其增殖给定的时间段(7-10天)。然后对形成的集落进行计数,并且针对作为原始细胞的干性的指标的干细胞标志物表达进行评分。任选地,随后挑选所形成的集落并传代以测试其自我更新和分化潜力。在自我更新测定中,当在适当的培养基中培养时,所述细胞应当在至少一次(例如1、2、3、4、5、10、20次等)细胞分裂期间维持干细胞标志物(例如Lgr5)表达。在干细胞分化测定中,当在适当的分化培养基中培养时,细胞应能够生成毛细胞,所述毛细胞可由通过qPCR、免疫染色、蛋白质印迹、RNA杂交或流式细胞术测量的毛细胞标志物表达来鉴别。

[0174] 本文所用的“干性驱动剂”是在保持自我更新的潜力和分化成毛细胞的潜力的同时诱导LGR5⁺细胞的增殖、上调细胞中的Lgr5、或维持细胞中的Lgr5表达的组合物。通常,干性驱动剂上调出生后干细胞的至少一种生物标志物。干性驱动剂包括但不限于Wnt激动剂和GSK3 β 抑制剂。

[0175] “受试者”包括人类和哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、猪、猫、狗和马)。在许多实施方案中,受试者是哺乳动物,特别是灵长类动物,尤其是人类。在一些实施方案中,受试者是家畜诸如牛、绵羊、山羊、奶牛、猪等;家禽诸如鸡、鸭、鹅、火鸡等;和驯化的动物,特别是宠物诸如狗和猫。在一些实施方案中(例如,特别是在研究情境下),受试哺乳动物将是例如啮齿类动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠)、兔、灵长类动物或猪诸如近交猪等。

[0176] 如本文中与耳蜗上皮关联使用的“支持细胞”包含在柯蒂氏器官内的非毛细胞的上皮细胞。这包括内柱细胞、外柱细胞、内指细胞、代特氏细胞、亨森细胞、伯特舍细胞和/或克劳迪乌斯细胞。

[0177] “协同作用”或“协同效应”是大于分别产生的每项效果的总和的效果,即大于累加效果。

[0178] 本文所用的“TGF- β 抑制剂”是减少TGF β 的活性的组合物。

[0179] “组织”是来自相同来源的类似细胞的集合体,所述细胞一起执行特定功能,包括例如耳蜗组织,诸如柯蒂氏器官。

[0180] “经鼓膜”施用是指穿过鼓膜将组合物直接注射进中耳。

[0181] 本文中与细胞群体关联使用的“处理”意指向该群体递送物质以产生结果。就体外群体而言,可以将物质直接(或甚至间接)递送给该群体。就体内群体而言,可以通过施用将物质递送给宿主受试者。

[0182] 本文所用的“Wnt活化”是Wnt信号传导途径的活化。

[0183] 本文所用的术语“烷基”是指直链或支链饱和烃。例如,烷基可以具有1至8个碳原子(即(C₁-C₈)烷基)或1至6个碳原子(即(C₁-C₆)烷基)或1至4个碳原子。

[0184] 本文所用的术语“烯基”是指具有2至约15个碳原子的直链或支链烃基,其包括一个或多个双键并且可包括二价基团。烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基、丁烯基及更高级的同系物和异构体。

[0185] 如本文中所示,术语“炔基”是指具有自2至约15个碳原子的直链或支链烃基,其包括一或多个三键并且可以包括二价基。炔基的实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丁炔基及

更高级的同系物和异构体。

[0186] 本文所用的术语“卤基”或“卤素”是指氟基、氯基、溴基和碘基。

[0187] 本文所用的术语“芳基”是指单个全碳芳环或多个稠合全碳环系,其中至少一个环是芳族的。例如,芳基可以具有6至20个碳原子、6至14个碳原子、或6至12个碳原子。芳基包括苯基。芳基还包括具有约9至20个碳原子的多个稠合环系(例如,包含2、3或4个环的环系),其中至少一个环是芳族的并且其中其它环可以是芳族的或非芳族的(即,碳环)。这种多个稠合环系可任选在所述多个稠合环系的任何碳环部分上被一个或多个(例如1、2或3个)氧代基取代。当价键要求允许时,所述多个稠合环系的环可以经由稠合、螺环和桥接键彼此连接。应当理解,如上面所定义的多稠合环系的连接点可位于环系的任何位置,包括所述环的芳族或碳环部分。

[0188] 本文所用的术语“杂芳基”是指在环中具有至少一个非碳的原子的单个芳环,其中该原子选自氧、氮和硫;该术语还包括具有至少一个这种芳环的多稠合环系,下面将进一步描述该多稠合环系。因此,该术语包括环中具有约1至6个碳原子以及约1至4个选自氧、氮和硫的杂原子的单一芳环。硫原子和氮原子也可以以氧化形式存在,前提条件是环为芳族的。该术语还包括多稠合环系(例如,包含2、3或4个环的环系),其中如上所定义的杂芳基可以与一个或多个选自以下的环稠合以形成所述多稠合环系:杂芳基(以形成例如萘啶基,诸如1,8-萘啶基)、杂环(以形成例如1,2,3,4-四氢萘啶基,诸如1,2,3,4-四氢-1,8-萘啶基)、碳环(以形成例如5,6,7,8-四氢喹啉基)和芳基(以形成例如吡啶基)。因而,杂芳基(单芳环或多稠合环系)在杂芳环内具有约1-20个碳原子和约1-6个杂原子。这种多稠合环系可任选在该稠合的碳环或杂环部分上被一或多个(如1、2、3或4个)氧代基取代。当价键要求允许时,所述多个稠合环系的环可以经由稠合、螺环和桥接键彼此连接。应当理解,该多稠合环系的各环可以相对于彼此以任何顺序连接。还应理解,多稠合环系(如上文对杂芳基所定义的)的连接点可位于该多稠合环系的任何位置(包括该多稠合环系的杂芳基、杂环、芳基或碳环部分),以及位于该多稠合环系的任何合适的原子(包括碳原子和杂原子(例如氮))上。

[0189] 本文所用的术语“环烷基”是指具有约3至约8个环成员的饱和或部分饱和的环结构,其仅具有碳原子作为环原子并且可包括二价基团。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯、环戊烯基、环己烯基。

[0190] 术语“杂环基”或“杂环的”是指含有碳和选自氧、磷、氮或硫的杂原子的单环或多环的3至24元环,并且其中不存在环碳或杂原子之间共享的离域 π 电子(芳香性)。杂环基的实例包括但不限于氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、四氢咪唑基、吡咯烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、吡喃基、噻喃基、四氢吡喃基、二氧戊环基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉基S-氧化物、硫代吗啉基S-二氧化物、哌嗪基、氮杂萘基、氧杂萘基、二氮杂萘基、托烷(tropanyl)和高托烷基(homotropanyl)。杂环基的实例还包括但不限于稠环、桥环(例如,2,5-二氮杂双环[2,2,1]庚烷)和螺环(例如,2,8-二氮杂螺[4,5]癸烷)。

[0191] 在本申请中,除非另外说明,否则“或”的使用包括“和/或”。如在本申请中使用的,术语“包含”和该术语的变形(诸如“包括”和“含有”)不意图排除其它添加剂、组分、整数或步骤。如在本申请中使用的,术语“约”和“大约”等同地使用。在本申请中使用的任何数字,不论有没有约/大约,都意在覆盖相关领域的普通技术人员所理解的任何正常波动。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在所述参考值的任一个方向(大于或更小)落在25%、

20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少之内的值的范围,除非另有说明或另外从上下文中显而易见(这种数字会超过可能值的100%的情况除外)。

[0192] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而无过度的毒性、刺激、变应性应答或者其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0193] 本文所用的“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于美国食品和药品管理局批准可用于人或家畜的任何佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性的药学上可接受的载体包括但不限于:糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素,以及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动植物油脂、石蜡、有机硅、膨润土、硅酸、氧化锌;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲液;以及药物制剂中使用的任何其它相容物质。

[0194] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐二者。

[0195] “药学上可接受的酸加成盐”是指保留游离碱的生物学有效性和特性(其不是在生物学上或其它方面不希望的)的那些盐,并且其用无机酸和有机酸形成,所述无机酸是诸如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,所述有机酸是例如但不限于乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡萄糖庚糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、羟乙酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、甲苯磺酸、三氟乙酸、十一烯酸等。

[0196] “药学上可接受的碱加成盐”是指保留游离酸的生物学有效性和特性(其不是在生物学上或其它方面不希望的)的那些盐。通过向游离酸添加无机碱或有机碱来制备这些盐。源自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。例如,无机盐包括但不限于铵盐、钠盐、钾盐、钙盐和镁盐。源自有机碱的盐包括但不限于:伯胺、仲胺和叔胺的盐、取代的胺(包括天然存在的取代的胺)、环胺和碱性离子交换树脂,诸如氨、异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、哈胺(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、苄乙苄胺、苄星青霉素、乙二胺、葡糖胺、甲葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。在某些实施方案中使用的实例有机碱包括异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0197] 润湿剂、乳化剂和润滑剂(诸如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于所述组合物中。

[0198] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂，诸如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂，诸如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等；和(3) 金属螯合剂，诸如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等等。

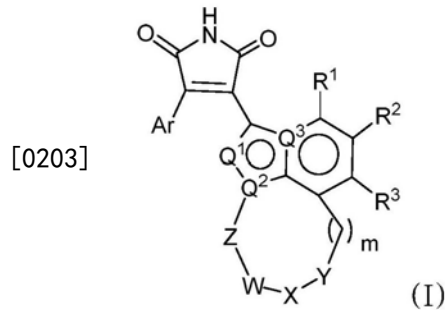
[0199] 本文所述的化合物或组合物可以以适合于所需递送途径(例如，经鼓膜注射、经鼓膜管芯针和导管，以及可注射的贮库)的任何方式配制。通常，制剂包括所有生理学上可接受的组合物，其包含其衍生物或前药、溶剂化物、立体异构体、外消旋体或互变异构体以及任何生理学上可接受的载体，稀释剂和/或赋形剂的。

具体实施方式

[0200] 对本发明的示例性实施方案的描述如下。

[0201] 化合物

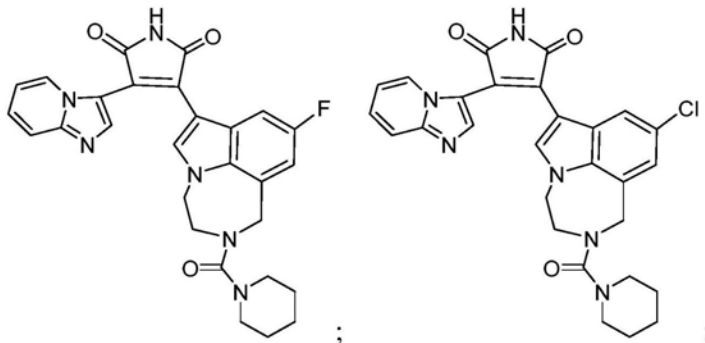
[0202] 本公开提供了式(I)化合物，



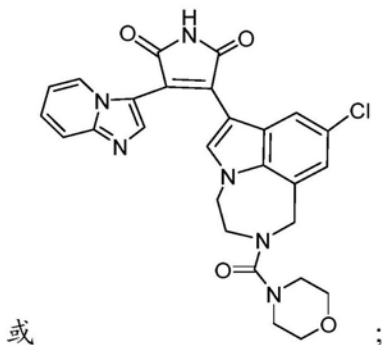
[0204] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体，其中 Q^1 、 Q^2 、 Q^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、Ar、-Z-W-X-Y-和m是如上文针对式(I)所限定的。

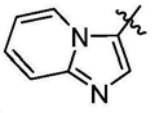
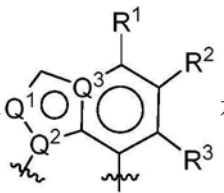
[0205] 在一些实施方案中，式(I)化合物具有以下特征中的一者或多者：

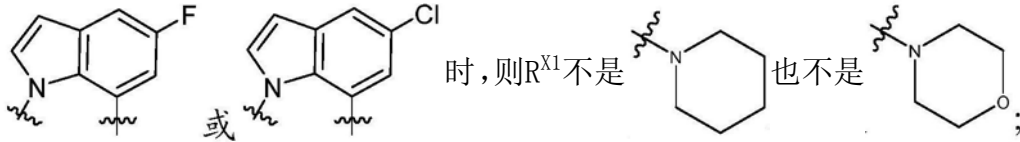
[0206] a) 前提条件是所述化合物不是



[0207]

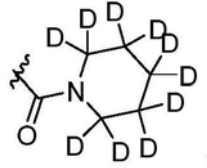


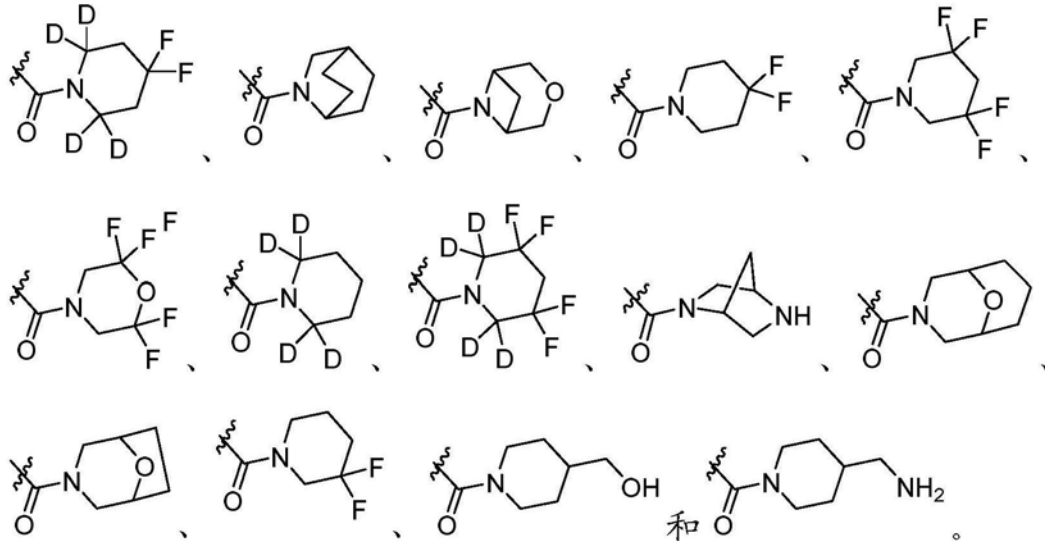
[0208] b) 前提条件是当Ar是  , 并且  是



[0209] 在某些实施方案中, 本公开提供了未在WO 2003/076442 (PCT/US03/05050) 中公开的式(I)化合物, 以引用的方式将该专利并入本文。

[0210] 在式(I)的某些实施方案中, R^X是-COR^{X1}或-SO₂R^{X1}。

[0211] 在式(I)的某些实施方案中, R^X选自  ,



[0212] 在某些实施方案中, R^{X1}是任选用1至12个卤基取代基取代的杂环基。在某些实施方案中, R^{X1}是氘代的杂环基。在某些实施方案中, 所述杂环基是单环的或双环的。在一些实施方案中, 所述杂环基是稠环、桥环或螺环。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一至三个氮(即1、2或3个氮)和/或一至三个氧(即1、2或3个氧)。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮和/或一个氧。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮。在某些实施方案中, 所述杂环基含有两个氮。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮和/或一个氧。

[0213] 在一些实施方案中, R^{X1}是哌啶、2,8-二氮杂螺[4,5]癸烷、2,5-二氮杂双环[2,2,1]庚烷或8-氧杂-3-氮杂双环[3.2.1]辛烷, 它们每一者任选用1至12个独立选自以下的取代基取代: 氘、卤基、C₁-C₄烷基、-[C(R^{X1a})₂]_p-OH、-(CH₂)_p-NMe₂、-(CH₂)_p-NHMe、-(CH₂)_p-NH₂; 其中p是0、1、2或3。在一些实施方案中, R^{X1}是哌啶, 任选用1至6个卤基取代基取代。在一些实施方案中, R^{X1}是任选用-[C(R^{X1a})₂]_p-OH、-(CH₂)_p-NMe₂取代的哌啶。

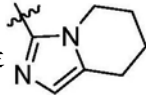
[0214] 在式(I)的某些实施方案中, 所述杂环基任选用C₁-C₄烷基、-(CH₂)_p-OH或-(CH₂)_p-

NH₂取代;其中p是1、2或3。在某些实施方案中,R^{X1}是C₁-C₄烷基取代的杂环基。在某些实施方案中,R^{X1}是-(CH₂)_p-OH取代的杂环基;其中p是1、2或3。在某些实施方案中,R^{X1}是-CH₂-OH取代的杂环基。在某些实施方案中,R^{X1}是-(CH₂)_p-NH₂取代的杂环基;其中p是1、2或3。在某些实施方案中,R^{X1}是-CH₂-NH₂取代的杂环基。

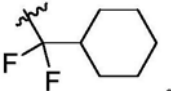
[0215] 在式(I)的某些实施方案中,R^{X1}是杂环基,其中所述杂环基任选用-[C(R^{X1a})₂]_p-CN取代。在某些实施方案中,R^{X1}是用-[C(R^{X1a})₂]_p-OH、-[C(R^{X1a})₂]_p-O-C₁-C₄烷基、-NHCOC₁-C₄烷基、-CONHC₁-C₄烷基、COH、-CO₂H、-[C(R^{X1a})₂]_p-COO-C₁-C₄烷基、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH₂、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH-C₁-C₄烷基或-[C(R^{X1a})₂]_p-N-(C₁-C₄烷基)₂取代的杂环基。在某些实施方案中,R^{X1}是杂环基,其中所述杂环基任选用-CONHC₁-C₄烷基、-COH、-CO₂H或-[C(R^{X1a})₂]_p-COO-C₁-C₄烷基取代。

[0216] 在式(I)的某些实施方案中,每个R^{X1a}独立地选自氢和卤基。在某些实施方案中,两个R^{X1a}基团一起形成C₃-C₆环烷基,诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

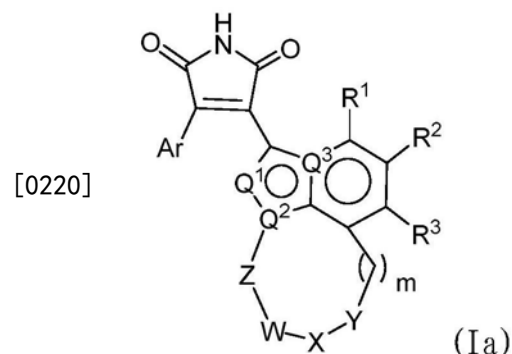
[0217] 在式(I)的某些实施方案中,R^X是杂芳基。在某些实施方案中,所述杂芳基是单环的或双环的。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一至三个氮(即1、2或3个氮)和/或一至三个氧(即1、2或3个氧)。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个氮和/或一个氧。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个氮。在某些实施方案中,所述杂芳基含有两个氮。在某些实

施方案中,所述杂芳基含有一个氮和一个氧。在某些实施方案中,R^X是 。

[0218] 在式(I)的某些实施方案中,R^X是-(C₁-C₄亚烷基)-(C₃-C₈环烷基)。在某些实施方案中,所述-(C₁-C₄亚烷基)-(C₃-C₈环烷基)在所述C₁-C₄亚烷基上用一个到两个卤基取代。在某些实施方案中,所述C₃-C₈环烷基是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在某些实施方案中,R^X是-(C₁-C₄亚烷基)-(C₃-C₈环烷基),其中所述-(C₁-C₄亚烷基)-(C₃-C₈环烷基)任选在所述C₁-C₄亚烷基上用一个或两个卤基取代,并且其中C₃-C₈环烷基是环丙基、环丁基、环戊基或环己

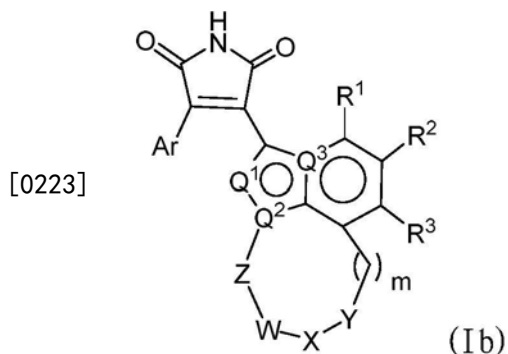
基。在某些实施方案中,R^X是 。

[0219] 本公开提供具有式(Ia)的化合物,



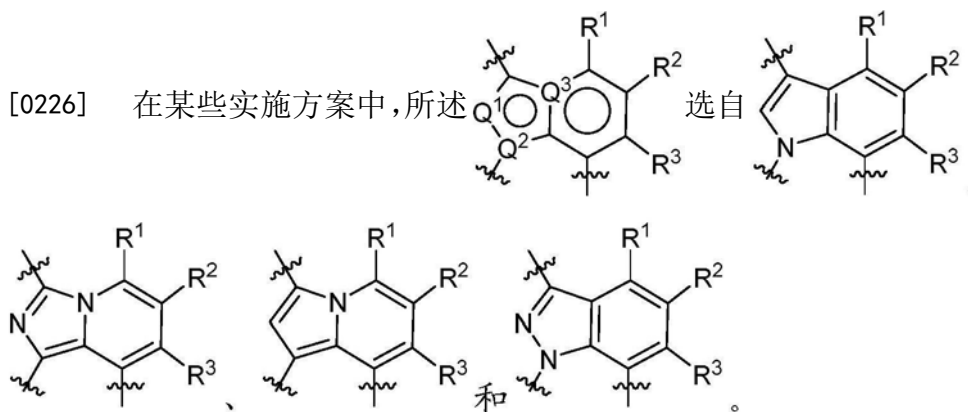
[0221] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体,其中Q¹、Q²、Q³、R¹、R²、R³、Ar、-Z-W-X-Y-和m是如上文针对式(Ia)所限定的。

[0222] 本公开提供具有式(Ib)的化合物,



[0224] 以及其药学上可接受的盐和互变异构体,其中 Q^1 、 Q^2 、 Q^3 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、Ar、-Z-W-X-Y-和m是如上文针对式(Ib)所限定的。

[0225] 在某些实施方案中, Q^1 是CH; Q^2 是N;并且 Q^3 是C。在某些实施方案中, Q^1 是N; Q^2 是C;并且 Q^3 是N。在某些实施方案中, Q^1 是CH; Q^2 是C;并且 Q^3 是N。在某些实施方案中, Q^1 是N; Q^2 是N;并且 Q^3 是C。



[0227] 在某些实施方案中, R^1 是氢或卤基。在某些实施方案中, R^1 是 C_1 - C_4 烷基,其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代。在某些实施方案中, R^1 是 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH或-S(O)₂NH₂。在某些实施方案中, R^1 是-NH₂或-NHC(O) R^{1a} ,其中 R^{1a} 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^1 是 C_1 - C_4 烯基。在某些实施方案中, R^1 是-O- C_1 - C_4 烷基。

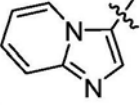
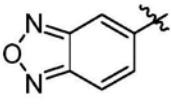
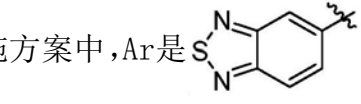
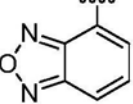
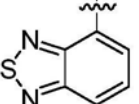
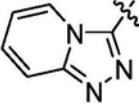
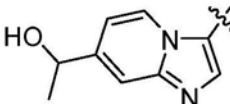
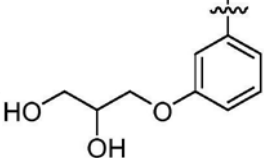
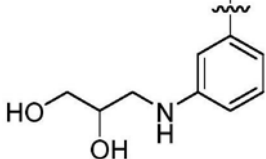
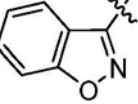
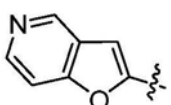
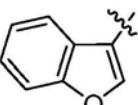
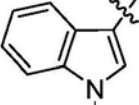
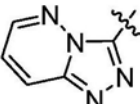
[0228] 在某些实施方案中, R^2 是氢或卤基。在某些实施方案中, R^2 是 C_1 - C_4 烷基,其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代。在某些实施方案中, R^2 是 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH或-S(O)₂NH₂。在某些实施方案中, R^2 是-NH₂或-NHC(O) R^{2a} ,其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^2 是-S(O)₂NH₂。

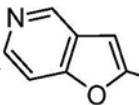
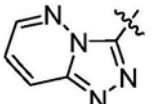
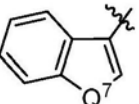
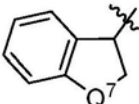
[0229] 在某些实施方案中, R^2 是 C_1 - C_4 烯基。在某些实施方案中, R^2 是-O- C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^2 是-NH₂、-NH(C_1 - C_4 烷基)或-N(C_1 - C_4 烷基)₂。

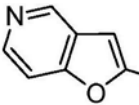
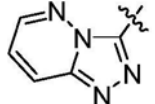
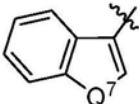
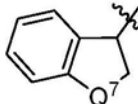
[0230] 在某些实施方案中, R^2 选自卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烯基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-O- C_1 - C_4 烷基、-NH₂、-NH(C_1 - C_4 烷基)、-N(C_1 - C_4 烷基)₂、-NHC(O) R^{2a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^2 选自卤基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH、-NH₂、-NHC(O) R^{2a} 和-S(O)₂NH₂;其中所述烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代;并且其中 R^{2a} 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^2 不是氢。

[0231] 在某些实施方案中, R^3 是氢或卤基。在某些实施方案中, R^3 是 C_1 - C_4 烷基,其中所述

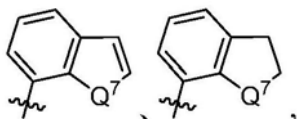
烷基任选用1至3个独立选自卤基和-OH的取代基取代。在某些实施方案中, R^3 是 C_1 - C_4 炔基、-CN、-OH或-S(O)₂NH₂。在某些实施方案中, R^3 是-NH₂或-NHC(O)R^{3a}, 其中R^{3a}是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, R^3 是 C_1 - C_4 烯基。在某些实施方案中, R^3 是-O- C_1 - C_4 烷基。

[0232] 在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。在某些实施方案中, Ar是 。

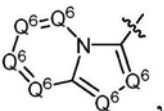
[0233] 在式(Ia)的某些实施方案中, Ar是 。在式(Ia)的某些实施方案中, Ar是 。在式(Ia)的某些实施方案中, Ar是  或 , 其中Q⁷选自S、O、CH₂和NR^{Q7}; 其中R^{Q7}是氢或任选取代的 C_1 - C_4 烷基。

[0234] 在式(Ib)的某些实施方案中, Ar是 。在式(Ib)的某些实施方案中, Ar是 。在式(Ib)的某些实施方案中, Ar是  或 , 其中Q⁷选自S、O、

CH₂和NR^{Q7}；其中R^{Q7}是氢或任选取代的C₁-C₄烷基。在式 (Ib) 的某些实施方案中，Ar是



其中Q⁷选自S、O、CH₂和NR^{Q7}；其中R^{Q7}是氢或任选取代的C₁-C₄烷基。在式

(Ib) 的某些实施方案中，Ar是  其中每个Q⁶独立地选自CR^{Q6}和N；其中R^{Q6}是氢、卤

基、-CN、低级烷基或取代的烷基。

[0235] 在某些实施方案中，-Z-W-X-Y-是-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-N(R^X)-C(R^Y)₂-。在某些实施方案中，-Z-W-X-Y-是-C(R^Z)₂-C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-。在某些实施方案中，-Z-W-X-Y-是C(R^W)₂-CH(R^X)-C(R^Y)₂-。

[0236] 在某些实施方案中，每个R^Z独立地选自氢和卤基。在某些实施方案中，两个R^Z基团一起形成C₃-C₆环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在某些实施方案中，两个R^Z基团一起形成氧代基。在某些实施方案中，R^Z和R^W与它们连接的碳合在一起形成C₃-C₆环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

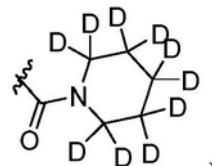
[0237] 在某些实施方案中，每个R^W独立地选自氢和卤基。在某些实施方案中，两个R^W基团一起形成C₃-C₆环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在某些实施方案中，两个R^W基团一起形成氧代基。在某些实施方案中，R^Z和R^W与它们连接的碳合在一起形成C₃-C₆环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

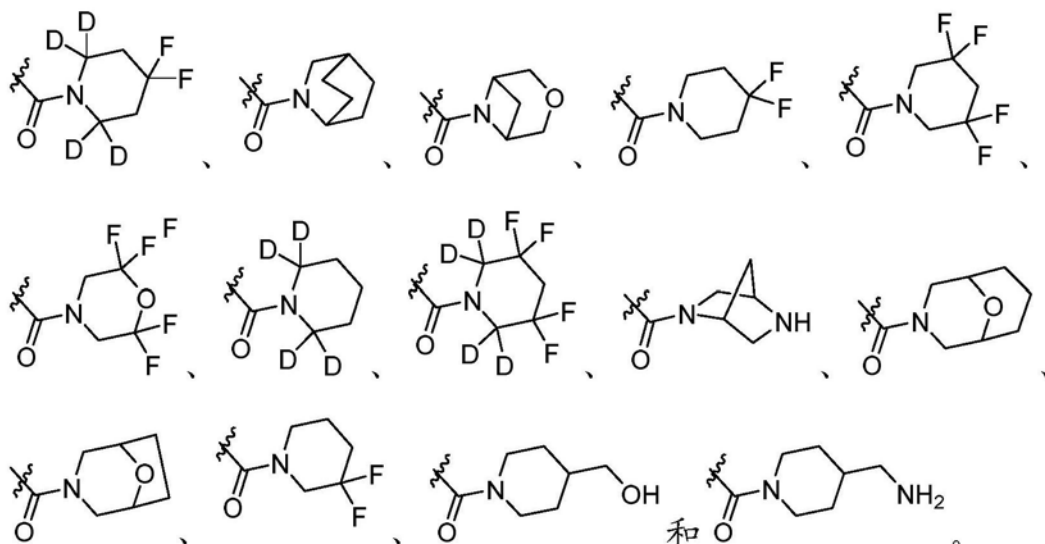
[0238] 在某些实施方案中，每个R^Y独立地选自氢和卤基。在某些实施方案中，两个R^Y基团一起形成C₃-C₆环烷基，诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在某些实施方案中，两个R^Y基团一起形成氧代基。

[0239] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中，R^X是H。在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中，R^X是R^{X1}，其为C₃-C₈环烷基、杂芳基或杂环基，其中所述杂环基任选用1至12个独立选自以下的取代基取代：氘、卤基、C₁-C₄烷基、-(CH₂)_p-OH、-[C(R^{X1a})₂]_p-OH、-[C(R^{X1a})₂]_p-O-C₁-C₄烷基、-NHCOC₁-C₄烷基、-CONHC₁-C₄烷基、-(CH₂)_p-NH₂、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH₂、-[C(R^{X1a})₂]_p-NH-C₁-C₄烷基、-[C(R^{X1a})₂]_p-N-(C₁-C₄烷基)₂；其中p是0、1、2或3；其中每个R^{X1a}独立地选自氢、氘、卤基和C₁-C₄烷基，或者两个R^{X1a}基团一起形成C₃-C₆环烷基。

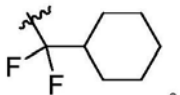
[0240] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中，R^X是-COR^{X1}或-SO₂R^{X1}。

[0241] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中，R^X选自





[0242] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, R^X 是 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$, 其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用 1 至 4 个卤基取代。在某些实施方案中, 所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用 1 个至 4 个卤基取代。在某些实施方案中, 所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用一个或两个卤基取代。在某些实施方案中, R^X 是 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$, 其中所述 $-(C_1-C_4$ 亚烷基) $-R^{X1}$ 在所述 C_1-C_4 亚烷基上任选用一个或两个卤基取代并且其中 R^{X1} 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。在某些实施方案中, R^X 是



[0243] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, R^{X1} 是 C_3-C_8 环烷基。在某些实施方案中, R^{X1} 是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

[0244] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, R^{X1} 是杂环基, 其中所述杂环基任选用 1 至 12 个卤基取代基取代。在某些实施方案中, R^{X1} 是氘代的杂环基。在某些实施方案中, 所述杂环基是单环的或双环的。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个至三个氮 (即 1、2 或 3 个氮) 和/或一个至三个氧 (即 1、2 或 3 个氧)。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮和/或一个氧。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮。在某些实施方案中, 所述杂环基含有两个氮。在某些实施方案中, 所述杂环基含有一个氮和/或一个氧。

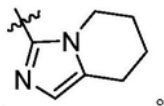
[0245] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, R^{X1} 是任选用 C_1-C_4 烷基、 $-(CH_2)_p-OH$ 或 $-(CH_2)_p-NH_2$ 取代的杂环基; 其中 p 是 1、2 或 3。在某些实施方案中, R^{X1} 是 C_1-C_4 烷基取代的杂环基。在某些实施方案中, R^{X1} 是 $-(CH_2)_p-OH$ 取代的杂环基; 其中 p 是 1、2 或 3。在某些实施方案中, R^{X1} 是 $-(CH_2)_p-NH_2$ 取代的杂环基; 其中 p 是 1、2 或 3。在某些实施方案中, R^{X1} 是 $-(CH_2)_p-NH_2$ 取代的杂环基。

[0246] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, R^{X1} 是杂环基, 其中所述杂环基任选用 $-[C(R^{X1a})_2]_p-CN$ 取代。在某些实施方案中, R^{X1} 是用 $-[C(R^{X1a})_2]_p-OH$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-O-C_1-C_4$ 烷基、 $-NHCOC_1-C_4$ 烷基、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH_2$ 、 $-[C(R^{X1a})_2]_p-NH-C_1-C_4$ 烷基或 $-[C(R^{X1a})_2]_p-N-(C_1-C_4$ 烷基) $_2$ 取代的杂环基。在某些实施方案中, R^{X1} 是杂环基, 其中所述杂环基任选用 $-CONHC_1-C_4$ 烷基、 $-COH$ 、 $-CO_2H$ 或 $-[C(R^{X1a})_2]_p-COO-C_1-C_4$ 烷基取代。

[0247] 在式 (Ia) 和式 (Ib) 的某些实施方案中, 每个 R^{X1a} 独立地选自氢和卤基。在某些实施

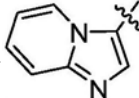
方案中,两个 R^{X1a} 基团一起形成 C_3-C_6 环烷基,诸如环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

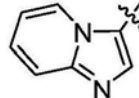
[0248] 在式(Ia)和式(Ib)的某些实施方案中, R^{X1} 是杂芳基。在某些实施方案中,所述杂芳基是单环的或双环的。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个至三个氮(即1、2或3个氮)和/或一个至三个氧(即1、2或3个氧)。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个氮和/或一个氧。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个氮。在某些实施方案中,所述杂芳基含有两个氮。在某些实施方案中,所述杂芳基含有一个氮和一个氧。在某些实施方案中, R^{X1} 是



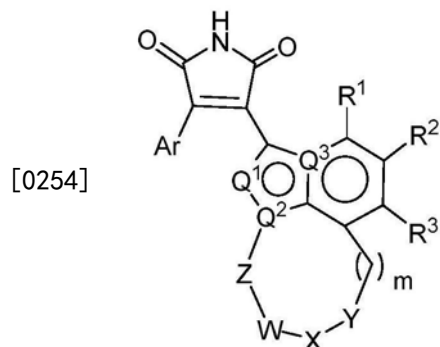
[0249] 在式(Ia)和式(Ib)的某些实施方案中, R^X 是 $-CON(R^{X2})_2$ 。在某些实施方案中, R^X 是 $-CON(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 是氢或甲基。在某些实施方案中, R^X 是 $-CONH_2$ 。在某些实施方案中, R^X 是 $-CON(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 是 C_1-C_4 烷基。在某些实施方案中, R^X 是 $-CON(R^{X2})_2$,其中 R^{X2} 是甲基。

[0250] 在某些实施方案中, m 是0。在某些实施方案中, m 是1。在某些实施方案中, m 是2。

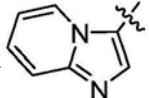
[0251] 在本文的化合物的一个变型中,Ar是 并且 Q^1 是CH; Q^2 是N; Q^3 是C; Q^4 是C; 并且 Q^5 是C。

[0252] 在本文的化合物的一个变型中,Ar是 并且 Q^1 是CH; Q^2 是N; Q^3 是C; Q^4 是C; 并且 Q^5 是C。

[0253] 本公开提供了本文的式(I)化合物:



[0255] 具有以下特征一个、两个、三个或更多个:

[0256] a) Ar是 ;

[0257] b) Q^1 是CH; Q^2 是N;并且 Q^3 是C;

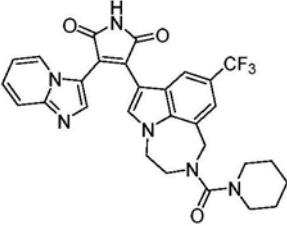
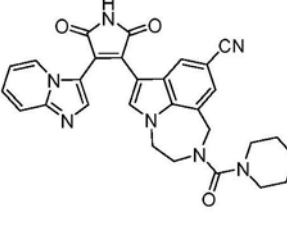
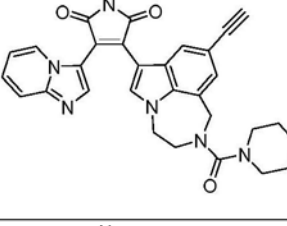
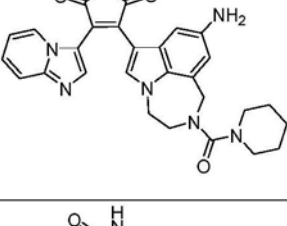
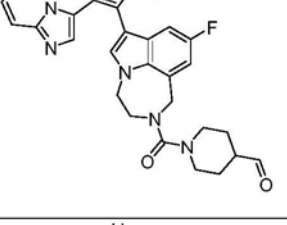
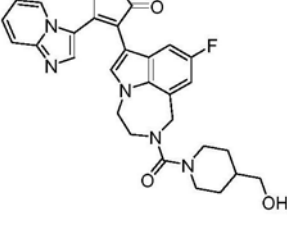
[0258] c) R^2 是氢或卤基;

[0259] d) $-Z-W-X-Y-$ 是 $-C(R^Z)_2-C(R^W)_2-N(R^X)-C(R^Y)_2-$;

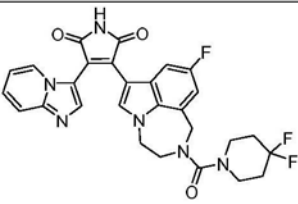
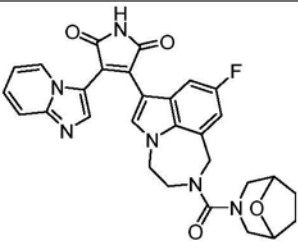
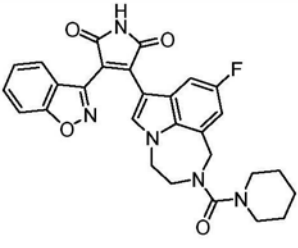
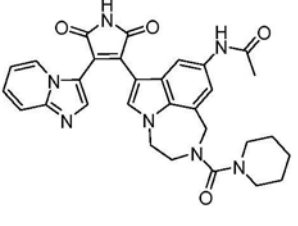
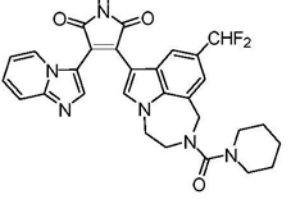
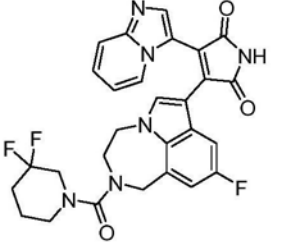
[0260] e) R^X 是 $-COR^{X1}$ 。

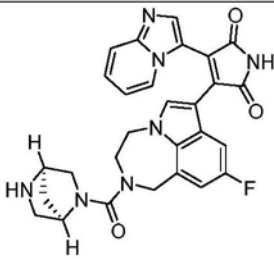
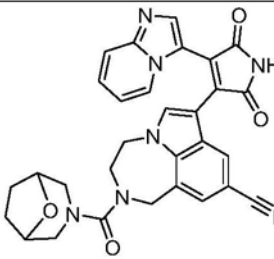
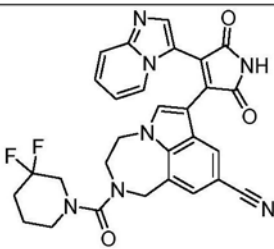
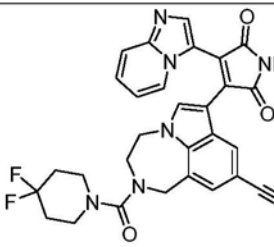
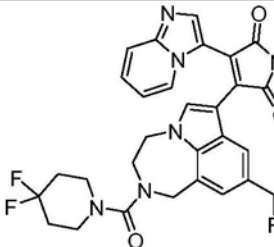
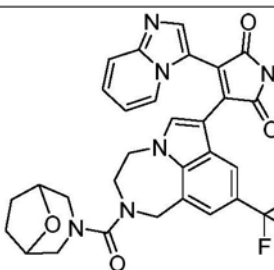
[0261] 本公开提供了本文的式(I)化合物:

[0278]

化合物 I-1	
化合物 I-2	
化合物 I-3	
化合物 I-4	
化合物 I-5	
化合物 I-6	

[0279]

化合物 I-7	
化合物 I-8	
化合物 I-9	
化合物 I-10	
化合物 I-11	
化合物 I-12	

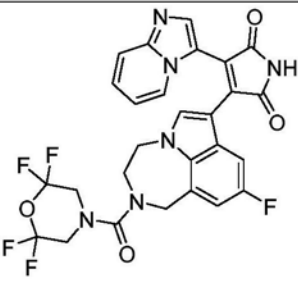
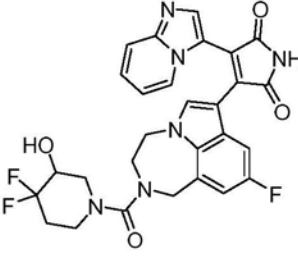
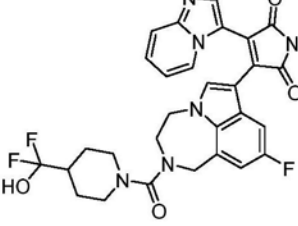
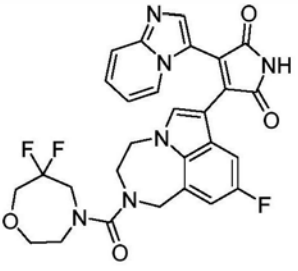
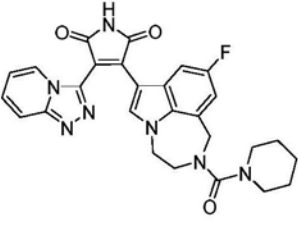
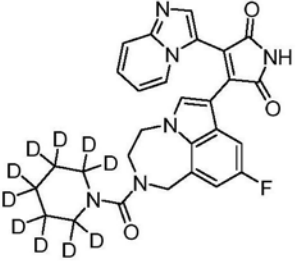
化合物 I-13	
化合物 I-14	
化合物 I-15	
化合物 I-16	
化合物 I-17	
化合物 I-18	

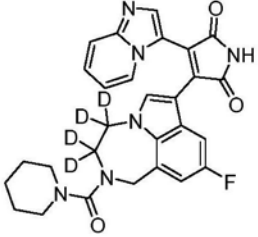
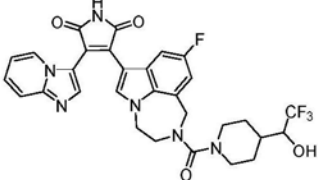
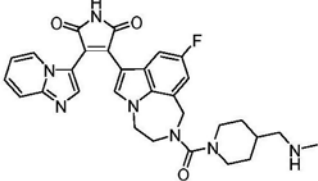
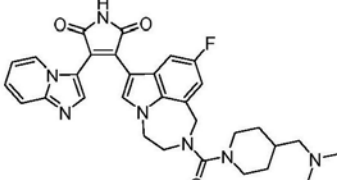
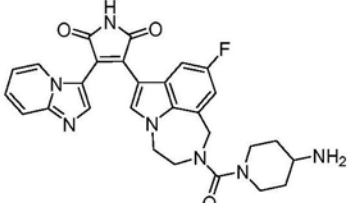
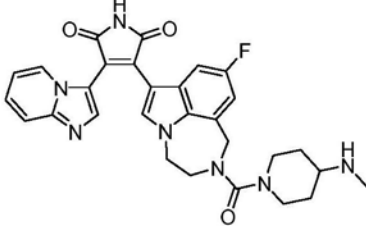
[0280]

[0281]

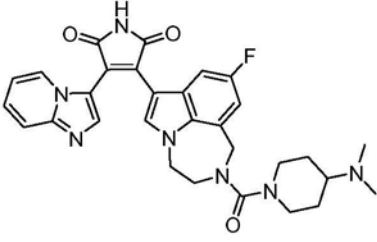
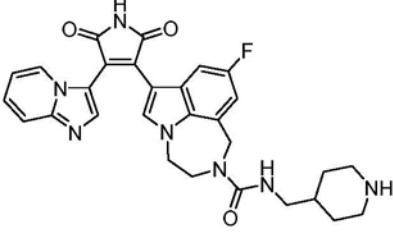
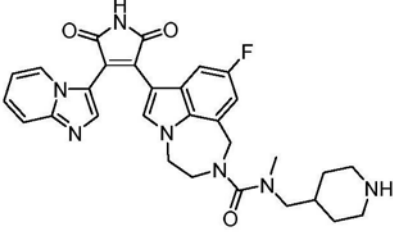
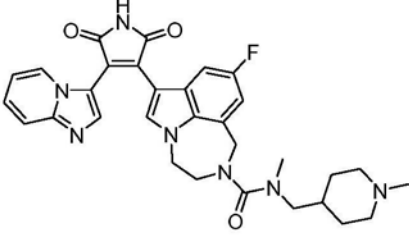
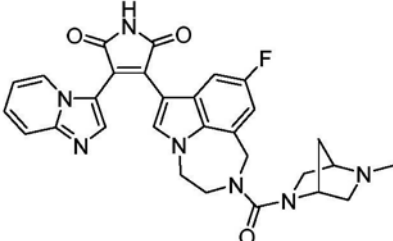
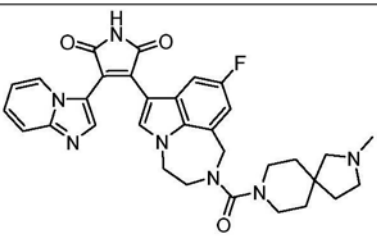
化合物 I-19	
化合物 I-20	
化合物 I-21	
化合物 I-22	
化合物 I-23	

[0282]

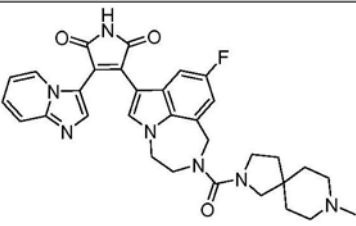
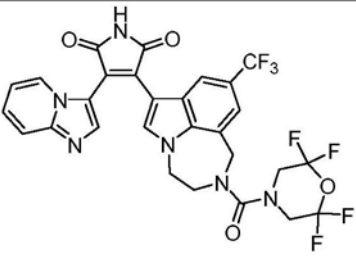
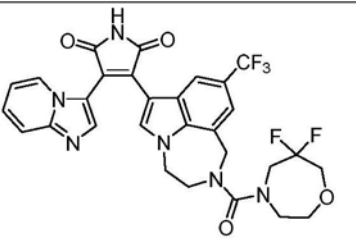
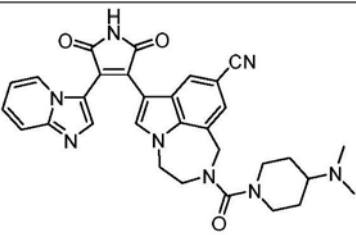
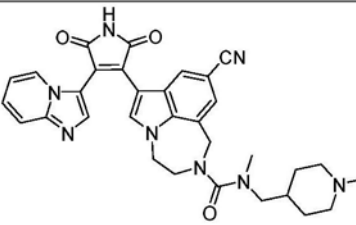
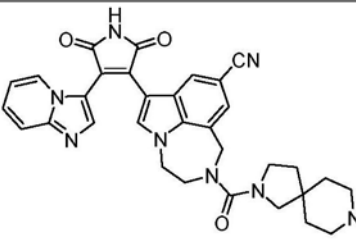
化合物 I-24	
化合物 I-25	
化合物 I-26	
化合物 I-27	
化合物 I-28	
化合物 I-29	

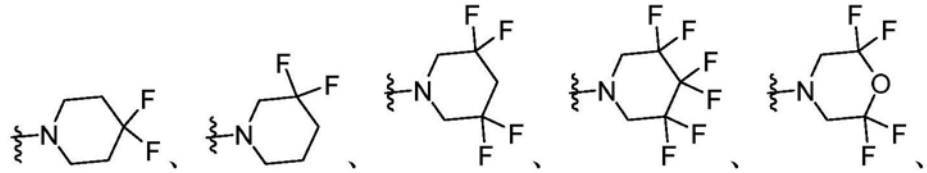
化合物 I-30	
化合物 I-31	
化合物 I-32	
[0283] 化合物 I-33	
化合物 I-34	
化合物 I-35	

[0284]

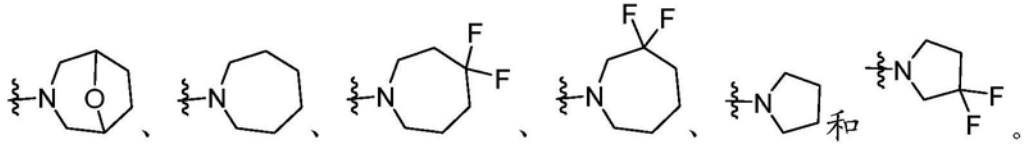
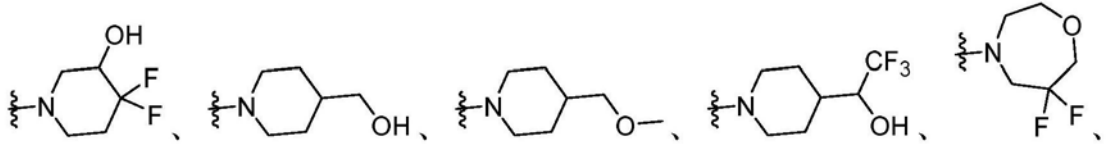
化合物 I-36	
化合物 I-37	
化合物 I-38	
化合物 I-39	
化合物 I-40	
化合物 I-41	

[0285]

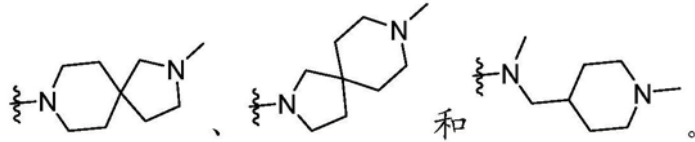
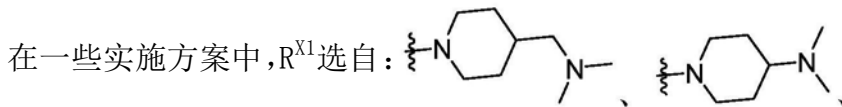
化合物 I-42	
化合物 I-43	
化合物 I-44	
化合物 I-45	
化合物 I-46	
化合物 I-47	



[0295]

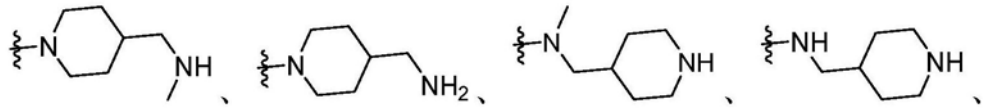


[0296]

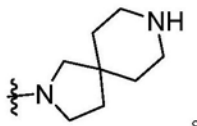
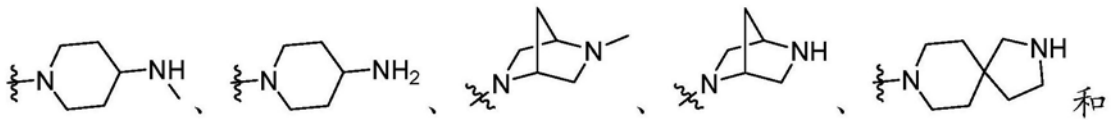


[0297]

在一些实施方案中, R^{X1}选自:



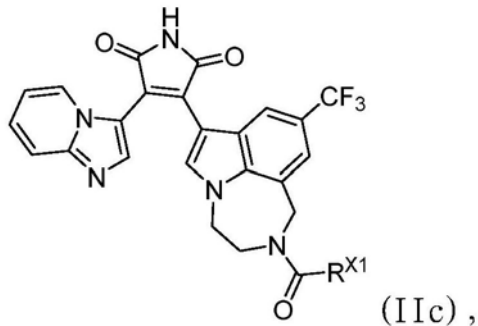
[0298]



[0299]

本公开提供具有式 (IIc) 的化合物:

[0300]

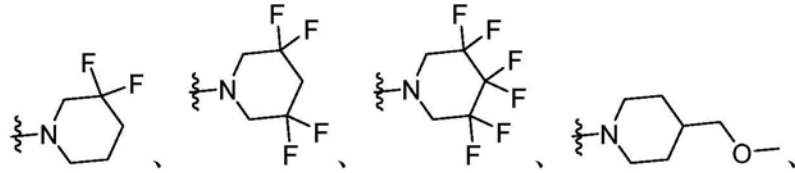


[0301]

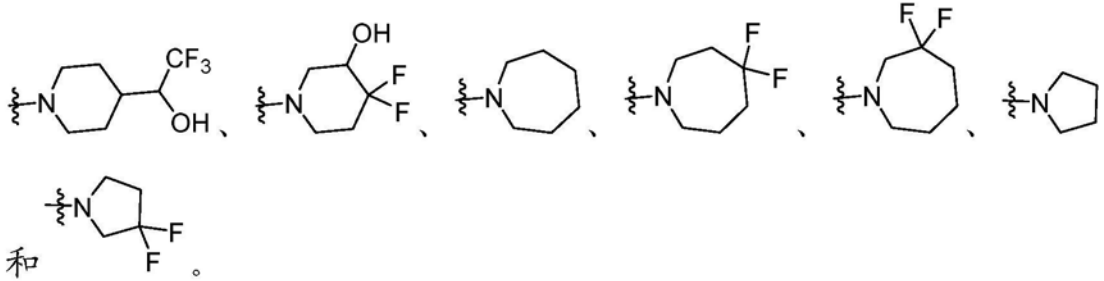
以及其药学上可接受的盐和互变异构体。

[0302]

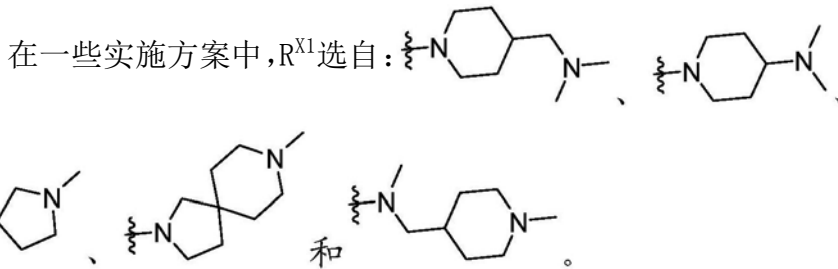
在一些实施方案中, R^{X1}选自:



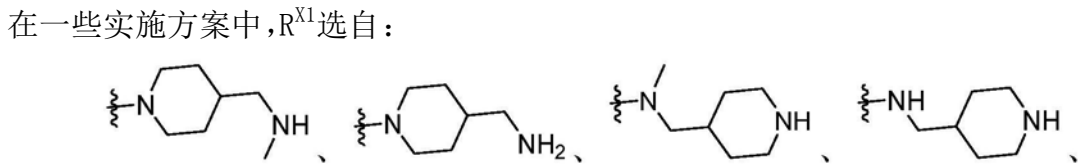
[0303]



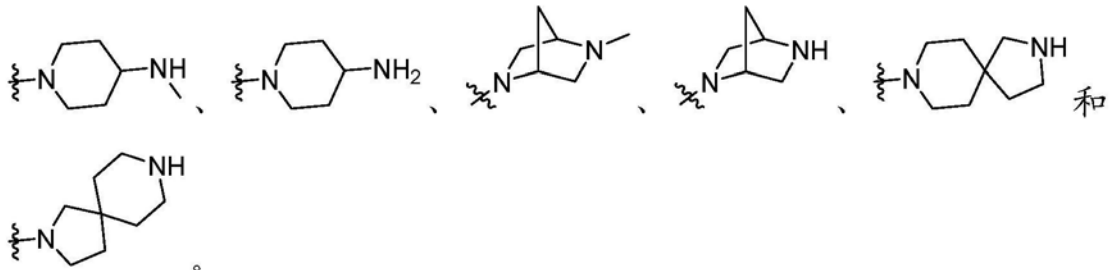
[0304]



[0305]



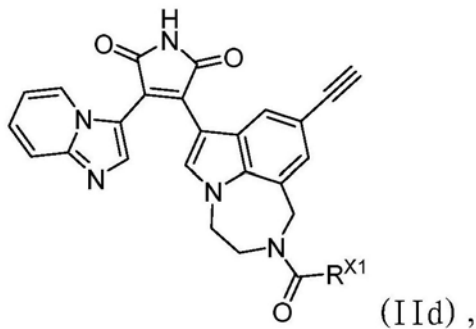
[0306]



[0307]

本公开提供具有式 (IIId) 的化合物:

[0308]

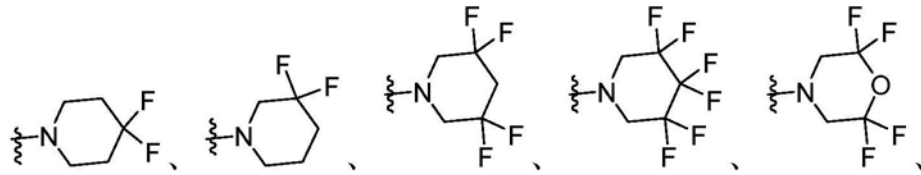


[0309]

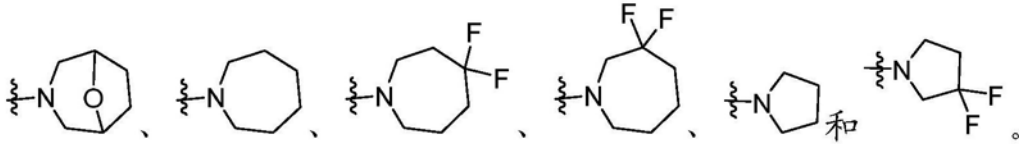
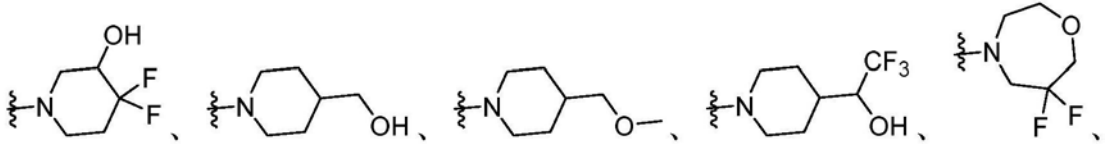
以及其药学上可接受的盐和互变异构体。

[0310]

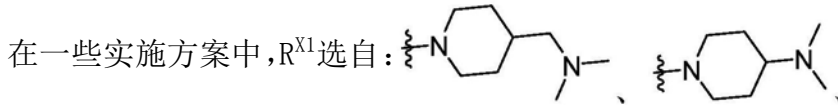
在一些实施方案中, R^{X1}选自:



[0311]

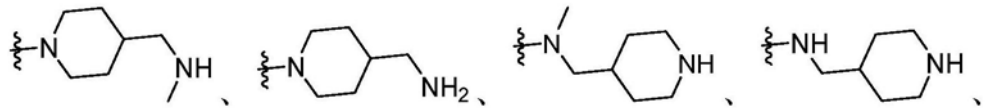


[0312]

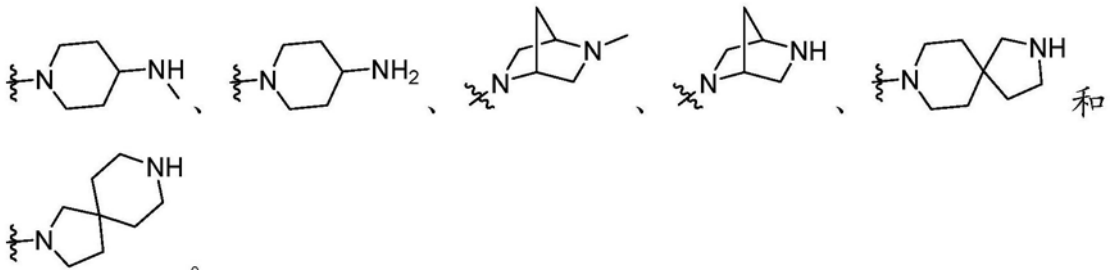


[0313]

在一些实施方案中, R^{X1}选自:



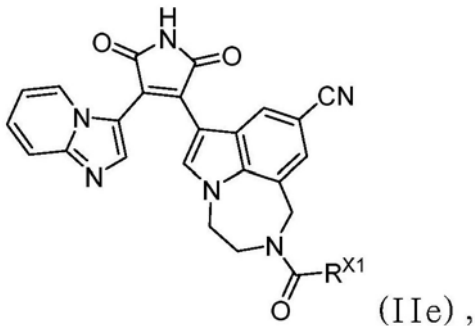
[0314]



[0315]

本公开提供具有式 (IIe) 的化合物:

[0316]

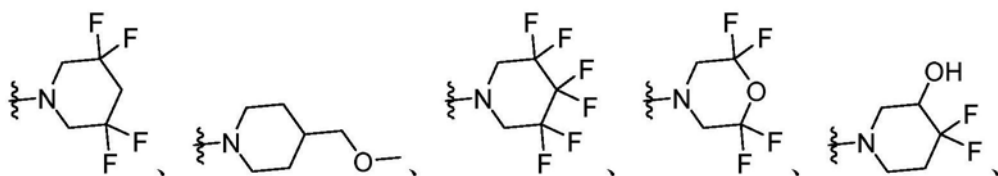


[0317]

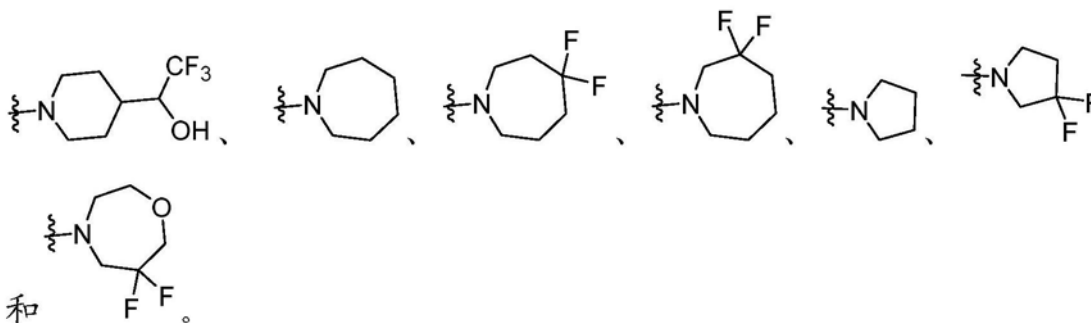
以及其药学上可接受的盐和互变异构体。

[0318]

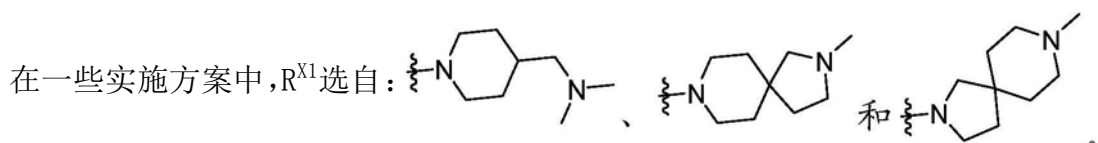
在一些实施方案中, R^{X1}选自:



[0319]

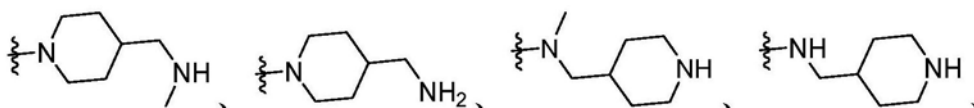


[0320]

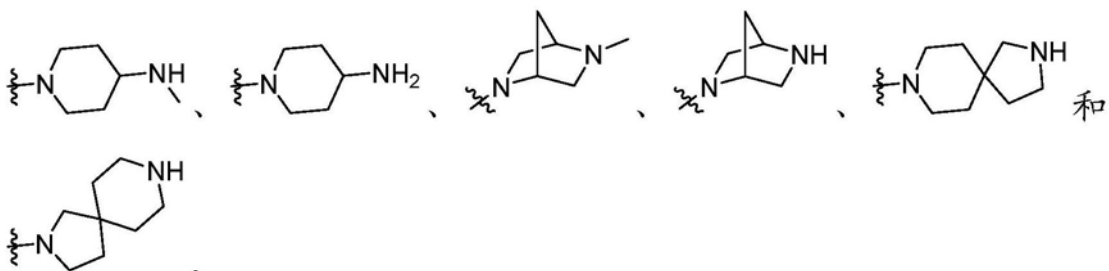


[0321]

在一些实施方案中, R^{X1} 选自:



[0322]



[0323] 除非另有说明, 否则本文描述的结构也意在包括仅在存在一个或多个同位素富集原子方面不同的化合物。例如, 具有本结构, 不同的是用氘或氚取代氢原子, 或者用 ^{13}C 或 ^{14}C 取代碳原子, 或者用 ^{15}N 取代氮原子, 或者用 ^{17}O 或 ^{18}O 取代氧原子的化合物, 均在本公开的范围。这种同位素标记的化合物可用作研究或诊断工具。在某些实施方案中, 氘化可用于减缓代谢, 从而潜在地改善化合物半衰期。化合物中的任何或所有氢都可以用氘代替。

[0324] 合成所公开的化合物的方法

[0325] 本公开化合物可通过多种方法制备, 包括标准化学。合适的合成路线描述于下面给出的方案中。

[0326] 具有任何本文所述化学式的化合物可通过有机合成领域中已知的方法(如部分通过下面的合成方案和实施例阐述的)制备。在下面描述的方案中, 众所周知, 根据一般原理或化学, 在必要时使用敏感基团或反应性基团的保护基团。根据有机合成的标准方法操纵保护基团(T.W.Greene和P.G.M.Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第三版, Wiley出版社, 纽约市, 1999年)。使用本领域技术人员显而易见的方法, 在化合物合成的方便阶段移除这些基团。选择过程以及反应条件和它们的执行顺序应与本公开化合物的制

备一致。

[0327] 本领域技术人员将认识到立体中心是否存在于本公开的任何化合物中。因此，本公开包括两种可能的立体异构体(除非在合成中另有说明)，并且不仅包括外消旋化合物，还包括单独的对映异构体和/或非对映异构体。当需要化合物作为单一对映异构体或非对映异构体时，可以通过立体有择合成或通过拆分最终产物或任何便利的中间体来获得。最终产物、中间体或起始材料的拆分可通过本领域已知的任何合适方法实现。参见例如，E.L.Eliel, S.H.Wilen和L.N.Mander的“Stereochemistry of Organic Compounds”(Wiley-Interscience出版社, 1994年)。

[0328] 制备所述化合物的方法

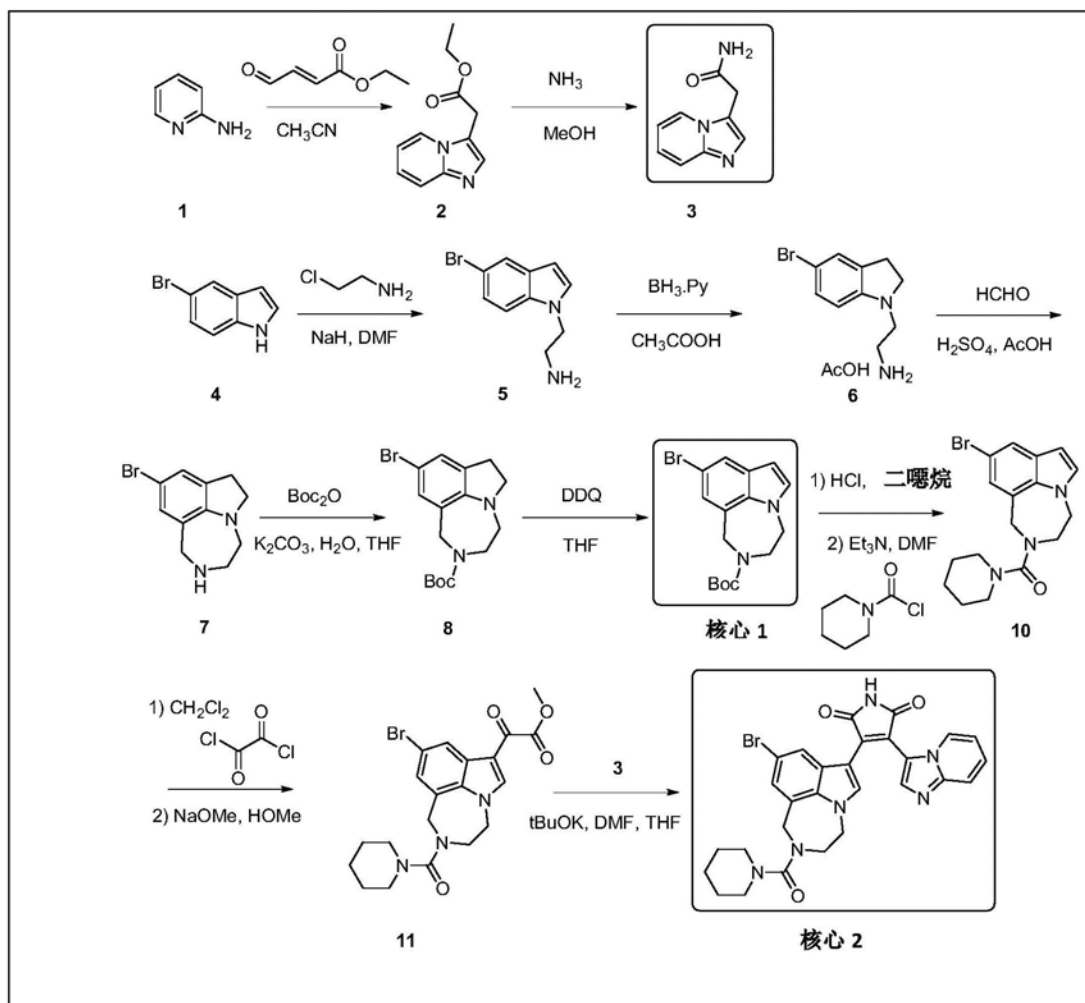
[0329] 本文所述的化合物可以由市售原料制备或使用已知的有机、无机和/或酶促方法合成。

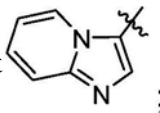
[0330] 本公开化合物可以用有机合成领域技术人员熟知的许多方式制备。举例来说，本公开的化合物可以使用下述方法，连同合成有机化学领域中已知的合成方法或本领域技术人员所理解的它们的变型形式来合成。这些方法包括但不限于下面描述的那些方法。

[0331] 方案1中示出了主题化合物的代表性合成。

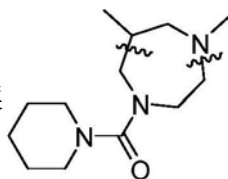
[0332] 方案1. 示例性式(I)化合物的一般合成

[0333]



[0334] 在方案1中,核心2是其中 Q^1 是CH; Q^2 是N;并且 Q^3 是C; R^2 是溴基;Ar是  并

且-Z-W-X-Y-是的实施方案



[0335] 化合物1和该烯丙基醛是市售的起始材料。作为另一种选择,化合物1和该烯丙基醛可以使用市售起始材料和/或通过常规合成方法制备的起始材料,经由各种不同的合成路线合成。

[0336] 继续参照方案1,使化合物1和烯丙基醛在例如约40°C-100°C的温度下在合适的溶剂诸如乙腈中,在缩合反应中反应而形成化合物2。使化合物2与氨在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如甲醇中反应而形成化合物3。化合物3可用于要在下面论述的偶联反应。

[0337] 继续参照方案1,可在存在碱,诸如碱金属氢化物,诸如氢化钠的情况下用卤代烷使化合物4烷基化而制备化合物5。该反应可在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如二甲基甲酰胺(DMF)中进行。

[0338] 化合物6可以通过使化合物5还原来制备。合适的还原剂包括硼烷吡啶络合物。该反应可在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如乙酸中进行。

[0339] 可由化合物6的反应制备化合物7。在存在酸诸如硫酸和乙酸的情况下用甲醛进行该反应。

[0340] 可以通过保护化合物7的氨基来制备化合物8。合适的试剂包括BOC酐。该反应可在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如四氢呋喃(THF)中进行。

[0341] 可以由化合物8的脱氢制备核心1。合适的试剂包括DDQ(2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌)。该反应可在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如四氢呋喃(THF)中进行。

[0342] 可以通过氨基的去保护、然后随后与酰基卤反应而从核心1制备化合物10。如果保护基团是BOC,则氨基的去保护可以在酸性条件下进行。然后与酰卤反应可得到化合物10。该反应可在例如0°C至室温范围内的温度下在合适的溶剂诸如二甲基甲酰胺(DMF)中进行。

[0343] 可以通过酰化反应,诸如Friedel Crafts酰化反应由化合物10制备化合物11。在该反应中,使酰基卤与化合物10在例如30°C至100°C范围内的温度下在合适的溶剂诸如二氯甲烷中反应。然后使产物与醇和碱反应而形成酯,如化合物11中的酯。

[0344] 使化合物11与化合物3反应而形成1H-吡咯-2,5-二酮化合物。该反应在惰性有机溶诸如二甲基甲酰胺、四氢呋喃等中,在存在碱诸如叔丁醇钾的情况下进行。

[0345] 使用所述化合物的方法

[0346] 本公开涉及活化Wnt途径或抑制GSK3-β活性的方法。尽管在专利和非专利文献中有数百种声称的GSK3抑制剂,但并非所有GSK3抑制剂在不存在其它治疗剂的情况下施用时就足以促进干细胞增殖的活化。

[0347] 在另一方面,本公开涉及预防、减轻或治疗与某些组织细胞的缺失或缺乏相关的

障碍或疾病的发病率和/或严重程度的方法。在一个方面,本公开涉及预防、减轻或治疗内耳障碍和听力损害的发病率和/或严重程度的方法,所述内耳障碍和听力损害涉及内耳组织、特别是内耳毛细胞、其祖细胞和任选的血管纹及相关听觉神经。特别要关注的是导致永久性听力损失(可能因减少的毛细胞数量引起)和/或降低的毛细胞功能的那些病症。还关注的是作为耳毒性治疗药物(包括顺铂及其类似物、氨基糖苷抗生素、水杨酸盐及其类似物或袪利尿剂)的不良副作用而出现的那些病症。在某些实施方案中,本公开涉及诱导、促进或增强内耳组织(特别是内耳支持细胞和毛细胞)的生长、增殖或再生。

[0348] 除此之外,本文提供的方法可用来制备用于预防和/或治疗急性和慢性耳疾病和听力损失、头晕和平衡问题,尤其是突然听力损失、声创伤、因长期噪音暴露引起的听力损失、老年性耳聋、在植入内耳假体期间的创伤(插入创伤)、由内耳区的疾病引起的眩晕、梅尼埃病相关的头晕和/或作为梅尼埃病的症状的眩晕、梅尼埃病相关的眩晕和/或作为梅尼埃病的症状的眩晕、耳鸣和因抗生素和细胞抑制剂和其它药物引起的听力损失的药物制剂。

[0349] 当用所述化合物处理耳蜗支持细胞群体时,无论该群体是在体内还是在体外,经处理的支持细胞都展现出干细胞样行为,因为经处理的支持细胞具有增殖和分化(更具体而言,分化成耳蜗毛细胞)的能力。优选地,所述组合物诱导和维持支持细胞以产生子代干细胞,所述干细胞可以分裂许多代并保持使高比例的所得细胞分化为毛细胞的能力。在某些实施方案中,增殖中的干细胞表达干细胞标志物,所述标志物可包括Lgr5、Sox2、Opem1、Phex、lin28、Lgr6、cyclin D1、Msx1、Myb、Kit、Gdnf3、Zic3、Dppa3、Dppa4、Dppa5、Nanog、Esrrb、Rex1、Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt3l、Utf1、Tcl1、Oct4、Klf4、Pax6、Six2、Zic1、Zic2、Otx2、Bmi1、CDX2、STAT3、Smad1、Smad2、smad2/3、smad4、smad5和/或smad7。

[0350] 在一些实施方案中,本公开的方法可以用于在显著的毛细胞形成之前维持或甚至瞬时增加预先存在的支持细胞群体的干性(即自我更新)。在一些实施方案中,所述预先存在的支持细胞群体包含内柱细胞、外柱细胞、内指细胞、代特氏细胞、亨森细胞、伯特舍细胞和/或克劳迪乌斯细胞。可以使用在代表性显微术样品上的免疫染色形态学分析(包括细胞计数)和谱系示踪来确认这些细胞类型中的一种或多种的扩增。在一些实施方案中,所述先前已有的支持细胞包含Lgr5⁺细胞。可以使用免疫染色形态学分析(包括细胞计数)以及qPCR和RNA杂交来确认细胞群体中的Lgr5上调。

[0351] 有利的是,本公开的方法在不使用遗传操纵的情况下实现这些目标。许多学术研究中使用的种系操纵不是治疗上合乎需要的治疗听力损失的方法。一般而言,疗法优选涉及在不伴随基因疗法的情况下施用小分子、肽、抗体或其它非核酸分子或核酸递送载体。在某些实施方案中,疗法涉及施用小有机分子。优选地,通过使用注射进中耳中并扩散进耳蜗中的(非基因)治疗剂来实现听力保护或恢复。

[0352] 耳蜗非常依赖于所有存在的细胞类型,并且这些细胞的组成结构对其功能而言是重要的。因为支持细胞在神经递质循环和耳蜗力学中起重要作用。因而,在柯蒂氏器官内保持玫瑰样图案可能对于功能而言是重要的。基底膜的耳蜗力学会活化毛细胞转导。由于耳蜗力学的高灵敏度,还期望避免细胞团块。总之,保持毛细胞和支持细胞沿基底膜的适当分布和关系(甚至在增殖之后),对于听觉而言可能是期望的特征,因为支持细胞功能和适当力学对于正常听力而言是必需的。

[0353] 在本公开的一个实施方案中,以维持或甚至建立耳蜗上皮的玫瑰样图案特征的方式扩增耳蜗细胞群体中的毛细细胞的细胞密度。

[0354] 根据本公开的一个方面,可以在包含毛细胞和支持细胞的耳蜗细胞群体中增加毛细细胞的细胞密度。所述耳蜗细胞群体可以是体内群体(即由受试者的耳蜗上皮组成),或者所述耳蜗细胞群体可以是体外(离体)群体。如果所述群体是体外群体,那么通过参照在任何处理之前和之后采集的所述群体的代表性显微术样品,可以确定细胞密度的增加。如果所述群体是体内群体,那么通过确定对受试者听力的效果可以间接地确定细胞密度的增加,其中毛细胞密度增加与听力改善相关。

[0355] 在一个实施方案中,在不存在神经元细胞的情况下置于干细胞增殖测定中的支持细胞形成带状突触。

[0356] 在天然耳蜗中,毛细胞和支持细胞的图案化以与基底膜平行的方式发生。在本公开的一个实施方案中,以耳蜗上皮的基底膜特征的方式扩增耳蜗细胞群体中的支持细胞的增殖。

[0357] 在一个实施方案中,通过用本文提供的组合物处理初始耳蜗细胞群体来选择性地扩增初始耳蜗细胞群体中的支持细胞的数量,以形成中间耳蜗细胞群体,并且其中所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比大于所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比。所述扩增的耳蜗细胞群体可以是例如体内群体、体外群体或甚至体外外植体。在一个这样的实施方案中,所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比大于所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比。例如,在一个这样的实施方案中,所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比超过所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比1.1倍。又例如,在一个这样的实施方案中,所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比超过所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比1.5倍。又例如,在一个这样的实施方案中,所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比超过所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比2倍。又例如,在一个这样的实施方案中,所述中间耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比超过所述初始耳蜗细胞群体中的支持细胞与毛细胞之比3倍。在前述实施方案中的每一者中,可借助于干细胞增殖测定来确定本段落所述的本公开组合物扩增耳蜗细胞群体的能力。

[0358] 在一个实施方案中,通过用本文提供的组合物处理耳蜗细胞群体来扩增耳蜗细胞群体中的干细胞的数量,以形成中间耳蜗细胞群体,其中所述中间耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度大于所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度。经处理的耳蜗细胞群体可以是例如体内群体、体外群体或甚至体外外植体。在一个这样的实施方案中,所述经处理的耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度超过所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度至少1.1倍。例如,在一个这样的实施方案中,所述经处理的耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度超过所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度至少1.25倍。例如,在一个这样的实施方案中,所述经处理的耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度超过所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度至少1.5倍。又例如,在一个这样的实施方案中,所述经处理的耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度超过所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度至少2倍。又例如,在一个这样的实施方案中,所述经处理的耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度超过所述初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度至少3倍。体外耳蜗细胞群体

可以扩增得显著超过体内群体；例如，在某些实施方案中，扩增的体外干细胞群体中的干细胞的细胞密度可以是初始耳蜗细胞群体中的干细胞的细胞密度的至少4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000或甚至3000倍。在前述实施方案中的每一者中，可借助于干细胞增殖测定来确定本段落所述的本公开组合物扩增耳蜗细胞群体的能力。

[0359] 根据本公开的一个方面，用本文提供的组合物处理耳蜗支持细胞群体来增加该群体的Lgr5活性。例如，在一个实施方案中，本文提供的组合物具有将耳蜗支持细胞的体外群体的Lgr5活性增加和保持在至少1.2倍的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体外群体的Lgr5活性增加1.5倍的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体外群体的Lgr5活性增加2、3、5、10、100、500、1000、2000或甚至3000倍的能力。对于体内群体也可观察到Lgr5活性的增加，但观察到的增加可能稍微更加轻微。例如，在一个实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体内群体的Lgr5活性增加至少5%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体内群体的Lgr5活性增加至少10%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体内群体的Lgr5活性增加至少20%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体内群体的Lgr5活性增加至少30%的能力。在前述实施方案中的每一者中，所述化合物的这种增加Lgr5活性的能力可以例如在体外Lgr5⁺活性测定中证实，而在体内群体中，可以例如在体内Lgr5⁺活性测定中证实，如通过分离所述器官并使用免疫染色进行形态学分析、Lgr5（例如，Lgr5、Sox2）的内源性荧光蛋白表达和针对Lgr5的qPCR测量的。

[0360] 除了增加群体的Lgr5活性之外，还可通过用本文提供的组合物处理含有Lgr5⁺支持细胞的耳蜗细胞群体（无论是体内还是体外），来增加耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的数量。一般而言，通过几种机制中的一种或多种，可以相对于初始细胞群体扩增干/祖支持细胞的细胞密度。例如，在一个这样的实施方案中，可以产生具有增大的干细胞倾向（即，更大的分化成毛细胞的能力）的新产生的Lgr5⁺支持细胞。又例如，在一个这样的实施方案中，没有子代Lgr5⁺细胞是通过细胞分裂产生，而是诱导预先存在的Lgr5⁺支持细胞分化为毛细胞。又例如，在一个这样的实施方案中，没有子代Lgr5⁺细胞是通过细胞分裂产生，而是将Lgr5⁻支持细胞活化至更高的Lgr5活性水平，所述活化的支持细胞然后能够分化为毛细胞。不论机制，在一个实施方案中，本公开的化合物具有将分离的体外耳蜗支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少5倍的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将体外耳蜗支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少10倍的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将体外耳蜗支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少100、至少500、至少1000或甚至至少2000倍的能力。对于体内群体也可观察到Lgr5⁺支持细胞的细胞密度的增加，但是所观察到的增加可能略微更加轻微。例如，在一个实施方案中，所述化合物具有将耳蜗支持细胞的体内群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少5%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将体内耳蜗支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少10%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将体内耳蜗支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少20%的能力。又例如，在一个这样的实施方案中，所述化合物具有将体内耳蜗

支持细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的细胞密度增加至少30%的能力。可例如在干细胞增殖测定中或在适当的体内测定中,证实所述化合物的这种增加体内群体中的Lgr5⁺支持细胞的能力。在一个实施方案中,本公开的化合物具有这样的能力:通过在缺失Lgr5蛋白或具有低检测水平的Lgr5蛋白质的细胞中诱导Lgr5表达而增加耳蜗中Lgr5⁺细胞的数量,同时保持天然形态。在一个实施方案中,本公开的化合物具有这样的能力:通过在缺失Lgr5蛋白或具有低检测水平的Lgr5蛋白质的细胞中诱导Lgr5表达而增加耳蜗中Lgr5⁺细胞的数量,同时保持天然形态而不会产生细胞聚集体。

[0361] 除了增加Lgr5⁺支持细胞的细胞密度之外,在一个实施方案中,本公开的方法具有增加耳蜗细胞群体中Lgr5⁺细胞与毛细胞之比的能力。在一个实施方案中,通过用本公开的组合物处理初始耳蜗细胞群体来选择性地扩增初始耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的数量,以形成扩增的细胞群体,并且其中所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞的数量至少等于毛细胞的数量。所述扩增的耳蜗细胞群体可以是例如体内群体、体外群体或甚至体外植体。在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少1:1。例如,在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少1.5:1。又例如,在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少2:1。又例如,在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少3:1。又例如,在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少4:1。又例如,在一个这样的实施方案中,所述扩增的耳蜗细胞群体中的Lgr5⁺支持细胞与毛细胞之比为至少5:1。在前述实施方案中的每一者中,可借助于干细胞增殖测定确定本段落所述的本公开的化合物扩增耳蜗细胞群体的能力。

[0362] 在某些实施方案中,所述方法将感觉上皮上的Lgr5⁺细胞在总细胞中的比例增加至少10%、20%、50%、100%、250%、500%、1000%或5000%。

[0363] 在某些实施方案中,所述方法增加Lgr5⁺细胞,直到它们达到感觉上皮(例如柯蒂氏器官)上的细胞的至少10%、20%、30%、50%、70%或85%。

[0364] 一般而言,优选避免耳蜗中支持细胞的过度增殖。在一个实施方案中,本公开的方法具有这样的能力:扩增耳蜗细胞群体而不产生超出耳蜗的天然表面的新细胞突出物,例如细胞聚集体。在一些实施方案中,在将本文提供的组合物置于圆窗膜或卵圆窗膜上后30天,所述耳蜗组织具有天然形态。在一些实施方案中,在将所述化合物置于圆窗膜或卵圆窗膜上后30天,所述耳蜗组织具有天然形态且缺乏细胞聚集体。在一些实施方案中,在将所述化合物置于圆窗膜或卵圆窗膜上后30天,所述耳蜗组织具有天然形态,并且所述柯蒂氏器官中的至少10%、20%、30%、50%、75%、90%、95%、98%或甚至至少99%的Lgr5⁺细胞都不是细胞聚集体的一部分。

[0365] 除了上述扩增支持细胞群体(一般而言)和Lgr5⁺支持细胞(具体而言)以外,本公开的方法还具有在子代细胞中保持分化为毛细胞的能力。在体内群体中,可通过受试者听力的改善间接地观察这种能力的保持。在体外群体中,这种能力的保持可以通过毛细胞数量相对于起始群体的增加而直接观察,或通过测量LGR5活性、SOX2活性或本文别处鉴别的一种或多种其它干细胞标志物而间接观察。

[0366] 在一个实施方案中,所述方法增加耳蜗支持细胞群体(一般而言)或Lgr5⁺支持细

胞群体(具体而言)的干性的能力可以与分离的Lgr5⁺细胞的体外群体的Lgr5活性的增加(通过Lgr5活性测定来确定)相关联。如前面指出的,在一个这样的实施方案中,相对于初始细胞群体中的细胞的Lgr5活性,所述组合物具有将中间细胞群体中的干细胞的Lgr5活性增加平均5倍的能力。又例如,在一个这样的实施方案中,相对于初始细胞群体中的细胞的Lgr5活性,所述方法具有将中间细胞群体中的干细胞的Lgr5活性增加10倍的能力。又例如,在一个这样的实施方案中,相对于初始细胞群体中的细胞的Lgr5活性,所述方法具有将中间细胞群体中的干细胞的Lgr5活性增加100倍的能力。又例如,在一个这样的实施方案中,相对于初始细胞群体中的细胞的Lgr5活性,所述方法具有将中间细胞群体中的干细胞的Lgr5活性增加1000倍的能力。在前述实施方案中的每一者中,可通过针对靶基因的免疫染色或内源性荧光蛋白表达以及经由成像分析或流式细胞术来分析它们的相对强度,或者使用针对靶干细胞基因的qPCR,体外确定所述细胞群体中的干细胞活性的增加。可以任选通过干细胞测定进一步确定所得的干细胞群体的身份,所述干细胞测定包括在干细胞测定中定义的干细胞标志物表达测定、集落形成测定、自我更新测定和分化测定。

[0367] 在一些实施方案中,应用于成体哺乳动物的所述方法产生处于S期的成体哺乳动物Lgr5⁺细胞群体。

[0368] 在一个实施方案中,在将本文提供的组合物施加至小鼠的圆窗或卵圆窗后,相对于未暴露于所述化合物的群体的基线,柯蒂氏器官中的细胞群体的体内Lgr5⁺活性增加1.3倍、1.5倍、至多20倍。在一些实施方案中,相对于未暴露于所述化合物的群体的基线,将所述化合物施加至小鼠的圆窗或卵圆窗会使柯蒂氏器官中的细胞的平均体内Lgr5⁺活性增加1.3倍、1.5倍、至多20倍。

[0369] 在某些实施方案中,所述方法可增加Lgr5⁺细胞,直到它们在数量上达到支持细胞群体的至少10%、7.5%、10%、至多100%。

[0370] 在某些实施方案中,所述组合物具有使耳蜗中的Lgr5⁺细胞的百分比增加5%、10%、25%、50%或80%的能力。

[0371] 在某些实施方案中,所述干细胞群体属于体内受试者,并且所述方法是针对听力损失和/或前庭功能障碍的治疗(例如,其中从所述扩增的干细胞群体产生内耳毛细胞会导致听力损失的部分或完全恢复和/或前庭功能改善)。在某些实施方案中,所述干细胞群体属于体内受试者,并且所述方法还包括将药物递送给所述受试者(例如,为了治疗与听力损失和/或前庭功能障碍无关的疾病和/或障碍),所述药物的浓度高于所述药物对于所述受试者而言的已知安全最大剂量(例如,如果不存在由所述方法引起的内耳毛细胞产生的情况下递送的已知安全最大剂量)(例如,由于所述药物的剂量限制性耳毒性的减少或消除)。

[0372] 在某些实施方案中,所述方法还包括使用所产生的内耳毛细胞执行高通量筛选。在某些实施方案中,所述方法包括使用所产生的内耳毛细胞关于对内耳毛细胞的毒性筛选分子。在某些实施方案中,所述方法包括使用所产生的内耳毛细胞关于改善内耳毛细胞(例如,暴露于所述分子的内耳毛细胞)的存活的能力筛选分子。

[0373] 在另一个方面,本公开涉及一种产生扩增的干细胞群体的方法,所述方法包括:给干细胞群体(例如,体外、离体或体内样品/受试者的干细胞群体)施用或造成其被施用本文提供的组合物。

[0374] 在某些实施方案中,通过执行向耳中的一次或多次注射(例如,经鼓膜注射进中耳和/或内耳中)进行所述施用步骤。

[0375] 在某些实施方案中,施用步骤包括以持续方式施用GSK3- β 抑制剂和/或Wnt激动剂。

[0376] 在某些实施方案中,所述干细胞是内耳干细胞和/或支持细胞。

[0377] 在某些实施方案中,所述方法还包括使用所产生的扩增的干细胞群体执行高通量筛选。在某些实施方案中,所述方法还包括使用所产生的干细胞关于对干细胞和/或它们的子代的毒性筛选分子。在某些实施方案中,所述方法包括使用所产生的干细胞关于改善干细胞和/或它们的子代的存活的能力筛选分子。

[0378] 在另一个方面,本公开涉及一种治疗患有或有风险发展听力损失和/或前庭功能障碍的受试者的方法,所述方法包括:鉴别已经经历听力损失和/或前庭功能障碍或有风险发展听力损失和/或前庭功能障碍的受试者,施用或造成其被施用本文提供的组合物。

[0379] 在某些实施方案中,所述干细胞群体包含Lgr5⁺细胞。在某些实施方案中,所述干细胞群体包含出生后细胞。在某些实施方案中,所述干细胞群体包含上皮干细胞。在某些实施方案中,干细胞包括祖细胞。

[0380] 在某些实施方案中,通过执行向耳中的一次或多次注射(例如,经鼓膜注射进中耳和/或内耳中)进行所述施用步骤。

[0381] 在另一个方面,本公开涉及一种产生内耳毛细胞的方法,所述方法包括:使初始干细胞群体(例如,体外、离体或体内样品/受试者的初始干细胞群体)中的干细胞增殖,从而导致扩增的干细胞群体(例如,使得扩增的群体是初始干细胞群体的至少1.25、1.5、1.75、2、3、5、10或20倍);以及促进从所述扩增的干细胞群体产生内耳毛细胞。

[0382] 在另一个方面,本公开涉及一种产生内耳毛细胞的方法,所述方法包括将本文提供的组合物(例如,以药学上可接受的形式(例如,盐))施用至受试者内耳中的细胞群体,由此促进内耳毛细胞的产生。

[0383] 在另一个方面,本公开涉及一种产生内耳毛细胞的方法,所述方法包括:使初始群体(例如,体外、离体或体内样品/受试者的初始群体)中的出生后LGR5⁺细胞增殖,从而导致扩增的LGR5⁺细胞群体(例如,使得扩增的群体是初始干细胞群体的至少1.25、1.5、1.75、2、3、5、10或20倍),所述扩增的LGR5⁺细胞群体导致内耳毛细胞的产生。在某些实施方案中,干细胞包括祖细胞。

[0384] 在另一个方面,本公开涉及一种治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括:使受试者的初始群体(体内)中的出生后Lgr5⁺上皮细胞增殖,从而导致扩增的Lgr5⁺上皮细胞群体(例如,使得扩增的群体是初始出生后Lgr5⁺上皮细胞群体的至少1.25、1.5、1.75、2、3、5、10或20倍)。

[0385] 在一些实施方案中,使Lgr5⁺细胞分化成毛细胞。

[0386] 毛细胞再生

[0387] 在某些实施方案中,本公开涉及促进内耳毛细胞产生的方法,所述方法包括:施用本公开的化合物以扩增耳蜗组织的干细胞群体。

[0388] 在某些实施方案中,本公开涉及促进内耳毛细胞产生的方法,所述方法包括:施用包含本公开化合物和HDAC抑制剂的组合物以扩增耳蜗组织的干细胞群体。

[0389] 在某些实施方案中,本公开涉及在哺乳动物中再生听力的方法。

[0390] 在某些实施方案中,所述干细胞群体属于体内受试者,并且所述方法是治疗听力损失和/或前庭功能障碍。

[0391] 在某些实施方案中,本公开涉及产生内耳毛细胞的方法,所述方法使用本公开化合物来使体内初始群体中的LGR5+细胞增殖,从而导致扩增的LGR5+细胞群体(例如,使得扩增的群体高于初始干细胞群体至少2倍、3倍、5倍、10倍或20倍),从而导致内耳毛细胞的产生。

[0392] 在某些实施方案中,本公开涉及产生内耳毛细胞的方法,所述方法使用包含本公开化合物和HDAC抑制剂的组合物来使体内初始群体中的LGR5+细胞增殖,从而导致扩增的LGR5+细胞群体(例如,使得扩增的群体高于初始干细胞群体至少2倍、3倍、5倍、10倍或20倍),从而导致内耳毛细胞的产生。

[0393] 肠再生

[0394] 在某些实施方案中,本公开涉及促进肠细胞产生的方法,所述方法包括:施用本公开的化合物以扩增肠上皮的干细胞群体。

[0395] 在某些实施方案中,本公开涉及促进肠细胞产生的方法,所述方法包括:施用包含本公开化合物和HDAC抑制剂的组合物以扩增肠上皮的干细胞群体。

[0396] 在某些实施方案中,本公开涉及在哺乳动物中再生肠上皮的方法。

[0397] 在某些实施方案中,所述干细胞群体属于体内受试者。在某些实施方案中,所述方法是用于促进与疾病(诸如化疗诱导的胃肠粘膜炎、移植物抗宿主病、胃溃疡、克罗恩病或溃疡性结肠炎)相关的受损粘膜的修复的治疗。

[0398] 肠Lgr5+增殖

[0399] 在某些实施方案中,本公开涉及促进肠细胞产生的方法,该方法包括:施用本公开的化合物以扩增肠上皮的Lgr5+细胞群体。

[0400] 在某些实施方案中,本公开涉及促进肠细胞产生的方法,所述方法包括:施用包含本公开化合物和HDAC抑制剂的组合物以扩增肠上皮的Lgr5+细胞群体。

[0401] 在某些实施方案中,本公开涉及在哺乳动物中再生Lgr5+细胞群体肠细胞的方法。

[0402] 在某些实施方案中,所述Lgr5+细胞群体属于体内受试者中。在某些实施方案中,所述方法是用于促进与疾病(诸如化疗诱导的胃肠粘膜炎、移植物抗宿主病、胃溃疡、克罗恩病或溃疡性结肠炎)相关的受损粘膜的修复的治疗。

[0403] 在某些实施方案中,本公开涉及治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括使体内Lgr5+上皮细胞增殖,从而导致扩增的Lgr5+上皮细胞群体(例如,使得扩增的群体高于初始出生后Lgr5+上皮细胞群体至少2倍、3倍、5倍、10倍或20倍)。

[0404] 前庭细胞群体的扩增

[0405] 在某些实施方案中,含有的药物制剂可以扩增前庭组织中的前庭细胞群体,包括接触所述前庭组织。在某些实施方案中,所述药物制剂在干细胞增殖测定中能够使干细胞增殖测定细胞群体中的支持细胞的数量增加至少10倍或至少50倍。在某些实施方案中,所述药物制剂在干细胞分化测定中能够从包含前庭支持细胞的细胞群体形成毛细胞。

[0406] 在某些实施方案中,所述前庭组织保持天然形态。在某些实施方案中,所述前庭组织是在受试者中。在某些实施方案中,使所述前庭组织与所述组合物接触通过向所述受试

者经鼓膜施用所述组合物来实现。在某些实施方案中,使所述前庭组织与所述组合物接触导致受试者的前庭功能改善。

[0407] 在某些实施方案中,本公开涉及治疗患有或有风险发展与缺失或缺乏某些组织细胞相关的疾病的受试者的方法,该方法包括向所述受试者施用或造成其被施用本公开的化合物。

[0408] 在某些实施方案中,所述化合物分散在生物相容性基质中。在某些实施方案中,所述生物相容性基质是生物相容性凝胶或泡沫。在某些实施方案中,将所述化合物经鼓膜施用至所述受试者的前庭组织。

[0409] 在某些实施方案中,本公开提供了用于扩增前庭组织中的前庭细胞群体的方法,包括使所述前庭组织与(i)本公开的化合物和(ii)TGF- β 抑制剂接触以在前庭组织中形成扩增的细胞群体。

[0410] 真皮乳头细胞的生成

[0411] 在某些实施方案中,本公开涉及促进真皮乳头细胞产生的方法,所述方法包括:施用单独的或与BMP抑制剂组合的本公开的化合物,以扩增真皮乳头细胞群体。在某些实施方案中,所述化合物可以在哺乳动物中再生毛发。在某些实施方案中,所述真皮乳头细胞群体属于体内受试者。在某些实施方案中,所述真皮乳头细胞群体属于用于治疗脱发的体内受试者。在某些实施方案中,本公开提供产生真皮乳头细胞的方法,所述方法使用单独的或与BMP抑制剂组合的本公开化合物来增殖体内初始群体中的真皮乳头细胞,从而导致扩增的真皮乳头细胞群体。

[0412] 施用

[0413] 圆窗或卵圆窗的膜是到内耳空间的生物屏障,且是听力受损的局部治疗的主要障碍。所施用的药物必须克服该膜以到达内耳空间。可以可操作地(例如,穿过鼓膜注射)将所述药物局部地置于圆窗或卵圆窗膜,然后可以渗透穿过圆窗膜或卵圆窗膜。穿透圆窗或卵圆窗的物质通常分布在外淋巴中且因而到达毛细胞和支持细胞。

[0414] 在某些实施方案中,药物制剂适于将药物局部施用于圆窗膜或卵圆窗膜。所述药物组合物或制剂还可以含有膜渗透促进剂,其支持本文提及的药剂透过圆窗膜或卵圆窗膜。因此,可以使用液体、凝胶或泡沫制剂。口服施加活性成分或采用递送方法的组合也是可能的。

[0415] 药物鼓室内(IT)递送至耳部越来越多地用于临床和研究目的。一些小组已经使用微型导管或微型管芯针以持续方式施加药物,而大部分已经将其作为单次或重复IT注射来施加(在多达2周的时间段中多达8次注射)。

[0416] 鼓室内施加的药物被认为主要通过穿过圆窗或卵圆窗(RW)膜而进入内耳流体。计算表明,控制进入耳中的药物的量和药物沿着耳长度的分布的主要因素是药物在中耳空间中停留的时间。单次“单剂(one-shot)”施加或持续几小时的水溶液施加会导致所施用的物质沿着耳蜗长度的药物梯度急剧下降,并且随着药物随后分布在整个耳中导致耳蜗底回中的浓度迅速下降。

[0417] 其它注射方法包括通过渗透泵,或者通过与植入的生物材料组合,以及更优选地,通过注射或输注。可以辅助控制药物的释放动力学和分布的生物材料包括水凝胶材料、可降解材料。最优选使用的一类材料包括原位胶凝材料。其它材料包括胶原或其它天然材料,

包括纤维蛋白、明胶和脱细胞的组织。明胶海绵 (gelfoam) 也可能是合适的。

[0418] 还可以经由备选手段来增强递送,所述备选手段包括但不限于添加到递送的组合物中的试剂,诸如渗透促进剂,或者可以通过经由超声、电穿孔或高速喷射的装置。

[0419] 本文所述的方法还可以用于可使用本领域技术人员已知的多种方法产生的内耳细胞类型,包括在PCT申请No. W02012103012 A1中描述的那些细胞类型。

[0420] 关于人和兽医治疗,所施用的特定试剂的量可以取决于多种因素,包括:受治的障碍和障碍的严重程度;所采用的具体试剂的活性;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;所采用的具体试剂的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的具体试剂组合或并用的药物;处方医师或兽医的判断;以及医学和兽医学领域中已知的类似因素。

[0421] 本文所述的试剂可以以治疗有效量施用给需要治疗的受试者。本文所述的组合物的施用可以是经由任何合适的施用途径,特别是通过鼓室内施用。其它途径包括:摄入,或者备选地,通过胃肠外,例如通过静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌内、鼻内、皮下、舌下、透皮,或通过吸入或吹入,或通过耳内滴注进行局部施用以通过耳道皮肤和鼓膜的膜进行吸收。这样的施用可以是单个或多个口服剂量、限定数量的滴耳剂,或者快速推注、多次注射,或者作为短期或长期输注。可植入装置(例如,可植入输注泵)也可以用于在一段时间内周期性地胃肠外递送等同或不同剂量的特定制剂。对于这种胃肠外施用,优选将所述化合物配制为在水或其它合适的溶剂或溶剂混合物中的无菌溶液。所述溶液可以含有其它物质,诸如盐、糖(特别是葡萄糖或甘露醇),以使所述溶液与血液等渗;缓冲剂,诸如乙酸、柠檬酸和/或磷酸及它们的钠盐;和防腐剂。

[0422] 本文所述的化合物可通过许多足以将所述化合物递送至内耳的方法来施用。将化合物递送至内耳包括将所述化合物施用至中耳,使得所述化合物可以跨过圆窗或卵圆窗扩散至内耳,以及通过穿过圆窗膜或卵圆窗膜直接注射而将化合物施用至内耳。这样的方法包括但不限于耳部施用、通过经鼓膜管芯针或导管,或胃肠外施用,例如,通过耳内、经鼓膜或耳蜗内注射。

[0423] 在特定实施方案中,局部施用本公开的化合物、组合物和制剂,这意味着,它们不是全身施用。

[0424] 在一个实施方案中,使用注射器和针装置利用耳部施用向受试者施用化合物或组合物。使用适当尺寸的针来刺穿鼓膜,并且将包含所述组合物的管芯针或导管穿过被刺穿的鼓膜插入受试者的中耳中。可以插入该装置,使得它与圆窗或卵圆窗接触或紧邻圆窗或卵圆窗。用于耳部施用的示例性装置包括但不限于:经鼓膜管芯针、经鼓膜导管、圆窗或卵圆窗微导管(将药物递送至圆窗或卵圆窗的小导管)和Silverstein Microwicks™(小管,“管芯针”穿过该管到圆窗或卵圆窗,从而允许受试者或医学专业人员调节)。

[0425] 在另一个实施方案中,使用注射器和针装置利用经鼓膜注射,在鼓膜后注射进中耳和/或内耳,将化合物或组合物施用给受试者。可以将制剂经由经鼓膜注射直接施用到圆窗膜或卵圆窗膜上,或者可以经由耳蜗内注射直接施用至耳蜗或经由前庭内注射直接施用至前庭器官。

[0426] 在一些实施方案中,所述递送装置是设计用于向中耳和/或内耳施用化合物或组合物的设备。仅举例而言:GYRUS Medical GmbH提供了微型耳镜,其用于圆窗龛或卵圆窗龛

的可视化和药物递送;Arenberg已经在美国专利No.5,421,818、No.5,474,529和No.5,476,446中描述了一种将流体递送至内耳结构的医疗装置(这些专利中的每一篇关于这样的公开内容通过引用并入本文)。系列号为08/874,208的美国专利申请描述了一种用于植入流体转移导管以将组合物递送至内耳的外科手术方法(该专利关于这样的公开内容通过引用并入本文)。美国专利申请公开2007/0167918还描述了用于进行经鼓膜流体取样和药物施加的组合型耳抽吸器和药物分配器(该专利申请关于这样的公开内容通过引用并入本文)。

[0427] 在一些实施方案中,将本文提供的组合物施用给有此需要的受试者一次。在一些实施方案中,将本文提供的组合物施用给有此需要的受试者超过一次。在一些实施方案中,本文提供的组合物的第一次施用之后是本文提供的组合物的第二次、第三次、第四次或第五次施用。

[0428] 向有此需要的受试者施用化合物的次数取决于医学专业人员的判断、所述障碍、所述障碍的严重程度和受试者对制剂的应答。在一些实施方案中,将本文公开的化合物向有此需要的患有轻度急性病症的受试者施用一次。在一些实施方案中,将本文公开的化合物向有此需要的患有中度或严重急性病症的受试者施用超过一次。在受试者的病症没有改善的情况下,根据医生的判断,可以长期施用所述化合物,也就是说,持续延长的时间段,包括贯穿受试者的生命持续期间,以便缓解或者以其它方式控制或限制受试者的疾病或病症的症状。

[0429] 在受试者的状况确实改善的情况下,根据医生的判断,可以连续地施用所述化合物;备选地,可以将所施用的药物的剂量暂时减小或暂时停止一段时间(即,“休药期”)。休药期的时长在2天至1年之间变化,仅举例而言,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天和365天。在休药期期间的剂量减小可以为从10%至100%,仅举例而言,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%和100%。

[0430] 一旦受试者的听力和/或平衡已经改善,如果必要的话,可以施用维持剂量。随后,根据症状,任选将剂量或施用频率或二者减小至使改善的疾病、障碍或病症得以保留的水平。在某些实施方案中,在任何症状复发后,受试者需要长期的间歇性治疗。

[0431] 在某些实施方案中,药物制剂还可以含有选自以下的附加试剂:Notch激活剂、HDAC抑制剂、BMP4拮抗剂、Noggin(抑制BMP4)、Sox2、维生素D(骨化三醇)、维生素B(烟酰胺)、维生素A、维生素C(pVC)、Lgr4、p38/MAPK抑制、ROCK抑制和/或A1k4/7抑制。在某些实施方案中,药物制剂可还含有表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、或它们的组合。

[0432] 具有HDAC的组合物

[0433] 在某些实施方案中,药物制剂也可含有HDAC。在某些实施方案中,含有HDAC的药物制剂可以增强Lgr5+细胞的形成、控制分化、控制干性以及复制或恢复听力和肠道再生。

[0434] 在某些实施方案中,所述HDAC抑制剂是丙戊酸或其前药、酯、盐形式或酰胺。

[0435] 在某些实施方案中,所述HDAC抑制剂是含羧酸化合物。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是C₆-C₂₀羧酸,其中所述羧酸包含烷基、烯基或炔基。

[0436] 在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是取代的或未取代的C₅-C₂₀直链、支链或环

链烷基-CO₂H、取代的或未取代的C₅-C₂₀直链、支链或环链烯基-CO₂H和取代的或未取代的C₅-C₂₀直链、支链或环链炔基-CO₂H。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是取代的C₅-C₂₀直链或支链烷基-CO₂H。

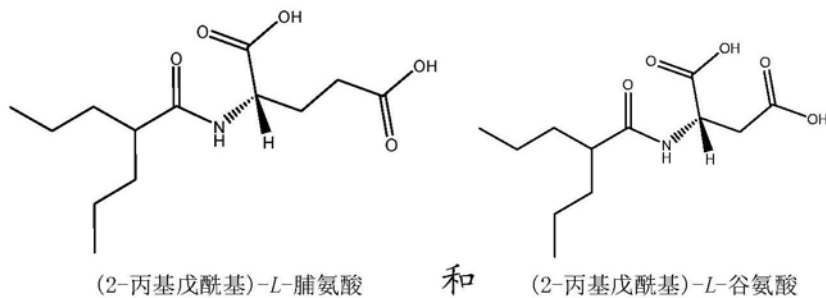
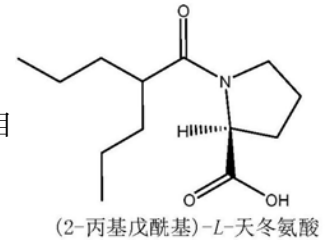
[0437] 在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是取代的C₅-C₂₀直链或支链烷基-CO₂H,其中取代基是-NH₂。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是氨基取代的2-丙基戊酸。在某些实施方案中,所述氨基取代的2-丙基戊酸选自5-氨基-2-丙基戊酸、4-氨基-2-丙基戊酸、3-氨基-2-丙基戊酸和2-氨基-2-丙基戊酸。

[0438] 在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是未取代的C₅-C₂₀直链或支链烷基-CO₂H。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是未取代的C₆-C₉支链直链烷基-CO₂H。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是未取代的C₈-C₉支链直链烷基-CO₂H。在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是未取代的C₈支链直链烷基-CO₂H。

[0439] 在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是丙戊酸。

[0440] 在某些实施方案中,所述含羧酸化合物是未取代的C₈支链直链烷基-CO₂H的前药形式,其中所述前药是酰胺或酯的形式。在某些实施方案中,未取代的C₈支链直链烷基-CO₂H的

酰胺是与氨基酸的缩合产物。在某些实施方案中,丙戊酸的酰胺选自



[0441] 在一些实施方案中,所述HDAC抑制剂是表1中所列抑制剂中的任一者。

[0442] 表1-HDAC抑制剂

[0443]

A 列	B 列	CAS 号
类别	试剂	
脂肪酸	丙戊酸	99-66-1
脂肪酸	苯基丁酸	1821-12-1
脂肪酸	丁酸	107-92-6
脂肪酸	2-(丙-2-炔-1-基)辛酸	96017-59-3
脂肪酸	(S)-2-(丙-2-炔-1-基)辛酸	185463-37-0
脂肪酸	(R)-2-(丙-2-炔-1-基)辛酸	185463-38-1
脂肪酸	2-(丙-2-炔-1-基)庚酸	176638-49-6
脂肪酸	(S)-2-(丙-2-炔-1-基)庚酸	185463-37-0
脂肪酸	(R)-2-(丙-2-炔-1-基)庚酸	185463-38-1
脂肪酸	2-氟-2-丙基戊酸	197779-85-4

[0444]

A 列	B 列	CAS 号
类别	试剂	
脂肪酸酯	AN-9	122110-53-6
胺	932718-22-4	932718-22-4
苯甲酰胺	恩替诺特 (Entinostat) (MS-275)	209783-80-2
苯甲酰胺	Mocetinostat (MGCD0103)	726169-73-9
苯甲酰胺	Tacedinaline	112522-64-2
苯甲酰胺	BML-210	537034-17-6
苯甲酰胺	NKL 22	537034-15-4
苯甲酰胺	RGFP109	1215493-56-3
苯甲酰胺	RGFP136	1215493-97-2
苯甲酰胺	RGFP966	1357389-11-7
苯甲酰胺	4SC-202	1186222-89-8
苯甲酰胺	HDAC 抑制剂 IV	537034-15-4
苯甲酰胺	西达本胺 (Chidamide)	743438-44-0
苯甲酰胺	TC-H 106, HDAC 抑制剂 VII	937039-45-7
环肽	罗米地辛 (Romidepsin)	128517-07-7
环肽	Trapoxin A	133155-89-2
环肽	HC 毒素	83209-65-8
环肽	Apicidin	183506-66-3
环肽	Thailandepsin A	1269219-30-8
环肽	二氢克林霉素 (Dihydrochlamydocin)	52574-64-8
环氧化物	(-)-Depudecin	139508-73-9
环氧化物	Parthenolide	20554-84-1
羟脲酸	曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA)	
羟脲酸	曲古菌素 A (Trichostatin A, TSA)	58880-19-6

[0445]

A 列	B 列	CAS 号
类别	试剂	
羟肟酸	SAHA (伏立诺他 (Zolinza, vorinostat))	149647-78-9
羟肟酸	4-碘-SAHA	1219807-87-0
羟肟酸	SBHA	38937-66-5
羟肟酸	CBHA	174664-65-4
羟肟酸	LAQ-824	591207-53-3
羟肟酸	PDX-101 (贝利司他 (belinostat))	866323-14-0
羟肟酸	LBH-589 (帕比司他 (panobinostat))	404950-80-7
羟肟酸	ITF2357 (吉维司他 (Givinostat))	497833-27-9
羟肟酸	PCI-34051	950762-95-5
羟肟酸	PCI-24781 (阿贝司他 (Abexinostat))	783355-60-2
羟肟酸	Tubastatin A	1252003-15-8
羟肟酸	CUDC-101	1012054-59-9
羟肟酸	Oxamflatin	151720-43-3
羟肟酸	ITF2357	497833-27-9
羟肟酸	丁苯羟肟酸 (Bufexamac)	2438-72-4
羟肟酸	APHA 化合物 8	676599-90-9
羟肟酸	HDAC 抑制剂 XXIV	854779-95-6
羟肟酸	Tubacin	537049-40-4
羟肟酸	羟基丁酰胺	4312-91-8
羟肟酸	MC 1568	852475-26-4
羟肟酸	SB939 (Pracinostat)	929016-96-6
羟肟酸	4SC-201 (Resminostat)	864814-88-0
羟肟酸	Tefinostat (CHR-2845)	914382-60-8
羟肟酸	CHR-3996	1256448-47-1
羟肟酸	NSC 57457	6953-61-3
羟肟酸	CG200745	936221-33-9
羟肟酸	ACY1215	1316214-52-4

[0446]

A 列	B 列	CAS 号
类别	试剂	
羟肟酸	Nexturastat A	1403783-31-2
羟肟酸	Droxinostat	99873-43-5
羟肟酸	Scriptaid	287383-59-9
羟肟酸	BRD9757	1423058-85-8
羟肟酸	HPOB	1429651-50-2
羟肟酸	CAY10603	1045792-66-2
羟肟酸	HDAC6 抑制剂 III	1450618-49-1
羟肟酸	M 344	251456-60-7
羟肟酸	4-(二甲基氨基)-N-[6-(羟基氨基)-6-氧代己基]-苯甲酰胺	193551-00-7
羟肟酸	(S)-HDAC-42	935881-37-1
羟肟酸	HNHA	926908-04-5
羟肟酸	Pyroxamide	382180-17-8
羟肟酸	HDAC 抑制剂 VI	926908-04-5
羟肟酸	HDAC 抑制剂 II	174664-65-4
羟肟酸	LMK235	1418033-25-6
羟肟酸	HDAC-IN-1	1239610-44-6
羟肟酸	VAHA	106132-78-9
酮 - CF ₃	化合物 6e	946500-31-8
酮 - CF ₃	化合物 6H	946500-39-6
酮 - CF ₃	化合物 27	946499-86-1
酮	化合物 43	891259-76-0
酮 - α -酮酰胺	436150-82-2	436150-82-2
聚酮	Rat jadone A	163564-92-9
硅烷醇	1587636-32-5	1587636-32-5
磺酰基脒	960130-17-0	960130-17-0
磺酰胺	1587636-33-6	1587636-33-6

[0447]

A 列	B 列	CAS 号
类别	试剂	
磺酰胺	329967-25-1	329967-25-1
硫醇	1428536-05-3	1428536-05-3
硫醇	908860-21-9	908860-21-9
硫醇	828920-13-4	828920-13-4
硫醇	1368806-68-1	1368806-68-1
硫醇	827036-76-0	827036-76-0
硫酯	TCS HDAC6 20b	956154-63-5
硫酯	PTACH	848354-66-5
硫酯	KD 5170	940943-37-3
硫酯	HDAC 抑制剂 XXII	848354-66-5
硫酮	SIRT1/2 抑制剂 VII	143034-06-4
环庚三烯酮	46189-88-2	46189-88-2
环庚三烯酮	1411673-95-4	1411673-95-4
非典型的	TMP269	1314890-29-3
非典型的	他喹莫德 (Tasquinimod)	254964-60-8

[0448] 用于本文公开的组合物和方法的各种实施方案中的HDAC抑制剂的类别包括但不限于表1的A列中列出的那些。用于本文公开的组合物和方法的各种实施方案的具体HDAC抑制剂包括但不限于表1的B列中列出的那些。表1的B列中列出的所有试剂应理解为包括其衍生物或药学上可接受的盐。表1的A列中列出的所有类别应理解为既包括包含该类的试剂也包括其衍生物或药学上可接受的盐。

[0449] 在某些实施方案中,含羧酸化合物的量介于至少2重量%(含羧酸化合物的重量/药物组合物的重量)至20重量%之间。在某些实施方案中,所述组合为包含至少4重量%的羧酸。在某些实施方案中,所述组合为包含至少8重量%的羧酸。在某些实施方案中,所述组合为包含至少12重量%的羧酸。在某些实施方案中,所述组合为包含至少16重量%的羧酸。在某些实施方案中,所述组合为包含至少20重量%的羧酸。

[0450] 具有BMP抑制剂的组合物

[0451] 在某些实施方案中,药物制剂也可含有BMP抑制剂。本文示出了BMP抑制剂的实例。其它实例描述于W02014138088A1和W02016054406A1中,将它们通过引用整体并入本文。

	BMP 抑制剂 II	1206711-16-1
	dorsomorphin	866405-64-3
[0452]	ML347	1062368-49-3
	LDN-193189	1062368-24-4

[0453] 具有TGF- β 抑制剂的组合物

[0454] 在某些实施方案中,药物制剂也可含有TGF- β 抑制剂。在某些实施方案中,含有TGF- β 抑制剂的药物制剂可以扩增前庭组织中的前庭细胞群体,包括接触所述前庭组织。在某些实施方案中,含有TGF- β 抑制剂的药物制剂在干细胞增殖测定中能够使干细胞增殖测定细胞群体中的支持细胞的数量增加至少10倍或至少50倍。在某些实施方案中,含有TGF- β 抑制剂的药物制剂在干细胞分化测定中能够从包含前庭支持细胞的细胞群体形成毛细胞。

[0455] 在一个实施方案中,TGF- β 抑制剂选自616452 (Repsox)、Galunisertib (LY2157299)、EW-719、IN-1130、EW-7203、EW-7195、SM16、R 268712、GW788388和PF-03671148。

[0456] 示例性的TGF- β 抑制剂列于表2中。TGF- β I型受体抑制剂包括但不限于2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶、[3-(吡啶-2-基)-4-(4-喹啉基)]-1H-吡唑和3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(4-喹啉基)-1-苯基硫代氨基甲酰基-1H-吡唑,其可购自Calbiochem公司(加利福尼亚州圣地亚哥市(San Diego, Calif.))。其它小分子抑制剂包括但不限于SB-431542(参见例如, Halder等人, 2005; Neoplasia 7(5):509-521)、SM16(参见例如, Fu, K等人, 2008; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 28(4):665)和SB-505124(参见例如, Dacosta Byfield, S., 等人, 2004; Molecular Pharmacology 65:744-52)等等。

[0457] 表2. TGF- β 抑制剂

类别	试剂	CAS号	别名
Tgf- β -R1 抑制剂	LY-364947	396129-53-6	616451, TGF- β RI 激酶抑制剂 I, [3-(吡啶-2-基)-4-(4-喹啉基)]-1H-吡唑, ALK5 抑制剂 I, LY-364947, HTS-466284
[0458] Tgf- β -R1 抑制剂	Repsox	446859-33-2	616452, TGF- β RI 激酶抑制剂 II, 2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶
Tgf- β -R1 抑制剂	SB-505124	356559-13-2	616453, TGF- β RI 激酶抑制剂 III, CAS 356559-13-2 2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-4-基-2-叔丁基-1H-咪唑-

[0459]

类别	试剂	CAS 号	别名
			4-基)-6-甲基吡啶 HCl, ALK5 抑制剂 III,
Tgf- β -R1 抑制剂	A-83-01	909910-43-6	616454, TGF- β RI 激酶抑制剂 IV - 3-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(4-喹啉基)-1-苯基硫代氨基酰基-1H-吡唑, A-83-01, ALK5 抑制剂 IV
Tgf- β -R1 抑制剂	SD-208	627536-09-8	616456, TGF- β RI 激酶抑制剂 V, 2-(5-氯-2-氟苯基)蝶啶-4-基)吡啶-4-基胺, SD-208, ALK5 抑制剂 V
Tgf- β -R1 抑制剂	SB-431542	301836-41-9	616461, TGF- β RI 激酶抑制剂 VI, 4-[4-(3,4-亚甲基二氧基苯基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺二水合物, 4-[4-(1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺二水合物
Tgf- β -R1 抑制剂	TGF- β RI 激酶抑制剂 VII	666729-57-3	616458, TGF- β RI 激酶抑制剂 VII, 1-(2-((6,7-二甲氧基-4-喹啉基)氧基)-(4,5-二甲基苯基)-1-乙酮, ALK5 抑制剂 VII
Tgf- β -R1 抑制剂	SB-525334	356559-20-1	616459, TGF- β RI 激酶抑制剂 VIII - SB-525334, 6-(2-叔丁基-5-(6-甲基-吡啶-2-基)-1H-咪唑-4-基)-喹喔啉, ALK5 抑制剂 VIII
Tgf- β -R1 抑制剂	TGF- β RI 激酶抑制剂 IX	1117684-36-2	616463, TGF- β RI 激酶抑制剂 IX, 4-((4-((2,6-二甲基吡啶-3-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)苯磺酰胺, ALK5 抑制剂 IX

[0460]

类别	试剂	CAS 号	别名
Tgf-β-R1 抑制剂	GW788388	452342-67-5	4-(4-(3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)吡啶-2-基)-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺
Tgf-β-R1 抑制剂	LY2109761	700874-71-1	7-(2-吗啉乙氧基)-4-(2-(吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)喹啉
Tgf-β-R1 抑制剂	Galunisertib (LY2157299)	700874-72-2	4-(2-(6-甲基吡啶-2-基)-5,6-二氢-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基)喹啉-6-甲酰胺
Tgf-β-R1 抑制剂	EW-7197	1352608-82-2	N-(2-氟苯基)-5-(6-甲基-2-吡啶基)-4-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基-1H-咪唑-2-甲胺
Tgfb 生成抑制剂	吡非尼酮 (Pirfenidone)	53179-13-8	5-甲基-1-苯基-2(1H)-吡啶酮,
Tgf-β-R1 抑制剂	K02288	1431985-92-0	3-[(6-氨基-5-(3,4,5-三甲氧基苯基)-3-吡啶基]苯酚
Tgf-β-R1 抑制剂	D 4476	301836-43-1	4-[4-(2,3-二氢-1,4-苯并二噁英-6-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯甲酰胺
Tgf-β-R1 抑制剂	R 268712	879487-87-3	4-[2-氟-5-[3-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]苯基]-1H-吡唑-1-乙醇
其它	ITD 1	1099644-42-4	4-[1,1'-联苯基]-4-基-1,4,5,6,7,8-六氢-2,7,7-三甲基-5-氧代-3-喹啉羧酸乙酯
Smad3 抑制剂	SIS3	1009104-85-1	1,2,3,4-四氢-6,7-二甲氧基-2-[(2E)-3-(1-苯基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)-1-氧代-2-丙烯基]-异喹啉盐酸盐
Tgf-β-R1 抑制剂	A77-01	909910-42-5	4-[5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]喹啉

[0461]

类别	试剂	CAS 号	别名
Tgf-β-R1 抑制剂	SM16	614749-78-9	4-(5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-4-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-咪唑-2-基)双环[2.2.2]辛烷-1-甲酰胺
Tgf-β-R1 抑制剂	LY-550410	737791-20-7	5,6-二氢-2-(2-吡啶基)-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-喹啉
Tgf-β-R1 抑制剂	LY-580276	476475-07-7	3-(4-氟苯基)-5,6-二氢-2-(6-甲基-2-吡啶基)-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑
Tgf-β-R1 抑制剂	EW-7203	1383123-98-5	3-[[[4-(6-甲基-2-吡啶基)-5-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基-2-噻唑基]氨基]甲基]-苯甲腈,
Tgf-β-R1 抑制剂	EW-7195	1352609-28-9	3-[[[5-(6-甲基-2-吡啶基)-4-[1,2,4]三唑并[1,5-a]吡啶-6-基-1H-咪唑-2-基]甲基]氨基]-苯甲腈
Tgf-β-R1 抑制剂	GW6604	452342-37-9	吡啶, 2-苯基-4-[3-(2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]-
Tgf-β-R1 抑制剂	化合物 3d	733806-89-8	4-喹啉胺, 2-(6-甲基-2-吡啶基)-N-4-吡啶基-
Tgf-β-R1 抑制剂	LY-566578	607738-00-1	吡啶, 2-[4-(4-氟苯基)-1H-吡唑-3-基]-6-甲基-
Tgf-β-R1 抑制剂	化合物 5	607738-02-3	苯酚, 4-[3-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]
Tgf-β-R1 抑制剂	化合物 3	676331-30-9	喹啉, 7-乙氧基-4-[3-(2-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]-
Tgf-β-R1 抑制剂	化合物 8b	705263-50-9	1H-苯并咪唑, 6-[5,6-二氢-2-(2-吡啶基)-4H-吡咯并[1,2-b]吡唑-3-基]-
Tgf-β-R1 抑制剂	化合物 4b	1308760-90-8	N-(3-氟苯基)-3-(6-甲基-2-吡啶基)-4-(6-喹啉基)-1H-吡唑-1-乙酰胺

[0462]

类别	试剂	CAS 号	别名
Tgf- β -R1 抑制剂	化合物 21b	1607465-38-2?	1H-吡唑-1-乙酰胺, N-(3-氟苯基)-3-(6-甲基-2-吡啶基)-4-[1, 2, 4]三唑并[1, 5-a]吡啶-6-基
Tgf- β -R1 抑制剂	PF-03671148	1378524-25-4	3-甲基-6-[1-(6-甲基-2-吡啶基)-1H-吡唑-5-基]-4(3H)-喹唑啉酮,
Tgf- β -R1 抑制剂	SB-203580	152121-47-6	吡啶, 4-[4-(4-氟苯基)-2-[4-(甲基亚磺酰基)苯基]-1H-咪唑-5-基]-
Tgf- β -R1 抑制剂	SB-202190	152121-30-7	4-[4-(4-氟苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]苯酚
Tgf- β -R1 抑制剂	IN-1130	868612-83-3	3-[[5-(6-甲基-2-吡啶基)-4-(6-喹啉基)-1H-咪唑-2-基]甲基]-苯甲酰胺,
Tgf- β -R1 抑制剂	IN-1233	1093952-95-4	3-[[5-(6-甲基-2-吡啶基)-4-(6-喹啉基)-1H-咪唑-2-基]甲基]-苯甲酰胺,
Tgf- β -R1 抑制剂	化合物 16i	864375-44-0	[[4-(6-苯并噻唑基)-5-(4-甲基-2-噻唑基)-1H-咪唑-2-基]甲基]-氨基甲酸 2-甲基丙酯
Tgf- β -R1 抑制剂	LDN-214117	1627503-67-6	1-[4-[6-甲基-5-(3, 4, 5-三甲氧基苯基)-3-吡啶基]苯基]-哌嗪
Tgf- β -R1 抑制剂	LDN-193189	1627503-67-6	CAS 1062368-24-4, 4-[6-[4-(1-哌嗪基)苯基]吡唑并[1, 5-a]嘧啶-3-基]-喹啉
Tgf- β -R1 抑制剂	化合物 12b	1415663-82-9	2-N-[(3-氟苯基)甲基]-4-(6-甲基-2-吡啶基)-5-[1, 2, 4]三唑并[1, 5-a]吡啶-6-基噻唑胺
Tgf- β -R1 抑制剂	化合物 6d	1630024-29-1	5-[[2-环丙基-6-(4-氟苯基)咪唑并[2, 1-b]-1, 3, 4-噻二

[0463]

类别	试剂	CAS 号	别名
			唑-5-基]亚甲基]-4-氧代-2-硫代-3-噻唑烷乙酸
Tgf- β -R1 抑制剂	SD-093		结构未知
Tgf- β -R1 抑制剂	Ki-26894		结构未知
Tgf- β -R1 抑制剂	NPC-30345		结构未知
Tgf- β -R1 抑制剂	SX-007		结构未知
Tgf- β -R1 抑制剂	SKI-2162		结构未知
其它	积雪草苷	16830-15-2	
Tgf- β 抗体	ID11		
Tgf- β 抗体	2G7		
Tgf- β 抗体	GC-1008		Fresolimumab
Tgf- β 抗体	CAT-152		Lerdelimumab
Tgf- β 抗体	CAT-192		Metelimumab
TGF- β 受体抗体	PF-03446962		
Tgf- β 抗体	SR-2F		
Tgf- β 抗体	2G7		
Tgf- β 抗体	LY2382770		
Tgf- β 抗体	IMC-TR1		
Tgf- β 抗体	STX-100		
TGF- β 拮抗剂	TGF-PRII: Fc		
重组蛋白	β 聚糖/TGF-PRIII		
寡核苷酸抑制剂	AP12009		Trabedersen, 反义分子
寡核苷酸抑制剂	AP11014		
寡核苷酸抑制剂	AP15012		
是否为 TGF β 抑制剂/是	LY-573636	519055-62-0	N-[(5-溴-2-噻吩基)磺酰基]-2,4-二氯-苯甲酰胺

类别	试剂	CAS 号	别名
	吡咯-咪唑聚酰胺		基因沉默
	美国专利 No. 7, 087, 626		作为药剂的吡咯衍生物
	美国专利 No. 6, 476, 031		作为药物的喹唑啉衍生物
	美国专利 No. 7, 723, 486, 和 EP 0945464		针对 TGF- β 的抗体
肽	Tryptopeptin A	1644153-72-9	
肽	Trx-xFoxH1b		Smad-相互作用肽适体
肽	Trx-Lef1		
肽	Distertide (p144)		
肽	p17		
肽	LSKL		
基于二氢吡咯并吡唑的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于咪唑的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于吡唑并吡啶的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于吡唑的骨架			参见美国专利 US 8298825 B1
基于咪唑并吡啶的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于三唑的骨架			参见美国专利 US 8298825 B1
基于吡啶并嘧啶的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
类别	试剂	CAS 号	别名
基于吡咯并吡唑的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于异噻唑的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		
基于噁唑的骨架	参见美国专利 US 8298825 B1		

[0464]

[0465]

[0466] 具有泊洛沙姆的组合物

[0467] 在某些实施方案中,本公开提供药物组合物,该组合物包含:a)本公开的化合物和b)泊洛沙姆。

[0468] 在某些实施方案中,该药物组合物的pH介于约5至约9之间。在某些实施方案中,该药物组合物的pH为约5、6、7、8或9。

[0469] 在某些实施方案中,在存在泊洛沙姆的情况下化合物的溶解度比在不存在泊洛沙姆的情况下化合物在相同pH下的溶解度高约3倍。在某些实施方案中,在存在泊洛沙姆的情况下化合物的溶解度比在不存在泊洛沙姆的情况下化合物在相同pH下的溶解度高约2倍、3倍、4倍或5倍。

[0470] 在某些实施方案中,药物制剂也可含有泊洛沙姆。泊洛沙姆是非离子三嵌段共聚物,其由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链、中心疏水链两侧的两个聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))亲水链组成。泊洛沙姆通常被认为是“功能赋形剂”,因为它们必需组分并且在制剂中起重要作用。

[0471] 在一些实施方案中,所述泊洛沙姆包含泊洛沙姆124、泊洛沙姆188、泊洛沙姆237、泊洛沙姆338或泊洛沙姆407中的至少一种。在一些实施方案中,所述泊洛沙姆包含泊洛沙姆124、泊洛沙姆188、泊洛沙姆237、泊洛沙姆338或泊洛沙姆407中的两种或更多种的混合物。在一些实施方案中,所述两种或更多种泊洛沙姆的混合物包含泊洛沙姆407和泊洛沙姆124。在另一个实施方案中,所述泊洛沙姆包含泊洛沙姆188和泊洛沙姆407或它们的混合物中至少一者。在一些实施方案中,所述泊洛沙姆是泊洛沙姆407。

[0472] 在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度介于约5重量%至约25重量%之间。在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度介于约10重量%至约23重量%之间。在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度介于约15重量%至约20重量%之间。在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度为大约17重量%。在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度为大约21重量%。

[0473] 在一些实施方案中,相对于所述组合物所述泊洛沙姆的浓度可以介于21重量%至40重量%之间。在另一个实施方案中,相对于组合物所述泊洛沙姆的浓度介于21重量%至30重量%之间。在另一个实施方案中,相对于组合物所述泊洛沙姆的浓度介于23重量%至29重量%之间。在另一个实施方案中,相对于组合物所述泊洛沙姆的浓度介于23重量%至27重量%之间。在另一个实施方案中,相对于组合物所述泊洛沙姆的浓度为25重量%。

[0474] 在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度高于约10°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度介于约11°C至约32°C之间。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度介于约15°C至约30°C之间。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度介于约20°C至约28°C之间。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度介于约24°C至约26°C之间。

[0475] 在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约15°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约20°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约24°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约26°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约28°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约30°C。在一些实施方案中,药物组合物的胶凝温度为约32°C。

[0476] 在某些实施方案中,本公开提供了胶凝温度高于10℃的药物组合物,该组合物包含:a)本公开的药物活性化合物;b)大于或等于药物组合物的21重量%的泊洛沙姆;c)HDAC抑制剂;其中该药物组合物的胶凝温度高于10℃。

[0477] 在某些实施方案中,本公开提供了胶凝温度高于10℃的药物组合物,该组合物包含:a)本公开的药物活性化合物;b)大于或等于药物组合物的21重量%的泊洛沙姆;c)含羧酸化合物;其中该药物组合物的胶凝温度高于10℃。

[0478] 实施例

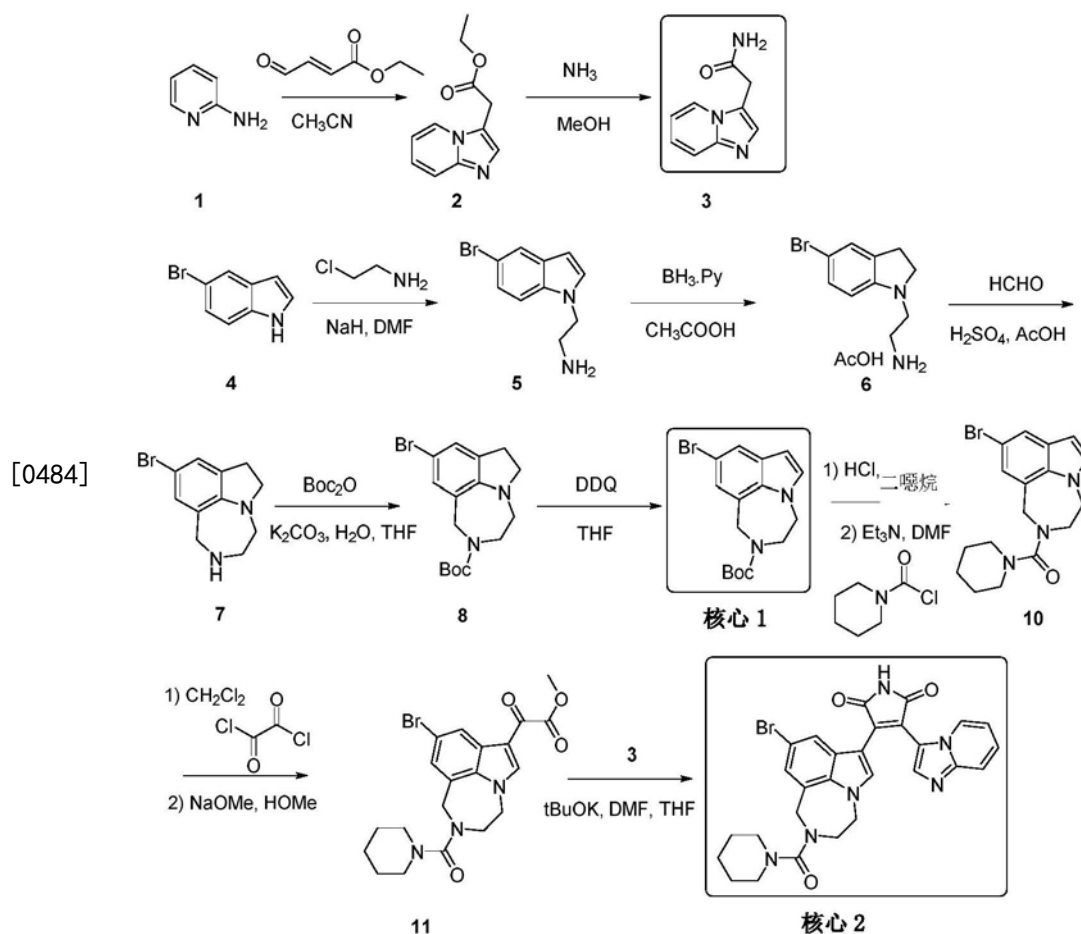
[0479] 一般实验方法

[0480] ^1H NMR谱在Bruker Avance III 400MHz和Bruker Fourier 300MHz上记录,并将TMS用作内标。

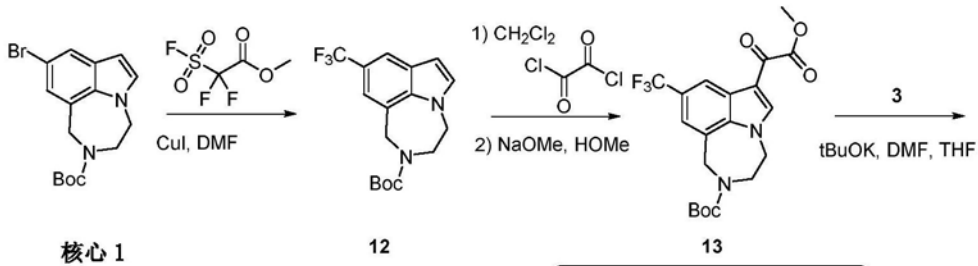
[0481] LCMS在Agilent LC/MSD 1200系列(柱:C18(50×4.6mm,5 μm))上的四极杆质谱仪上进行,以ES(+)或(-)电离模式操作;T=30℃

[0482] 合成方案

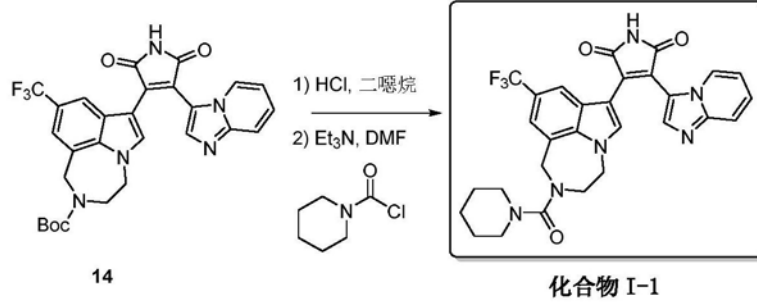
[0483] 合成方案1



[0485] 合成方案2

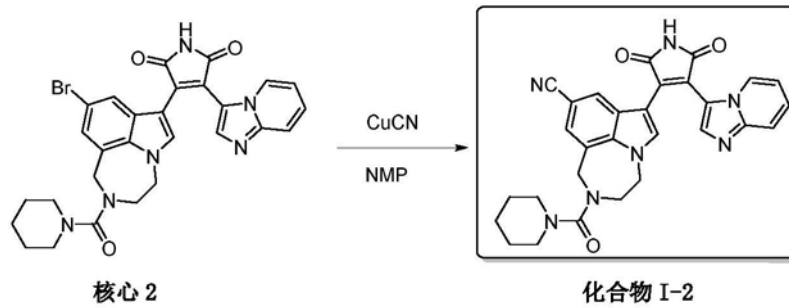


[0486]

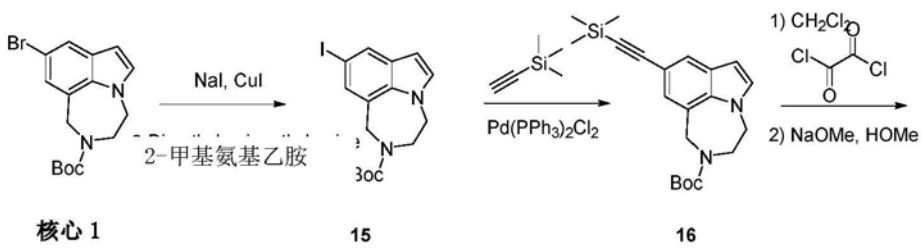


[0487] 合成方案3

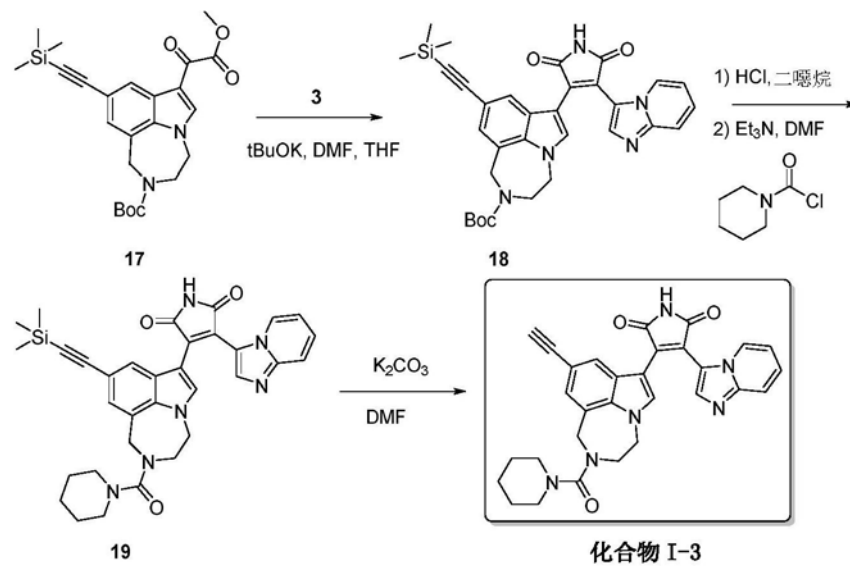
[0488]



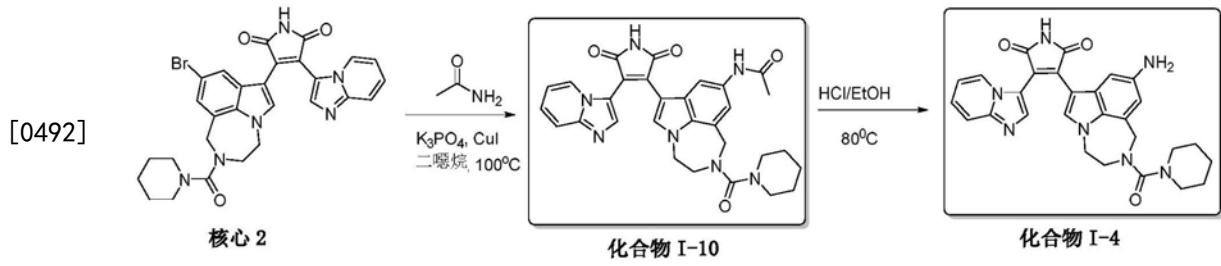
[0489] 合成方案4



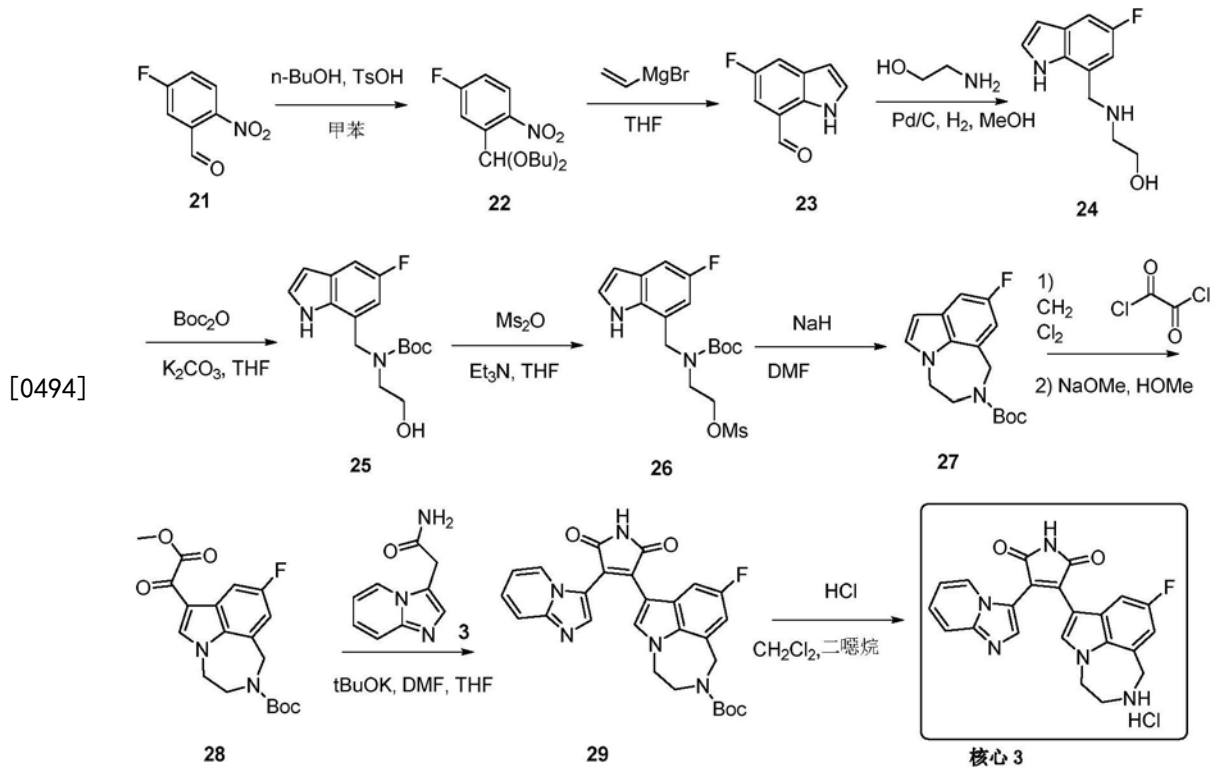
[0490]



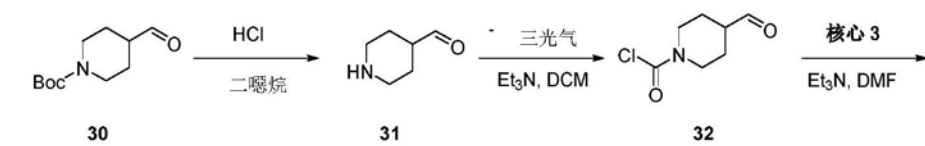
[0491] 合成方案5



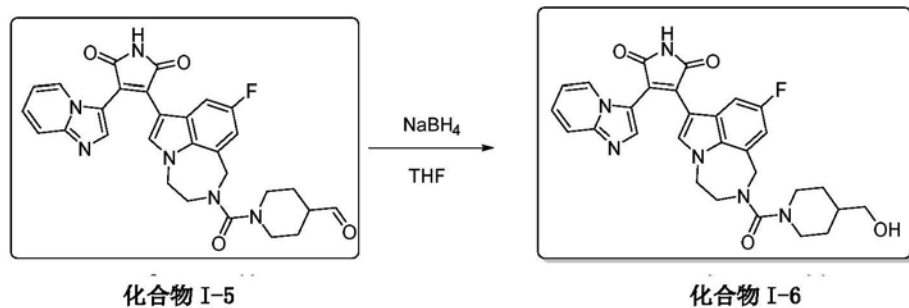
[0493] 合成方案6



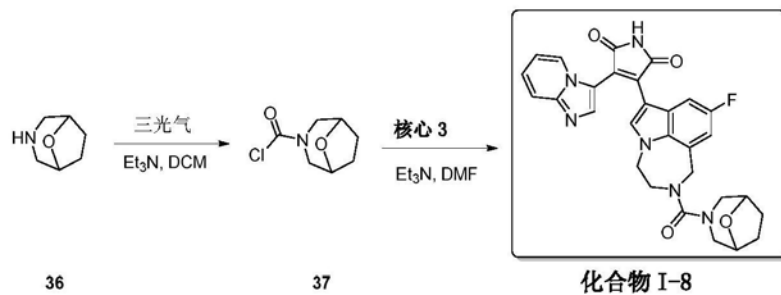
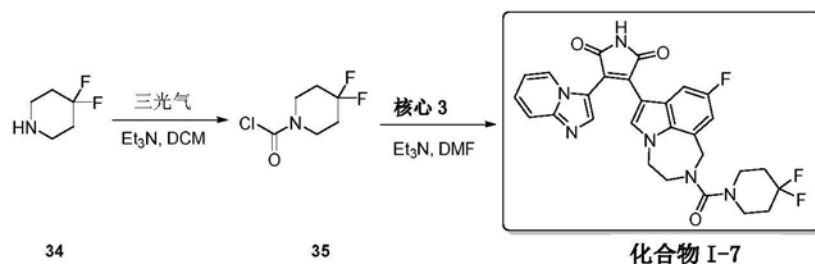
[0495] 合成方案7



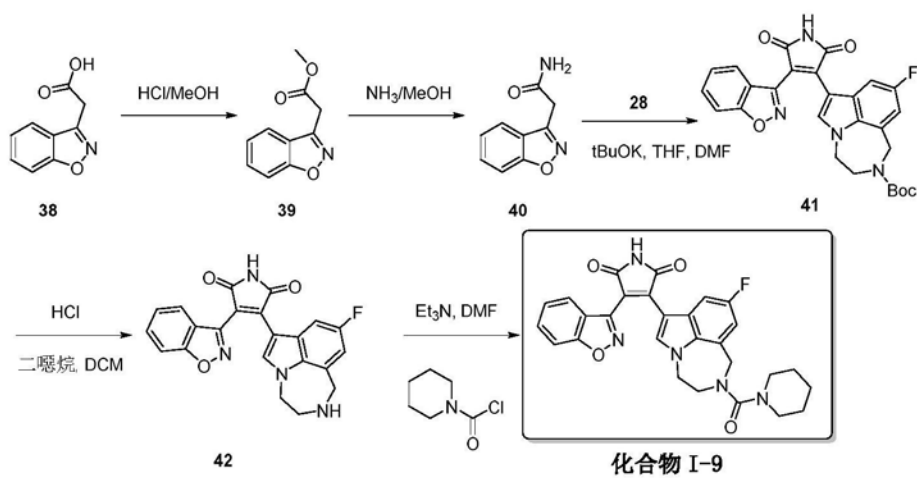
[0496]



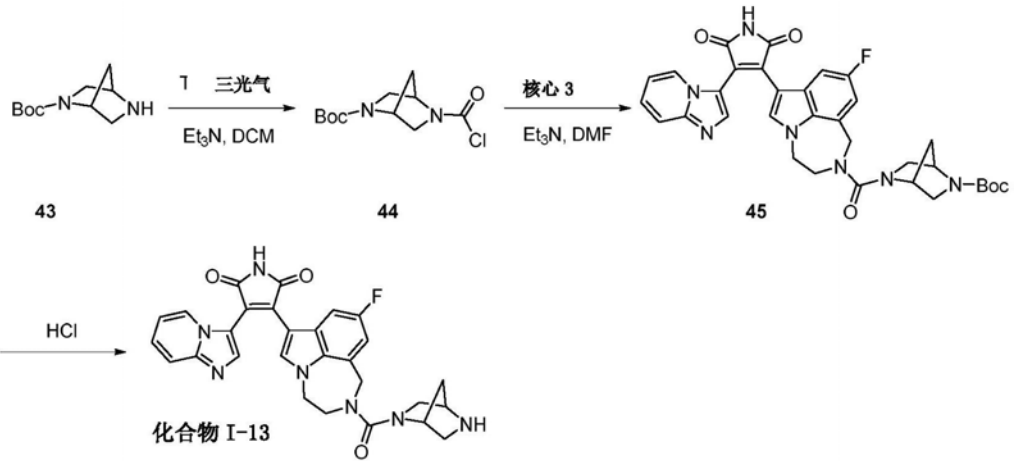
[0497] 合成方案8



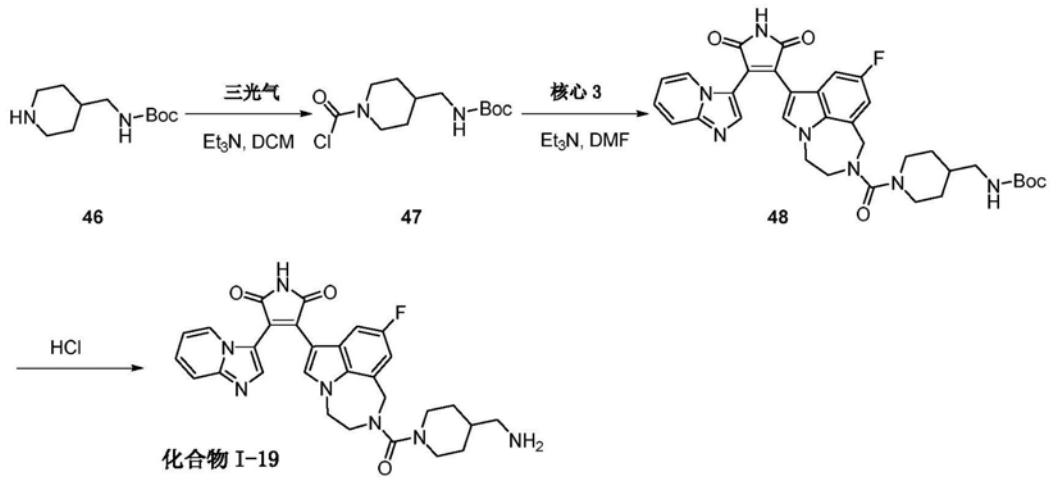
[0498]



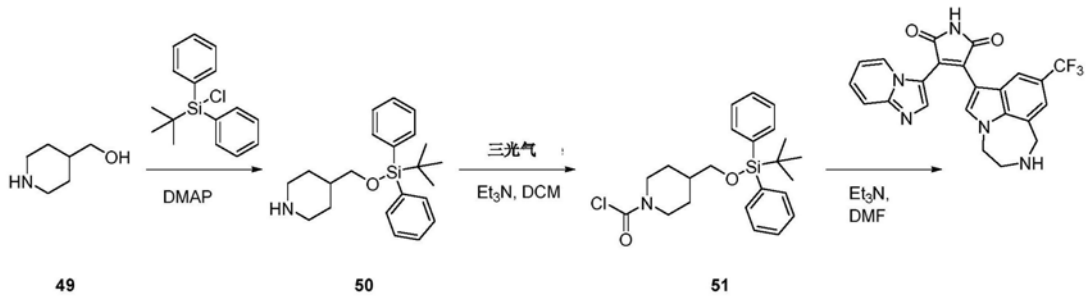
[0499] 合成方案9



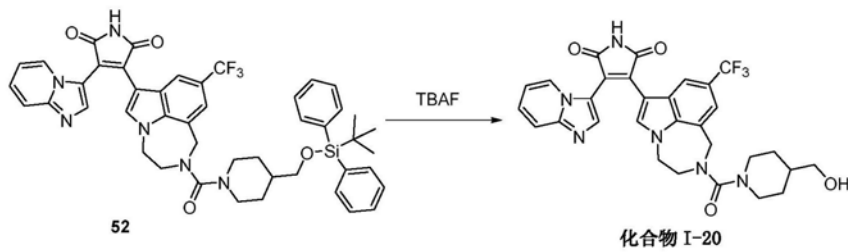
[0500]



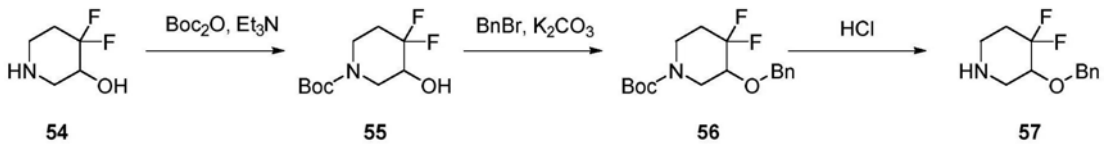
[0501] 合成方案10



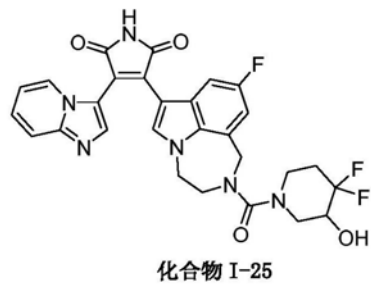
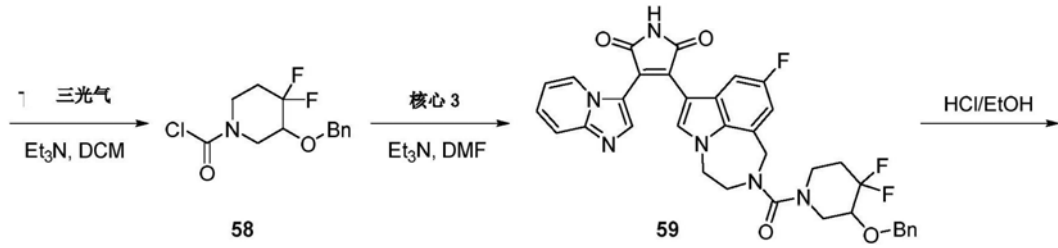
[0502]



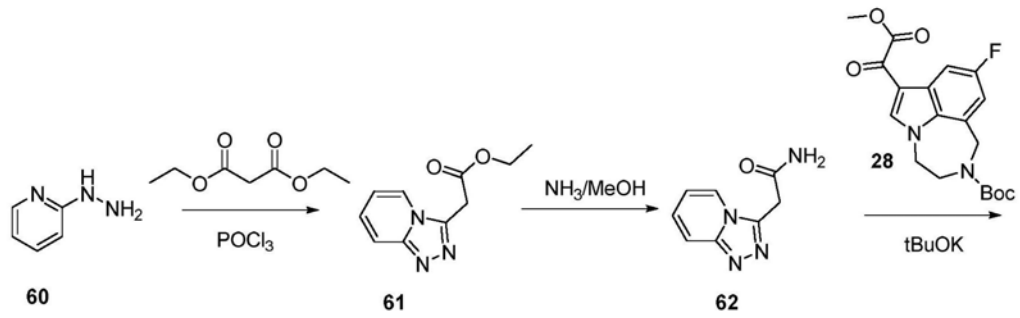
[0503] 合成方案11



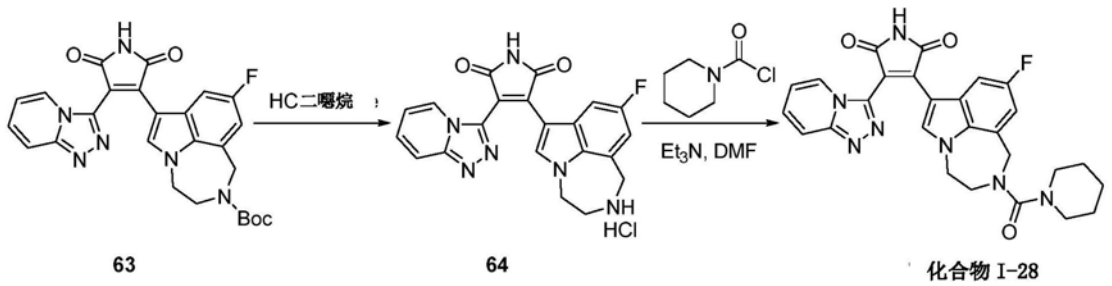
[0504]



[0505] 合成方案12

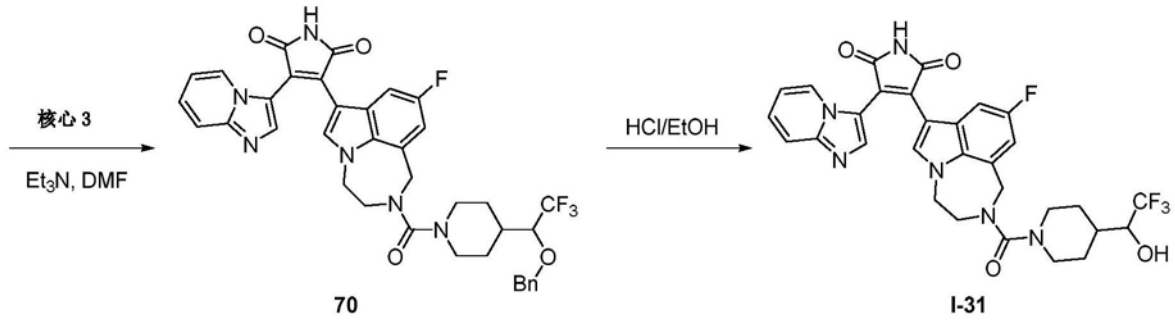
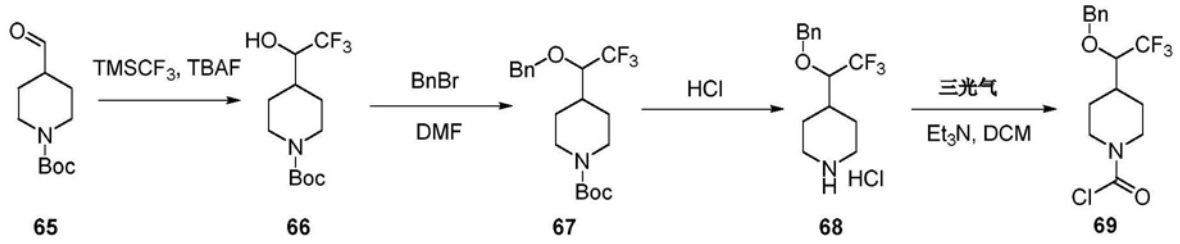


[0506]



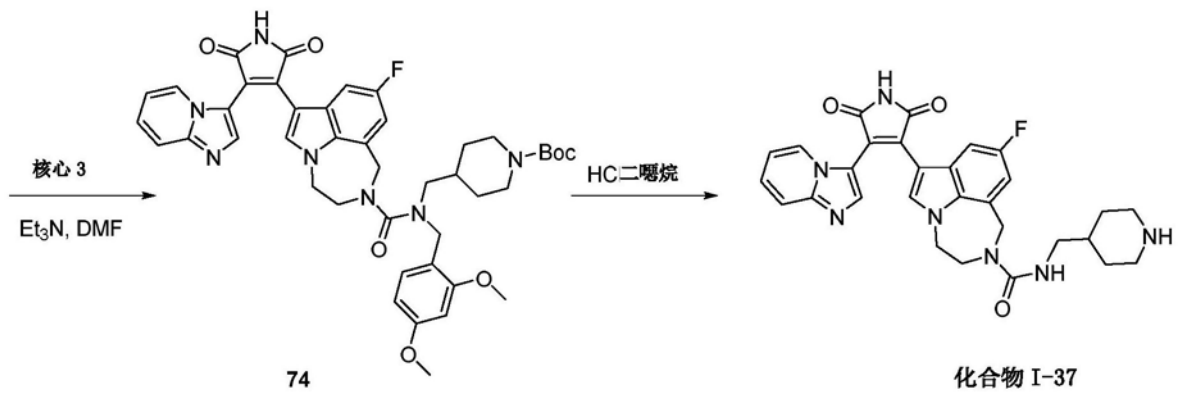
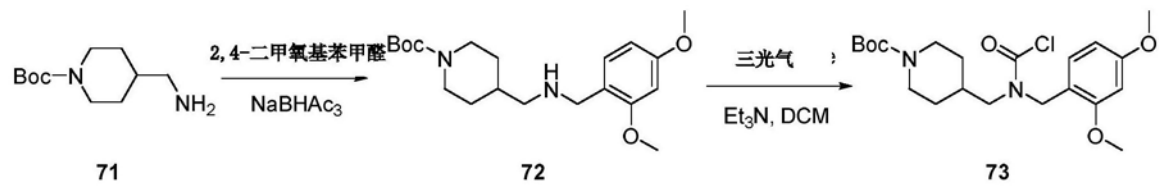
[0507] 合成方案13

[0508]



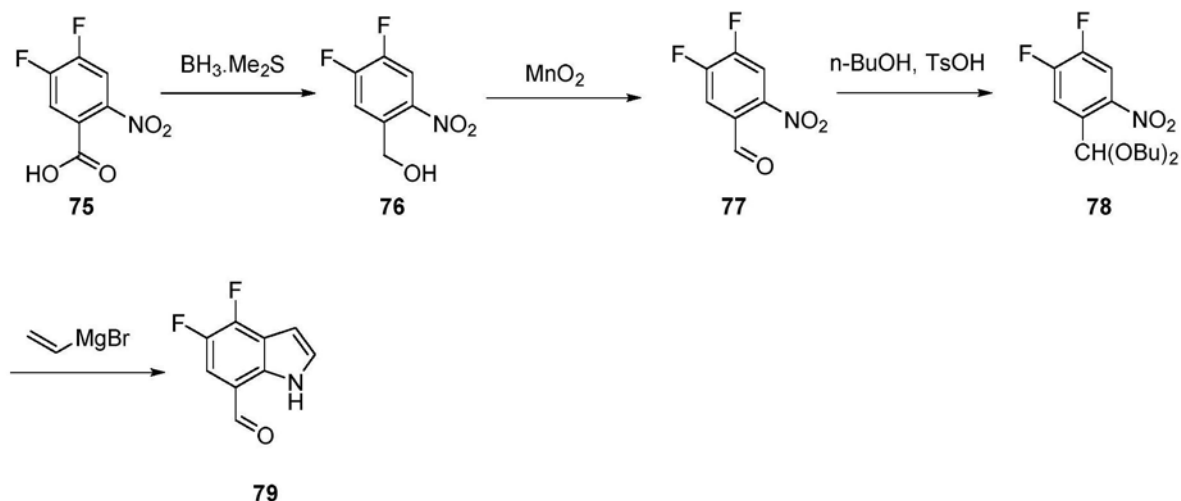
[0509] 合成方案14

[0510]



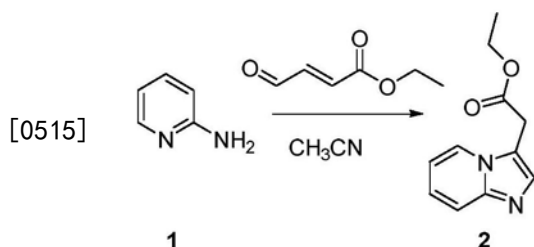
[0511] 合成方案15

[0512]



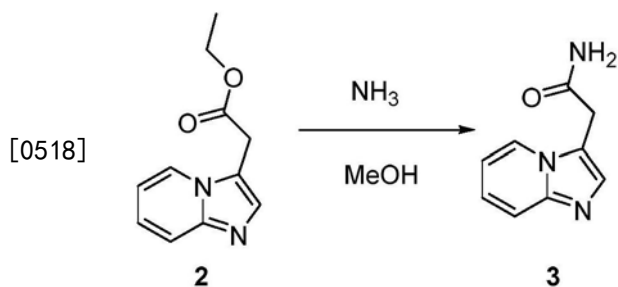
[0513] 实验程序:

[0514] 中间体2的合成.



[0515] 向中间体1 (20g, 213mmol) 在MeCN (540ml) 中的溶液添加 (E)-4-氧代-丁烯酸乙酯 (28.6g, 223mmol)。将该反应混合物加热至80℃并搅拌6小时。减压浓缩反应混合物, 通过快速柱色谱 (用1:0至200:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化残余物, 得到粗制中间体2 (25g) 的棕色固体。

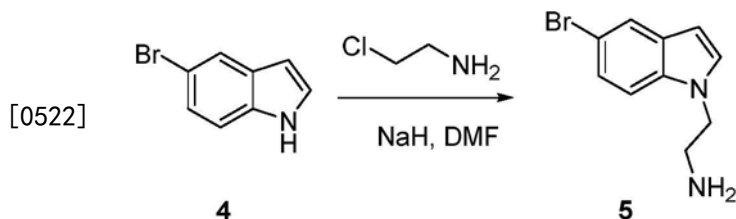
[0517] 中间体3的合成.



[0518] 向粗制中间体2 (25g) 在MeOH (100ml) 中的溶液添加NH₃/MeOH (6M, 100ml)。将该混合物在室温下搅拌过夜。将混合物倾注进EtOAc (500ml) 中, 然后过滤。将滤饼真空干燥以得到中间体3 (13g, 两个步骤为35%) 的棕色固体。

[0520] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 8.30 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.60 (s br, 1H), 7.54 (d, J=5.2Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.19-7.23 (m, 1H), 7.06 (s br, 1H), 6.89-6.93 (m, 1H), 3.80 (s, 2H)。

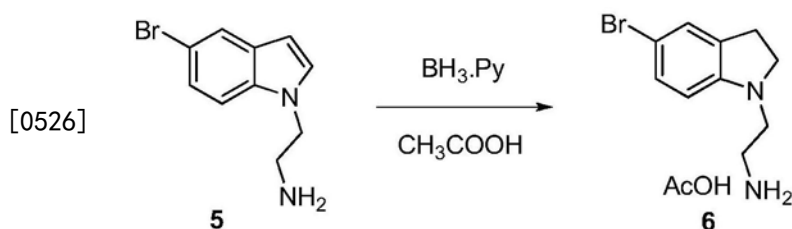
[0521] 中间体5的合成.



[0523] 0℃下向中间体4 (100g, 0.51mol) 在DMF (1000ml) 中的溶液添加NaH (60%, 61g, 1.53mol)。将该混合物在室温下搅拌20分钟。0℃下将2-氯乙胺盐酸盐 (89.2g, 0.77mol) 分批添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (石油醚/EtOAc=5/1) 显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (600ml × 3) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到中间体5 (110g, 90%) 的黄色油。

[0524] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 7.74-7.75 (d, 1H, J=1.2Hz) , 7.21-7.29 (m, 2H) , 7.13-7.14 (d, 1H, J=3.2Hz) , 6.44-6.45 (d, 1H, J=2.8Hz) , 4.14-4.17 (t, 2H, J=6Hz) , 3.08-3.11 (t, 2H, J=6Hz) 。

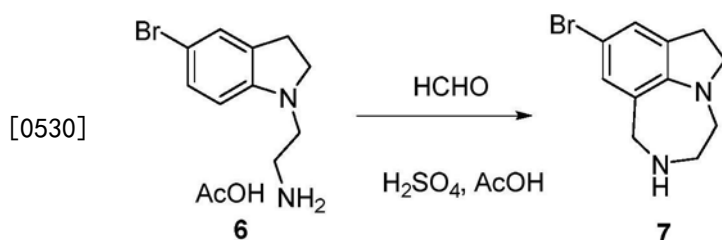
[0525] 中间体6的合成。



[0527] 在N₂下于室温向中间体5 (150g, 0.63mol) 在AcOH (720ml) 中的溶液添加硼烷-吡啶络合物 (9.3M, 135.5ml, 1.26mol)。将该混合物在室温下搅拌过夜。用NaOH水溶液将该混合物调节至pH=9-10, 用EtOAc (800ml × 3) 提取。真空浓缩合并的有机相而得到粗制化合物。将水 (720ml) 添加至该粗制化合物, 然后缓慢添加浓HCl (240ml)。将该混合物在室温下搅拌30分钟, 用NaOH水溶液调节至pH=10-11, 用EtOAc (800ml × 3) 提取, 浓缩而得到粗制化合物。室温下向该粗制化合物在甲基叔丁基醚 (500ml) 中的溶液添加AcOH (28ml)。将混合物在室温下搅拌30分钟, 然后过滤, 将滤饼用甲基叔丁基醚洗涤、干燥, 得到中间体6 (120g, 63.5%) 的白色固体。

[0528] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 7.14 (s, 1H) , 7.09-7.12 (d, 1H, J=8.4Hz) , 6.43-6.45 (d, 1H, J=8.4Hz) , 3.33-3.37 (t, 2H, J=8.4Hz) , 3.06-3.09 (t, 2H, J=6.6Hz) , 2.87-2.92 (t, 2H, J=8.4Hz) , 2.76-2.79 (t, 2H, J=6.6Hz) 。

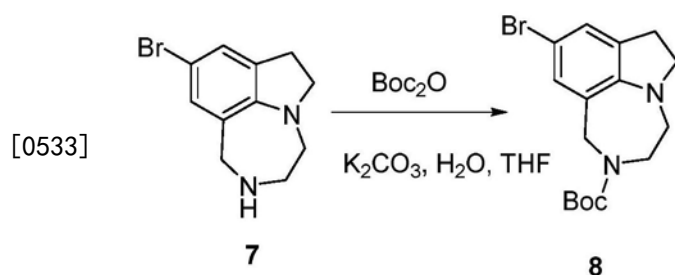
[0529] 中间体7的合成。



[0531] 室温下分批向H₂SO₄ (12.6ml) 在AcOH (80ml) 和HCHO (37%水溶液, 660ml) 中的溶液添加中间体6 (100g, 0.33mol)。将该混合物在50℃下搅拌20分钟。然后用NaOH水溶液将该混合物调节至pH=9-10, 用EtOAc (800ml × 3) 提取, 浓缩而得到粗制中间体7 (100g) 的黄色固

体,将其直接用于下一步而无需纯化。

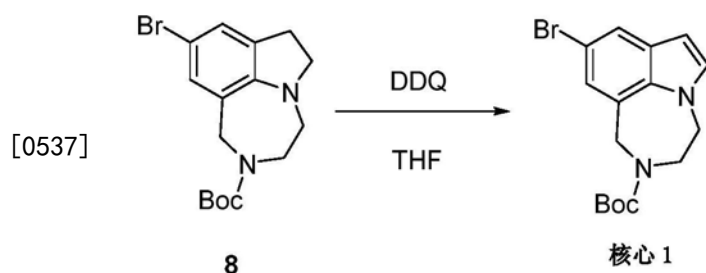
[0532] 中间体8的合成.



[0534] 室温下向中间体7 (100g,粗品) 和 K_2CO_3 水溶液 (300ml, 1M) 在THF (700ml) 中的混合物添加 $(Boc)_2O$ (94.4g)。将该混合物在室温下搅拌过夜。TLC (二氯甲烷/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后添加 H_2O , 用EtOAc (500ml \times 3) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用50:1至5:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体8 (75g, 两个步骤为64.6%) 的黄色固体。

[0535] 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ (ppm) 7.11 (bs, 1H) , 6.99 (bs, 1H) , 4.30-4.37 (m, 2H) , 3.68 (m, 2H) , 3.36-3.40 (m, 2H) , 2.96-3.01 (m, 4H) , 1.41 (s, 9H) 。

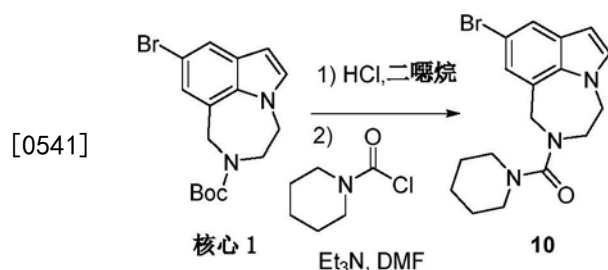
[0536] 核心1的合成.



[0538] 在 N_2 下于 $0^\circ C$ 向中间体8 (49g, 0.14mol) 在THF (490ml) 中的溶液添加DDQ (37.9g, 0.17mol) 在THF (490ml) 中的溶液。将该混合物在 $0^\circ C$ 下搅拌15分钟。TLC (石油醚/EtOAc=5/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进 Na_2CO_3 水溶液中并用EtOAc (400ml \times 2) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用50:1至10:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到核心1 (24g, 49%) 的黄色固体。

[0539] 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) : δ (ppm) 7.63 (bs, 1H) , 7.04-7.15 (m, 2H) , 6.46-6.47 (d, 1H, $J=3.2$ Hz) , 4.76-4.83 (m, 2H) , 4.25 (m, 2H) , 3.92 (m, 2H) , 1.42-1.45 (m, 9H) 。

[0540] 中间体10的合成

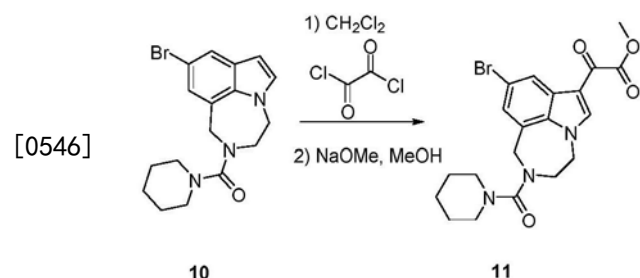


[0542] 室温下向核心1 (10g, 28.5mmol) 在二氯甲烷 (100ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (7M, 50ml)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (石油醚/EtOAc=5/1) 显示反应完成。真空浓缩溶剂而得到白色固体。

[0543] 在低于5℃下向该白色固体和1-哌啶酰氯(4.6g, 31.3mmol)在DMF(100ml)中的溶液添加Et₃N(8.6g, 85.5mmol)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC(二氯甲烷/MeOH=10/1)显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EA(200ml×4)提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(用20:1至1:1的石油醚/EtOAc洗脱)纯化该残余物而得到中间体10(7.5g, 72.8%)的黄色固体。

[0544] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ(ppm) 7.86(d, J=1.6Hz, 1H), 7.26(s, 1H), 7.02(t, J=1.6Hz, 1H), 6.47(d, J=3.2Hz, 1H), 4.63(s, 2H), 4.22-4.20(t, J=4.8Hz, 2H), 3.98-4.00(t, J=4.8Hz, 2H), 3.18-3.19(m, 4H), 1.58-1.40(m, 6H)。

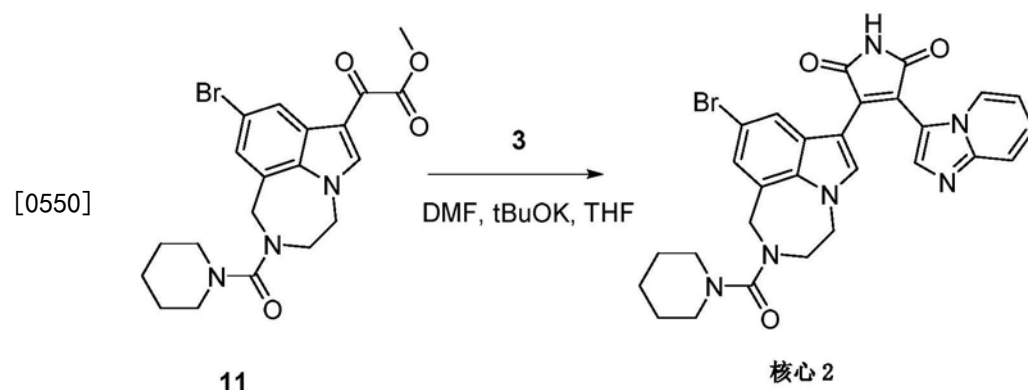
[0545] 中间体11的合成。



[0547] 在N₂下于0℃向中间体10(10g, 27.6mmol)在二氯甲烷(100ml)中的溶液添加(COCl)₂(8.8g, 69mmol)。将该混合物在40℃下搅拌1小时。TLC(石油醚/EtOAc=1/1)显示反应完成。然后在N₂下于-60℃添加NaOMe(3.7g, 69mmol)在MeOH(10ml)中的溶液。将该混合物在室温下搅拌1小时。添加水,用二氯甲烷(100ml×3)提取。将合并的有机相用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(用5:1至1:2的石油醚/EtOAc洗脱)纯化该残余物而得到中间体11(6g, 48.5%)的黄色固体。

[0548] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ(ppm) 8.70(d, J=1.6Hz, 1H), 8.29(s, 1H), 7.41(s, 1H), 4.67(s, 2H), 4.41-4.39(m, 2H), 4.01-3.98(m, 2H), 3.95(s, 3H), 3.15-3.01(m, 4H), 1.60-1.40(m, 6H)。

[0549] 核心2的合成。



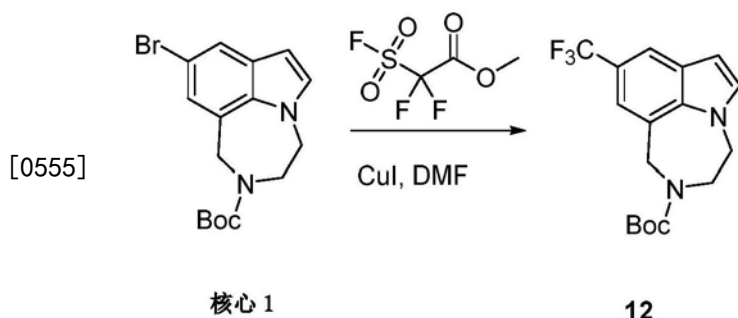
[0551] 0-10℃下向中间体11(10g, 22.3mmol)和中间体3(3.9g, 22.3mmol)在DMF(180ml)中的溶液添加t-BuOK(6.4g, 19.0mmol)在THF(100ml)中的溶液。将该混合物在0-10℃下搅拌15分钟。TLC(二氯甲烷/MeOH=15/1)显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc(100ml×4)提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(用10:5:1至1:1:1的石油醚/EtOAc/THF洗脱)纯化该残余物而得到核心2(6.5g,

50.7%)的橙色固体。

[0552] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.25 (s, 1H) , 8.02 (s, 1H) , 7.91 (s, 1H) , 7.65-7.68 (d, J=6.8Hz, 1H) , 7.59-7.61 (d, J=6.8Hz, 1H) , 7.19-7.23 (t, J=7.6Hz, 1H) , 7.04 (s, 1H) , 6.55-6.58 (t, J=6.4Hz, 1H) , 6.08 (s, 1H) , 4.63 (s, 2H) , 4.50-4.62 (m, 2H) , 3.82-3.86 (m, 2H) , 2.94-3.06 (m, 4H) , 1.40-1.60 (m, 6H) 。

[0553] LC/MS M+1=573.1

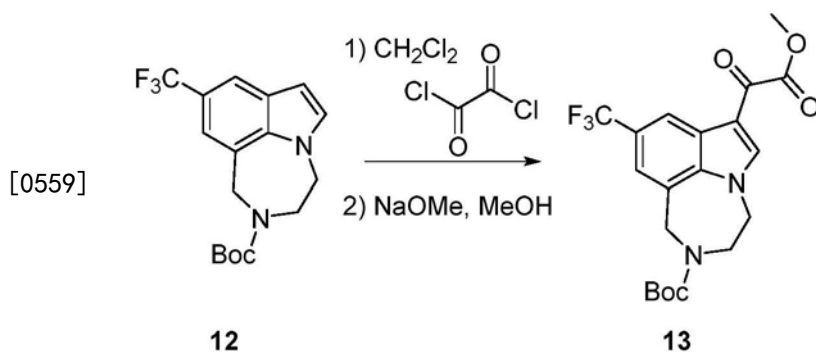
[0554] 中间体12的合成。



[0556] 在 N_2 下于室温向核心1 (10g, 28.5mmol) 在DMF (200ml) 中的溶液添加CuI (5.4g, 28.5mmol) 和2,2-二氟-2-(氟磺酰基) 乙酸甲酯 (19.2g, 100mmol) 。将该混合物在80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌2.5小时。TLC (石油醚/EtOAc=5/1) 显示反应完成。将该混合物冷却至室温, 并过滤。向滤液添加水并用EtOAc (100ml \times 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用20:1至5:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体12 (5.5g, 56.7%) 的黄色固体。

[0557] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 7.81 (s, 1H) , 7.13-7.28 (m, 2H) , 6.62 (s, 1H) , 4.92-4.84 (m, 2H) , 4.22 (s, 2H) , 3.98-3.97 (m, 2H) , 1.40 (s, 9H) 。

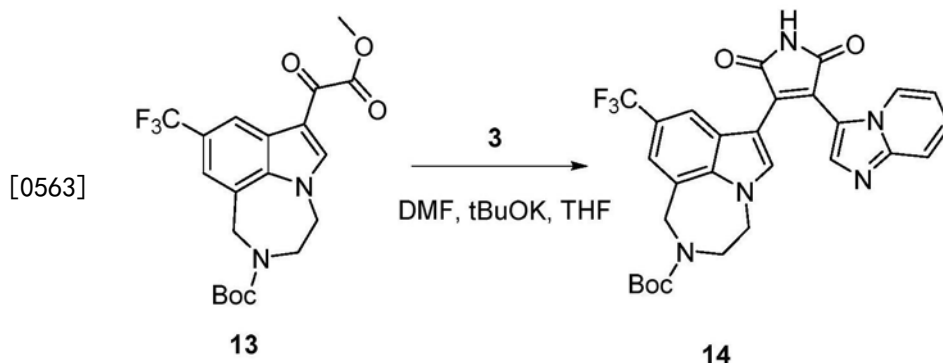
[0558] 中间体13的合成。



[0560] 在 N_2 下向中间体12 (5.0g, 14.7mmol) 在二氯甲烷 (75ml) 中的溶液添加 $(\text{COCl})_2$ (4.6g, 36.7mmol) 。将该混合物在40 $^\circ\text{C}$ 下搅拌1小时。TLC (石油醚/EtOAc=1/1) 显示反应完成。然后在 N_2 下于-60 $^\circ\text{C}$ 添加NaOMe (1.98g, 36.7mmol) 在MeOH (10ml) 中的溶液。将该混合物在室温下搅拌1小时。添加水, 用二氯甲烷 (100ml \times 3) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用10:1至5:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体13 (3.8g, 60.7%) 的黄色固体。

[0561] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 8.64 (s, 1H) , 8.44 (s, 1H) , 7.40-7.31 (m, 1H) , 4.98-4.88 (m, 2H) , 4.51-4.50 (m, 2H) , 4.04-4.01 (m, 2H) , 3.96 (s, 3H) , 1.40 (s, 9H) 。

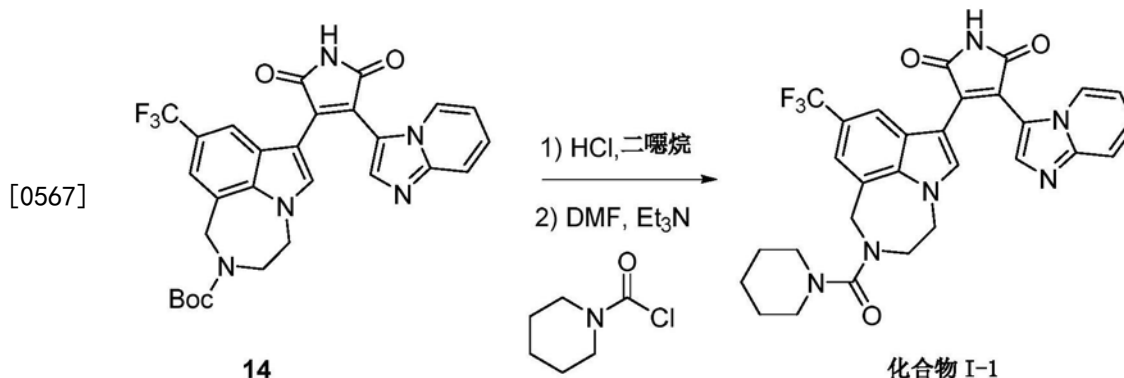
[0562] 中间体14的合成.



[0564] 0-10℃下向中间体13 (5.5g, 12.9mmol) 和中间体3 (2.25g, 12.9mmol) 在DMF (110ml) 中的溶液添加tBuOK (3.6g, 32.2mmol) 在THF (10ml) 中的溶液。将该混合物在0-10℃下搅拌15分钟。TLC (石油醚/EtOAc=1/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用100:1至30:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到中间体14 (3.5g, 58.3%) 的橙色固体。

[0565] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 8.16 (s, 1H) , 8.02 (s, 1H) , 7.96 (s, 1H) , 7.35 (s, 1H) , 7.27 (s, 1H) , 7.12-7.08 (m, 2H) , 6.40-6.38 (m, 2H) , 4.89-4.77 (m, 2H) , 4.50 (s, 2H) , 4.04 (s, 2H) , 1.48-1.37 (m, 9H) 。

[0566] 化合物I-1的合成.



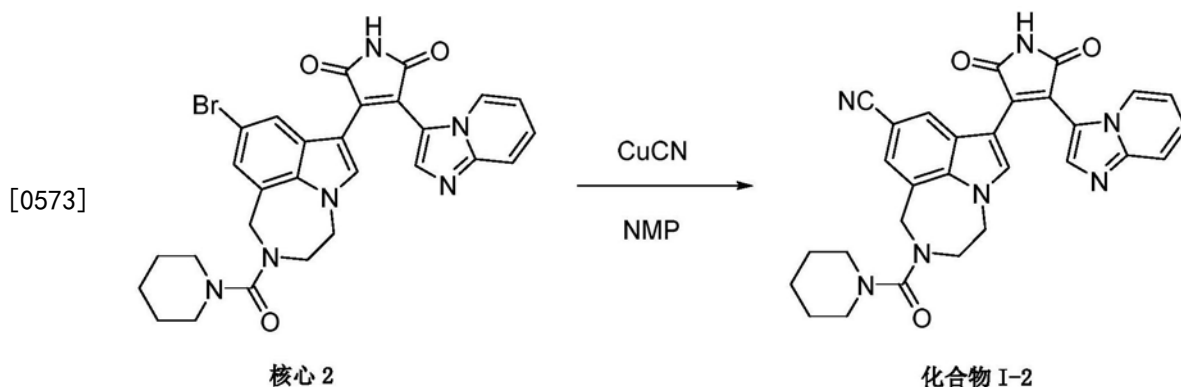
[0568] 室温下向中间体14 (5g, 9.1mmol) 在二氯甲烷 (50ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (50ml, 7M)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。真空浓缩溶剂而得到白色固体。

[0569] 室温下向该白色固体和1-哌啶酰氯 (1.8g, 12.3mmol) 在DMF (40ml) 中的溶液添加Et₃N (2.49g, 24.6mmol)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用20:1至10:1的二氯甲烷/THF洗脱) 纯化该残余物而得到化合物I-1 (3.0g, 70%) 的红色固体。

[0570] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 11.30 (s, 1H) , 8.17 (s, 1H) , 7.93 (s, 1H) , 7.64-7.60 (m, 2H) , 7.19 (s, 1H) , 6.56 (m, 1H) , 6.31 (s, 1H) , 4.77-4.69 (m, 2H) , 4.68-4.60 (m, 2H) , 3.95-3.85 (m, 2H) , 3.10-2.90 (m, 4H) , 1.55-1.35 (m, 6H) 。

[0571] LC/MS M+1563.1

[0572] 化合物I-2的合成.

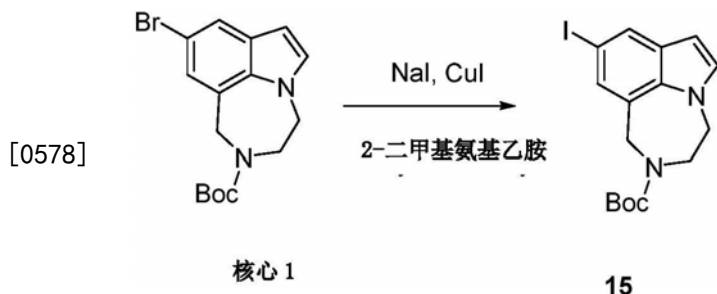


[0574] 室温下向核心2 (5g, 8.7mmol) 在N-甲基-2-吡咯烷酮 (50ml) 中的溶液添加CuCN (2.5g, 28mol)。在N₂下于150℃搅拌该混合物6小时。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml×4) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(用1:0至50:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到化合物I-2 (2.2g, 49%) 的橙色固体。

[0575] ¹H NMR (DMSO-d₆) : δ (ppm) 11.30 (s, 1H) , 8.07 (s, 1H) , 7.97 (s, 1H) , 7.66-7.68 (d, 1H, J=9.2Hz) , 7.54-7.56 (d, 1H, J=6.8Hz) , 7.29 (s, 1H) , 7.19-7.23 (t, J=8Hz, 1H) , 6.53-6.57 (t, 1H, J=6.8Hz) , 6.44 (s, 1H) , 4.68 (s, 4H) , 4.60-4.63 (m, 4H) , 3.84-3.88 (m, 2H) , 2.96-3.05 (m, 4H) , 1.43-1.47 (m, 6H) 。

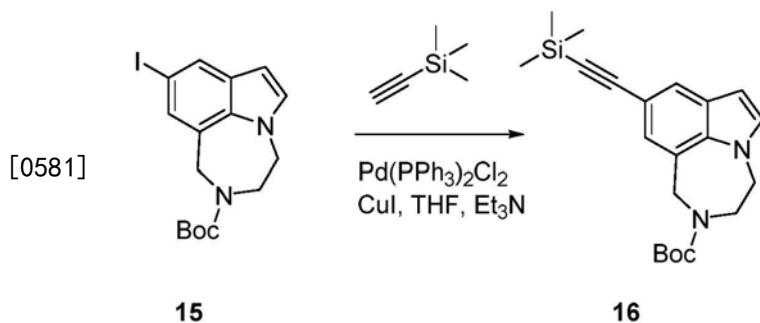
[0576] LC/MS M+1520.1

[0577] 中间体15的合成.



[0579] 向核心1 (50g, 0.14mol) 在1,4-二噁烷 (500ml) 中的溶液添加NaI (42.7g, 0.28mol) 和CuI (2.7g) 及2-二甲基氨基乙胺 (2.5g)。在N₂下于140℃搅拌该混合物过夜。将混合物过滤, 用二氯甲烷洗涤滤饼。真空浓缩合并的有机相。将残余物用甲基叔丁基醚洗涤而得到中间体15 (50g, 88.0%) 的黄色固体。

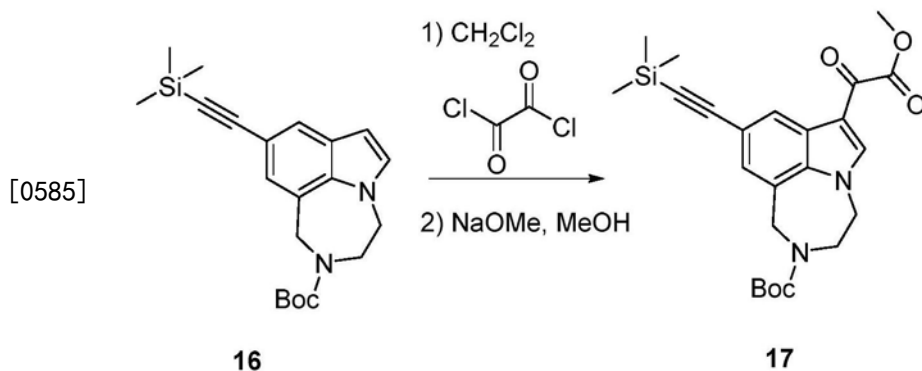
[0580] 中间体16的合成.



[0582] 室温下向中间体15 (10g, 25.1mmol) 在Et₃N (120ml) 和THF (60ml) 中的溶液, 然后在N₂下添加Pd (PPh₃)₂Cl₂ (1.2g, 2.4mmol) 和CuI (1.2g, 2.4mmol)。然后滴加乙炔基三甲基硅烷 (4.75g, 48.4mmol)。于60℃搅拌该混合物过夜。真空浓缩该混合物以移除Et₃N。然后将该混合物倾注进冰水中, 用CH₂Cl₂ (300ml × 2) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用100:1至50:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体16 (6g, 64.8%) 的黄色固体。

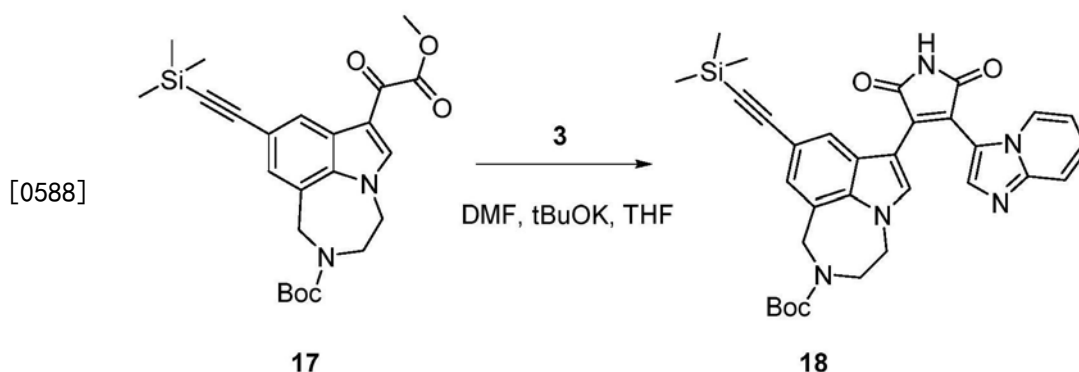
[0583] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 7.63–7.67 (m, 1H) , 7.04–7.41 (m, 2H) , 6.46–6.49 (m, 1H) , 4.77–4.84 (m, 2H) , 4.23–4.29 (m, 2H) , 3.90–3.97 (m, 2H) , 1.43 (s, 9H) , 0.26 (s, 9H)。

[0584] 中间体17的合成。



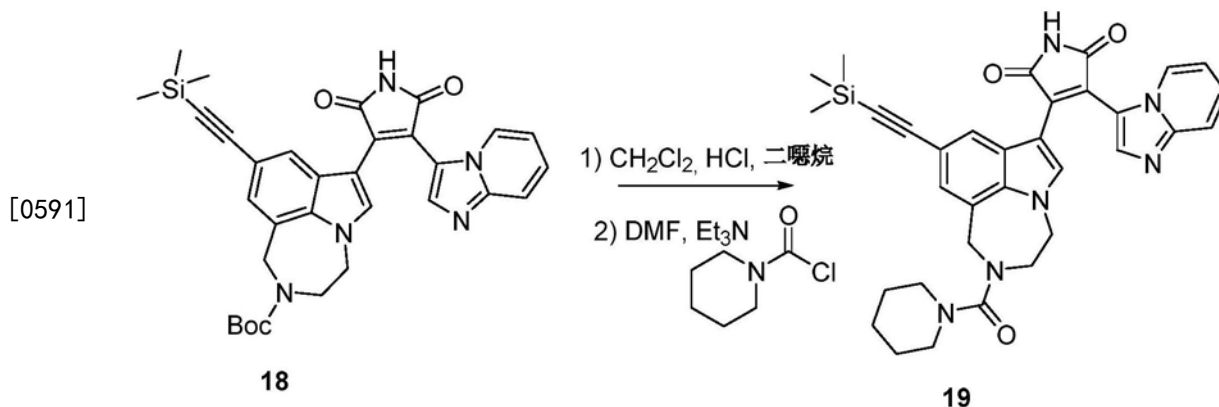
[0586] 在N₂下于0℃向中间体16 (10g, 27mmol) 在二氯甲烷 (110ml) 中的溶液添加(COCl)₂ (8.5g, 67.4mmol)。将该混合物在40℃下搅拌1小时。TLC (石油醚/EtOAc = 5/1) 显示反应完成。然后在N₂下于-60℃添加NaOMe (3.64g, 67.4mmol) 在MeOH (10ml) 中的溶液。将该混合物在室温下搅拌1小时。添加水, 用二氯甲烷 (100ml × 3) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用100:1至5:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体17 (7g, 56.7%) 的黄色固体。

[0587] 中间体18的合成。



[0589] 0–10℃下向中间体17 (8g, 17.6mmol) 和中间体3 (3.1g, 17.6mmol) 在DMF (80ml) 中的溶液添加tBuOK (4.9g, 44mmol) 在THF (30ml) 中的溶液。将该混合物在0–10℃下搅拌15分钟。TLC (石油醚/EtOAc = 1/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml × 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用100:1至50:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到中间体18 (5g, 49%) 的橙色固体。

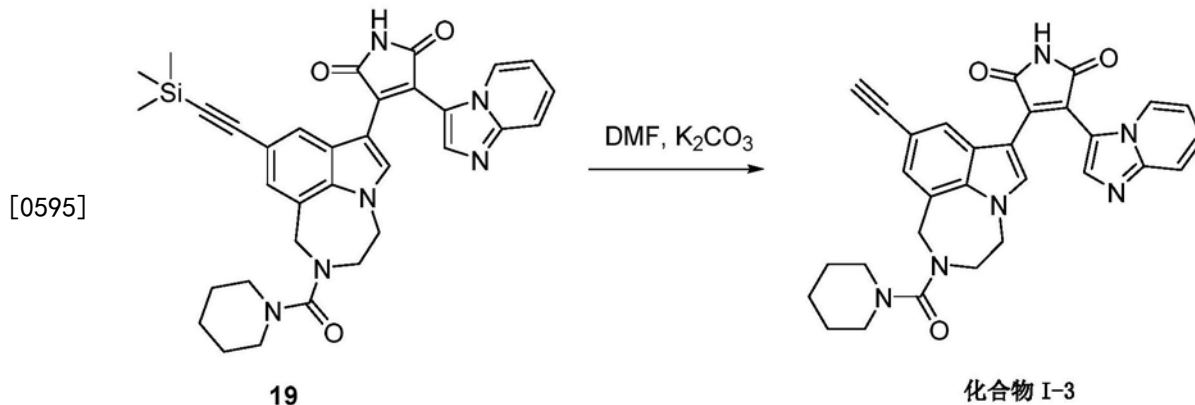
[0590] 中间体19的合成。



[0592] 室温下向中间体18 (5g, 8.6mmol) 在二氯甲烷 (50ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (50ml, 7M)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。真空浓缩溶剂而得到白色固体。

[0593] 室温下向该白色固体和1-哌啶酰氯 (1.4g, 9.5mmol) 在DMF (50ml) 中的溶液添加 Et_3N (2.6g, 25.8mmol)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml \times 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩而得到粗制中间体19 (5.2g), 将其直接用于下一步而无需纯化。

[0594] 化合物I-3的合成。

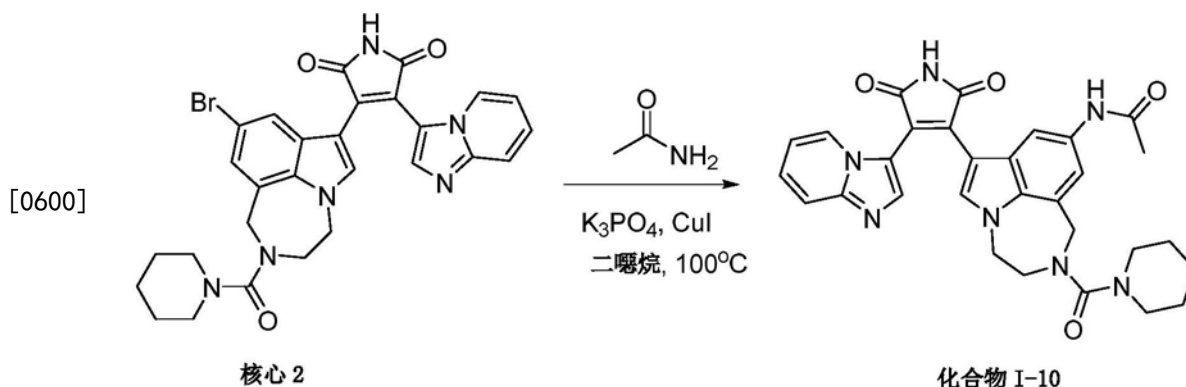


[0596] 向粗制中间体19 (5.2g) 在DMF (100ml) 中的溶液添加 K_2CO_3 (2g)。将该混合物加热至 50°C 并搅拌1小时。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml \times 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用100:1至30:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到化合物I-3 (3g, 两个步骤为18.6%) 的红色固体。

[0597] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.26 (s, 1H) , 8.02 (s, 1H) , 7.92 (s, 1H) , 7.65-7.59 (m, 2H) , 7.20 (t, 1H, $J=8\text{Hz}$) , 6.97 (s, 1H) , 6.58-6.55 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 1H) , 6.18 (s, 1H) , 4.63 (s, 2H) , 4.50-4.60 (m, 2H) , 3.80-3.90 (m, 2H) , 3.75 (s, 1H) , 2.95-3.05 (m, 4H) , 1.46-1.35 (m, 6H) 。

[0598] LC/MS $M+1519.2$

[0599] 化合物I-10的合成

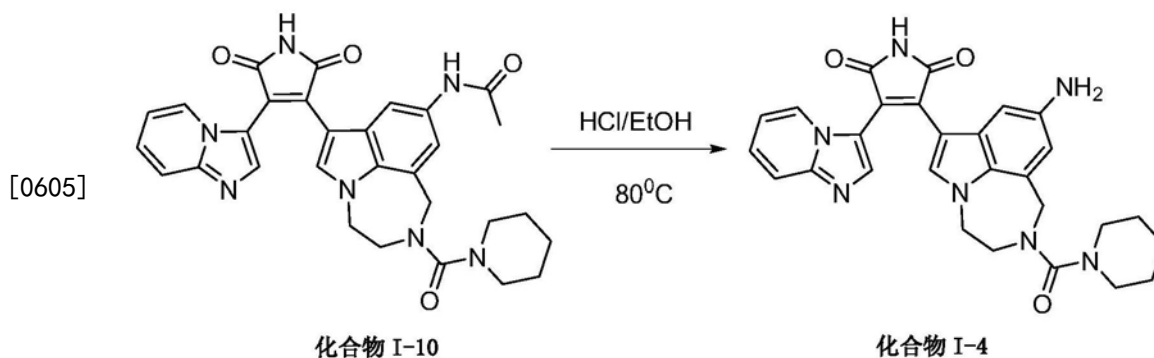


[0601] N₂下于室温向核心2 (5g, 8.8mmol) 在二噁烷 (50ml) 中的溶液添加乙酰胺 (3.1g, 53.3mmol)、CuI (1.1g, 5.8mmol)、K₃PO₃ (5.5g, 26.4mmol)。将该混合物在室温下搅拌20分钟。在N₂下添加N¹, N²-二甲基乙烷-1, 2-二胺 (1.56g, 17.8mmol), 然后将该混合物于115℃下搅拌5小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc/THF (3/1, 100ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用200:1至50:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到化合物I-10 (3g, 62%) 的红色固体。

[0602] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 11.21 (s, 1H) , 9.43 (s, 1H) , 7.86 (s, 1H) , 7.78 (s, 1H) , 7.58-7.64 (m, 2H) , 7.17-7.21 (t, 1H, J=8.0Hz) , 7.00 (s, 1H) , 6.77 (s, 1H) , 6.56-6.58 (t, 1H, J=7.2Hz) , 4.60 (s, 2H) , 4.40-4.50 (m, 2H) , 3.80-3.88 (m, 2H) , 2.88-3.12 (m, 4H) , 1.85 (s, 3H) , 1.15-1.20 (m, 6H) 。

[0603] LC/MS M+1552.2

[0604] 化合物I-4的合成。

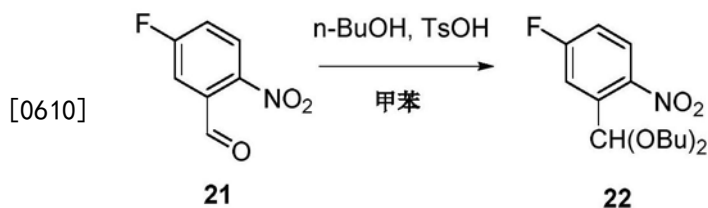


[0606] 室温下向化合物I-10 (3g, 5.4mmol) 在EtOH (10ml) 中添加HCl (28ml, 6N)。将该混合物在80℃下搅拌3小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用二氯甲烷 (100ml×2) 提取, 然后用Na₂CO₃水溶液将水相调节至PH=9-10, 用二氯甲烷 (100ml×6) 提取, 真空浓缩。将残余物用甲基叔丁基醚洗涤, 过滤。将滤饼真空干燥以得到化合物I-4 (2.1g, 75%) 的红色固体。

[0607] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 11.19 (s, 1H) , 7.86 (s, 1H) , 7.84 (s, 1H) , 7.62 (bs, 2H) , 7.18-7.22 (t, 1H, J=7.2Hz) , 6.57-6.61 (t, 1H, J=6.8Hz) , 6.24 (s, 1H) , 5.27 (s, 1H) , 4.50 (s, 2H) , 4.36-4.39 (m, 2H) , 4.14-4.17 (m, 2H) , 3.75-3.78 (m, 2H) , 2.88-3.05 (m, 4H) , 1.44-1.48 (m, 6H) 。

[0608] MS/LC M+1511.1

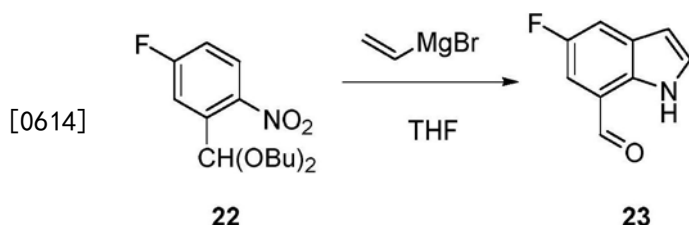
[0609] 中间体22的合成.



[0611] 室温下向中间体21 (100g, 0.59mol) 在干甲苯 (890ml) 中的溶液添加n-BuOH (131.6g, 1.78mol) 和TsOH (10g)。将该混合物在120℃下搅拌过夜,并用Dean-stark装置除去水。TLC(石油醚/EtOAc=5/1)显示反应完成。将该混合物真空浓缩而得到粗制中间体22。通过快速柱色谱(用100:1至20:1的石油醚/EtOAc洗脱)纯化该粗制中间体22而得到中间体22 (120g, 67.8%) 的黄色油。

[0612] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 7.89–7.92 (dd, 1H, $J=4.8\text{Hz}, 8.8\text{Hz}$), 7.51–7.54 (dd, 1H, $J=2.8\text{Hz}, 9.6\text{Hz}$), 7.09–7.14 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.50–3.56 (m, 4H), 1.55–1.62 (m, 4H), 1.33–1.42 (m, 4H), 0.83–0.93 (m, 6H)。

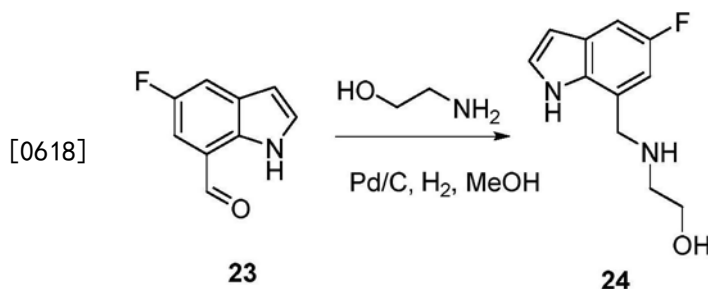
[0613] 中间体23的合成.



[0615] -40°C 下向中间体22 (50g, 0.17mol) 在干THF (1500ml) 中的溶液滴加乙烯基溴化镁溶液 (1M, 668.8ml, 668.8mmol)。将该混合物在 -40°C 下搅拌1小时。TLC(石油醚/EtOAc=5/1)显示反应完成。然后将该混合物倾注进 NH_4Cl 水溶液中,用EtOAc (300ml \times 3) 提取,将有机相浓缩而得到粗制化合物。通过快速柱色谱(用100:1至20:1的石油醚/EtOAc洗脱)纯化该粗制化合物而得到化合物 (24g) 的黄色油。室温下向该化合物 (24g) 在THF (100ml) 中的溶液滴加HCl (0.5N, 80ml)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC(石油醚/EtOAc=5/1)显示反应完成。用NaOH水溶液将该混合物调节至PH=10,用EtOAc (300ml \times 3) 提取,真空浓缩而得到中间体23 (16g, 58.8%) 的黄色固体。

[0616] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 10.06 (s, 1H), 7.62 (dd, 1H, $J=2\text{Hz}, 9.2\text{Hz}$), 7.38–7.41 (m, 2H), 6.60 (t, 1H, $J=2.4\text{Hz}$)。

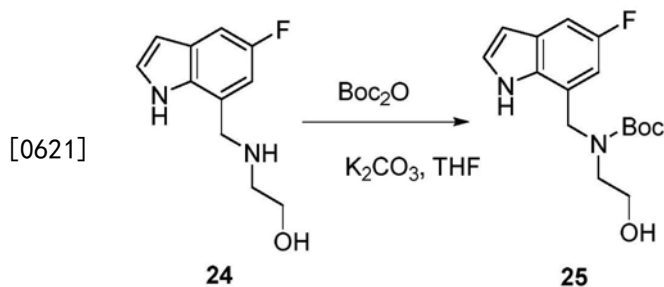
[0617] 中间体24的合成.



[0619] 在 N_2 下于室温向中间体23 (140g, 0.86mol) 在MeOH (2100ml) 中的溶液添加2-氨基乙醇 (78g, 1.3mol) 和Pd/C (14g)。在 N_2 下于室温搅拌该混合物2小时。然后在 H_2 下于室温将该

混合物搅拌过夜。将混合物过滤、浓缩而得到中间体24 (200g, 粗品) 的黄色油, 将其直接用于下一步而无需纯化。

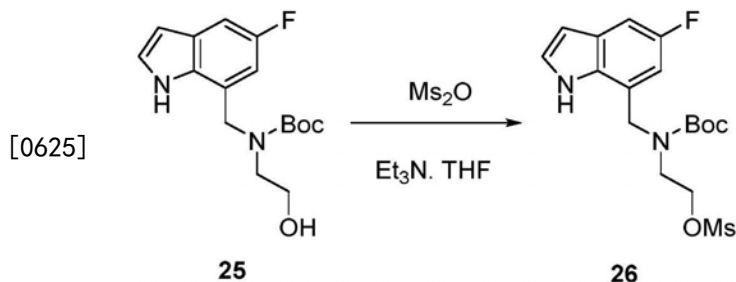
[0620] 中间体25的合成.



[0622] 室温下向中间体24 (90g, 粗品) 和 K_2CO_3 (467ml, 1M) 在THF (1300ml) 中的混合物添加 Boc_2O (141g)。将该混合物在室温下搅拌过夜。TLC (二氯甲烷/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后添加 H_2O , 用EtOAc (500ml \times 3) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用10:1至1:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体25 (66.6g, 两个步骤为56%) 的黄色油。

[0623] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 10.17 (s, 1H) , 7.23-7.26 (m, 2H) , 6.78-6.82 (dd, 1H, $J=9.2\text{Hz}$, $J=2\text{Hz}$) , 6.48-6.50 (t, 1H, $J=2.4\text{Hz}$) , 4.67 (s, 2H) , 3.66-3.71 (m, 2H) , 3.25-3.5 (m, 2H) , 1.40 (s, 9H) 。

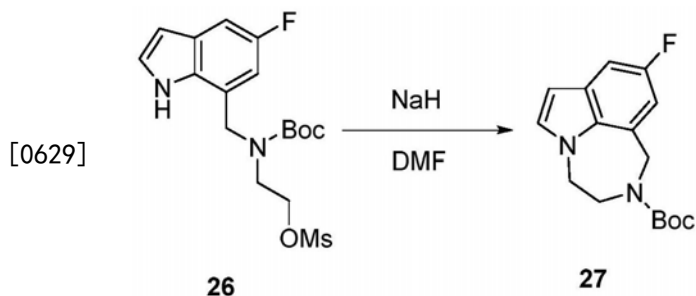
[0624] 中间体26的合成.



[0626] 在 N_2 下于 0°C 向中间体25 (50g, 0.26mol) 在THF (1000ml) 中的溶液添加 Et_3N (79g, 0.79mol) 和 Ms_2O (55g, 0.32mol)。将该混合物在 0°C 下搅拌2小时。TLC (石油醚/EtOAc=3/1) 显示反应完成。然后将其倾注进冰水中并用EtOAc (400ml \times 2) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩而得到中间体26 (50g, 79%) 的黄色油。

[0627] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) : δ (ppm) 10.08 (bs, 1H) , 7.24-7.29 (m, 2H) , 6.81-6.84 (m, 1H) , 6.49-6.50 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$) , 4.67 (s, 2H) , 4.28-4.31 (m, 2H) , 3.48-3.52 (m, 2H) , 2.79 (s, 3H) , 1.51 (s, 9H) 。

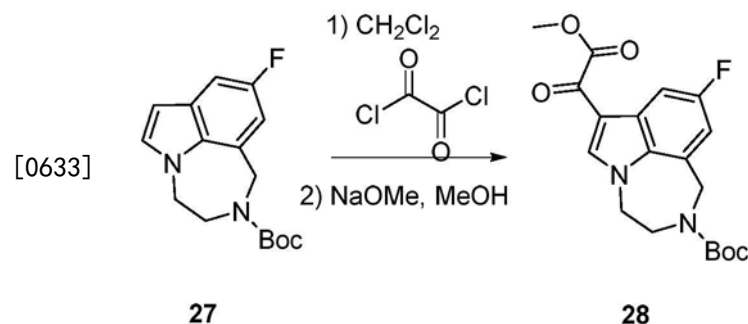
[0628] 中间体27的合成.



[0630] 0℃下向中间体26 (65g, 0.19mol) 在DMF (722ml) 中的溶液添加NaH (60%, 11.5g, 0.29mol)。在N₂下于0℃搅拌该混合物1小时。TLC (石油醚/EtOAc=3/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (500ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用50:1至10:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体27 (26g, 53.2%) 的黄色固体。

[0631] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 7.14-7.16 (d, 1H, J=8Hz) , 7.07 (s, 1H) , 6.72-6.83 (m, 1H) , 6.48-6.49 (d, 1H, J=2.8Hz) , 4.844.76 (s, 2H) , 4.24-4.25 (m, 2H) , 3.94 (m, 2H) , 1.45-1.48 (m, 9H) 。

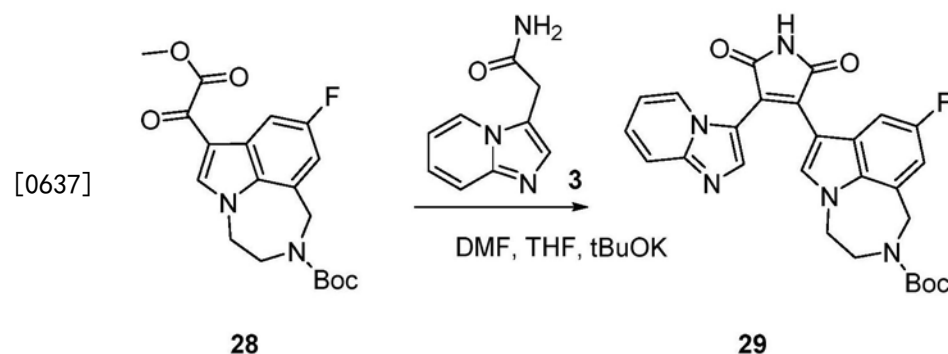
[0632] 中间体28的合成。



[0634] 在N₂下于0℃向中间体27 (27.5g, 95.0mmol) 在二氯甲烷 (900ml) 中的溶液添加(COCl)₂ (18g, 142mmol)。将该混合物在0℃下搅拌2小时。TLC (石油醚/EtOAc=1/1) 显示反应完成。然后在N₂下于-60℃添加NaOMe (13.4g, 247mmol) 在MeOH (40.8ml) 中的溶液。将该混合物在室温下搅拌1小时。添加水, 用二氯甲烷 (200ml×3) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用20:1至1:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体28 (20g, 56%) 的白色固体。

[0635] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 8.37 (s, 1H) , 8.02-8.04 (d, 1H, J=8.4Hz) , 6.84-6.91 (m, 1H) , 4.80-4.90 (m, 2H) , 4.44 (bs, 2H) , 3.91-3.98 (m, 5H) , 1.41-1.46 (m, 9H) 。

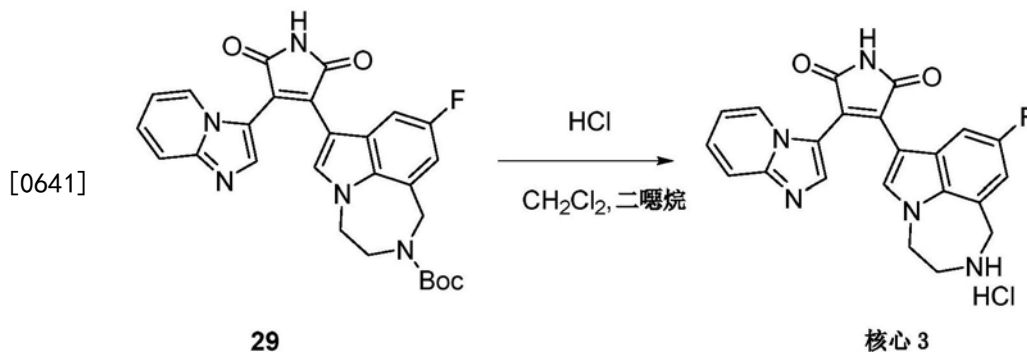
[0636] 中间体29的合成。



[0638] 0-10℃下向中间体28 (10g, 26.5mmol) 和中间体3 (4.6g, 26.5mmol) 在DMF (120ml) 中的溶液添加tBuOK (7.4g, 66.2mmol) 在THF (100ml) 中的溶液。将该混合物在0-10℃下搅拌15分钟。TLC (石油醚/EtOAc=1/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用20:1至1:1的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体29 (7g, 52.5%) 的红色固体。

[0639] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.07 (s, 1H) , 8.02-8.01 (d, 1H, J=4Hz) , 8.96 (s, 1H) , 7.61-7.63 (t, 1H, J=8.8Hz) , 7.45 (s, 1H) , 7.17 (s, 1H) , 6.57-6.64 (m, 1H) , 6.47-6.49 (d, 1H, J=8Hz) , 5.77-5.80 (d, 1H J=8.4Hz) , 4.734.78 (2H) , 4.52 (bs, 2H) , 3.96 (bs, 2H) , 1.25-1.44 (m, 9H) 。

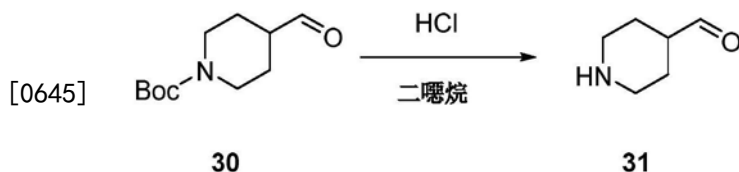
[0640] 核心3的合成。



[0642] 室温下向中间体29 (5g, 9.9mmol) 在二氯甲烷 (50ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (50ml, 7M)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。真空浓缩溶剂。将残余物用甲基叔丁基醚洗涤, 过滤。将滤饼真空干燥以得到核心3 (4g, 91.9%) 的橙色固体。

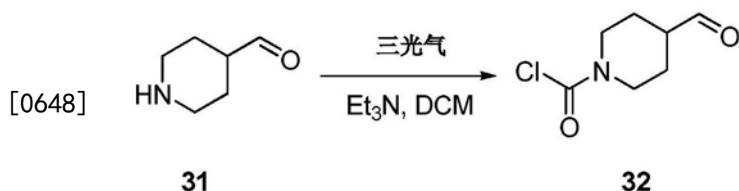
[0643] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.59 (s, 1H) , 10.46 (bs, 2H) , 8.49 (s, 1H) , 8.18 (s, 1H) , 8.08-8.12 (m, 2H, J=14Hz) , 7.88-7.92 (t, 1H, J=8.0Hz) , 7.25-7.29 (t, 1H, J=6.8Hz) , 7.04-7.07 (m, 1H) , 6.22-6.25 (m, 1H) , 4.76 (bs, 2H) , 4.62 (bs, 2H) , 3.68 (bs, 2H) 。

[0644] 中间体31的合成。



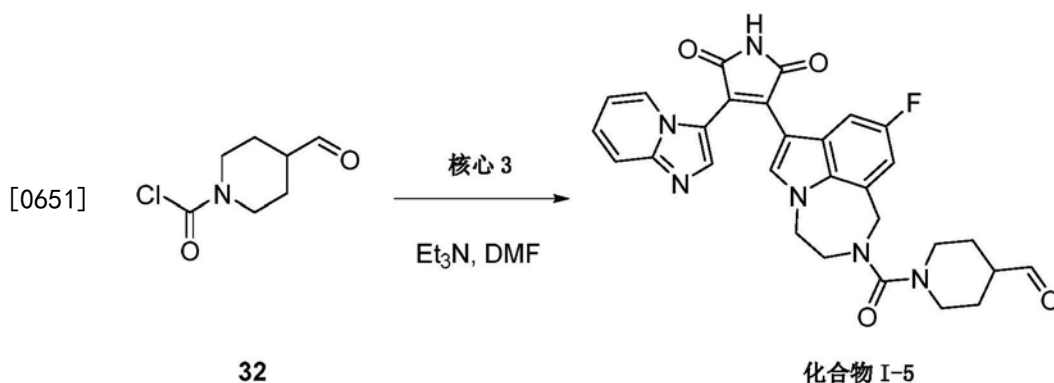
[0646] 室温下向中间体30 (20g, 94mmol) 在二噁烷 (100ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (100ml, 7M)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (石油醚/EtOAc=3/1) 显示反应完成。将该混合物倾注于甲基叔丁基醚 (300ml) 上, 并过滤。将滤饼真空干燥以得到中间体31盐酸盐 (8g, 57%) 的白色固体。

[0647] 中间体32的合成。



[0649] 室温下向中间体31盐酸盐 (7g, 47mmol) 在二氯甲烷 (180ml) 中的溶液添加Et₃N (14.2g, 141mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将三光气 (5.6g, 19mmol) 在二氯甲烷 (20ml) 中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物用NaHCO₃水溶液、水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。将该粗制产品真空蒸馏而得到中间体32 (2.5g, 30.5%) 的无色油。

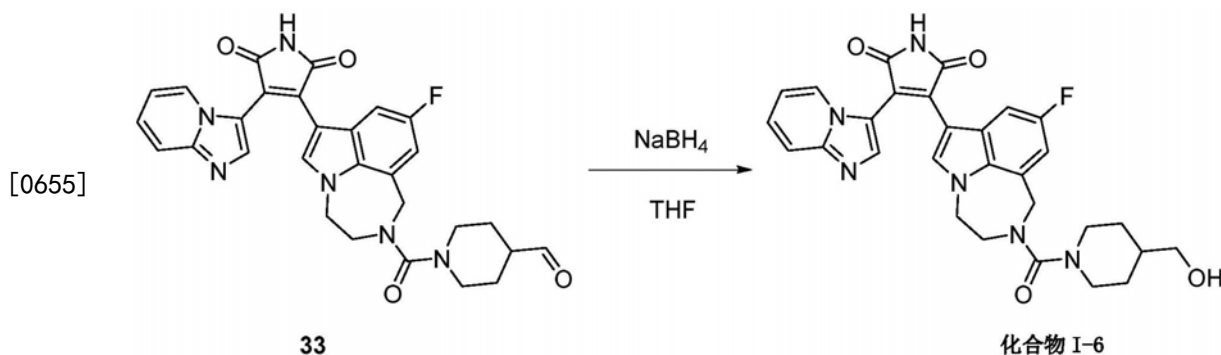
[0650] 化合物I-5的合成.



[0652] 室温下向核心3 (5g, 11.45mmol) 在DMF (70ml) 中的溶液添加Et₃N (3.5g, 34.35mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将中间体32 (3.6g, 20.5mmol) 在DMF (5ml) 中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中并用甲基叔丁基醚提取以移除杂质, 然后用EtOAc (100ml×5) 提取。将合并的EtOAc相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗制化合物I-5 (4.5g, 粗品) 的橙色固体。

[0653] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 11.3 (s, 1H) , 9.58 (s, 1H) , 8.05 (s, 1H) , 7.92 (s, 1H) , 7.65 (d, 1H, J=8.8Hz) , 7.60 (d, 1H, J=6.8Hz) , 7.21 (t, 1H, J=8Hz) , 6.78 (d, 1H, J=9.6Hz) , 6.58 (t, 1H, J=6.8Hz) , 5.62 (d, 1H, J=2Hz) , 4.64 (s, 2H) , 4.55 (s, 2H) , 3.85 (s, 2H) , 3.21-3.37 (m, 2H) , 2.73-2.76 (m, 2H) , 1.75-1.76 (m, 2H) , 1.33-1.47 (m, 3H) 。

[0654] 化合物I-6的合成.

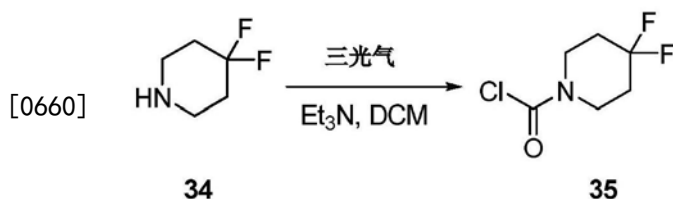


[0656] 在低于5℃下向粗制中间体33 (化合物I-5) (4.5g) 在THF (100ml) 中的溶液分批添加NaBH₄ (0.16g, 4.2mmol)。添加后, 将该反应混合物在低于5℃下搅拌0.5小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进水中并用EtOAc (100ml×4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用200:1至30:1的二氯甲烷/MeOH洗脱) 纯化该残余物而得到化合物I-6 (3g, 两个步骤为48%) 的橙色固体。

[0657] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz) : δ (ppm) 11.24 (s, 1H) , 8.06 (s, 1H) , 7.92 (s, 1H) , 7.64-7.66 (d, 1H, J=8.8Hz) , 7.59-7.61 (d, 1H, J=6.4Hz) , 7.18-7.22 (t, 1H, J=8Hz) , 6.78-6.80 (d, 1H, J=9.6Hz) , 6.56-6.59 (t, 1H, J=6.8Hz) , 5.62-5.65 (dd, 1H, J=2Hz, J=10Hz) , 4.63 (s, 2H) , 4.55 (s, 2H) , 4.45-4.47 (t, 2H, J=5.2Hz) , 3.85 (s, 2H) , 3.40-3.43 (d, 2H, J=12.4Hz) , 3.23-3.26 (t, 2H, J=4.8Hz) , 2.58-2.65 (t, 2H, J=12Hz) , 1.55-1.58 (d, 2H, J=12.8Hz) , 1.47-1.48 (d, 1H, J=6.4Hz) , 1.05-1.13 (m, 2H) 。

[0658] LC/MS M+1543.1

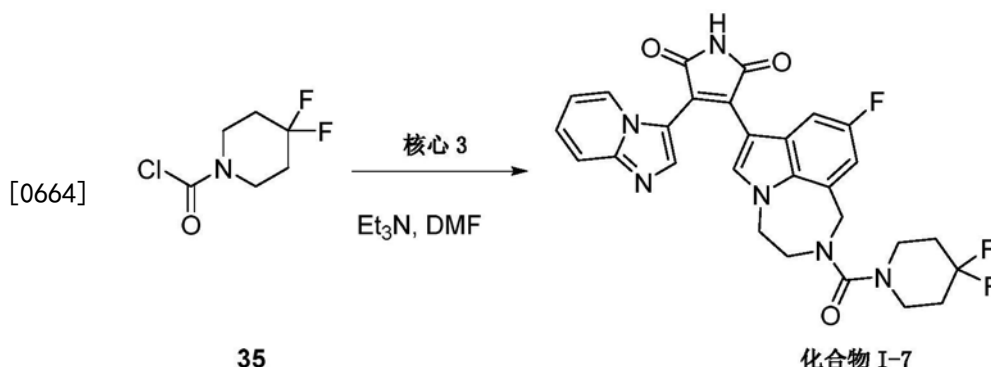
[0659] 中间体35的合成.



[0661] 室温下向中间体34盐酸盐(8.6g, 55.0mmol)在二氯甲烷(240ml)中的溶液添加Et₃N(16.7g, 165.0mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将三光气(6.5g, 22.0mmol)在二氯甲烷(20ml)中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC(二氯甲烷/MeOH=10/1)显示反应完成。然后将该混合物用NaHCO₃水溶液、水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。将该粗制产品真空蒸馏而得到中间体35(4.2g, 42%)的无色油。

[0662] ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ(ppm) 3.80-3.85(bs, 2H), 3.71-3.75(bs, 2H), 2.01-2.11(m, 4H)。

[0663] 化合物I-7的合成.

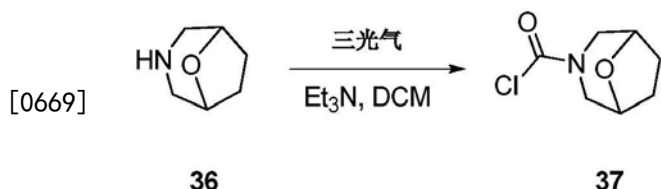


[0665] 室温下向核心3(3g, 6.8mmol)在DMF(40ml)中的溶液添加Et₃N(2.1g, 20.6mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将中间体35(1.4g, 7.5mmol)在DMF(5ml)中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC(二氯甲烷/MeOH=10/1)显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中并用甲基叔丁基醚提取以移除杂质,过滤。将滤饼用水(100ml×3)洗涤,用二氯甲烷(200ml)溶解,用盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到化合物I-7(2.2g, 58%)的橙色固体。

[0666] ¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz): δ(ppm) 11.24(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.91(s, 1H), 7.62-7.66(m, 2H), 7.19-7.23(t, 1H, J=8Hz), 6.84-6.86(d, 1H, J=8.0Hz), 6.58-6.61(t, 1H, J=6.4Hz), 5.63-5.66(d, 1H, J=8.0Hz), 4.70(s, 2H), 4.58(bs, 2H), 3.90(bs, 2H), 3.15(bs, 4H), 1.93-1.96(m, 4H)。

[0667] LC/MS M+1549.1

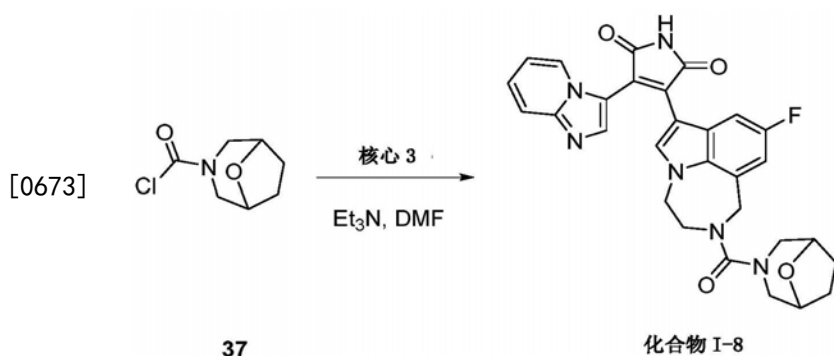
[0668] 中间体37的合成.



[0670] 室温下向中间体36盐酸盐(15g, 100mmol)在二氯甲烷(430ml)中的溶液添加Et₃N(30.6g, 300mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将三光气(11.9g, 40mmol)在二氯甲烷(20ml)中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC(二氯甲烷/MeOH=10/1)显示反应完成。然后将该混合物用NaHCO₃水溶液、水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。将该粗制产品真空蒸馏而得到中间体37(9.2g, 52%)的无色油。

[0671] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 4.40 (s, 2H), 3.90-3.94 (d, 2H, J=13.2Hz), 3.41-3.44 (d, 1H, J=13.2Hz), 3.23-3.36 (d, 1H, J=12.8Hz), 1.90-2.04 (m, 2H), 1.80-1.86 (m, 2H)。

[0672] 化合物I-8的合成

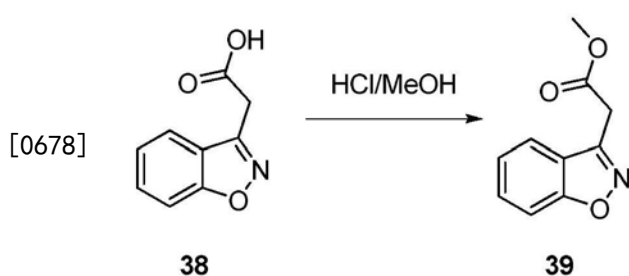


[0674] 室温下向核心3(3g, 6.8mmol)在DMF(40ml)中的溶液添加Et₃N(2.1g, 20.6mmol)。将该混合物在室温下搅拌10分钟。然后在0℃-10℃下将中间体37(1.3g, 7.5mmol)在DMF(5ml)中的溶液添加至该混合物。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC(二氯甲烷/MeOH=10/1)显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc(100ml×4)提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱(用200:1至50:1的二氯甲烷/MeOH洗脱)纯化该残余物而得到化合物I-8(2.3g, 62%)的橙色固体。

[0675] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 11.24 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.60-7.66 (m, 2H), 7.20-7.24 (t, 1H, J=7.6Hz), 6.80-6.82 (d, 1H, J=9.2Hz), 6.57-6.59 (t, 1H, J=6.8Hz), 5.64-5.67 (d, 1H, J=10Hz), 4.60 (s, 2H), 4.54 (bs, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.84 (bs, 2H), 3.20-3.24 (d, 2H, J=12.8Hz), 3.01-3.04 (d, 2H, J=12Hz), 1.74 (s, 4H)。

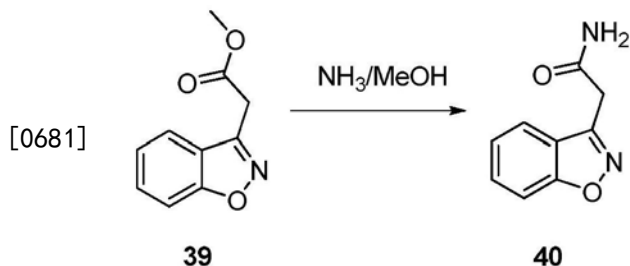
[0676] LC/MS M+1541.1

[0677] 中间体39的合成。



[0679] 向中间体38 (20g, 113mmol) 在MeOH (100ml) 中的溶液添加HCl/MeOH (4M, 100ml), 然后室温下搅拌过夜。真空浓缩该混合物。向滤液添加水 (500ml), 然后用EtOAc (200ml × 4) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗制中间体39 (21g) 的棕色固体, 将其直接用于下一步而无需纯化。

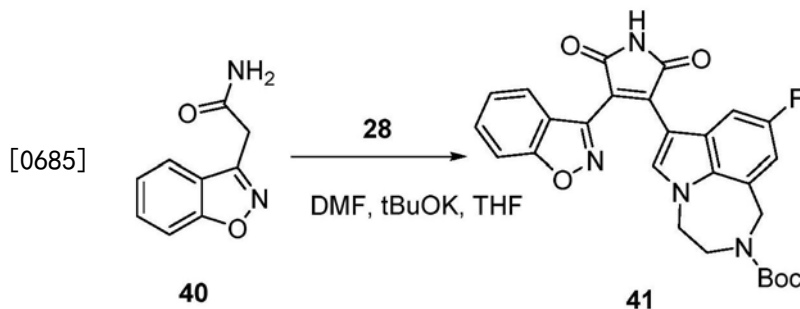
[0680] 中间体40的合成。



[0682] 向粗制中间体39 (21g) 在MeOH (100ml) 中的溶液添加NH₃/MeOH (6M, 100ml)。将该混合物在室温下搅拌过夜。将混合物倾注进EtOAc (500ml) 中, 然后过滤。将滤饼真空干燥以得到中间体40 (8g, 两个步骤为40%) 的米白色固体。

[0683] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 7.86 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.80 (s br, 1H), 7.72 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.62-7.66 (m, 1H), 7.37-7.41 (m, 1H), 7.22 (s br, 1H), 3.88 (s, 2H)。

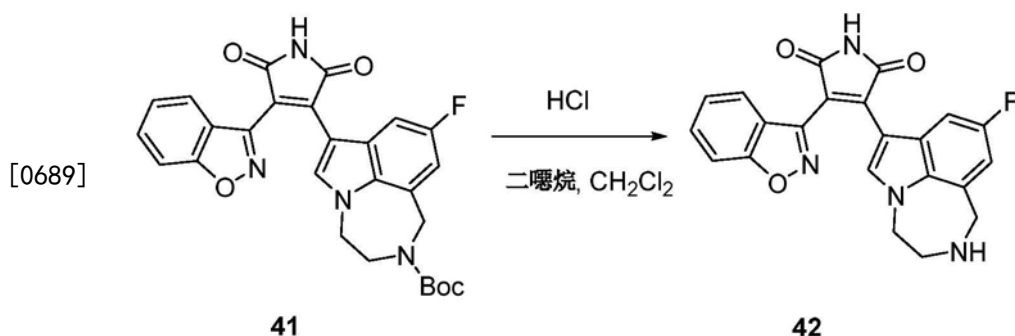
[0684] 中间体41的合成。



[0686] 0-10℃下向中间体28 (10g, 26.5mmol) 和中间体40 (4.6g, 26.5mmol) 在DMF (120ml) 中的溶液添加tBuOK (7.4g, 66.2mmol) 在THF (100ml) 中的溶液。将该混合物在0-10℃下搅拌15分钟。TLC (石油醚/EtOAc=1/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml × 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩。通过快速柱色谱 (用10:5至1:2的石油醚/EtOAc洗脱) 纯化该残余物而得到中间体41 (5g, 37.5%) 的红色固体。

[0687] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 11.07 (s, 1H), 8.02-8.01 (d, 1H, J=4Hz), 8.96 (s, 1H), 7.61-7.63 (t, 1H, J=8.8Hz), 7.45 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.57-6.64 (m, 1H), 6.47-6.49 (d, 1H, J=8Hz), 5.77-5.80 (d, 1H, J=8.4Hz), 4.73-4.78 (d, 2H), 4.52 (bs, 2H), 3.96 (bs, 2H), 1.25-1.44 (m, 9H)。

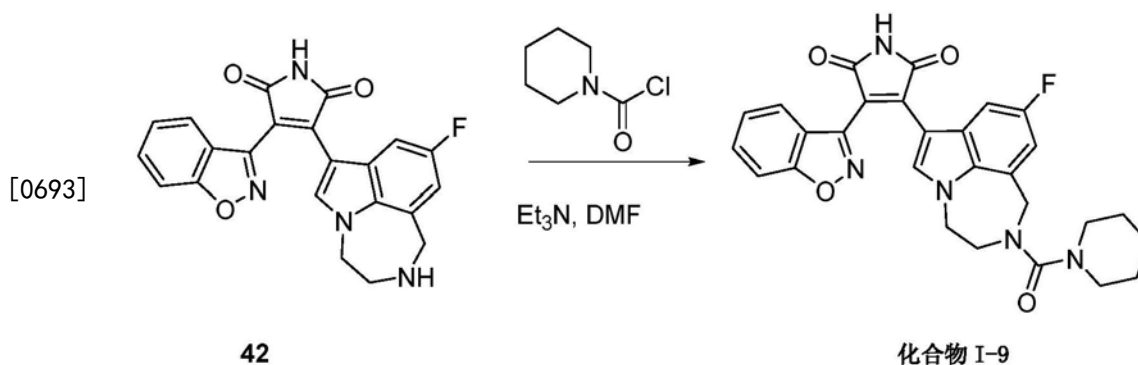
[0688] 中间体42的合成。



[0690] 室温下向中间体41 (5g, 9.9mmol) 在二氯甲烷 (50ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (50ml, 7M)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。浓缩溶剂而得到中间体42 (4g, 92%) 的橙色固体。

[0691] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.59 (s, 1H) , 10.46 (s, 1H) , 8.49 (s, 1H) , 8.17 (s, 1H) , 8.08–8.12 (m, 2H, $J=14\text{Hz}$) , 7.88–7.92 (t, 1H, $J=8.4\text{Hz}$) , 7.25–7.29 (t, 1H, $J=13.6\text{Hz}$) , 7.04–7.07 (t, 1H, $J=10\text{Hz}$) , 6.22–6.25 (m, 1H) , 4.76 (s, 2H) , 4.62 (s, 2H) , 4.45 (s, 2H) , 3.68 (s, 2H) 。

[0692] 化合物I-9的合成。



[0694] 室温下向中间体42 (2g, 4.9mmol) 和1-哌啶酰氯 (1.1g, 7.4mmol) 在DMF (20ml) 中的溶液添加 Et_3N (1.5g, 14.9mmol)。将该混合物在室温下搅拌30分钟。TLC (二氯甲烷/MeOH=15/1) 显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc (100ml \times 4) 提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩。将残余物用甲基叔丁基醚洗涤, 过滤。将滤饼真空干燥而得到化合物I-9 (1.1g, 43.1%) 的橙色固体。

[0695] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.48 (s, 1H) , 8.23 (s, 1H) , 7.83–7.86 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$) , 7.68–7.76 (m, 1H) , 7.35–7.39 (t, 1H, $J=7.6\text{Hz}$) , 6.89–6.92 (m, 1H) , 6.04–6.07 (m, 1H) , 4.66 (s, 2H) , 4.57–4.65 (bs, 2H) , 3.83–3.90 (m, 2H) , 3.01–3.05 (m, 4H) , 1.46–1.49 (m, 6H) 。

[0696] LC/MS M+514.1

[0697] 化合物I-12的合成。

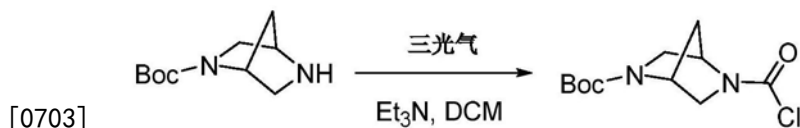
[0698] 可使用3,3-二氟哌啶作为起始原料, 以与化合物I-7类似的方式合成化合物I-12。

[0699] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.25 (s, 1H) , 8.06 (s, 1H) , 7.93 (s, 1H) , 7.58–7.66 (m, 2H) , 7.18–7.23 (t, 1H, $J=8\text{Hz}$) , 6.81–6.79 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$) , 6.58–6.61 (t, 1H, $J=6.4\text{Hz}$) , 5.65–5.67 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$) , 4.66 (s, 2H) , 4.56 (bs, 2H) , 3.88 (bs, 2H) , 3.31–3.64 (bs, 2H) , 3.07 (bs, 2H) , 1.96–2.01 (bs, 2H) , 1.69 (bs, 2H) 。

[0700] LC/MS M+1549.1

[0701] 化合物I-13的合成.

[0702] 如方案9中所示合成化合物I-13。



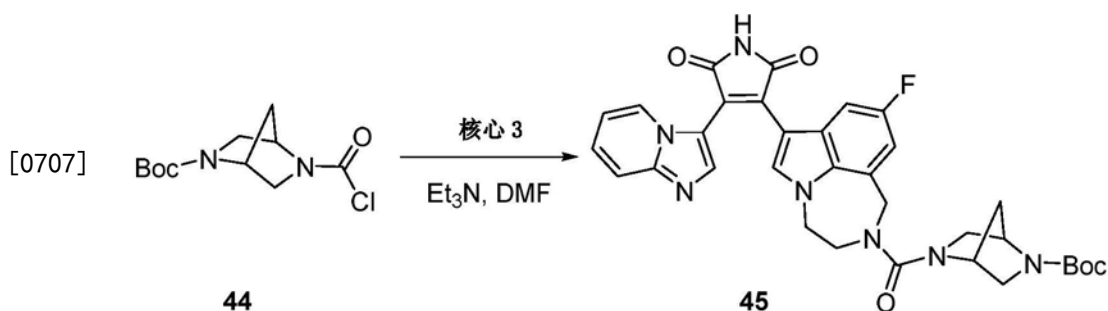
43

44

[0704] 中间体44的合成方式类似与中间体47,收率为43%。

[0705] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.47 (9H, s), 1.91-1.94 (2H, m), 3.37-3.56 (4H, m), 4.40-4.70 (1H, m), 4.71-4.74 (1H, m)

[0706] 中间体45的合成

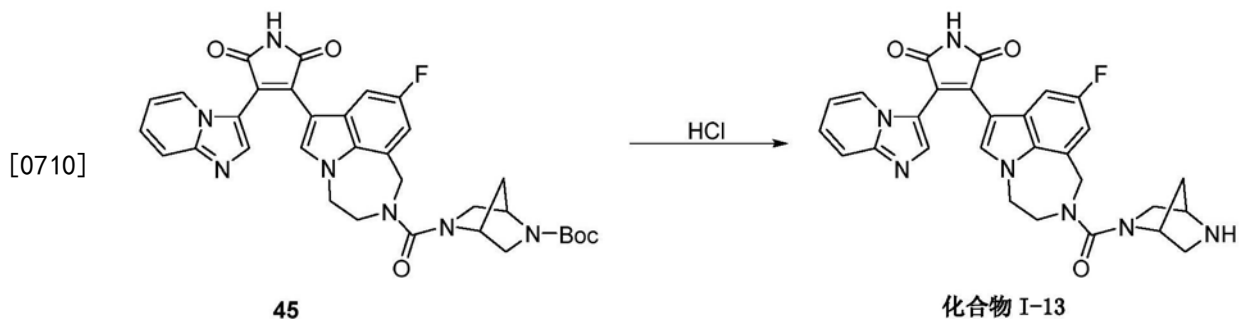


44

45

[0708] 中间体45的合成方式类似与中间体48,粗品。

[0709] 化合物I-13的合成



45

化合物 I-13

[0711] 化合物I-13的合成类似于化合物I-19,两个步骤的收率为20.7%。

[0712] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.45-1.48 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$), 1.54-1.56 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$), 2.71-2.73 (1H, d, $J=9.2\text{Hz}$), 2.88-2.90 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 2.97-2.99 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$), 3.35-3.37 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$), 3.49 (1H, s), 3.75-3.76 (1H, m), 3.90-3.92 (1H, m), 4.04 (1H, s), 4.46-4.50 (1H, m), 4.58-4.74 (3H, m), 5.60-5.62 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 6.60-6.63 (1H, m), 6.78-6.80 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$), 7.20-7.24 (1H, m), 7.63-7.66 (2H, m), 7.90 (1H, s), 8.06 (1H, s)。

[0713] MS计算值:525.5;MS实测值:526.2[M+1]⁺。

[0714] 化合物I-14的合成.

[0715] 化合物I-14可以类似于化合物I-8的方式合成。

[0716] LC/MS M+1548.2

[0717] 化合物I-15的合成.

[0718] 化合物I-15可以类似于化合物I-7的方式合成.

[0719] LC/MS M+1556.2

[0720] 化合物I-16的合成.

[0721] 化合物I-16可以类似于化合物I-7的方式合成.

[0722] LC/MS M+1556.2

[0723] 化合物I-17的合成.

[0724] 化合物I-17可以类似于化合物I-7的方式合成.

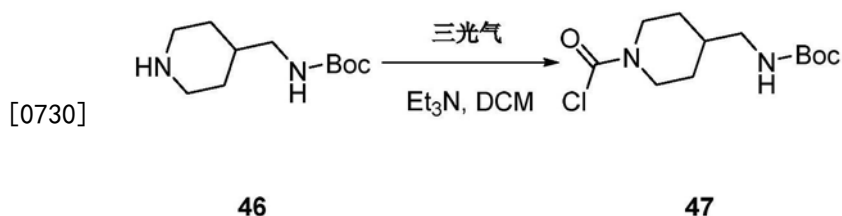
[0725] LC/MS M+1599.2

[0726] 化合物I-18的合成.

[0727] 化合物I-18可以类似于化合物I-8的方式合成.

[0728] LC/MS M+1591.2

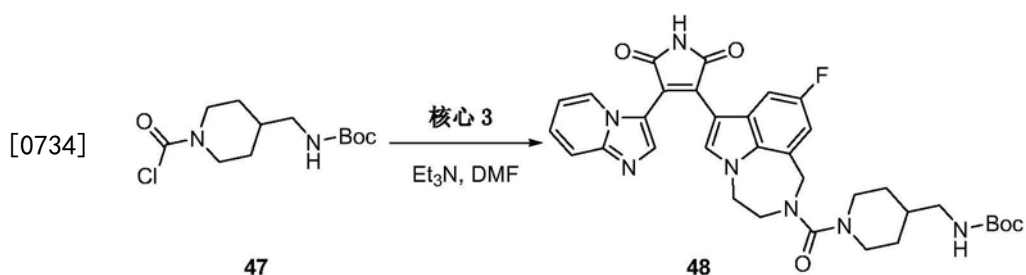
[0729] 化合物I-19的合成.



[0731] 向中间体46 (1.0g, 4.67mmol) 在二氯甲烷 (25ml) 中的溶液添加Et₃N (1.41g, 14.0mmol)。搅拌悬浮液并在0-10℃下滴加DCM (5ml) 中的三光气 (0.55g, 1.87mmol) 进行处理。完成添加后, 将悬浮液在室温下搅拌2小时。将反应混合物倾注到冰水 (20ml) 中, 用DCM提取, 并用NaHCO₃ (含水)、盐水洗涤有机层, 用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物, 得到中间体47 (0.6g, 46.5%) 的无色油。

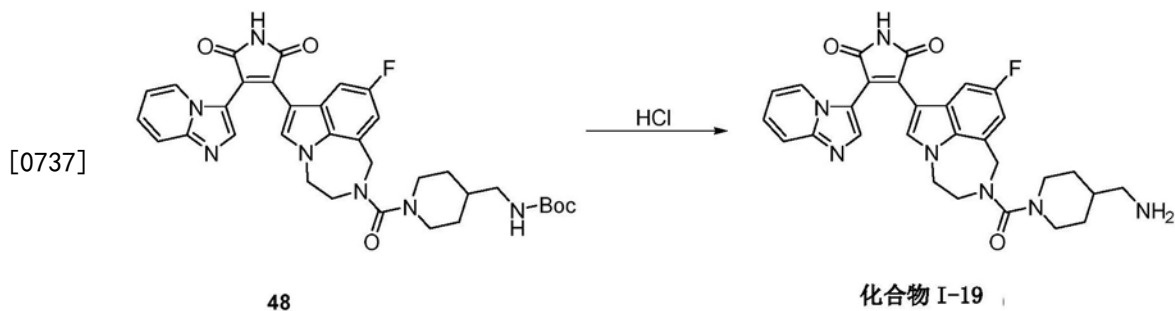
[0732] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.20-1.27 (2H, m), 1.41 (9H, s), 1.72-1.79 (3H, m), 2.84-2.90 (1H, m), 3.03-3.09 (3H, m), 4.32-4.35 (2H, m), 4.66 (1H, br s)。

[0733] 化合物I-19的合成



[0735] 向核心3 (1.0g, 2.29mmol) 在DMF (13ml) 中的溶液添加Et₃N (0.70g, 6.87mmol)。在0-10℃下搅拌该悬浮液并滴加DCM (2ml) 中的中间体47 (0.70g, 2.52mmol) 进行处理。完成添加后, 将悬浮液在室温下搅拌2小时。将该反应混合物倾注进冰水 (60ml) 中, 过滤并真空浓缩而得到中间体48 (1.0g, 粗品) 的红色固体。

[0736] 化合物I-19的合成

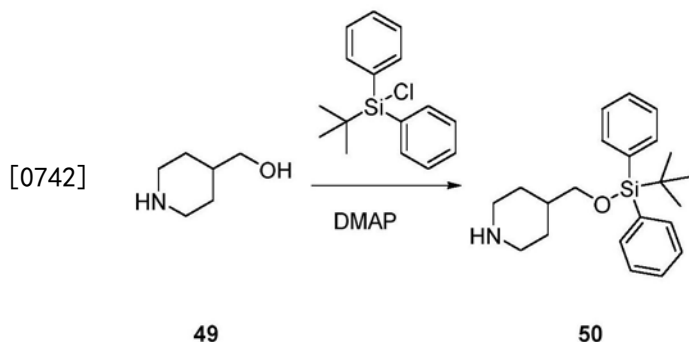


[0738] 室温下向中间体48 (1.0g, 粗品) 在DCM (30ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (10ml, 8mol/L), 并将混合物在室温下搅拌2小时。过滤该反应混合物, 将滤饼溶于水, 用Na₂CO₃ (水溶液) 调节至pH=8-9, 再次过滤, 用水洗涤并真空浓缩而得到化合物I-19 (130mg, 两步为10.5%) 的红色固体。

[0739] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.03-1.11 (2H, m), 1.13-1.62 (3H, m), 2.44-2.82 (4H, m), 3.41-3.44 (2H, m), 3.85 (2H, m), 4.54 (2H, m), 4.64 (2H, m), 5.64-5.66 (1H, d, J=9.6Hz), 6.56-6.58 (1H, m), 6.78-6.81 (1H, m), 7.19-7.23 (1H, m), 7.60-7.66 (2H, m), 7.92 (1H, s), 8.06 (1H, s)。

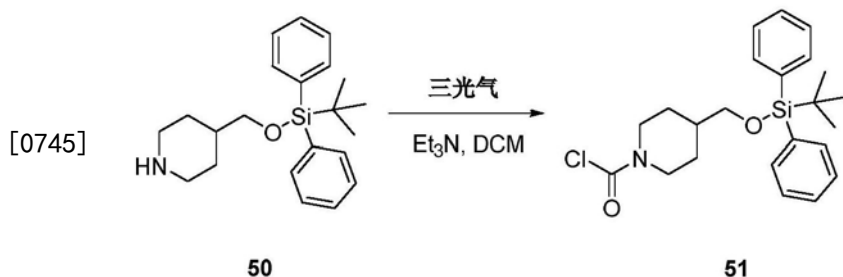
[0740] MS计算值: 541.6; MS实测值: 542.2 ([M+1]⁺)。

[0741] 化合物I-20的合成。



[0743] 向中间体49 (15g, 130.2mmol) 在DCM (1.5L) 中的溶液添加Et₃N (19.8g, 195.3mmol) 和DMAP (0.8g, 6.5mmol)。在0-10℃下搅拌该悬浮液并滴加叔丁基二苯基氯硅烷 (53.7g, 195.3mmol) 进行处理。完成添加后, 将悬浮液在室温下搅拌5小时。将反应混合物倾注到冰水 (500ml) 中, 用DCM (300ml × 2) 提取, 并用盐水 (300ml × 2) 洗涤有机层, 用Na₂SO₄干燥, 过滤并真空浓缩而得到中间体50 (30g, 粗品) 的黄色油。

[0744] 中间体51的合成

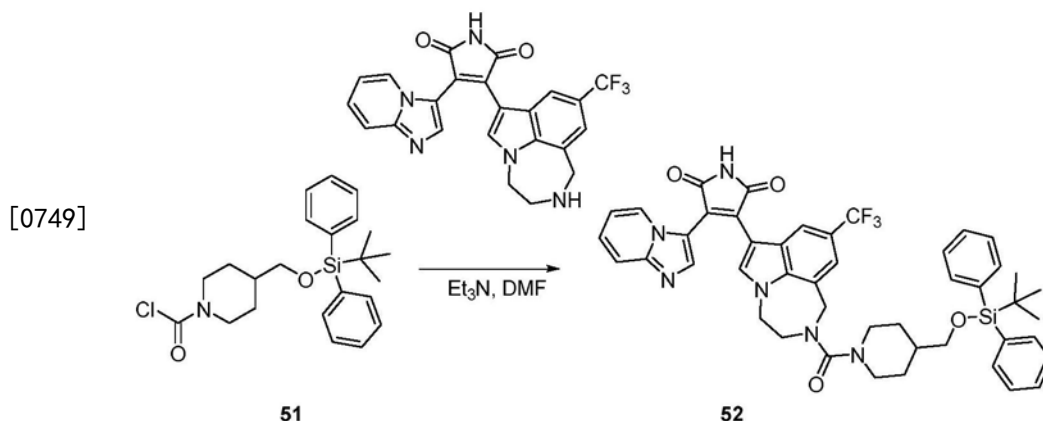


[0746] 向中间体50 (30g, 粗品, 84.8mmol) 在DCM (900ml) 中的溶液添加Et₃N (25.8g, 254.5mmol)。搅拌悬浮液并在0-10℃下滴加DCM (50ml) 中的三光气 (10.1g, 33.9mmol) 进行

处理。完成添加后,将悬浮液在室温下搅拌2小时。将反应混合物倾注到冰水(300ml)中,用DCM提取,并用NaHCO₃(水溶液)、盐水洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥,过滤并真空浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物,得到中间体51(3.1g,8.8%)的无色油。

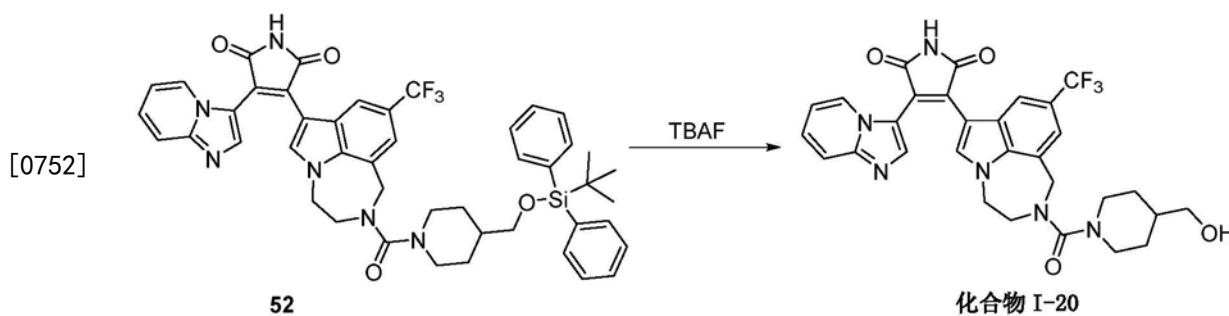
[0747] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ1.05(9H,s),1.22-1.29(2H,m),1.78-1.83(3H,m),2.84-2.90(1H,m),3.01-3.07(1H,m),3.50-3.51(2H,d,J=5.6Hz),4.30-4.34(2H,m),7.36-7.45(6H,m),7.62-7.64(4H,m)。

[0748] 中间体52的合成



[0750] 向CF₃核心(在方案2中描述了合成)(1.6g,3.28mmol)在DMF(15ml)中的溶液添加Et₃N(1.0g,9.84mmol)。在0-10℃下搅拌悬浮液并滴加DCM(5ml)中的中间体51(1.5g,3.60mmol)进行处理。完成添加后,将悬浮液在室温下搅拌2小时。将反应混合物倒入冰水(80ml)中,过滤并将滤饼用水和MTBE洗涤,真空浓缩而得到中间体52(0.98g,粗品)的红色固体。

[0751] 化合物I-20的合成:

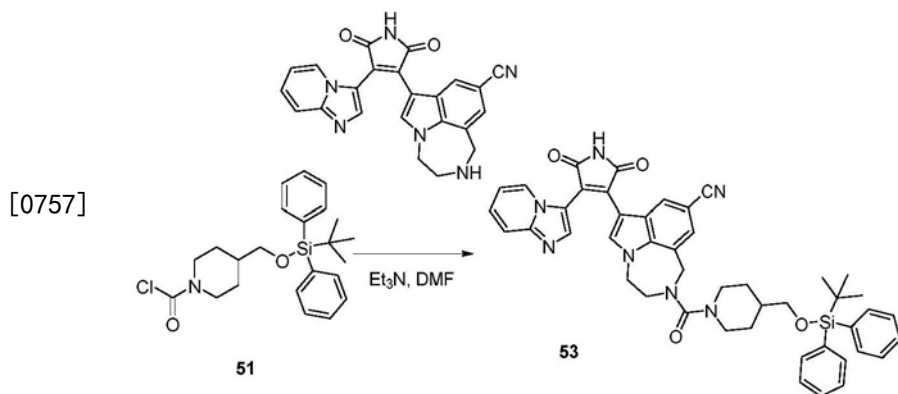


[0753] 室温下向中间体52(0.98g,粗品)在THF(20ml)中的溶液添加THF(10ml)中的TBAF(0.56g,1.77mmol),并将混合物在室温下搅拌2小时。将该反应混合物倾注进冰水(40ml)中,过滤,并将滤饼真空浓缩,通过硅胶柱色谱纯化而得到化合物I-20(160mg,22.8%)的橙色固体。

[0754] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ1.05-1.13(2H,m),1.48-1.58(3H,m),2.54-2.67(2H,m),3.23-3.26(2H,m),3.40-3.44(2H,m),3.87-3.90(2H,m)4.44-4.47(1H,m)4.62-4.69(2H,m),4.72(2H,s),6.31(1H,s),6.53-6.56(1H,m),7.14-7.20(2H,m),7.60-7.64(2H,m),7.92(1H,s),8.16(1H,s),11.29(1H,s)。

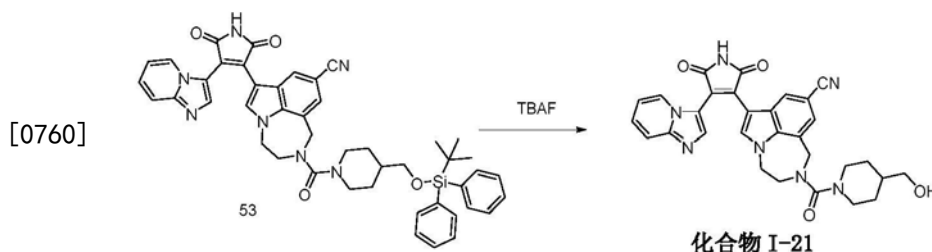
[0755] MS计算值:592.6;MS实测值:593.2([M+1]⁺)。

[0756] 化合物I-21的合成.



[0758] 中间体53的合成的方式类似与中间体52。可以通过使用如方案3中所述的条件置换Br, 然后使用针对核心1转变成中间体10所述的条件下去封闭, 由核心1来制备该CN核心的合成。

[0759] 化合物I-21的合成



[0761] 化合物I-21合成的方式类似于化合物I-20合成中的最后步骤, 收率为28.6%。

[0762] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 1.08-1.13 (2H, m), 1.47-1.56 (1H, m), 1.56-1.59 (2H, m), 2.58-2.65 (2H, m), 3.23-3.26 (2H, m), 3.40-3.43 (2H, m), 3.86 (2H, s), 4.45-4.61 (1H, m), 4.61 (2H, s), 4.68 (2H, s), 6.44 (1H, s), 6.53-6.57 (1H, m), 7.19-7.24 (1H, m), 7.28 (1H, s), 7.54-7.56 (1H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 7.67-7.69 (2H, d, $J=9.2\text{Hz}$), 7.98 (1H, s), 8.08 (1H, s), 11.32 (1H, s)。

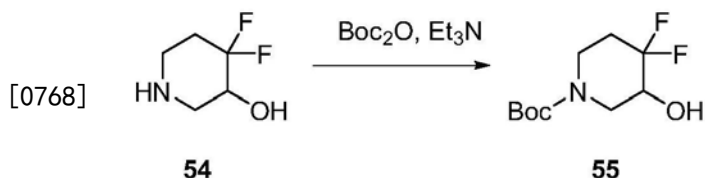
[0763] MS计算值: 549.6; MS实测值: 550.2 $[\text{M}+1]^+$ 。

[0764] 化合物I-22的合成MS计算值: 620.14; MS实测值: 621.1 $[\text{M}+1]^+$, 23、24MS计算值: 586.14; MS实测值: 587.1 $[\text{M}+1]^+$, 26、27MS计算值: 584.17; MS实测值: 565.1 $[\text{M}+1]^+$, 可以以类似于化合物I-7的方式合成。

[0765] 化合物I-25的合成。

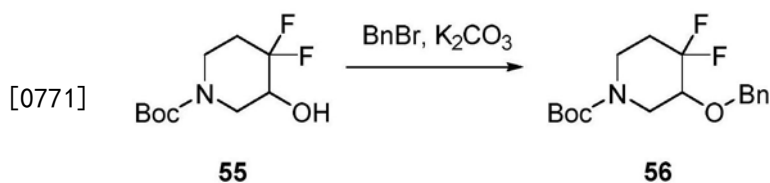
[0766] 化合物I-25可如合成方案11所示合成。

[0767] 中间体55的合成



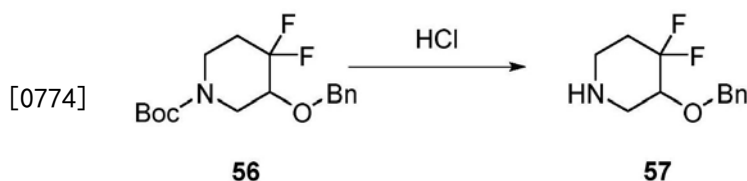
[0769] 向化合物54 (2.3g, 13.2mmol) 在DCM (30ml) 中的溶液添加 Et_3N (2.9g, 29.1mmol) 和 Boc_2O (3.5g, 15.9mmol)。然后将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。将混合物倾注进冰水 (500ml) 中, 用DCM提取, 用盐水洗涤合并的有机相, 用 Na_2SO_4 干燥并真空浓缩而得到中间体55 (2.3g, 57.8%) 的白色固体。

[0770] 中间体56的合成



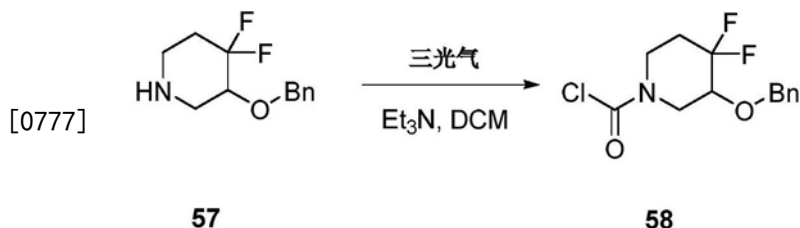
[0772] 0-10℃下向中间体55 (2.3g, 9.7mmol) 在DMF (30ml) 中的溶液添加NaH (0.5g, 13.6mmol)。然后在室温下搅拌2小时后,将BnBr (2.5g, 14.6mmol) 添加至该混合物。TLC (PE/EtOAc=3/1) 显示反应完成。将该反应物倾注进冰水中,用EtOAc提取。将合并的有机相用水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗品,通过硅胶色谱纯化该粗品而得到中间体56 (2.8g, 87.5%) 的白色固体。

[0773] 中间体57的合成



[0775] 向中间体56 (2.8g, 8.6mmol) 在二噁烷 (10ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (7M, 30ml)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (PE/EtOAc=3/1) 显示反应完成。然后将该混合物真空浓缩而得到中间体57 (1.9g, 粗品) 的黄色油。

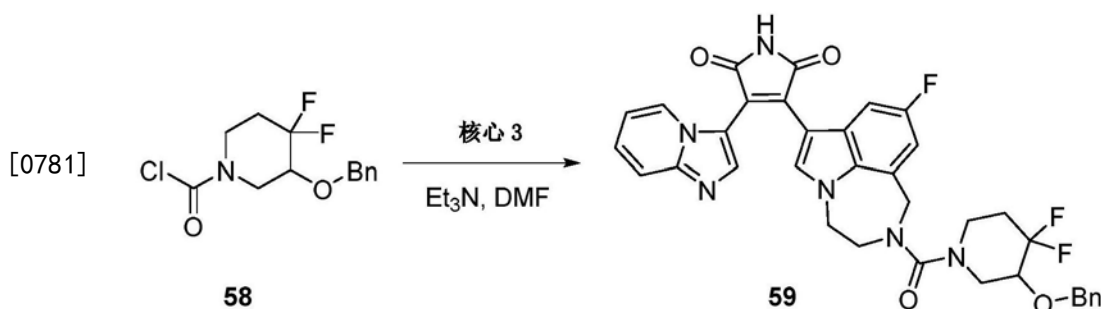
[0776] 中间体58的合成



[0778] 在0-10℃下向中间体57 (1.9g, 粗品) 在DCM (50ml) 中的溶液添加Et₃N (2.1g, 21.1mmol), 然后滴加DCM (10ml) 中的三光气 (0.8g, 2.8mmol)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用DCM提取,将合并的有机相用NaHCO₃ (水溶液)、水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗品,通过硅胶色谱纯化该粗品而得到中间体58 (0.6g, 两个步骤为24.2%) 的白色固体。

[0779] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 7.24-7.36 (m, 5H) , 4.66-5.27 (m, 2H) , 4.16-4.55 (m, 2H) , 3.60-3.65 (m, 1H) , 3.23-3.30 (m, 1H) , 3.17-3.21 (m, 1H) , 2.24-2.42 (m, 1H) , 1.94-2.03 (m, 1H) 。

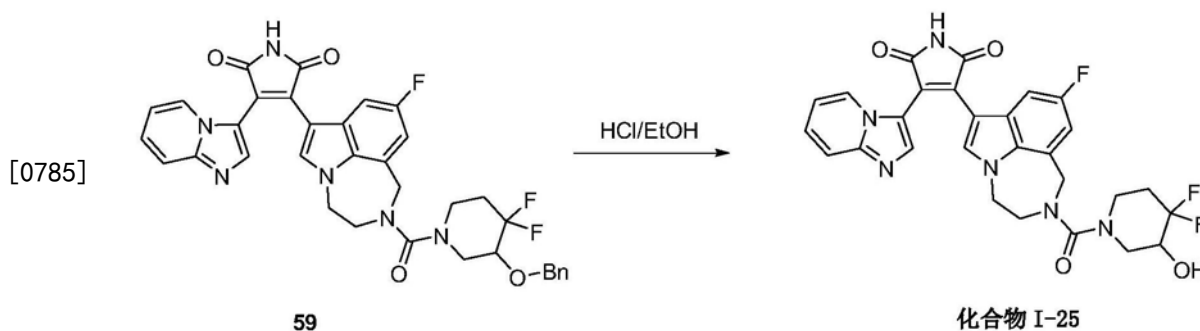
[0780] 中间体59的合成.



[0782] 向核心3 (1.1g, 2.6mmol) 在DMF (10ml) 中的溶液添加Et₃N (0.6g, 6.0mmol), 然后在0-10℃下滴加DMF (3ml) 中的中间体58 (0.6g, 2.0mmol), 将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水和MTBE中, 过滤并用MTBE洗涤滤饼, 真空浓缩而得到中间体59 (1.0g, 76.3%) 的黄色固体。

[0783] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 11.24 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.63-7.66 (m, 2H), 7.26-7.32 (m, 3H), 7.13-7.22 (m, 3H), 6.79-6.83 (m, 1H), 6.56 (t, 1H, J=6.4Hz), 5.64-5.67 (m, 1H), 4.40-4.72 (m, 6H), 3.87-3.89 (m, 1H), 3.70-3.79 (m, 2H), 3.38-3.39 (m, 1H), 3.33 (s, 2H), 3.17-3.16 (m, 1H), 2.06-2.14 (m, 1H), 1.86-1.90 (m, 1H)。

[0784] 化合物I-26的合成



[0786] 向中间体59 (1.0g, 1.5mmol) 在EtOH (5ml) 中的溶液添加HCl (12M, 10ml)。将该混合物加热回流4小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。将该混合物冷却, 用Na₂CO₃ (水溶液) 调节至pH=7-8, 过滤并用MTBE洗涤滤饼, 真空干燥而得到化合物I-25 (0.4g, 46.5%) 的橙色固体。

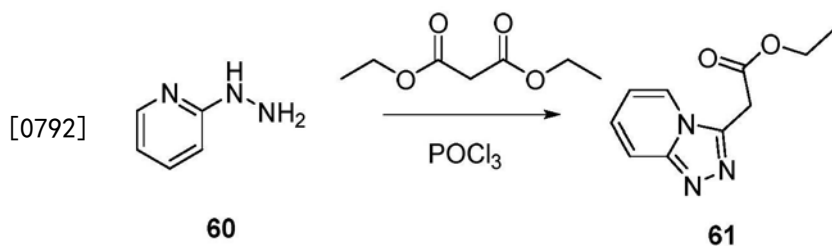
[0787] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 11.24 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.63-7.67 (m, 2H), 7.23 (t, 1H, J=7.6Hz), 6.82 (dd, 1H, J=2.0Hz, 9.6Hz), 6.62 (t, 1H, J=6.4Hz), 5.75-5.76 (m, 1H), 5.65 (dd, 1H, J=2.4Hz, 10.0Hz), 4.65-4.74 (m, 2H), 4.49-4.62 (m, 2H), 3.83-3.95 (m, 2H), 3.67-3.69 (m, 1H), 3.16-3.25 (m, 2H), 3.05-3.10 (m, 2H), 2.07-2.14 (m, 1H), 1.86-1.88 (m, 1H)。

[0788] MS计算值: 564.17; MS实测值: 565.1 [M+1]⁺,

[0789] 化合物I-28的合成。

[0790] 化合物I-28的合成MS计算值: 513.19; MS实测值: 514.2 [M+1]⁺ 可如合成方案12中所示合成。将中间体60转化为中间体61, 利用针对中间体2转化为中间体3以及中间体28转化为核心3以及核心3转化为化合物I-1所述的条件将中间体61变成化合物I-28。

[0791] 中间体61的合成。



[0793] 向60 (10g, 91.7mmol) 在POCl₃ (200ml) 中的溶液添加丙二酸二乙酯 (73.4g, 458.3mmol)。将该反应混合物加热至回流并搅拌3小时。冷却后, 将反应混合物倾注到冰水中, 添加NaHCO₃直至pH=7-8, 用EtOAc提取。将有机相用盐水洗涤、用Na₂SO₄干燥、过滤、减压浓缩。通过快速柱色谱纯化残余物, 得到61 (1.8g, 9.5%) 的白色固体。

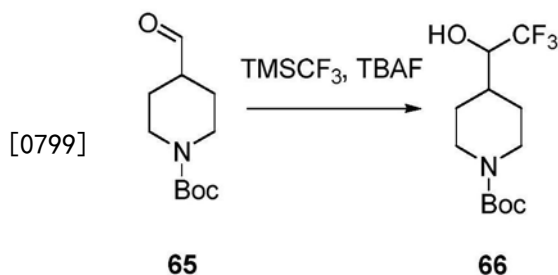
[0794] ¹H NMR (DMSO-d₆) : δ (ppm) 8.43 (d, 1H, J=6.8Hz) , 7.75 (d, 1H, J=9.2Hz) , 7.37-7.41 (t, 1H) , 6.99-7.02 (t, 1H) , 4.41 (s, 2H) , 4.10-4.16 (q, 2H) , 1.17-1.21 (t, 3H) 。

[0795] 化合物I-29和化合物30的合成可以与未氘代的物质类似的方式, 通过采用适当的氘代起始原料合成。

[0796] 化合物I-31的合成。

[0797] 化合物I-31可如合成方案13所示合成。

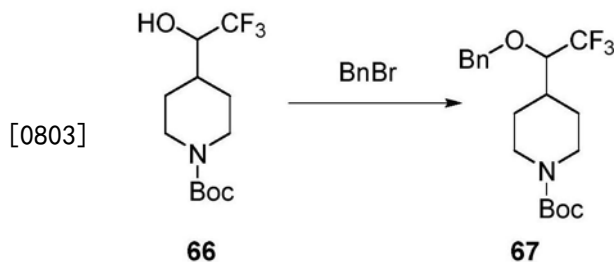
[0798] 中间体65的合成



[0800] 0℃下向化合物65 (5.0g, 23.5mmol) 在THF (50ml) 中的溶液添加TMSCF₃ (4.0g, 28.2mmol) 和TBAF (28.2ml, 28.2mmol)。将该混合物在30℃下保温并搅拌3小时。TLC (PE/EtOAc=1/1) 显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中, 用EtOAc (40ml×3) 提取。将合并的有机相用盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到中间体66 (6g, 粗品) 的黄色油。

[0801] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 4.10-4.16 (m, 2H) , 3.76-3.77 (m, 1H) , 2.70-2.71 (m, 2H) , 2.21 (d, 1H, J=6.0Hz) , 1.85-1.89 (m, 2H) , 1.56-1.64 (m, 1H) , 1.53-1.54 (m, 3H) , 1.46 (s, 9H) 。

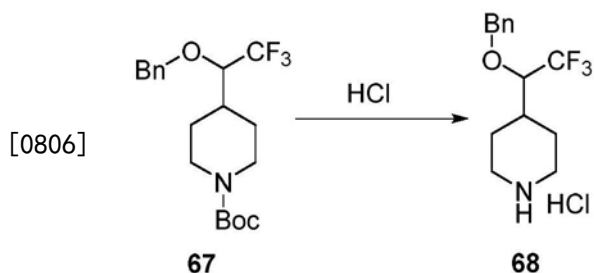
[0802] 中间体67的合成。



[0804] 在0-10℃下向中间体66 (5g, 17.7mmol) 在DMF (50ml) 中的溶液添加NaH (1.0g, 24.7mmol), 然后滴加BnBr (4.5g, 26.5mmol)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (PE/

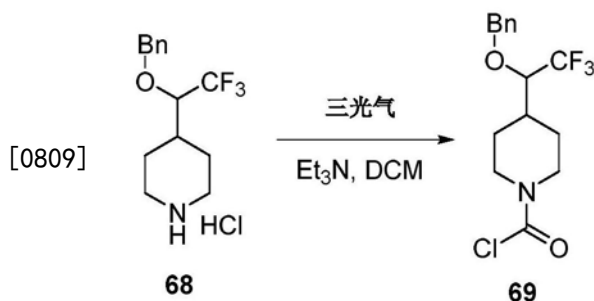
EtOAc=2/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用EtOAc提取,用水、盐水洗涤合并的有机相,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到中间体67 (7.5g,粗品) 的黄色油。

[0805] 中间体68的合成



[0807] 向中间体67 (7.5g,粗品) 在DCM (10ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (7M, 50ml), 然后将混合物在室温下搅拌3小时。TLC (PE/EtOAc=2/1) 显示反应完成。然后将该混合物真空浓缩而得到中间体68 (6.6g,粗品) 的黄色油。

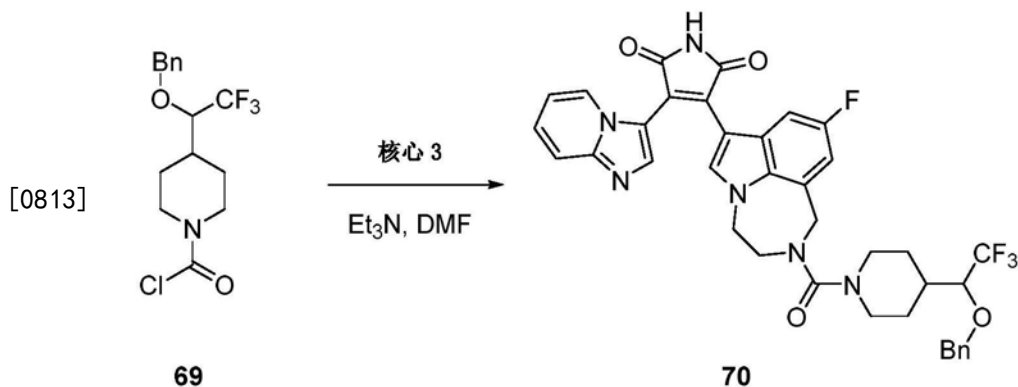
[0808] 中间体69的合成



[0810] 在0-10℃下向中间体68 (6.6g,粗品) 在DCM (130ml) 中的溶液添加Et₃N (6.5g, 63.9mmol), 然后滴加DCM (20ml) 中的三光气 (2.5g, 8.5mmol)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用DCM提取,将合并的有机相用NaHCO₃ (水溶液)、水、盐水洗涤,用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗品,通过硅胶色谱纯化该粗品而得到中间体69 (2.0g,三个步骤为33.8%) 的白色固体。

[0811] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) : δ (ppm) 7.32-7.41 (m, 5H) , 4.86 (d, 1H, J=11.2Hz) , 4.52 (d, 1H, J=11.2Hz) , 4.33 (d, 2H, J=12.4Hz) , 3.55-3.57 (m, 1H) , 3.00-3.03 (m, 1H) , 2.81-2.84 (m, 1H) , 1.89-1.97 (m, 2H) , 1.61-1.64 (m, 1H) , 1.45-1.53 (m, 2H) 。

[0812] 中间体70的合成



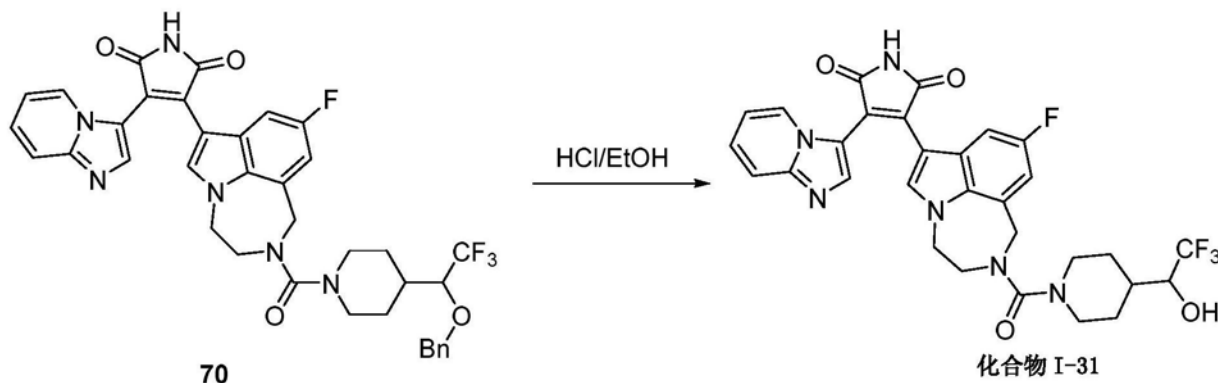
[0814] 向核心3 (2.3g, 5.4mmol) 在DMF (40ml) 中的溶液添加Et₃N (1.6g, 16.2mmol), 然后在0-10℃下滴加DMF (10ml) 中的中间体69 (2.0g, 6mmol), 将该混合物在室温下搅拌2小时。

TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中,过滤并用MTBE洗涤滤饼,真空浓缩而得到中间体70 (0.7g, 17.9%) 的红色固体。

[0815] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.25 (s, 1H) , 8.06 (s, 1H) , 7.92 (s, 1H) , 7.59-7.65 (m, 2H) , 7.32-7.37 (m, 5H) , 7.15-7.20 (m, 1H) , 6.73 (dd, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, 9.6Hz) , 6.54-6.56 (m, 1H) , 5.63 (dd, 1H, $J=2.4\text{Hz}$, 10.0Hz) , 4.74 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$) , 4.54-4.64 (m, 5H) , 4.01 (t, 1H $J=4.8\text{Hz}$) , 3.84-3.86 (m, 2H) , 3.41-3.46 (m, 2H) , 2.63-2.65 (m, 2H) , 1.75-1.90 (m, 1H) , 1.53-1.62 (m, 2H) , 1.37-1.40 (m, 2H) 。

[0816] 化合物I-31的合成

[0817]



[0818] 向中间体70 (0.7g, 1.0mmol) 在EtOH (20ml) 中的溶液添加HCl (12M, 10ml) 。将该混合物加热回流5小时。TLC (D/M=10/1) 显示反应完成。将该混合物冷却,用 Na_2CO_3 (水溶液) 调节至pH=7-8,过滤并用MTBE洗涤滤饼,真空浓缩而得到化合物I-31 (211mg, 30%) 的黄色固体。

[0819] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) : δ (ppm) 11.25 (s, 1H) , 8.06 (s, 1H) , 7.92 (s, 1H) , 7.59-7.67 (m, 2H) , 7.18-7.22 (m, 1H) , 6.77-6.79 (m, 1H) , 6.55 (t, 1H, $J=6.8\text{Hz}$) , 6.17 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$) , 5.64 (dd, 1H, $J=2.0\text{Hz}$, 10.0Hz) , 4.64 (s, 2H) , 4.56 (s, 2H) , 3.77-3.85 (m, 3H) , 3.42-3.46 (m, 2H) , 2.59-2.67 (m, 2H) , 1.73-1.74 (m, 1H) , 1.60 (bm, 1H) , 1.36-1.52 (m, 3H) 。

[0820] MS计算值:610.2;MS实测值:611.2[M+1]⁺

[0821] 化合物I-32的合成.

[0822] 化合物I-32MS计算值:555.24;MS实测值:556.2[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-19的方式合成。

[0823] 化合物I-33的合成.

[0824] 化合物I-33MS计算值:569.26;MS实测值:570.2[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。

[0825] 化合物I-34的合成.

[0826] 化合物I-34MS计算值:527.21;MS实测值:528.1[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-19的方式合成。

[0827] 化合物I-35的合成.

[0828] 化合物I-35MS计算值:541.22;MS实测值:542.1[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-19的方式合成。

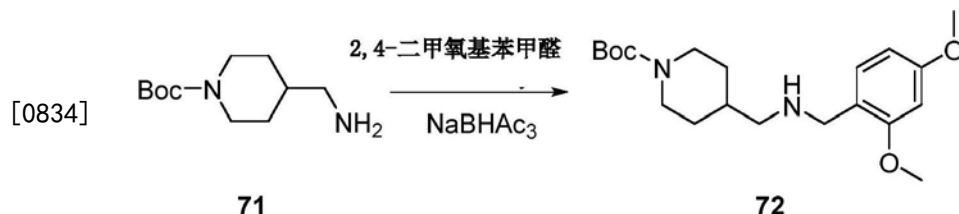
[0829] 化合物I-36的合成.

[0830] 化合物I-36MS计算值:555.24;MS实测值:556.2[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。

[0831] 化合物I-37的合成.

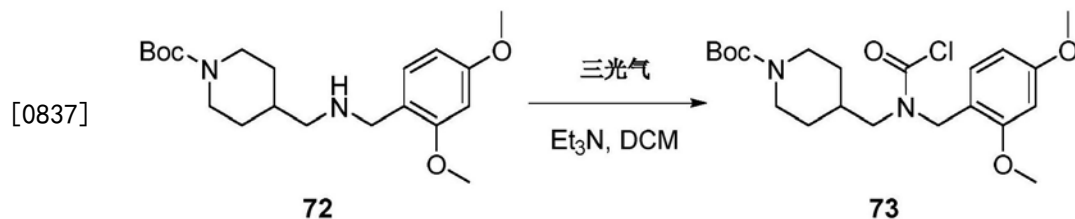
[0832] 可如合成方案14所示合成化合物I-37。

[0833] 中间体72的合成



[0835] 向化合物71 (5.0g, 23.3mmol) 在THF (300ml) 中的溶液添加2,4-二甲氧基苯甲醛 (3.9g, 23.3mmol), 然后将混合物在室温下搅拌2小时。在0℃下缓慢添加NaBHAc₃ (7.4g, 35mmol)。然后将该混合物在室温下搅拌3小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。将该混合物倾注进冰水中, 分离, 将有机相用盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到中间体72 (9g, 粗品) 的黄色油。

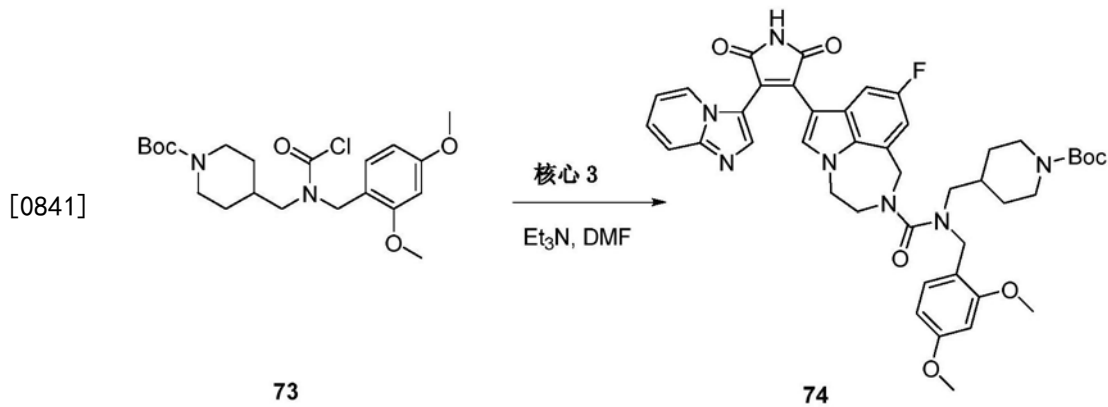
[0836] 中间体73的合成



[0838] 在0-10℃下向中间体72 (9.0g, 粗品) 在DCM (300ml) 中的溶液添加Et₃N (7.5g, 74.1mmol), 然后滴加DCM (30ml) 中的三光气 (2.9g, 9.9mmol)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (PE/EtOAc=3/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中并用DCM提取, 将合并的有机相用NaHCO₃ (水溶液)、水、盐水洗涤, 用Na₂SO₄干燥并真空浓缩而得到粗品, 通过硅胶色谱纯化该粗品而得到中间体73 (3.0g, 两个步骤为30%) 的黄色油。

[0839] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ (ppm) 7.07-7.19 (m, 1H), 6.45-6.49 (m, 2H), 4.65 (s, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.09-4.14 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.29 (d, 1H, J=6.8Hz), 3.14 (s, 1H), 2.64-2.67 (m, 2H), 1.90-1.91 (m, 1H), 1.60-1.66 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.12-1.18 (m, 2H)。

[0840] 中间体74的合成

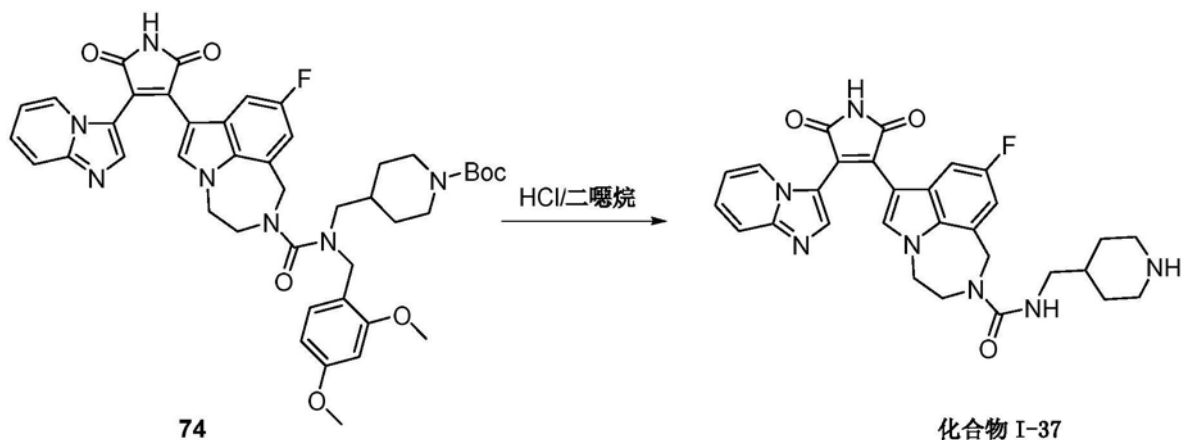


[0842] 向核心3 (2.8g, 6.4mmol) 在DMF (30ml) 中的溶液添加Et₃N (1.9g, 19.2mmol), 然后在0-10℃下滴加DMF (5ml) 中的中间体73 (3.0g, 7.0mmol), 将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水和MTBE中, 过滤并用MTBE洗涤滤饼, 真空浓缩而得到中间体74 (1.2g, 24%) 的黄色固体。

[0843] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 11.23 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.57-7.64 (m, 2H), 7.08 (t, 1H, J=8.0Hz), 6.98 (d, 1H, J=8.4Hz), 6.71 (dd, 1H, J=1.6Hz, 9.2Hz), 6.49 (d, 1H, J=2.0Hz), 6.42-6.45 (m, 2H), 5.59-5.62 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.82-3.88 (m, 4H), 3.72 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.75 (d, 2H, J=6.8Hz), 2.50-2.51 (m, 2H), 1.58 (s, 1H), 1.42-1.45 (m, 2H), 1.34 (s, 9H), 0.71-0.75 (m, 2H)。

[0844] 化合物I-37的合成

[0845]

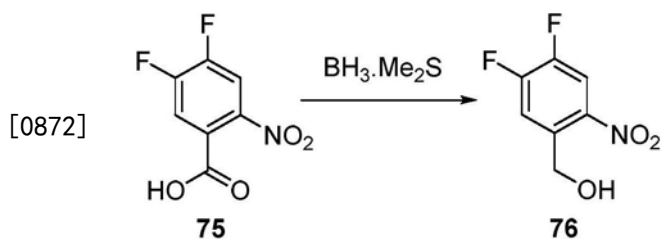


[0846] 向中间体74 (1.2g, 1.5mmol) 在DCM (30ml) 中的溶液添加HCl/二噁烷 (7M, 10ml)。将该混合物在室温下搅拌2小时。TLC (DCM/MeOH=10/1) 显示反应完成。然后将该混合物倾注进冰水中, 过滤并用水 (用Na₂CO₃水溶液调节至pH=7-8) 溶解滤饼, 再次过滤并用MTBE洗涤滤饼, 真空干燥而得到化合物I-37 (0.27g, 32.9%) 的红色固体。

[0847] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 8.07 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.64 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.19-7.23 (m, 1H), 6.76-6.78 (m, 1H), 6.58-6.62 (t, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.66 (dd, 1H, J=2.0Hz, 10.0Hz), 4.78 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.90 (bm, 2H), 2.84 (s, 4H), 2.30-2.36 (m, 2H), 1.41 (bd, 3H, J=10.8Hz), 0.84-0.92 (m, 2H)。

[0848] MS计算值: 541.22; MS实测值: 542.2 [M+1]⁺

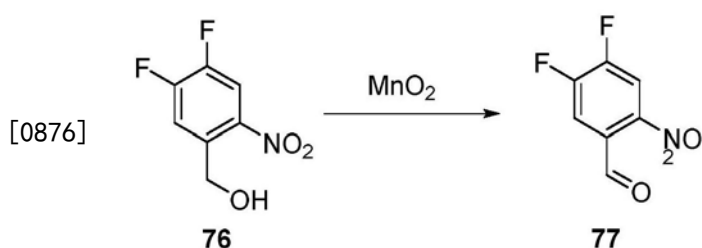
- [0849] 化合物I-38的合成.
- [0850] 化合物I-38MS计算值:555.24;MS实测值:556.2[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-19的方式合成。
- [0851] 化合物I-39的合成.
- [0852] 化合物I-39MS计算值:569.26;MS实测值:570.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。
- [0853] 化合物I-40的合成.
- [0854] 化合物I-40MS计算值:539.21;MS实测值:540.2[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。
- [0855] 化合物I-41的合成.
- [0856] 化合物I-41MS计算值:581.26;MS实测值:582.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。
- [0857] 化合物I-42的合成.
- [0858] 化合物I-42MS计算值:581.26;MS实测值:582.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-8的方式合成。
- [0859] 化合物I-43的合成.
- [0860] 化合物I-43MS计算值:636.14;MS实测值:637.1[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-18的方式合成。
- [0861] 化合物I-44的合成.
- [0862] 化合物I-44MS计算值:614.17;MS实测值:615.1[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-18的方式合成。
- [0863] 化合物I-45的合成.
- [0864] 化合物I-45MS计算值:562.24;MS实测值:563.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-36的方式合成。
- [0865] 化合物I-46的合成.
- [0866] 化合物I-46MS计算值:576.26;MS实测值:577.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-39的方式合成。
- [0867] 化合物I-47的合成.
- [0868] 化合物I-47MS计算值:588.26;MS实测值:589.3[M+1]⁺,可以以类似于合成化合物I-42的方式合成。
- [0869] 化合物I-48的合成.
- [0870] 化合物I-48MS计算值:530.19;MS实测值:531.2[M+1]⁺可如合成方案15中所示进行合成以产生中间体79。如方案6(中间体23转变为核心3)和方案8(中间体42转变为I-9)中所示将中间体79变成最终产物。
- [0871] 中间体76的合成



[0873] 在N₂下于室温向中间体75 (20g, 98.5mmol) 在干THF (130ml) 中的溶液添加BH₃·Me₂S (10M, 49ml, 492.6mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时, 然后加热至50℃ 1小时。TLC (DCM/MeOH=5/1) 显示反应完成。将混合物冷却至室温, 在0℃缓慢添加MeOH (50ml), 浓缩混合物溶液而得到粗制中间体76 (20g, >100%) 的黄色固体。

[0874] ¹H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 8.32 (dd, 1H, J=7.2Hz, 10.4Hz), 7.80 (dd, 1H, J=8.0Hz, 11.6Hz), 5.77-5.79 (t, 1H), 4.82 (d, 2H, J=3.6Hz)。

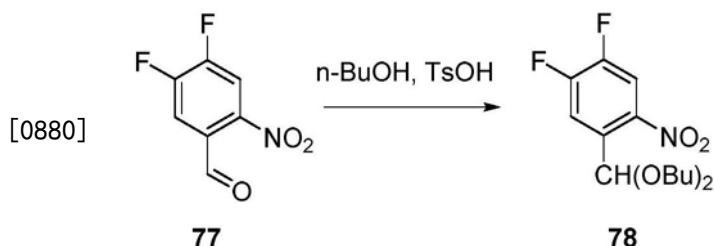
[0875] 中间体77的合成。



[0877] 化合物I-46的合成。

[0878] 在N₂下于室温向中间体76 (20g, 粗品) 在THF (300ml) 中的溶液添加MnO₂ (42.8g, 492.5mmol)。将混合物在80℃下搅拌5小时。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示该反应完成。然后将该混合物过滤、浓缩而得到中间体77 (20g, >100%) 的黄色油。¹H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 10.17 (s, 1H), 8.45-8.50 (dd, 1H, J=6.8Hz, 10.0Hz), 7.99-8.04 (dd, 1H, J=8.0Hz, 10.0Hz)。

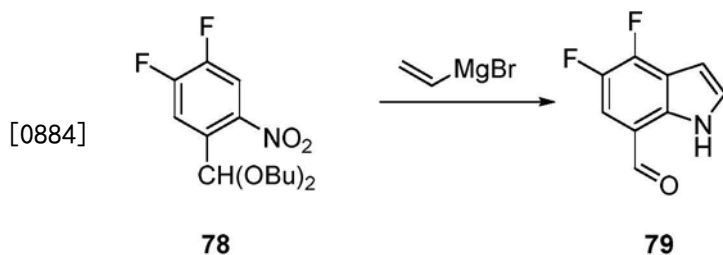
[0879] 中间体78的合成。



[0881] 室温下向中间体77 (20g, 粗品) 在干甲苯 (180ml) 中的溶液添加n-BuOH (26g) 和TsOH (2g)。将该反应混合物在120℃下搅拌3小时。并用Dean-stark装置除去水。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示反应完成。将该混合物真空浓缩而得到粗制化合物。通过硅胶色谱 (PE/EtOAc=1:0-200:1) 纯化该粗制化合物而得到中间体78 (15g, 三个步骤为48%) 的黄色油。

[0882] ¹H NMR (DMSO-d₆): δ (ppm) 8.22-8.27 (dd, 1H, J=7.2Hz, 10.0Hz), 7.63-7.68 (dd, 1H, J=8.4Hz, 11.2Hz), 5.88 (s, 1H), 3.47-3.59 (m, 4H), 1.47-1.54 (m, 4H), 1.27-1.40 (m, 4H), 0.83-0.89 (m, 6H)。

[0883] 中间体79的合成。



[0885] 在 N_2 下于 $-40^\circ C$ 向中间体78 (15g, 47.3mmol) 在THF (450ml) 中的溶液滴加乙烯基溴化镁溶液 (1M, 189ml, 189.2mmol)。将该混合物在 $-40^\circ C$ 下搅拌1小时。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示反应完成, 在 $-40^\circ C-0^\circ C$ 下添加 NH_4Cl 水溶液, 用EtOAc提取, 浓缩而得到粗制化合物。通过硅胶色谱纯化该粗制化合物而得到该化合物 (10g) 的黄色油。向该化合物 (10g) 在EtOAc (100ml) 中的溶液滴加HCl (0.5N, 100ml)。将该混合物在室温下搅拌1小时。TLC (PE/EtOAc=5/1) 显示反应完成。用NaOH水溶液将该混合物调节至pH=8-9, 用EtOAc提取, 用盐水洗涤合并的有机相, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 真空浓缩而得到中间体79 (6g, 70.5%) 的黄色固体。

[0886] 1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 11.99 (s, 1H), 10.08 (s, 1H), 7.89-7.94 (dd, 1H, $J=7.6Hz, 10.8Hz$), 7.54 (d, 1H, $J=3.2Hz$), 6.72 (d, 1H, $J=3.2Hz$)

[0887] 生物学实施例

[0888] 测定:

[0889] 使用重组人GSK3的酶促活性, 使用用于GSK3 α 和GSK3 β 抑制的体外酶促测定。

[0890] 酶和底物:

测定	所用的酶 (ng) / 反应	底物/ATP
[0891] 3 α	GSK 13	0.1 mg/ml GSKtide/10 uM ATP
3 β	GSK 13	0.1 mg/ml GSKtide/10 uM ATP

[0892] 测定条件:

[0893] 使用Kinase-Glo Max发光激酶测定试剂盒 (Promega) 进行该测定。它通过定量激酶反应后溶液中残留的ATP量来测量激酶活性。来自该测定的发光信号与存在的ATP的量相关并且与激酶活性的量负相关。将化合物在10%DMSO中稀释, 并将5 μ l稀释液添加至50 μ l反应物, 使得在所有反应物中DMSO的最终浓度为1%。酶促反应在 $30^\circ C$ 下进行40分钟。该50 μ l反应混合物含有40mM Tris, pH 7.4、10mM $MgCl_2$ 、0.1mg/ml BSA、2mM DTT、0.1mg/ml GSKtide底物、10 μ M ATP和GSK3。在酶促反应后, 向每个反应物添加50 μ l Kinase-Glo Max发光激酶测定溶液 (Promega) 并在室温下温育平板15分钟。使用BioTek Synergy 2酶标仪测量发光信号。

[0894] 数据分析:

[0895] 在每种浓度下一式两份进行激酶活性测定。使用计算机软件Graphpad Prism分析发光数据。将在不存在激酶的情况下的发光强度 (Lut) 与存在激酶的情况下的发光强度 (Luc) 的差值定义为100%活性 (Lut-Luc)。使用在存在化合物的情况下的发光信号 (Lu), %活性计算如下: %活性 = $\{ (Lut-Lu) / (Lut-Luc) \} \times 100\%$, 其中Lu=在存在化合物的情况下

的发光强度(在表中低于零的所有百分比活性均显示为零)。

[0896] 然后利用对用方程 $Y=B+(T-B)/1+10((\text{LogEC}_{50}-X) \times \text{Hill Slope})$ 生成的S型剂量-反应曲线进行非线性回归分析来绘制相对于一系列化合物浓度的%活性值,其中Y=百分比活性,B=最小百分比活性,T=最大百分比活性,X=化合物的对数,Hill Slope=斜率因子或希尔系数。通过引起半数最大百分比活性的浓度来确定IC₅₀值。

[0897] 化合物对GSK- α 和GSK- β 的活性的表:

[0898] 本文中的表示出了某些化合物的活性。对于效力,“+”表示大于约1 μ M;“++”表示约100nM至1 μ M;“+++”表示约10nM至100nM,“++++”表示约1nM至10nM。

[0899]

化合物	效力 α	效力 β
化合物 I-1	++++	++++
化合物 I-2	++++	++++
化合物 I-3	++++	++++
化合物 I-4	++++	++++
化合物 I-6	++++	++++
化合物 I-7	++++	++++
化合物 I-8	++++	++++
化合物 I-9	+++	++++
化合物 I-10	++++	++++
化合物 I-12	++++	++++
化合物 I-13	++++	++++
化合物 I-14	++++	++++
化合物 I-15	++++	++++

[0900]

化合物 I-16	++++	++++
化合物 I-17	++++	++++
化合物 I-18	++++	++++
化合物 I-19	++++	++++
化合物 I-20	++++	++++
化合物 I-21	++++	++++
化合物 I-22	++++	++++
化合物 I-24	++++	++++
化合物 I-25	++++	++++
化合物 I-27	++++	++++
化合物 I-28	++++	++++
化合物 I-31	++++	++++
化合物 I-32	++++	++++
化合物 I-33	++++	++++
化合物 I-34	++++	++++
化合物 I-35	++++	++++
化合物 I-36	++++	++++
化合物 I-37	++++	++++
化合物 I-38	++++	++++
化合物 I-39	++++	++++
化合物 I-40	++++	++++
化合物 I-41	++++	++++
化合物 I-42	++++	++++
化合物 I-43	++++	++++

[0901]	化合物 I-44	++++	++++
	化合物 I-45	++++	++++
	化合物 I-46	++++	++++
	化合物 I-47	++++	++++
	化合物 I-48	++++	++++

[0902] 测定法:小鼠品系

[0903] 将Lgr5-EGFP-IRES-Cre-ER小鼠(Barker等人,2007年)(<http://jaxmice.jax.org/strain/008875.html>)用于分析小分子对耳蜗干细胞扩增的影响。

[0904] 从内耳分离干细胞:在经批准的根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health guidelines)指南的机构方案下进行所有动物研究。对于使用新生儿小鼠(出生后1-3天)的实验,在HBSS中解剖耳蜗,并将柯蒂氏器官与血管纹和蜗轴分离。然后将柯蒂氏器官用细胞恢复溶液(康宁公司(Corning))处理1小时以将耳蜗上皮与下面的间质分离。然后收集上皮并用TrypLE(生命科技公司(Life Technologies))在37°C下处理15至20分钟。将通过机械研磨得到的单细胞过滤(40µm)并悬浮于Matrigel(康宁公司)中进行3天培养。

[0905] Lgr5阳性细胞的扩增

[0906] 将细胞在DMEM与F12的1:1混合物中培养,该混合物补充有Glutamax(GIBCO公司)、N2、B27(英杰公司(Invitrogen))、EGF(50ng/ml;Chemicon公司)、bFGF(50ng/ml;Chemicon公司)、IGF1(50ng/ml;Chemicon公司)和本文提供的组合物。每隔一天更换培养基。

[0907] 使Lgr5阳性的祖细胞干细胞集落在DMEM与F12的1:1混合物中分化,该混合物补充有Glutamax(GIBCO公司)、N2、B27(英杰公司),添加特定的药物,或者在除去生长因子以后不添加药物。将小分子添加至该培养物以测试它们对分化的影响。

[0908] 分析

[0909] 在多种条件下培养10天(D10)以后,定量Lgr5阳性细胞。使用TrypLE(Gibco公司)将细胞集落解离成单细胞。然后将所述细胞用碘化丙啶(PI)染色,并使用流式细胞术分析Lgr5-GFP表达。定量GFP阳性细胞的数量和GFP阳性细胞的百分比。

[0910] 在分化处理的第0天(D0)和第10天(D10)定量Atoh1-nGFP阳性细胞以确定已经分化的毛细胞的数量。将细胞集落在细胞恢复溶液中温育以从Matrigel释放集落并使用TrypLE解离成单细胞。对于多种培养条件,使用流式细胞术定量GFP阳性细胞的总数和百分比。使用ANOVA对比条件之间的平均值,并使用双尾Student T检验将每种条件与具有最高收率的处理进行对比。

[0911] 本文中的表示出了某些化合物的活性。对于效力,“+”表示大于约1µM;“++”表示约100nM至1µM;“+++”表示约1nM至100nM。对于细胞的百分比,“+”表示约0-5%;“++”表示约6-10%;“+++”表示大于约11%。

[0912]

化合物	效力	细胞的百分比 (%)
化合物 I-1	+++	+++
化合物 I-2	+++	+++
化合物 I-3	+++	+++

[0913]

化合物 I-4	++	+++
化合物 I-6	+++	+++
化合物 I-7	+++	++
化合物 I-8	+++	+++
化合物 I-9	+	+++
化合物 I-10	+	+
化合物 I-12	+++	+++
化合物 I-13	+	+++
化合物 I-14	+	+
化合物 I-15	+	++
化合物 I-16	++	+++
化合物 I-17	+	+
化合物 I-19	+	+++
化合物 I-20	+	+++
化合物 I-21	+	+++
化合物 I-22	+++	++
化合物 I-24	+++	++
化合物 I-27	+++	+++
化合物 I-31	+++	+++
化合物 I-32	+	+++
化合物 I-33	++	+++
化合物 I-34	+	++
化合物 I-35	+	+
化合物 I-37	+	+

[0914]

化合物 I-38	+	+
化合物 I-40	+	+
化合物 I-41	+	+++
化合物 I-41	+	+++
化合物 I-43	++	+++
化合物 I-44	++	+++
化合物 I-48	+++	++