



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111885914 A

(43) 申请公布日 2020.11.03

(21) 申请号 201880083616.6

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22) 申请日 2018.10.26

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

(51) Int.Cl.

62/578,297 2017.10.27 US

A01K 67/027 (2006.01)

62/583,328 2017.11.08 US

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/057783 2018.10.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/084452 EN 2019.05.02

(71) 申请人 投资健康有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·科塔里 T·韦伯 王湛

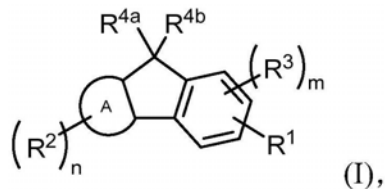
权利要求书13页 说明书84页 附图58页

(54) 发明名称

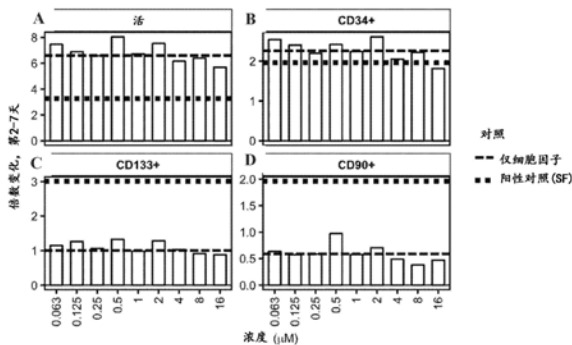
使用衍生物制造扩增的造血干细胞的组合和方法

(57) 摘要

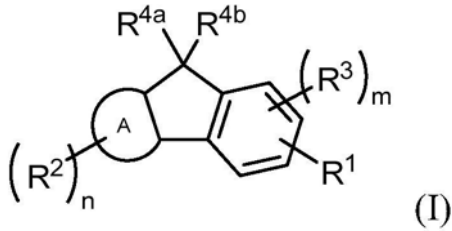
本发明尤其涉及用于维持、增强和扩增源自一种或多种CD34+细胞源的造血干细胞的化合物、方法、系统和组合物。CD34+细胞源包括骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血。本文还提供了式I的化合物



物可用于维持、增强和扩增造血干细胞。



1. 一种式I的化合物



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物；其中

A是选自苯基、 C_{3-6} 环烷基、杂环烷基、和杂芳基的稠合环状部分，或不存在；

其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员，并且

每个杂芳基包含具有1至3个氮原子环成员的5至6个环成员；

R^1 选自 $-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{1b}$ 、 $-NR^b-X^1-C(O)-R^{1a}$ 、 $-C(O)-X^1-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-C(O)-NR^b-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-NR^b-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-NR^b-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-X^1-O-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-R^{1a}$ 、 $-C(O)-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-R^{1a}$ 、卤基、和 $-NO_2$ ；

R^{1a} 选自H、 C_{1-10} 烷基、和 C_{1-10} 卤代烷基；

R^{1b} 选自 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、杂环烷基、和苯基，

其中每个杂环烷基包含具有1至3个选自氮、氧和硫的杂原子环成员的从5至6个环成员，并且

每个杂环烷基和苯基是未经取代的或被1至4个 C_{1-4} 烷基、 $-OH$ 、和卤基取代；

每个 R^2 独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{2-8}$ 烯基、 C_{2-8} 炔基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{2a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{2a}$ 、 $-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ 、和 $-O-C(O)-R^a$ ；

每个 R^3 独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{2-8}$ 烯基、 C_{2-8} 炔基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{3a}$ 、 $-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、和 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ ；

每个 R^{2a} 和 R^{3a} 独立地选自H、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 卤代烷基、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ ；

R^{4a} 选自 $-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-O-C(O)-R^a$ 、和氰基；

R^{4b} 是H；或将 R^{4a} 和 R^{4b} 组合以形成氧代或脞部分；

每个 R^a 和 R^b 独立地选自H和 C_{1-4} 烷基；

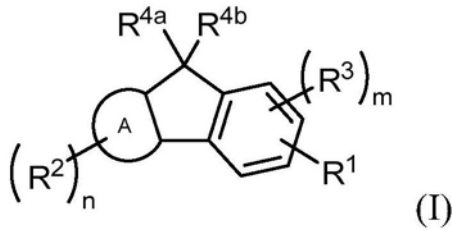
每个 X^1 是 C_{1-4} 亚烷基；

下标n是从0至3的整数；并且

下标m是从0至2的整数

条件是所述式I的化合物不是2-氟-9H-苻-9-酮、2-氨基-9H-苻-9-酮、2-硝基-9H-苻-9-酮、N-(9-氧代-9H-苻-2-基)乙酰胺。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其具有式I



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物；其中

A是选自苯基、C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和杂芳基的稠合环状部分；

其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员，并且

每个杂芳基包含具有1至3个氮原子环成员的5至6个环成员；

R¹选自-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1b}、-NR^b-X¹-C(O)-R^{1a}、-C(O)-X¹-NR^b-R^{1a}、-X¹-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-X¹-C(O)-R^{1b}、-C(O)-NR^b-X¹-C(O)-R^{1b}、-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-X¹-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-R^{1a}、和-C(O)-R^{1a}；

R^{1a}选自H、C₁₋₁₀烷基；C₁₋₁₀卤代烷基；

R^{1b}选自-OR^a、-NR^aR^b、

每个R²独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{2a}、-NR^b-C(O)-R^{2a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b

每个R³独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{3a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b；

每个R^{2a}和R^{3a}独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀卤代烷基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b；

R^{4a}选自-OR^a和-NR^aR^b；

R^{4b}是H；或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代或脞部分；

每个R^a和R^b独立地选自H和C₁₋₄烷基；

每个X¹是C₁₋₄亚烷基；

下标n是从0至3的整数；并且

下标m是从0至2的整数。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的化合物，其中

A是选自C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和苯基的稠合环状部分，

其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的化合物，其中

A是选自C₃₋₆环烷基和苯基的稠合环状部分。

5. 根据权利要求1或权利要求2所述的化合物，其中

A是稠合C₃₋₆环烷基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中

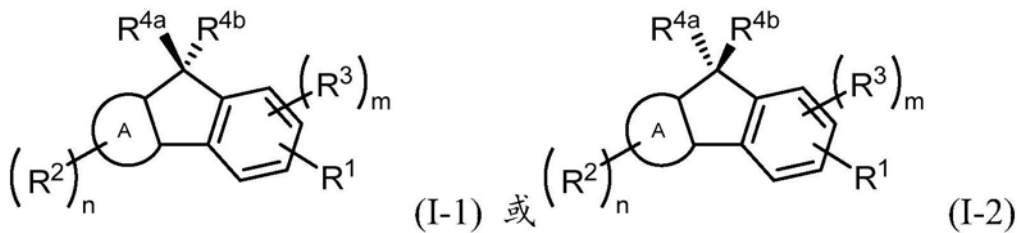
R^{4a}是-OR^a；R^{4b}是H；或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代部分。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中

R^{4a}是-OR^a；并且R^{4b}是H。

8. 根据权利要求1至5中任一项所述的化合物,其中
 R^{4a} 是 $-NR^aR^b$;并且 R^{4b} 是H。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中
 R^1 选自 $-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-X^1-C(O)-R^{1a}$ 、 $-C(O)-X^1-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-C(O)-NR^b-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-NR^b-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-R^{1a}$ 、和 $-C(O)-R^{1a}$ 。
10. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中
 R^1 选自 $-C(O)-NH-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-NH-R^{1a}$ 、 $-NH-R^{1a}$ 、和 $-C(O)-R^{1a}$ 。
11. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中
 R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-R^{1b}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、和 $-NR^b-R^{1a}$ 。
12. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中
 R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-R^{1b}$ 、和 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 。
13. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中
 R^1 是 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^2 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{2a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{2a}-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-O-C(O)-R^a$ 。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{3a}$ 、 $-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、和 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ 。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、和 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ 。
17. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-OR^a$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{2a}-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ 。
18. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ 。
19. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中
 每个 R^2 和 R^3 独立地选自 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 或 $-X^1-NR^aR^b$ 。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中
 R^{1a} 是 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基。
21. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中
 R^{1a} 是 C_{1-6} 烷基。
22. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中
 R^{1a} 是 C_{2-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基。

23. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中 R^{1a} 是 C_{2-6} 烷基。
24. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中 R^{1b} 是 $-OR^a$ 。
25. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,其中 R^{1b} 是 $-OH$ 。
26. 根据权利要求1至25中任一项所述的化合物,其中每个 R^a 和 R^b 独立地选自H和 C_{1-2} 烷基。
27. 根据权利要求1至26中任一项所述的化合物,其中每个 X^1 是 C_{1-2} 亚烷基。
28. 根据权利要求1至26中任一项所述的化合物,其中每个 X^1 是 C_1 亚烷基。
29. 根据权利要求1至28中任一项所述的化合物,其中下标n是从1至3的整数。
30. 根据权利要求1至28中任一项所述的化合物,其中下标n是1。
31. 根据权利要求1至28中任一项所述的化合物,其中下标n是0。
32. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物,其中下标m是从1至2的整数。
33. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物,其中下标m是0。
34. 根据权利要求1至31中任一项所述的化合物,其中下标m是1。
35. 根据权利要求1至34中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式I-1或I-2的结构

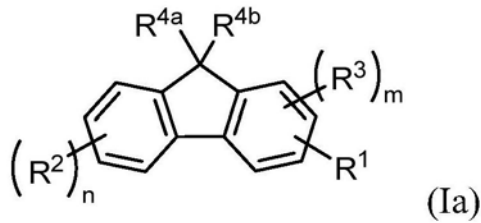


或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

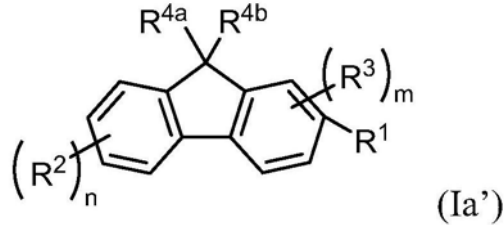
R^{4b} 是H。

36. 根据权利要求2或9至34中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式Ia的结构



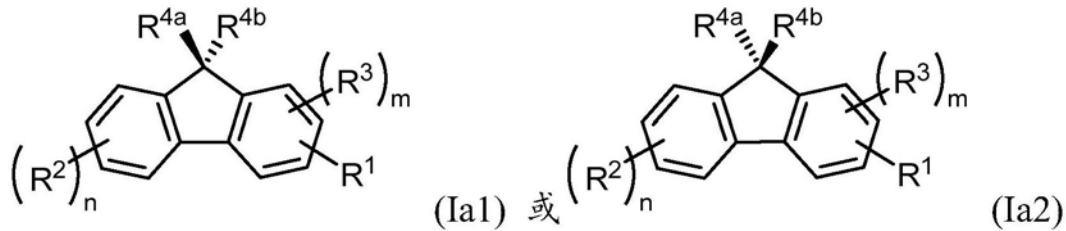
或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

37. 根据权利要求36所述的化合物,其中所述式Ia的化合物具有式Ia'的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

38. 根据权利要求36所述的化合物,其中所述式Ia的化合物具有式Ia1或Ia2的结构

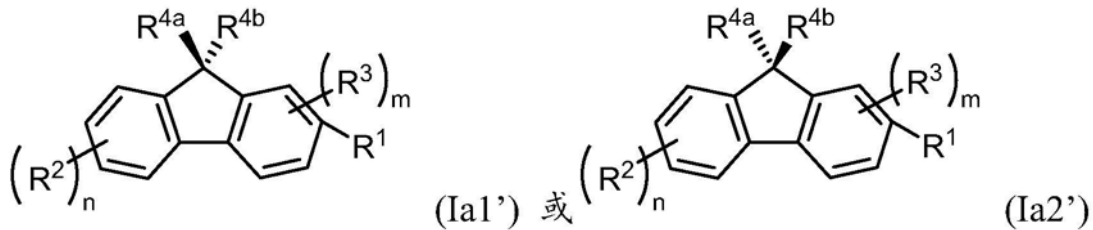


或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

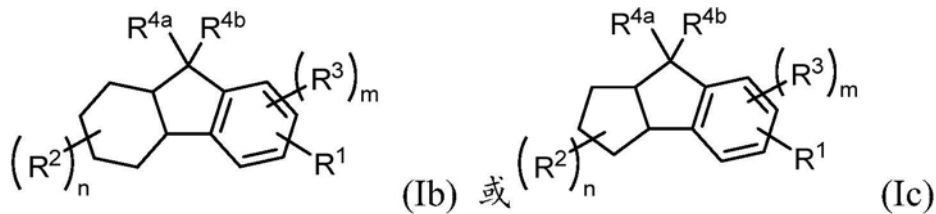
R^{4b} 是H。

39. 根据权利要求38所述的化合物,其中所述式Ia1或Ia2的化合物具有式Ia1'或Ia2'的结构



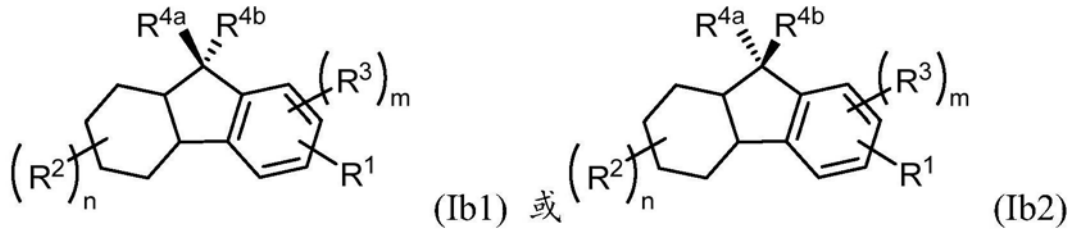
或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

40. 根据权利要求2或9至34中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式Ib或Ic的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

41. 根据权利要求40所述的化合物,其中所述式Ib的化合物具有式Ib1或Ib2的结构。

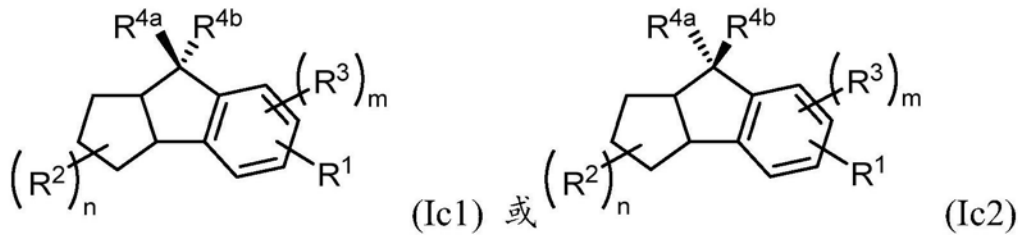


或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

R^{4b} 是H。

42. 根据权利要求40所述的化合物,其中所述式Ic的化合物具有式Ic1或Ic2的结构。



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

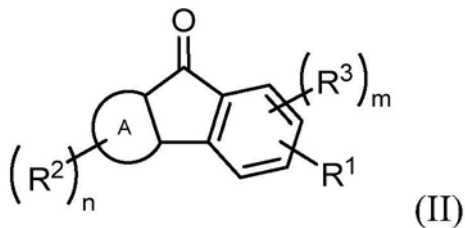
R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

R^{4b} 是H。

43. 根据权利要求35至42中任一项所述的化合物,其中其中 R^{4a} 是 $-OH$ 或 $-NH_2$ 。

44. 根据权利要求35至42所述的化合物,其中 R^{4a} 是 $-OH$ 。

45. 根据权利要求1至34中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式II的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

46. 根据权利要求45所述的化合物,其中

R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-NH-X^1-C(O)-R^{1a}$ 、和 $-NH-R^{1a}$;

每个 R^2 和 R^3 独立地选自 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-X^1-NH_2$ 、 $-X^1-OH$;

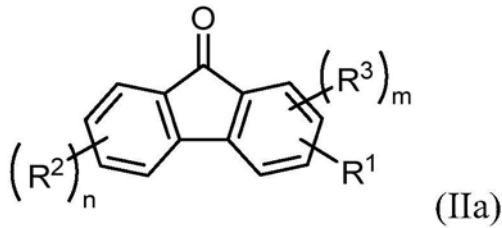
R^{1a} 选自 C_{1-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;

每个 X^1 是 C_{1-2} 亚烷基;

下标n是从0至2的整数;并且

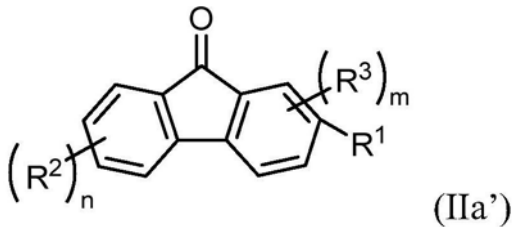
下标m是0或1。

47. 根据权利要求45或权利要求46所述的化合物,其中所述式II的化合物具有式IIa的结构



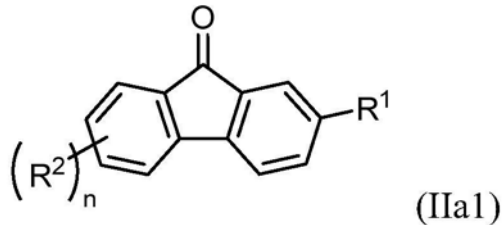
或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

48. 根据权利要求47所述的化合物,其中所述式IIa的化合物具有式IIa'的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

49. 根据权利要求47所述的化合物,其中所述式IIa的化合物具有式IIa1的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

50. 根据权利要求48或权利要求49所述的化合物,其中

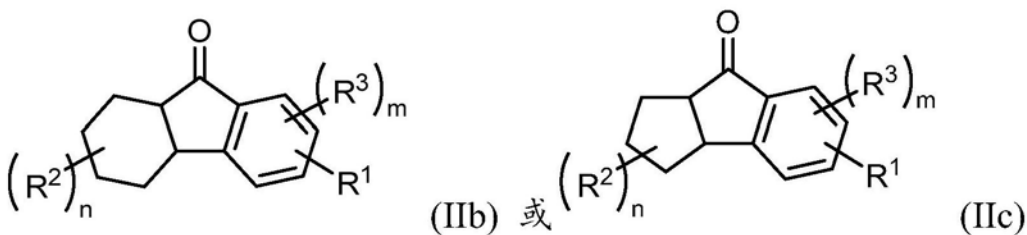
R¹选自-NH-C(O)-R^{1a};

R²独立地选自-NH₂或-OH;

R^{1a}选自C₁₋₆烷基;和C₁₋₆卤代烷基;并且

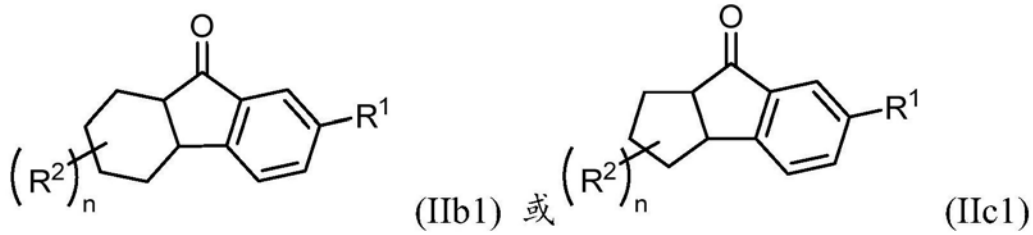
下标n是0或1。

51. 根据权利要求45或权利要求46所述的化合物,其中所述式II的化合物具有式IIb或IIc的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

52. 根据权利要求51所述的化合物,其中所述式IIb或IIc的化合物具有式IIb1或IIc1的结构



53. 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

根据权利要求52所述的化合物,其中

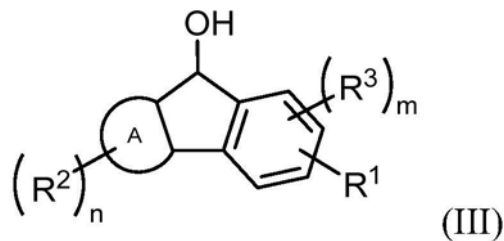
R^1 选自 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{1a}$;

R^2 独立地选自 $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$;

R^{1a} 选自 C_{1-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;并且

下标 n 是0或1。

54. 根据权利要求1至34中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式III的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

55. 根据权利要求54所述的化合物,其中

R^1 选自 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{1a}$ 、 $-\text{NH}-\text{X}^1-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{1a}$ 、 $-\text{NH}-\text{R}^{1a}$ 、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^{1a}$ 、和卤基;

R^{1a} 选自 C_{1-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;

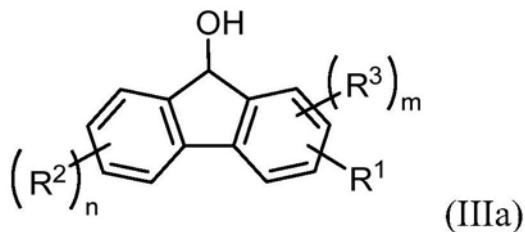
每个 R^2 和 R^3 独立地选自 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{X}^1-\text{NH}_2$ 、 $-\text{X}^1-\text{OH}$;

每个 X^1 是 C_{1-2} 亚烷基;

下标 n 是从0至2的整数;并且

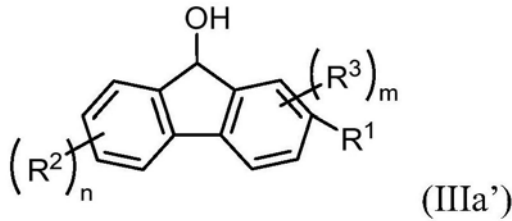
下标 m 是0或1。

56. 根据权利要求54或权利要求55所述的化合物,其中所述式III的化合物具有式IIIa的结构



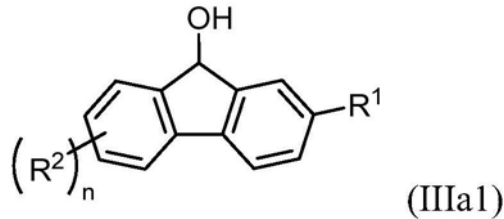
或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

57. 根据权利要求54或权利要求55所述的化合物,其中所述式III的化合物具有式IIIa'的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

58. 根据权利要求54或权利要求55所述的化合物,其中所述式III的化合物具有式IIIa1的结构



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

59. 根据权利要求57或权利要求58所述的化合物,其中

R¹是-NH-C(O)-R^{1a};

R²选自-NH₂或-OH;

R^{1a}选自C₁₋₆烷基;和C₁₋₆卤代烷基;并且

下标n是0或1。

或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

60. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自表1。

61. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的方法,所述方法包括使在培养物中的CD34⁺细胞源与有效量的根据权利要求1-60中任一项所述的化合物接触,从而扩增在所述培养物中的造血干细胞。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源选自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源是动员外周血。

64. 根据权利要求61所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源是脐带血。

65. 根据权利要求61所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源是骨髓。

66. 根据权利要求61所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源是非动员外周血。

67. 根据权利要求62或权利要求66中任一项所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源包含以下中的一种或多种 (a) CD34⁺造血祖细胞; (b) CD34⁺早期造血祖细胞和/或干细胞; (c) CD133⁺早期造血祖细胞和/或干细胞; 和/或 (d) CD90⁺早期造血祖细胞和/或干细胞。

68. 根据权利要求62或权利要求66中任一项所述的方法,其中所述CD34⁺细胞源包含以下中的一种或多种: (a) CD34⁺造血祖细胞; (b) CD34⁺早期造血祖细胞和/或干细胞; (c) CD133⁺早期造血祖细胞和/或干细胞; (d) CD90⁺早期造血祖细胞和/或干细胞; (e) CD45RA⁻早期造血祖细胞和/或干细胞; 和/或 (f) CD38低/-早期造血祖细胞和/或干细胞。

69. 根据权利要求61-68中任一项所述的方法,其进一步包括视黄酸受体 (RAR) 抑制剂或调节剂。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。

71. 根据权利要求61-70中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在大气氧条件下培养所述细胞。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中大气氧条件包括含有约20%氧气的气氛。

73. 根据权利要求61-70中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在低氧条件下培养所述细胞。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中低氧条件包括含有约5%或更少氧气的气氛。

75. 根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与选自以下的一种或多种试剂接触:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、肝细胞生长因子(HGF)、p38 MAPK抑制剂、表皮生长因子(EGF)、JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂。

76. 根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)接触。

77. 根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、和白介素6(IL-6)接触。

78. 根据权利要求61-74中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)接触。

79. 根据权利要求61-78中任一项所述的方法,其中所述方法使所述造血干细胞表型稳定。

80. 根据权利要求79所述的方法,其中所述造血干细胞表型包括CD45+、CD34+、CD133+、CD90+、CD45RA-、CD38低/-,并且关于包括CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56的主要造血谱系标记物呈阴性。

81. 根据权利要求61-80中任一项所述的方法,其中与未与根据权利要求1-60中任一项所述的化合物接触的在培养物中的细胞相比,CD133+和/或CD90+阳性细胞增加。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中培养7天后,与未与根据权利要求2-60任一项所述的化合物接触的在培养物中的细胞相比,所述细胞展现出CD133+和/或CD90+阳性细胞数目的至少约两倍。

83. 根据权利要求61-82中任一项所述的方法,其中所述CD34+细胞源是人类。

84. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的培养基,其包含:

(a) (i) 基础培养基或(ii) 补料培养基;和

(b) 根据权利要求1-60中任一项所述的化合物。

85. 根据权利要求84所述的培养基,其中所述培养基进一步包含(c) 视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。

86. 根据权利要求85所述的培养基,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。

87. 根据权利要求84-86中任一项所述的培养基,其中所述培养基进一步包含(c) 选自以下的一种或多种试剂:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-

1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PTN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、Oct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)。

88. 根据权利要求87所述的培养基,其中所述FBS是热灭活的。

89. 根据权利要求84-86中任一项所述的培养基,其中所述培养基进一步包含(c)血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。

90. 根据权利要求84-86中任一项所述的培养基,其中所述培养基进一步包含(c)血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、和白介素6(IL-6)。

91. 根据权利要求84-86中任一项所述的培养基,其中所述培养基进一步包含(c)血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)。

92. 根据权利要求84-91中任一项所述的培养基,其中所述基础培养基是StemSpan无血清扩增培养基(SFEM)。

93. 根据权利要求84-91中任一项所述的培养基,其中所述基础培养基是基础盐培养基。

94. 根据权利要求88所述的培养基,其中所述基础盐培养基是 α MEM。

95. 根据权利要求93所述的培养基,其中所述基础盐培养基包含足够量的CaCl₂,以将所述基础盐培养基调节至320-380mOsm。

96. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的方法,所述方法包括使在培养物中的CD34+细胞源与根据权利要求84-95中任一项所述的培养基接触,从而扩增在所述培养物中的造血干细胞。

97. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的系统,所述系统包含(a)在培养物中的CD34+细胞源;和(b)根据权利要求84-95中任一项所述的培养基。

98. 根据权利要求97所述的系统,其中所述CD34+细胞源选自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血。

99. 根据权利要求98所述的系统,其中所述CD34+细胞源是脐带血。

100. 根据权利要求98所述的系统,其中所述CD34+细胞源是动员外周血。

101. 根据权利要求98所述的系统,其中所述CD34+细胞源是非动员外周血。

102. 根据权利要求98至101中任一项所述的系统,其中所述CD34+细胞源包含以下中的一种或多种:(a) CD34+造血祖细胞;(b) CD34+早期造血祖细胞和/或干细胞;(c) CD133+早期造血祖细胞和/或干细胞;和/或(d) CD90+早期造血祖细胞和/或干细胞。

103. 根据权利要求97-102中任一项所述的系统,其进一步包含(c)约20%的氧气。

104. 根据权利要求97-102中任一项所述的系统,其进一步包含(c)含有低氧的气氛。

105. 根据权利要求104所述的系统,其中所述气氛含有约5%或更少的氧气。

106. 根据权利要求97-105中任一项所述的系统,其中所述CD34+细胞源是人类。

107. 一种试剂盒,其包括:

(a) (i) 基础培养基或(ii) 补料培养基;和

(b) 根据权利要求1-60中任一项所述的化合物。

108. 根据权利要求107所述的试剂盒,其进一步包括(c)维持和/或扩增在培养物中的造血干细胞的书面说明书。

109. 根据权利要求107或权利要求108所述的试剂盒,其进一步包括(d)视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。

110. 根据权利要求109所述的培养基,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。

111. 根据权利要求107-110所述的试剂盒,其进一步包括选自以下的一种或多种试剂:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PTN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、Oct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)。

112. 根据权利要求111所述的试剂盒,其中所述FBS是热灭活的。

113. 根据权利要求107-110中任一项所述的试剂盒,其进一步包括(d)血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。

114. 根据权利要求107-110中任一项所述的试剂盒,其进一步包括(d)血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、和白介素6(IL-6)。

115. 根据权利要求107-110中任一项所述的试剂盒,其进一步包括(d)血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)。

116. 根据权利要求107-115中任一项所述的试剂盒,其中所述基础培养基是StemSpan无血清扩增培养基(SFEM)。

117. 根据权利要求107-115中任一项所述的试剂盒,其中所述基础培养基是基础盐培养基。

118. 根据权利要求117所述的试剂盒,其中所述基础盐培养基是 α MEM。

119. 根据权利要求117所述的试剂盒,其中所述基础盐培养基包含320-380 mOsm CaCl_2 。

120. 一种造血干细胞群体,其通过根据权利要求61-83或96中任一项所述的方法产生。

121. 一种治疗剂,其包含根据权利要求120所述的造血干细胞群体。

122. 一种治疗需要造血重构的个体的方法,其包括向所述个体给予根据权利要求121所述的治疗剂。

123. 根据权利要求122所述的方法,其中所述个体是骨髓供体或接受者。

124. 根据权利要求123所述的方法,其中所述个体被诊断出患有癌症。

125. 根据权利要求124所述的方法,其中所述方法用作除化疗之外的补充治疗。

126. 根据权利要求125所述的方法,其中所述方法用于缩短化疗治疗之间的时间。

127. 根据权利要求122所述的方法,其中所述个体被诊断出患有自身免疫疾病。

128. 一种用于生产用于培养造血干细胞(HSC)的细胞培养基的方法,所述方法包括:将(a)基础培养基或补料培养基;和(b)根据权利要求2-60中任一项所述的化合物组合。

129. 根据权利要求128所述的方法,其进一步包括:(c) 视黄酸受体 (RAR) 抑制剂或调节剂。

130. 根据权利要求129所述的方法,其中所述视黄酸受体 (RAR) 抑制剂或调节剂是 ER50891。

131. 根据权利要求128-130中任一项所述的方法,其进一步包括血小板生成素 (TPO)、干细胞因子 (SCF)、和/或fms相关酪氨酸激酶3配体 (FLT3L)。

132. 根据权利要求128-130中任一项所述的方法,其进一步包括血小板生成素 (TPO) 和干细胞因子 (SCF)。

133. 根据权利要求128-132所述的方法,其进一步包括:将以下中的一种或多种组合:胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、红细胞分化因子 (EDF)、肝细胞生长因子 (HGF)、表皮生长因子 (EGF)、热休克因子 (HSF)、多效生长因子 (PTN)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血管生成素1 (ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、O₆ct4激活化合物1 (OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素 (HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体 (FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清 (FBS)。

134. 根据权利要求133所述的方法,其中所述FBS是热灭活的FBS。

135. 根据权利要求128-131所述的方法,其进一步包括:(d) 胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、人类生长激素 (HGH)、和胎牛血清 (FBS)。

136. 根据权利要求128-135所述的方法,其中所述基础培养基或补料培养基是StemSpan无血清扩增培养基 (SFEM)。

137. 根据权利要求128-135所述的方法,其中所述基础培养基或补料培养基是 α MEM。

使用芬衍生物制造扩增的造血干细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年10月27日提交的美国临时专利申请号62/578,297;和2017年11月8日提交的美国临时专利申请号62/583,328的优先权,将各自的全部内容通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明尤其涉及用于维持和/或增强在培养物中的造血干细胞和/或祖细胞的扩增的方法和系统、用于培养造血干细胞和祖细胞的培养基、以及用于治疗血液系统障碍的治疗性化合物和包含其的组合物。

背景技术

[0004] 造血系统的维持依赖于原始的多能造血干细胞(HSC),所述多能造血干细胞具有自我更新和向所有血细胞谱系重新填补相关祖细胞的能力。长期以来,由于其自我更新的能力以及其多能、长期的重构潜力,HSC已被认为理想用于在各种血液系统障碍的治疗后移植以重构造血系统或作为用于递送治疗性基因的靶标。另外,人类HSC具有在自身免疫疾病中恢复免疫系统以及诱导对同种异体实体器官移植的耐受性的潜在应用。

[0005] 经典的造血扩增细胞因子血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、白介素-3(IL-3)和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)不足以真正维持和扩增HSC。在这些培养物中,HSC通常在一周内失去其效力。由于细胞的相对效力和易获取性,脐带血可能是可用的HSC的最佳源之一。脐带血库具有大量保存的细胞储备,所述细胞储备可以迅速用于治疗性用途。然而,在不大量扩增单一脐带单位的情况下,每个脐带不太可能用于多于一个治疗剂量或应用。

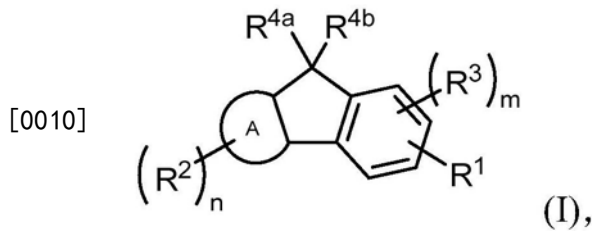
[0006] 考虑到HSC和/或早期造血祖细胞的维持和扩增或增强将能够实现的治疗性益处,开发新的、激进的、高效而安全的方案和试剂以实现此目标是至关重要的。本公开文本解决了这种需求并且还提供了相关优点。

[0007] 在整个说明书中,引用了各种专利、专利申请和其他类型的出版物(例如,期刊文章、电子数据库条目等)。出于所有目的,将本文引用的所有专利、专利申请和其他出版物的公开内容通过引用以其整体特此并入。

发明内容

[0008] 本文尤其提供了用于快速扩增、维持和增强源自一种或多种CD34+细胞源的造血干细胞和/或祖细胞的化合物、方法和组合物。

[0009] 因此,在一些方面,本文还提供了式I的化合物



[0011] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^{4a} 、 R^{4b} 、A、m、和n是如下定义的。

[0012] 另外,在一些方面,本文提供了用于扩增在培养物中的造血干细胞和/或祖细胞的方法,所述方法包括使在培养物中的CD34+细胞源与有效量的式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1的化合物或表1的化合物接触,所述化合物各自在下面进一步描述。在一些实施方案中,用于扩增在培养物中的造血干细胞和祖细胞的方法限制视黄酸信号传导。在一些实施方案中,通过使用控制或减少视黄酸量的培养基来限制视黄酸信号传导。在一些实施方案中,所述培养基包含视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂是ER50891。

[0013] 在一些方面,CD34+细胞源是骨髓、脐带血、动员外周血、或非动员外周血。在一些方面,所述CD34+细胞源是非动员外周血。在一些方面,所述CD34+细胞源包含:(a) CD34+造血祖细胞;(b) CD34+早期造血祖细胞和/或干细胞;(c) CD133+早期造血祖细胞和/或干细胞;和/或(d) CD90+早期造血祖细胞和/或干细胞。

[0014] 在一些方面,所述方法使造血干细胞表型稳定。在一些方面,所述造血干细胞表型包括:CD45+、CD34+、CD133+、CD90+、CD45RA-、CD38低/-,并且关于包括CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56的主要造血谱系标记物呈阴性。在一些方面,与未与式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1的化合物或表1的化合物接触的在培养物中的细胞相比,CD133+和/或CD90+阳性细胞增加。在一些方面,与未与本文公开的式I的化合物或子实施方案接触的在培养物中的细胞相比,所述细胞展现出CD133+和/或CD90+阳性细胞数目的至少约两倍。在一些方面,与未与本文公开的式I的化合物或子实施方案接触的在培养物中的细胞相比,CD90+细胞增加。在一些方面,与未与本文公开的式I的化合物或子实施方案接触的在培养物中的细胞相比,CD38低/-细胞增加。在一些方面,与未与本文公开的式I的化合物或子实施方案接触的在培养物中的细胞相比,CD90+和CD38低/-细胞增加。在一些方面,所述CD34+细胞源是人类。

[0015] 在一些方面,本文提供了用于生产用于培养造血干细胞(HSC)和/或祖细胞的细胞培养基的方法。所述方法涉及将基础培养基或补料培养基;和式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1的化合物或表1的化合物组合

[0016] 在一些方面,本文提供了用于维持和/或增强在培养物中的造血干细胞的扩增的系统。此系统包括在培养物中的CD34+细胞源(诸如来自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血中的一种或多种的CD34+细胞)和本文描述的任何细胞培养基组合物。

[0017] 在一些方面,本文提供了用于治疗需要造血重构的个体的方法。所述方法涉及向所述个体给予含有根据本发明的方法衍生的任何培养的HSC的治疗剂。

附图说明

[0018] 图1A-D展示了针对化合物1.001(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.001下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0019] 图2A-D展示了针对化合物1.002(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.002下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0020] 图3A-D展示了针对化合物1.003(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.003下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0021] 图4A-D展示了针对化合物1.004(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.004下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0022] 图5A-D展示了针对化合物1.005(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.005下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0023] 图6A-D展示了针对化合物1.006(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.006下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0024] 图7A-D展示了针对化合物1.007(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.007下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0025] 图8A-D展示了针对化合物1.008(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.008下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0026] 图9A-D展示了针对化合物1.009(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.009下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0027] 图10A-D展示了针对化合物1.010(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞

(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.010下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0028] 图11A-D展示了针对化合物1.011(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.011下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0029] 图12A-D展示了针对化合物1.012(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.012下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0030] 图13A-D展示了针对化合物1.013(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.013下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0031] 图14A-D展示了针对化合物1.014(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.014下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0032] 图15A-D展示了针对化合物1.015(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.015下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0033] 图16A-D展示了针对化合物1.016(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.016下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0034] 图17A-D展示了针对化合物1.017(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.017下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0035] 图18A-D展示了针对化合物1.018(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.018下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0036] 图19A-D展示了针对化合物1.019(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.019下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0037] 图20A-D展示了针对化合物1.020(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚

线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.020下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0038] 图21A-D展示了针对化合物1.021(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.021下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0039] 图22A-D展示了针对化合物1.022(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.022下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0040] 图23A-D展示了针对化合物1.023(柱)和对照测量的扩增作用:基础条件物(细虚线)和+SF条件物(粗虚线)。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第2至7天的倍数变化。每个柱报告了在所指出浓度的化合物1.023下的细胞倍数变化。倍数变化的计算如实施例33中所描述。

[0041] 图24A-E报告了“基础条件物”(白柱,在左);“+SF条件物”(斜线散列的柱,从左数第二个);“+1.008条件物”(黑柱,从右数第二个);“+1.008/+ER条件物”(水平条纹的柱,在右)中培养的脐带血样品中的流式细胞术细胞计数。图24A报告了培养物中的活细胞的总数目,并且图24B、24C、24D、和24E显示+1.008条件物和+1.008/+ER条件物增加了CD34+细胞(24B)、CD34+/CD133+细胞(24C)、CD34+/CD133+/CD90+(24D)、和CD34+/CD133+/CD90+/CD38^低-细胞(24E)的总数目。

[0042] 图25A-E报告了基于图24中报告的脐带血数据从第2天至所指示那天细胞计数的倍数变化。“基础条件物”(白柱,在左);“+SF条件物”(斜线散列的诸,从左数第二个);“+1.008条件物”黑柱,从右数第二个);“+1.008/+ER条件物”(水平条纹的柱,在右)图25A报告了培养物中的活细胞的倍数变化,并且图25B、25C、25D、和25E示出了CD34+细胞(25B)、CD34+/CD133+细胞(25C)、CD34+/CD133+/CD90+(25D)、和CD34+/CD133+/CD90+/CD38^低-细胞(25E)的总数目的倍数变化。

[0043] 图26A-D展示了针对化合物1.005和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.005下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0044] 图27A-D展示了针对化合物1.006和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.006下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0045] 图28A-D展示了针对化合物1.007和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.007下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0046] 图29A-D展示了针对化合物1.008和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.008下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0047] 图30A-D展示了针对化合物1.009和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.009下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0048] 图31A-D展示了针对化合物1.010和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.010下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0049] 图32A-D展示了针对化合物1.013和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.013下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0050] 图33A-D展示了针对化合物1.014和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.014下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0051] 图34A-D展示了针对化合物1.015和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.015下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0052] 图35A-D展示了针对化合物1.021和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.021下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0053] 图36A-D展示了针对化合物1.022和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.022下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0054] 图37A-D展示了针对化合物1.023和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.023下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0055] 图38A-D展示了针对化合物1.024和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.024下细胞的倍

数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0056] 图39A-D展示了针对化合物1.025和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.025下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0057] 图40A-D展示了针对化合物1.026和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.026下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0058] 图41A-D展示了针对化合物1.027和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.027下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0059] 图42A-D展示了针对化合物1.028和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.028下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0060] 图43A-D展示了针对化合物1.029和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.029下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0061] 图44A-D展示了针对化合物1.030和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.030下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0062] 图45A-D展示了针对化合物1.031和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.031下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0063] 图46A-D展示了针对化合物1.032和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.032下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0064] 图47A-D展示了针对化合物1.033和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.033下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0065] 图48A-D展示了针对化合物1.034和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细

胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.034下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0066] 图49A-D展示了针对化合物1.035和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.035下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0067] 图50A-D展示了针对化合物1.036和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.036下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0068] 图51A-D展示了针对化合物1.037和“仅细胞因子”对照(虚线)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1至7天的倍数变化。每个数据点报告了在所指出浓度的化合物1.037下细胞的倍数变化。倍数变化的计算如实施例35中所描述。

[0069] 图52A-F展示了使用源自脐带血的造血干细胞在培养物中7、10、14、和21天后,针对化合物1.010(黑条)和“仅细胞因子”对照(白条)测量的扩增作用。数据报告为从第1天至所指示的天数所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)、CD34+/CD13+/CD90+/CD38^低-细胞(E)、和CD34+/CD13+/CD90+/CD45RA-细胞(F)的倍数变化。

[0070] 图53A-F展示了使用源自动员外周血的造血干细胞在培养物中7、10、14、和21天后,针对化合物1.010(黑条)和“仅细胞因子”对照(白条)测量的扩增作用。数据报告为从第1天至所指示的天数所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)、CD34+/CD13+/CD90+/CD38^低-细胞(E)、和CD34+/CD13+/CD90+/CD45RA-细胞(F)的倍数变化。

[0071] 图54A-F展示了使用源自非动员外周血的造血干细胞在培养物中7、10、14、和21天后,针对化合物1.010(黑条)和“仅细胞因子”对照(白条)测量的扩增作用。数据报告为从第1天至所指示的天数所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)、CD34+/CD13+/CD90+/CD38^低-细胞(E)、和CD34+/CD13+/CD90+/CD45RA-细胞(F)的倍数变化。

[0072] 图55A-D展示了在大气氧下在培养物中9天后,针对化合物1.010(黑条)和“仅细胞因子”对照(白条)测量的扩增作用。数据报告为所有活细胞(A)、CD34+细胞(B)、CD34+/CD133+细胞(C)、和CD34+/CD133+/CD90+细胞(D)从第1天至第9天的倍数变化。

具体实施方式

[0073] 本文描述的发明尤其提供了化合物,组合物,以及使用其维持、增强和扩增造血干细胞(HSC)的方法。用于维持、增强和扩增造血干细胞(HSC)的方法和组合物可以源自一种或多种CD34+细胞源(诸如非动员外周血)。CD34+细胞源可以包括外周血、脐带血、和骨髓。已知外周血可靠地携带小数目CD34+造血祖细胞以及甚至更少数目的CD34+和CD133+早期造血祖细胞和干细胞。作为天然地效力最小、最小富集、最稀少且不切实际小数目表现

干细胞的源,干细胞科学家已普遍得出的结论是,与其他潜在的HSC源(诸如骨髓细胞、动员外周血、脐带血)和甚至胚胎或诱导的多能干细胞(也称为iPS)源的CD34+细胞相比,此源不太可能是治疗相关的。尽管使用更大效力的细胞源(诸如骨髓和脐带血)扩增血干细胞的努力失败,但有一些证据表明,促分裂因子、促存活因子和静止诱导因子可以以阳性的方式影响这些细胞的表型并且甚至有助于将其在体外维持一些时间。

[0074] 本发明的诸位发明人已观察到,通过在含有式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1的化合物或表1的化合物的培养基中培养这些细胞,可以成功地维持、扩增和增强多能血干细胞和祖细胞,所述化合物各自在下面进一步描述。特别地,本发明的方法和组合物不仅能够成功地从诸如骨髓、脐带血和动员外周血的常规源衍生HSC,而且还能够从诸如非动员外周血的非常规源衍生HSC。因此,本文描述的方法和组合物提供了治疗相关的干细胞移植产物的产生,所述治疗相关的干细胞移植产物源自易于获取且永久可得的组织源,而无需使供体暴露于显著的风险或疼痛中,并且所述组织源比脐带血更易可得。

[0075] I. 通用技术

[0076] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用本领域技术人员众所周知的分子生物学、微生物学、细胞生物学、生物化学、核酸化学和免疫学的常规技术。诸如以下的文献中充分解释了此类技术:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版(Sambrook等人,2012)和Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第三版(Sambrook和Russel,2001),(在本文统称为“Sambrook”);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑,1987,包括2014年的增补物);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑,1994);Antibodies:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY(Greenfield编辑,2014),Beaucage等人编辑,Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,John Wiley&Sons,Inc.,New York,2000,(包括2014年的增补物),Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells(Makrides编辑,Elsevier Sciences B.V.,Amsterdam,2003),and Current Protocols in Immunology(Horgan K and S.Shaw(1994)(包括2014年的增补物)。

[0077] II. 定义

[0078] 造血细胞不仅包括HSC,而且还包括红细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞、血小板、巨核细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞、B和T淋巴细胞和NK细胞以及各自的谱系祖细胞。

[0079] 如本文所用,“维持”HSC的“扩增”是指培养这些细胞,使得它们继续分裂而不是采取静止状态和/或失去其多能特征。可以使用本领域已知的方法使用已知的多能性标记物来评估细胞的多能性。示例性多能性标记物包括CD133+、CD90+、CD38低/-、CD45RA阴性但总体CD45阳性、和CD34。在一些实施例中,CD34低/-细胞可以是造血干细胞。在实施例中,在CD34低/-细胞是造血干细胞的情况下,这些细胞表达CD133。

[0080] 如本文所用,术语“细胞因子”是指对细胞产生多种作用(例如,诱导生长或增殖)的众多因子中的任何一种。细胞因子可以是人类起源的,或者在对感兴趣的细胞具有活性时可以源自其他物种。所述定义的范围包括例如通过重组手段产生的具有与野生型或纯化的细胞因子相似的生物学活性的分子;以及与细胞因子受体结合并且引起与天然细胞因

子相似的细胞反应的分子。

[0081] 术语“培养”是指细胞在各种种类的培养基(诸如本文公开的任何培养基)上或中的增殖。

[0082] 如本文所用,术语“动员血”是指已暴露于促进细胞从骨髓向外周血和/或身体的其他储库(例如,滑液)或组织中运动的试剂的细胞。

[0083] 如本文所用,短语“非动员外周血”是指从未暴露于促进细胞从骨髓向外周血和/或身体的其他储库中运动的试剂的个体获得的血样品。在一些情况下,“非动员外周血”是指来自未暴露于促进细胞从骨髓向外周血和/或身体的其他储库中运动的试剂至少1、3、5、7或10或更多天的个体的血。在一些情况下,“非动员外周血”是指未暴露于促进细胞从骨髓向外周血和/或身体的其他储库中运动的试剂至少5、7、10、14、21或更多天的个体的血。在一些情况下,“非动员外周血”是指未暴露于促进细胞从骨髓向外周血和/或身体的其他储库中运动的试剂至少14、21、28、35、42、49或更多天的个体的血。

[0084] 如本文所用的“四次跨膜蛋白(tetraspanin)”(也称为“四跨膜蛋白(tetraspan)”或“跨膜4超家族”(TM4SF))是指在所有多细胞真核生物中发现的具有四个跨膜结构域、细胞内N端和C端以及两个细胞外结构域:一个称为小细胞外结构域或环(SED/SEL或EC1)并且另一个较长(典型地100个氨基酸残基)结构域称为大细胞外结构域/环(LED/LEL或EC2)的膜蛋白的家族。哺乳动物中有34种四次跨膜蛋白,其中33种也已在人类中鉴定。四次跨膜蛋白显示出众多特性,所述特性指示其在细胞粘附、运动性、激活和增殖中的生理学重要性以及其对诸如转移或病毒感染的病毒性感染的贡献。

[0085] “个体”可以是脊椎动物、哺乳动物或人类。哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、小鼠和大鼠。在一个方面,个体是人类。

[0086] 如本文所用的“治疗(Treatment、treat或treating)”涵盖对哺乳动物例如人类的疾病或病症的任何治疗,并且包括但不限于:(a)防止可能易患所述疾病或病症但尚未被诊断出患有所述疾病或病症的受试者发生所述疾病或病症;(b)抑制所述疾病或病症,即阻止其发展;(c)减轻和或改善所述疾病或病症,即引起疾病或病症消退;或(d)治愈所述疾病或病症,即停止其发展或进程。通过本发明的方法治疗的个体群体包括患有不希望的病症或疾病的个体以及处于发展所述病症或疾病的风险中的个体。

[0087] “烷基”是指具有所指示的碳原子数目的直链或支链的饱和脂族基团。烷基可以包含任何数目的碳,诸如C₁₋₂、C₁₋₃、C₁₋₄、C₁₋₅、C₁₋₆、C₁₋₇、C₁₋₈、C₁₋₉、C₁₋₁₀、C₂₋₃、C₂₋₄、C₂₋₅、C₂₋₆、C₃₋₄、C₃₋₅、C₃₋₆、C₄₋₅、C₄₋₆和C₅₋₆。例如,C₁₋₆烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。烷基可以是经取代或未经取代的。

[0088] “亚烷基”是指具有所指示的碳原子数目并且连接至少两个其他基团(即,二价烃基)的直链或支链的饱和脂族基团。连接至亚烷基的两个部分可以连接至亚烷基的相同原子或不同原子。例如,直链亚烷基可以是-(CH₂)_n-的二价基团,其中n是1、2、3、4、5或6。代表性亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、异亚丙基、亚丁基、异亚丁基、仲亚丁基、亚戊基和亚己基。亚烷基可以是经取代或未经取代的。

[0089] “烯基”是指具有至少2个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃。烯基可以包含任何数目的碳,诸如C₂、C₂₋₃、C₂₋₄、C₂₋₅、C₂₋₆、C₂₋₇、C₂₋₈、C₂₋₉、C₂₋₁₀、C₃、C₃₋₄、C₃₋₅、C₃₋₆、C₄、C₄₋₅、C₄₋₆、C₅、C₅₋₆、和C₆。烯基可以具有任何合适数目的双键,包括但不限于1、2、3、4、5或更多个。



烯基的例子包括但不限于乙烯基(vinyl、ethenyl)、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、异戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,3-己二烯基、1,4-己二烯基、1,5-己二烯基、2,4-己二烯基、或1,3,5-己三烯基。烯基可以是经取代或未经取代的。

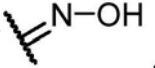

[0090] “炔基”是指具有至少2个碳原子和至少一个三键的直链或支链烃。炔基可以包含任何数目的碳,诸如C₂、C₂₋₃、C₂₋₄、C₂₋₅、C₂₋₆、C₂₋₇、C₂₋₈、C₂₋₉、C₂₋₁₀、C₃、C₃₋₄、C₃₋₅、C₃₋₆、C₄、C₄₋₅、C₄₋₆、C₅、C₅₋₆、和C₆。炔基的例子包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、丁二炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、异戊炔基、1,3-戊二炔基、1,4-戊二炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、1,3-己二炔基、1,4-己二炔基、1,5-己二炔基、2,4-己二炔基、或1,3,5-己三炔基。炔基可以是经取代或未经取代的。

[0091] “卤素”或“卤基”是指氟、氯、溴和碘。

[0092] “卤代烷基”是指如上所定义的烷基,其中一些或全部氢原子被卤素原子替代。至于烷基,卤代烷基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C₁₋₆。例如,卤代烷基包括三氟甲基、氟甲基等。在一些情况下,术语“全氟”可以用于定义其中所有氢都被氟替代的化合物或基团。例如,全氟甲基是指1,1,1-三氟甲基。

[0093] “烷氧基”是指具有氧原子的烷基,所述氧原子将烷基连接至附接点:烷基-O-。至于烷基,烷氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C₁₋₆。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基可以进一步被各种取代基取代。烷氧基可以是经取代或未经取代的。

[0094] “氧代”是指通过双键与化合物的其余部分连接的氧原子(例如, , 其中“波浪线”() 表示与分子其余部分的附接点)。

[0095] “肟”是指通过双键连接至化合物的其余部分并且包含连接至羟基部分的另外一个共价键的氮原子(例如 , 其中的“波浪线”() 表示与分子其余部分的附接点)。

[0096] “羟基烷基”是指如上所定义的烷基,其中至少一个氢原子被羟基替代。至于烷基,羟基烷基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C₁₋₆。示例性羟基烷基包括但不限于羟基-甲基、羟基乙基(其中羟基在1-位或2-位)、羟基丙基(其中羟基在1-位、2-位或3-位)、羟基丁基(其中羟基在1-位、2-位、3-位或4-位)、羟基戊基(其中羟基在1-位、2-位、3-位、4-位或5-位)、羟基己基(其中羟基在1-位、2-位、3-位、4-位、5-位或6-位)、1,2-二羟基乙基等。

[0097] “杂芳基”是指含有5至6个环原子的单环组合体,其中从1至3个环原子是杂原子,诸如N、O或S。另外的杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以是氧化的,诸如但不限于-S(O)-和-S(O)₂。杂芳基可以包括诸如以下的基团:吡咯、吡啶、咪唑、吡唑、三唑、四唑、吡嗪、嘧啶、哒嗪、三嗪(1,2,3-异构体、1,2,4-异构体和1,3,5-异构体)、噁吩、呋喃、噻唑、异噻唑、噁唑和异噁唑。杂芳基可以是经取代或未经取代的。

[0098] “杂环烷基”是指具有从3至6个环成员和从1至3个N、O和S的杂原子的饱和环系。另外的杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以是氧化的,诸如但不

限于-S(O)-和-S(O)₂。杂环烷基中可以包含任何合适数目的杂原子,诸如1、2、3个,或1至2、1至3、2至3个。杂环烷基可以包括诸如以下的基团:氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、氮杂环庚烷、氮杂环辛烷、奎宁环、吡唑烷、咪唑烷、哌嗪(1,2-异构体、1,3-异构体和1,4-异构体)、环氧乙烷、氧杂环丁烷、四氢呋喃、噁烷(四氢吡喃)、氧杂环庚烷、环硫乙烷、硫杂环丁烷、硫杂环戊烷(四氢噻吩)、硫杂环己烷(四氢噻喃)、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、二氧戊环、二硫杂环戊烷、吗啉、硫代吗啉、二噁烷、或二噻烷。杂环烷基可以是未经取代或经取代的。例如,杂环烷基尤其可以被C₁₋₆烷基或氧代(=O)取代。

[0099] 与“包括(including)”、“含有(containing)”或“特征在于(characterized by)”同义的过渡术语“包含(comprising)”是包含性的或开放式的,并且不排除其他未列举的要素或方法步骤。相比之下,过渡短语“由……组成”不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡用语“基本上由……组成”将权利要求的范围限制为所指定的材料或步骤“以及实质上不影响”所要求保护的发明的“一个或多个基本且新颖的特征的那些”

[0100] 除非本文另外定义,否则本文所用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0101] 除非上下文明确指示其他含义,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数提及物。

[0102] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学中心)或双键;外消旋体、非对映异构体、几何异构体、区域异构体和单独的异构体(例如,单独的对映异构体)均旨在涵盖在本发明的范围内。在一些实施方案中,本发明的化合物是基本上不含其他形式的特定对映异构体或非对映异构体。

[0103] 术语“基本上不含”是指10%或更少量的另一种形式,优选8%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更少的另一种形式。在一些实施方案中,异构体是立体异构体。

[0104] III. 本发明的组合物

[0105] 本文提供了扩增的造血干细胞(HSC)的细胞培养物、用于维持和/或增强在培养物中的造血干细胞的扩增的细胞培养基、和含有HSC的细胞群体。此类含有HSC的细胞群体可以通过本文描述的方法来制造。造血干细胞可以包括哺乳动物和禽类的造血干细胞。造血细胞群体可能具有体内治疗性应用的潜力。所述培养基包含基础培养基或补料培养基以及式I的化合物。用于培养哺乳动物细胞的任何合适的基础培养基或补料培养基可以用于本发明的上下文,并且可以包括但不限于可商购培养基,诸如DMEM培养基、IMDM培养基、StemSpan无血清扩增培养基(SFEM)、199/109培养基、Ham的F10/F12培养基、McCoy的5A培养基、 α MEM培养基(不含酚红以及含酚红)、和RPMI1640培养基。在一些实施方案中,所述基础培养基或补料培养基是 α MEM培养基(不含酚红)。

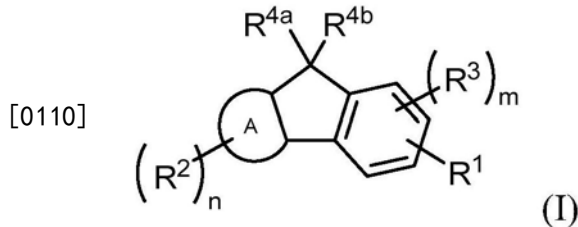
[0106] 在一些实施方案中,本文提供的方法、培养基、系统和试剂盒不包括四次跨膜蛋白。在一些实施方案中,本文提供的方法、培养基、系统和试剂盒还包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂是ER50891。

[0107] 本文提供的含有HSC的细胞群体赋予了在脐带血中发现的干细胞的相同或相似的优点。本领域技术人员将容易认识到来自脐带血的干细胞的特征以及其中的有利特性。在一些实施方案中,本文提供的含有HSC的细胞群体的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%是扩增的HSC细胞。在一些实施方案中,细胞群体中的扩增

的HSC细胞已在延长的时间段内保留了其干细胞表型。例如,在一些实施方案中,含有HSC的细胞群体包括具有包括CD45⁺、CD34⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD45RA⁻、和/或CD38低⁻的细胞表面表型的扩增的HSC细胞,并且已经在体外培养了至少3、7、10、13、14、20、25、30、40、或50或更多天。在一些实施方案中,含有HSC的细胞群体包括具有包括CD133⁺和/或CD90⁺的细胞表面表型的扩增的HSC细胞,并且已经在体外培养了至少3、7、10、13、19、21或更多天。

[0108] A. 式I的化合物

[0109] 在一个方面,本文提供了式I的化合物



[0111] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物;其中

[0112] A是选自苯基、C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和杂芳基的稠合环状部分,或不存在;

[0113] 其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员,并且

[0114] 每个杂芳基包含具有1至3个氮原子环成员的5至6个环成员;

[0115] R¹选自-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1b}、-NR^b-X¹-C(O)-R^{1a}、-C(O)-X¹-NR^b-R^{1a}、-X¹-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-X¹-C(O)-R^{1b}、-C(O)-NR^b-X¹-C(O)-R^{1b}、-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-X¹-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-R^{1a}、-C(O)-R^{1a}、-O-C(O)-R^{1a}、卤基、和-NO₂;

[0116] R^{1a}选自H、C₁₋₁₀烷基;C₁₋₁₀卤代烷基;

[0117] R^{1b}选自-OR^a、-NR^aR^b、杂环烷基、和苯基

[0118] 其中每个杂环烷基包含具有1至3个选自氮、氧和硫的杂原子环成员的从5至6个环成员,并且

[0119] 每个杂环烷基和苯基是未经取代的或被1至4个C₁₋₄烷基、-OH、和卤基取代;

[0120] 每个R²独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{2a}、-NR^b-C(O)-R^{2a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、-X¹-S(O)₂NR^aR^b、和-O-C(O)-R

[0121] 每个R³独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{3a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b;

[0122] 每个R^{2a}和R^{3a}独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀卤代烷基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b;

[0123] R^{4a}选自-OR^a、-NR^aR^b、-O-C(O)-R^a、和氰基;

[0124] R^{4b}是H;或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代或脞部分;

[0125] 每个R^a和R^b独立地选自H和C₁₋₄烷基;

[0126] 每个X¹是C₁₋₄亚烷基;

[0127] 下标n是从0至3的整数;并且

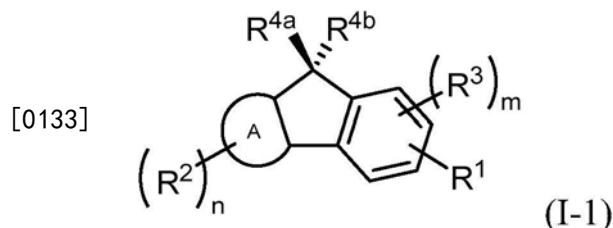
[0128] 下标m是从0至2的整数。

[0129] 在一些实施方案中,所述式I的化合物不是2-氟-9H-茚-9-酮、2-氨基-9H-茚-9-酮、2-硝基-9H-茚-9-酮、N-(9-氧代-9H-茚-2-基)乙酰胺。

[0130] 在一些方面,式I的化合物可以抑制或改变PTEN的活性,从而提供用于扩增和维持在培养物中的造血干细胞的改善条件物。

[0131] PTEN被称为肿瘤抑制因子,其在高频率的癌症中发生突变。此蛋白负调节磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP₃)的细胞内水平并且通过负调节Akt/PKB信号传导途径而起肿瘤抑制因子的功能。PTEN抑制剂是降低、阻断、防止或在其他方面减小PTEN的天然活性的化合物。

[0132] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式I-1的结构

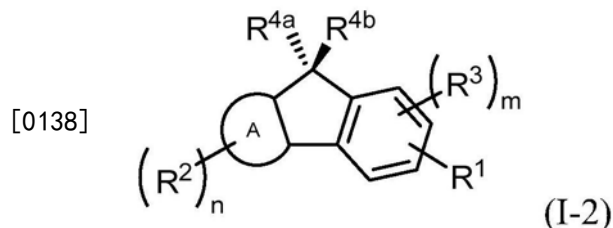


[0134] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0135] R^{4a}选自-OR^a和-NR^aR^b;

[0136] R^{4b}是H。

[0137] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式I-2的结构



[0139] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0140] R^{4a}选自-OR^a和-NR^aR^b;

[0141] R^{4b}是H。

[0142] 在一些实施方案中,式I、I-1和I-2中的A是

[0143] 选自C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和苯基的稠合环状部分,

[0144] 其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员。

[0145] 在一些实施方案中,式I、I-1和I-2中的A是选自C₃₋₆环烷基和苯基的稠合环状部分。

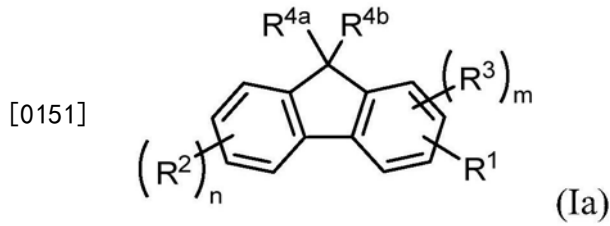
[0146] 在一些实施方案中,式I、I-1和I-2中的A是稠合C₃₋₆环烷基。

[0147] 在一些实施方案中,式I中的R^{4a}是-OR^a;R^{4b}是H;或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代部分。

[0148] 在一些实施方案中,式I中的R^{4a}是-OR^a;R^{4b}是H。

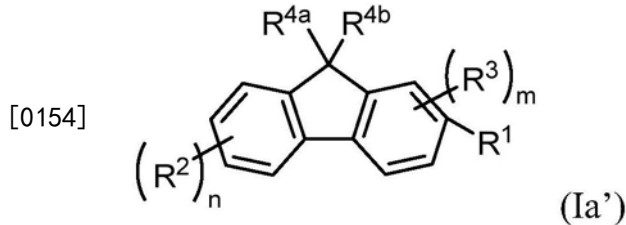
[0149] 在一些实施方案中,式I中的R^{4a}是-NR^aR^b;R^{4b}是H。

[0150] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式Ia的结构



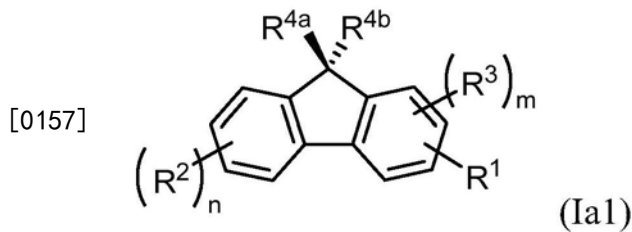
[0152] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0153] 在一些实施方案中,所述式Ia的化合物具有式Ia'的结构



[0155] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0156] 在一些实施方案中,所述式Ia的化合物具有式Ia1的结构

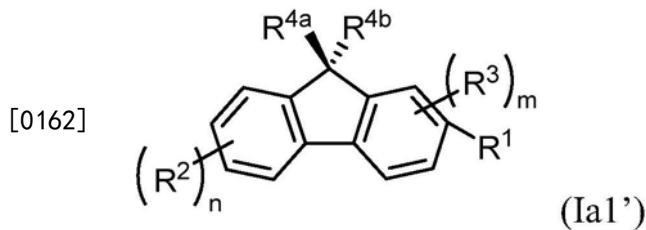


[0158] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0159] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

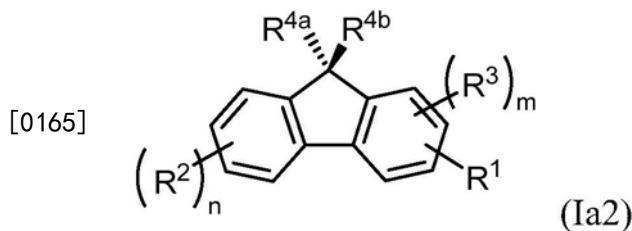
[0160] R^{4b} 是H。

[0161] 在一些实施方案中,所述式Ia1的化合物具有式Ia1'的结构



[0163] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0164] 在一些实施方案中,所述式Ia的化合物具有式Ia2的结构。

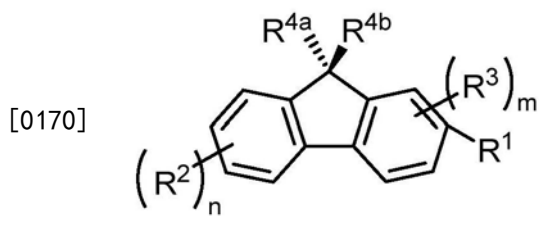


[0166] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0167] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

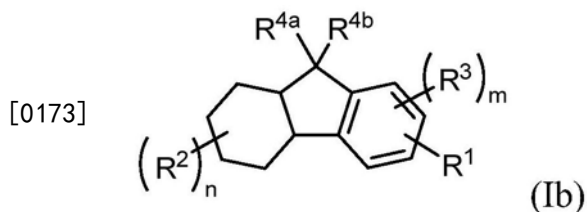
[0168] R^{4b} 是H。

[0169] 在一些实施方案中,所述式Ia2的化合物具有式Ia2'的结构。



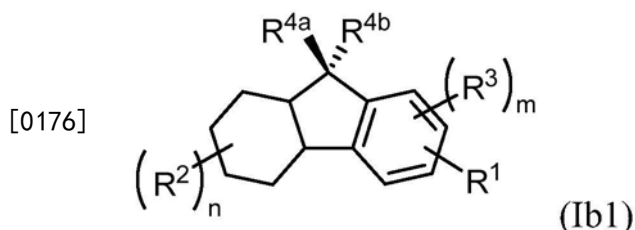
[0171] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0172] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式Ib的结构



[0174] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0175] 在一些实施方案中,所述式Ib的化合物具有式Ib1的结构

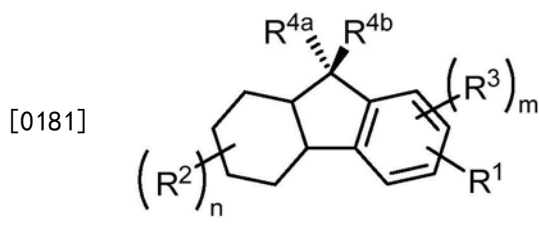


[0177] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0178] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

[0179] R^{4b} 是H。

[0180] 在一些实施方案中,所述式Ib的化合物具有式Ib2的结构。

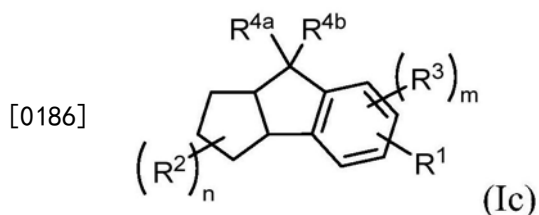


[0182] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0183] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

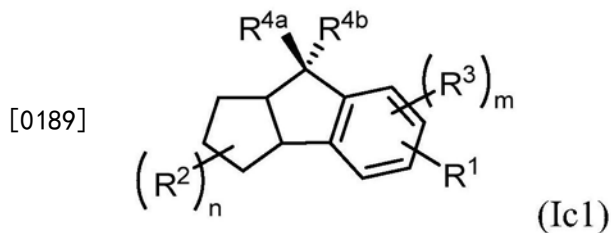
[0184] R^{4b} 是H。

[0185] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式Ic的结构



[0187] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0188] 在一些实施方案中,所述式Ic的化合物具有式Ic1的结构

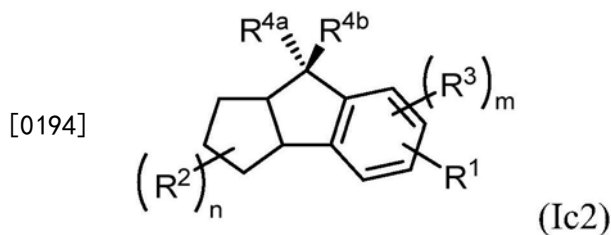


[0190] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0191] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

[0192] R^{4b} 是H。

[0193] 在一些实施方案中,所述式Ic的化合物具有式Ic2的结构。

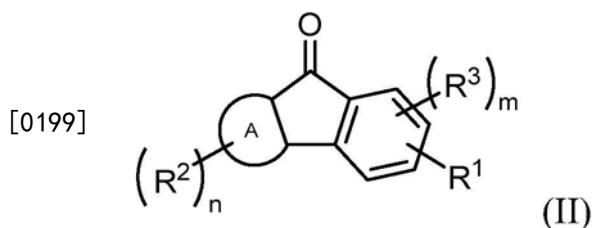


[0195] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0196] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

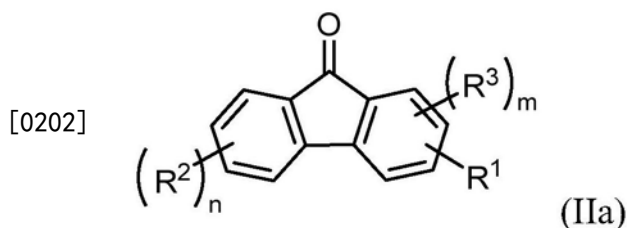
[0197] R^{4b} 是H。

[0198] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式II的结构



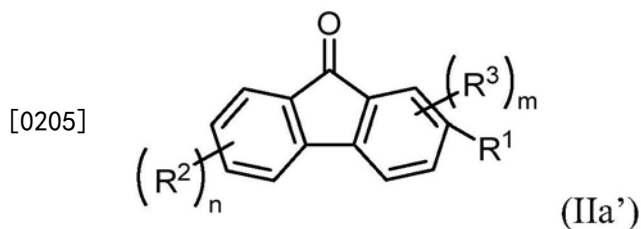
[0200] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0201] 在一些实施方案中,所述式II的化合物具有式IIa的结构



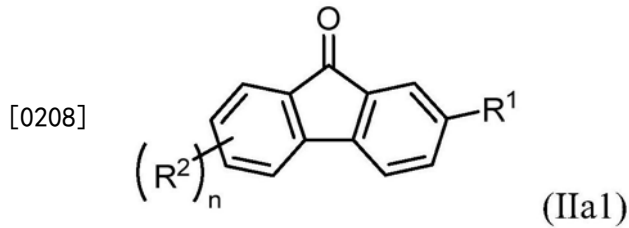
[0203] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0204] 在一些实施方案中,所述式IIa的化合物具有式IIa'的结构

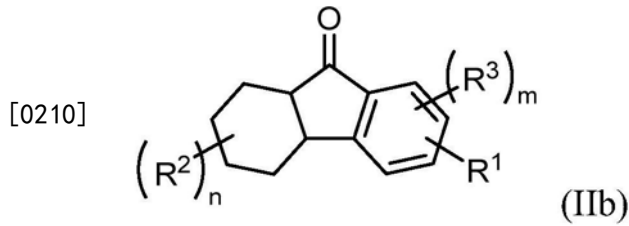


[0206] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0207] 在一些实施方案中,所述式IIa的化合物具有式IIa1的结构

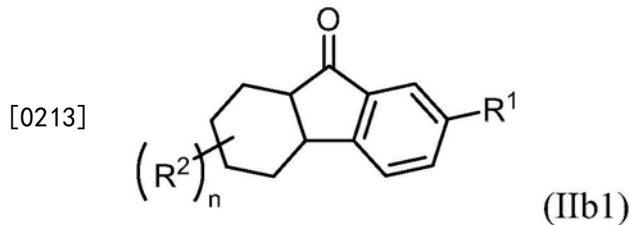


[0209] 在一些实施方案中,所述式II的化合物具有式IIb的结构



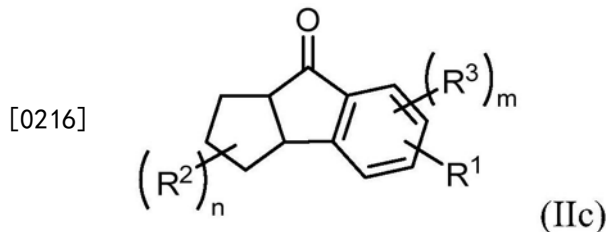
[0211] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0212] 在一些实施方案中,所述式IIb的化合物具有式IIb1的结构



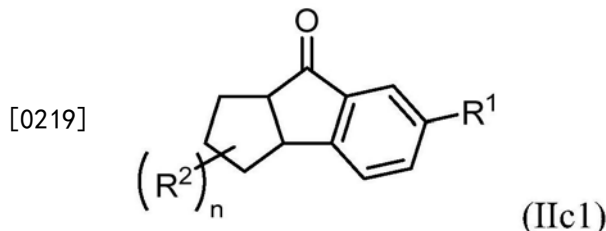
[0214] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0215] 在一些实施方案中,所述式II的化合物具有式IIc的结构



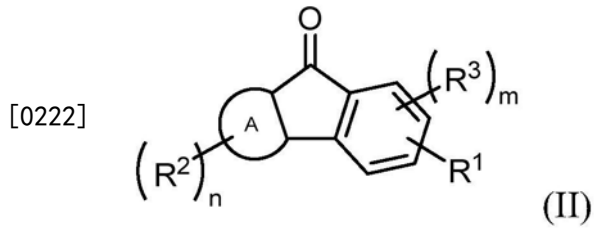
[0217] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0218] 在一些实施方案中,所述式IIc的化合物具有式IIc1的结构



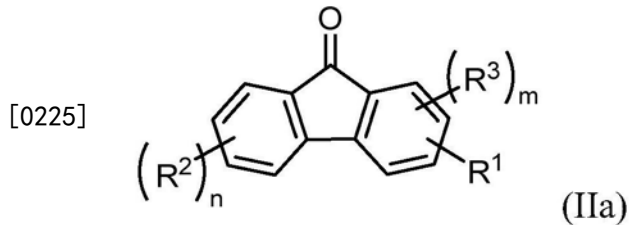
[0220] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0221] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式II的结构



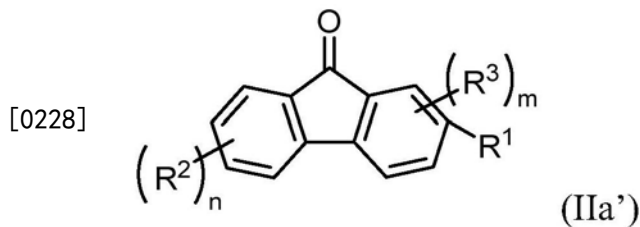
[0223] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0224] 在一些实施方案中,所述式II的化合物具有式IIa的结构



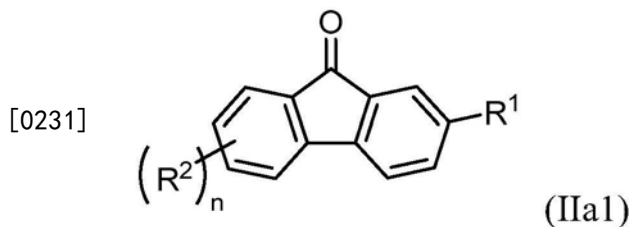
[0226] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0227] 在一些实施方案中,所述式IIa的化合物具有式IIa'的结构

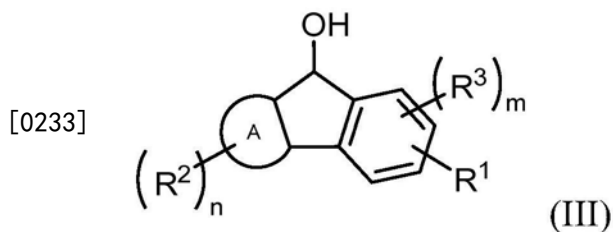


[0229] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0230] 在一些实施方案中,所述式IIa的化合物具有式IIa1的结构

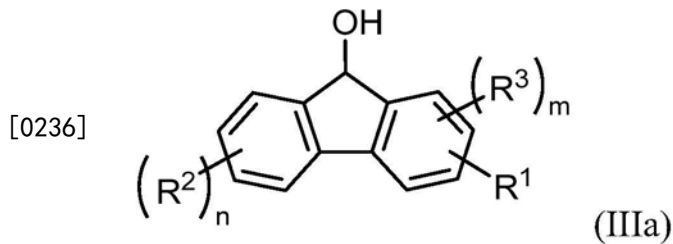


[0232] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式III的结构



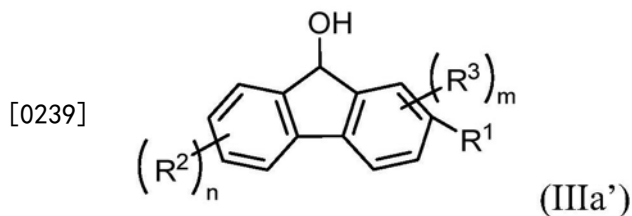
[0234] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0235] 在一些实施方案中,所述式III的化合物具有式IIIa的结构



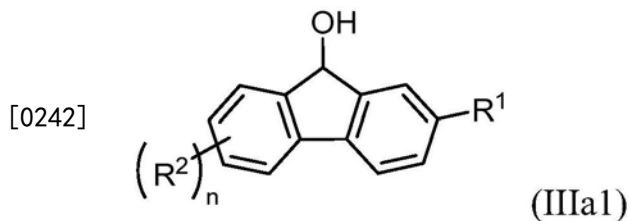
[0237] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0238] 在一些实施方案中,所述式IIIa的化合物具有式IIIa'的结构



[0240] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0241] 在一些实施方案中,所述式IIIa的化合物具有式IIIa1的结构



[0243] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0244] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹选自-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-X¹-C(O)-R^{1a}、-C(O)-X¹-NR^b-R^{1a}、-X¹-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-X¹-C(O)-R^{1b}、-C(O)-NR^b-X¹-C(O)-R^{1b}、-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-R^{1a}、和-C(O)-R^{1a}。

[0245] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹选自-C(O)-NH-R^{1a}、-NH-C(O)-R^{1a}、-NH-C(O)-O-R^{1a}、-O-C(O)-NH-R^{1a}、-NH-R^{1a}、和-C(O)-R^{1a}。

[0246] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹选自-NH-C(O)-R^{1a}、-NH-C(O)-O-R^{1a}、和-NR^b-R^{1a}。

[0247] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹选自-NH-C(O)-R^{1a}、和-NH-C(O)-O-R^{1a}。

[0248] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹是-NH-C(O)-R^{1a}。

[0249] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹是卤

基。

[0250] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R¹是氟。

[0251] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的每个R²独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{2a}、-NR^b-C(O)-R^{2a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b。

[0252] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的每个R²独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b。

[0253] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的每个R²独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b。

[0254] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的每个R²独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^b-C(O)-R^{2a}、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b。

[0255] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的每个R²独立地选自-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b或-X¹-NR^aR^b。

[0256] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc、III、IIIa、或IIIa'中的每个R³独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、-C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{3a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b。

[0257] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc、III、IIIa、或IIIa'中的每个R³独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b。

[0258] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc、III、IIIa、或IIIa'中的每个R³独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b。

[0259] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc、或III、IIIa、或IIIa'中的每个R³独立地选自卤素、-C₁₋₈烷基、C₁₋₈卤代烷基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b。

[0260] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc、或III、IIIa、或IIIa'中的每个R³独立地选自-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b或-X¹-NR^aR^b。

[0261] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、

Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R^{1a}是C₁₋₆烷基或C₁₋₆卤代烷基。

[0262] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R^{1a}是C₁₋₆烷基。

[0263] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R^{1a}是C₂₋₆烷基或C₂₋₆卤代烷基。

[0264] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1中的R^{1a}是C₂₋₆烷基。

[0265] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是-OR^a。

[0266] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是-OH。

[0267] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是杂环烷基,其中每个杂环烷基包含具有1至3个选自氮、氧和硫的杂原子环成员的从5至6个环成员,并且是未经取代的或被1至4个C₁₋₄烷基、-OH、和卤基取代。

[0268] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是四氢吡喃。

[0269] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是未经取代的或被1至4个C₁₋₄烷基、-OH、和卤基取代的苯基。

[0270] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是4-羟基苯基。

[0271] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的R^{1b}是-NH₂或-N(CH₃)₂。

[0272] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的每个R^a和R^b独立地选自H和C₁₋₂烷基。

[0273] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的每个X¹是C₁₋₂亚烷基。

[0274] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的每个X¹是C₁亚烷基。

[0275] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的下标n是从1至3的整数。

[0276] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的下标n是1。

[0277] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、或IIc1中的下标n是0。

[0278] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc中的下标m是从1至2的整数。

[0279] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc中的下标m是0。

[0280] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIb、IIc中的下标m是1。

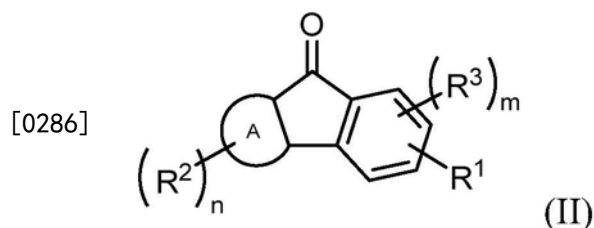
[0281] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、或Ic2中的R^{4a}是-OH或-NH₂。

[0282] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、或Ic2中的R^{4a}是-OH。

[0283] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、或Ic2中的R^{4a}是-O-C₁₋₄烷基。

[0284] 在一些实施方案中,式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、或Ic2中的R^{4a}是-O-C(O)-C₁₋₄烷基。

[0285] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式II的结构



[0287] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0288] R¹选自-NH-C(O)-R^{1a}、-NH-C(O)-O-R^{1a}、-NH-X¹-C(O)-R^{1a}、和-NH-R^{1a};

[0289] 每个R²和R³独立地选自-NH₂、-OH、-X¹-NH₂、-X¹-OH;

[0290] R^{1a}选自C₂₋₆烷基;和C₁₋₆卤代烷基;

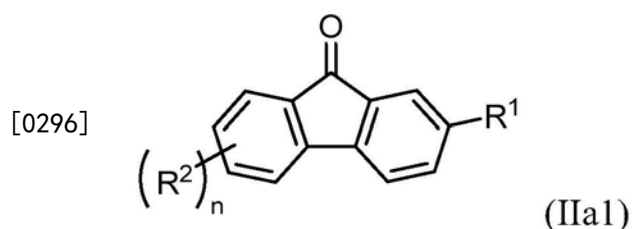
[0291] 每个X¹是C₁₋₂亚烷基;

[0292] 下标n是从0至2的整数;并且

[0293] 下标m是0或1。

[0294] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0295] 在一些实施方案中,所述式IIa的化合物具有式IIa1的结构



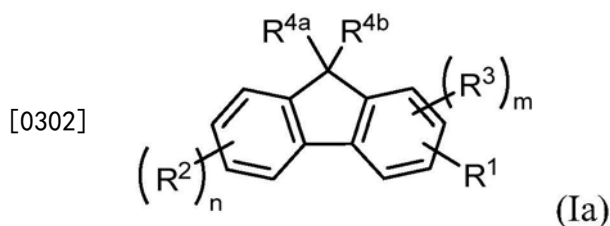
[0297] R¹选自-NH-C(O)-R^{1a};

[0298] R²独立地选自-NH₂或-OH;

[0299] R^{1a}选自C₂₋₆烷基;和C₁₋₆卤代烷基;并且

[0300] 下标n是0或1。

[0301] 在一些实施方案中,所述式I的化合物具有式Ia的结构



[0303] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0304] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$;

[0305] R^2 独立地选自 $-NH_2$ 或 $-OH$;

[0306] R^{1a} 选自 C_{2-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;

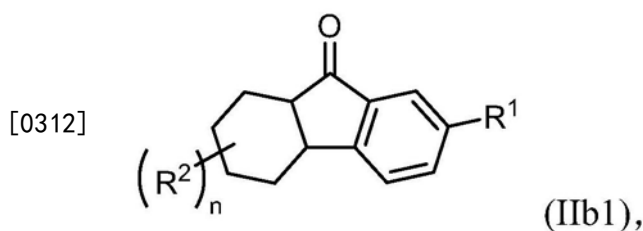
[0307] R^{4a} 是 $-OH$;

[0308] R^{4b} 是 H ;

[0309] 下标n是0或1;并且

[0310] 下标m是0。

[0311] 在一些实施方案中,所述式IIb的化合物具有式IIb1的结构



[0313] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

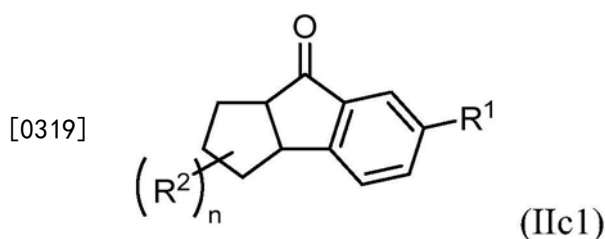
[0314] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$;

[0315] R^2 独立地选自 $-NH_2$ 或 $-OH$;

[0316] R^{1a} 选自 C_{2-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;并且

[0317] 下标n是0或1。

[0318] 在一些实施方案中,所述式IIc的化合物具有式IIc1的结构



[0320] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0321] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$;

[0322] R^2 独立地选自 $-NH_2$ 或 $-OH$;

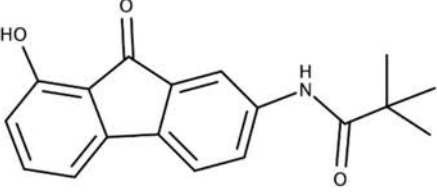
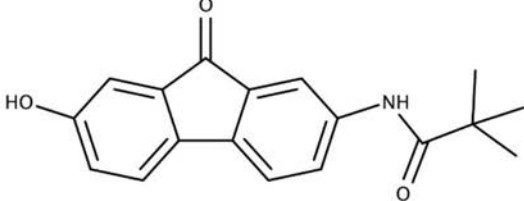
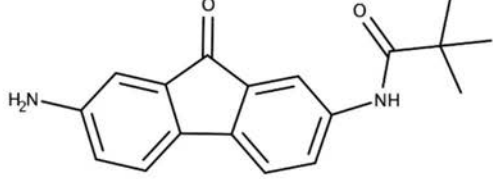
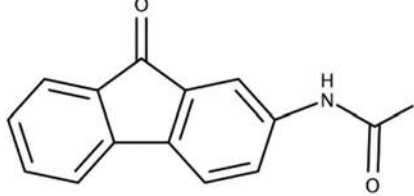
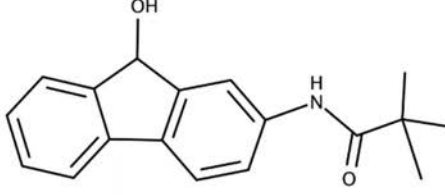
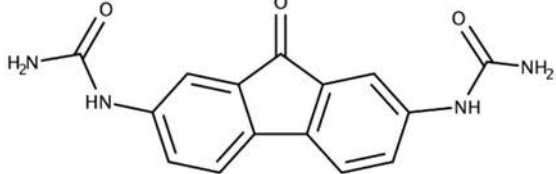
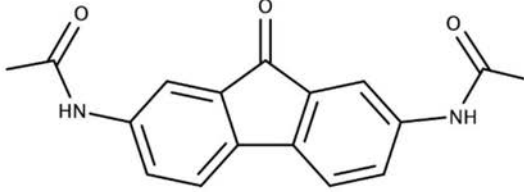
[0323] R^{1a} 选自 C_{2-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;并且

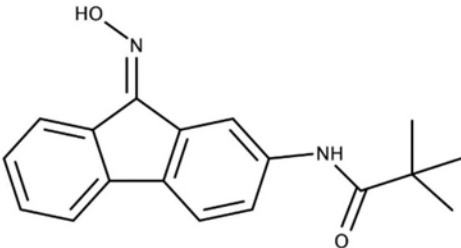
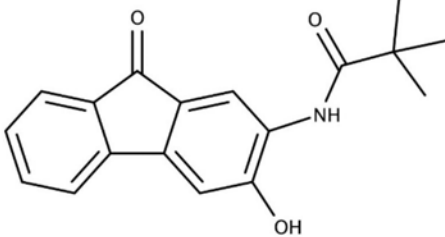
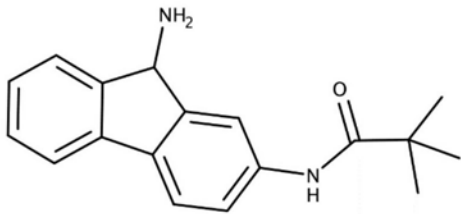
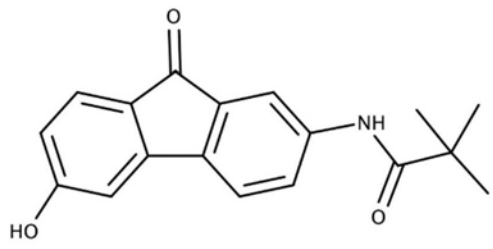
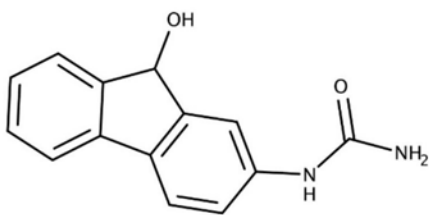
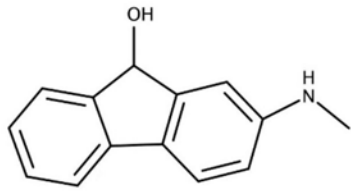
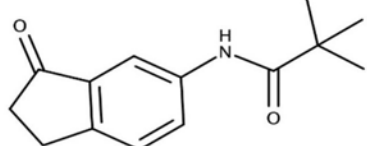
[0324] 下标n是0或1。

[0325] 在一些实施方案中,所述式I的化合物选自表1。

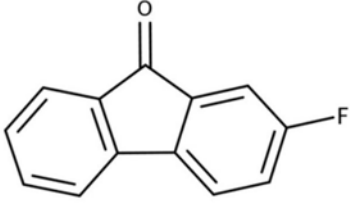
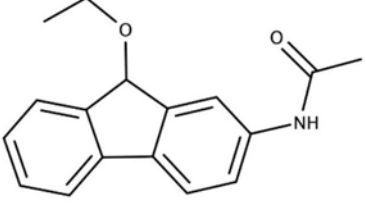
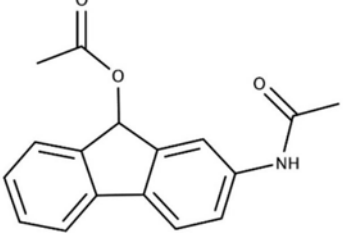
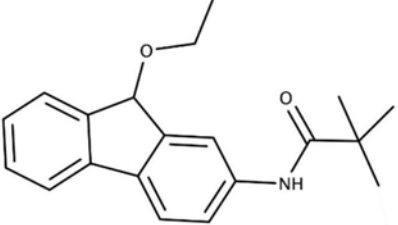
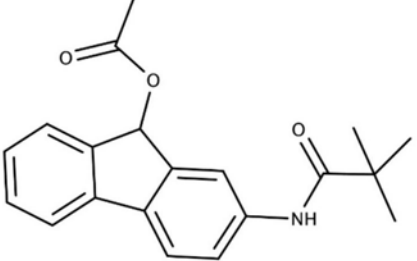
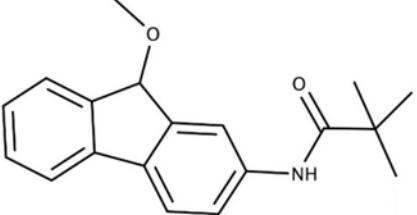
[0326] 表1:特定化合物

化合物	结构
1.001	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c3c(c1)C(=O)C4CCCC42</chem>
1.002	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c3c(c1)C(=O)C4CCCCC42</chem>
[0327] 1.003	 <chem>CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc2c3c(c1)C(=O)C4C=CC=C42</chem>
1.004	 <chem>CC(C)(C)Nc1ccc2c3c(c1)C(=O)C4C=CC=C42</chem>
1.005	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c3c(c1)C(=O)C4C=CC=C42</chem>

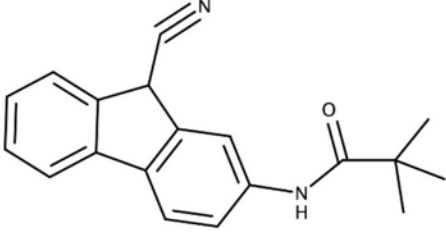
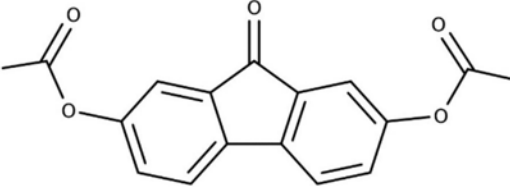
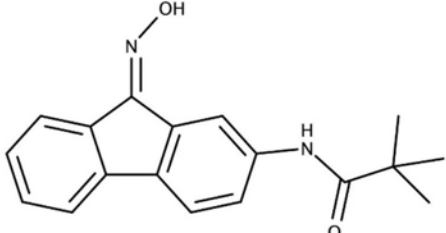
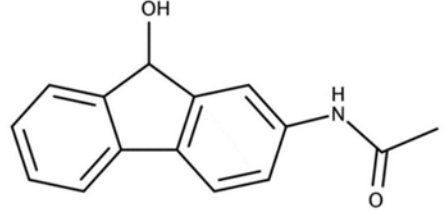
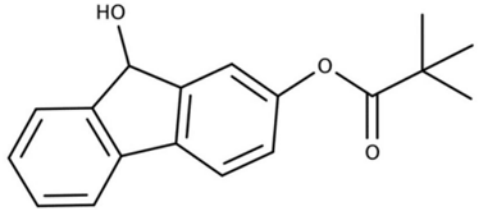
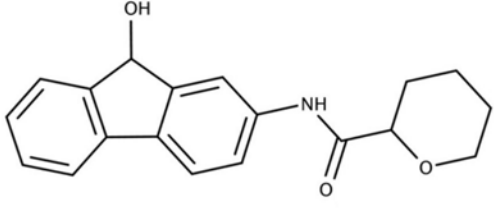
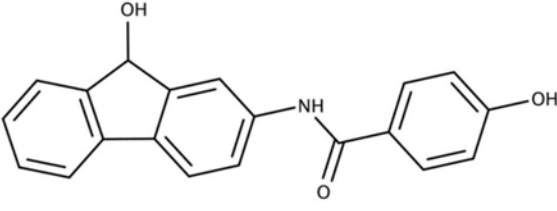
1.006	
1.007	
1.008	
[0328] 1.009	
1.010	
1.011	
1.012	

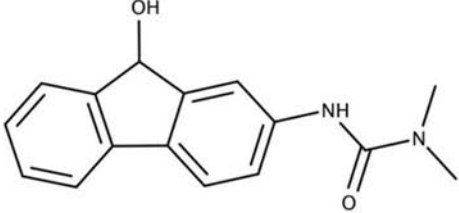
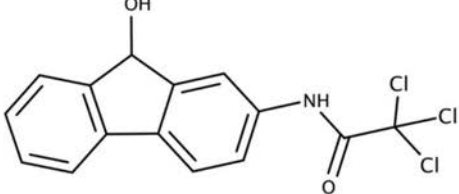
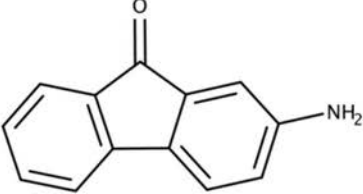
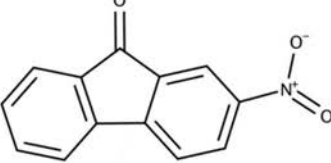
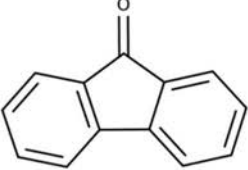
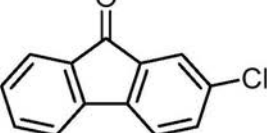
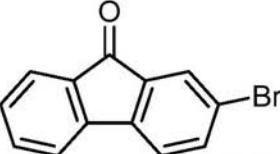
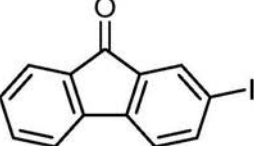
1.013	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2N=O</chem>
1.014	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc(O)c2c1c3ccccc3c2=O</chem>
1.015	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc(N)c2c1c3ccccc3c2</chem>
[0329] 1.016	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc(O)c2c1c3ccccc3c2=O</chem>
1.017	 <chem>NC(=O)Nc1ccc(O)c2c1c3ccccc3c2=O</chem>
1.018	 <chem>Cc1ccc(O)c2c1c3ccccc3c2=O</chem>
1.019	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc(=O)c2c1c3ccccc3c2</chem>

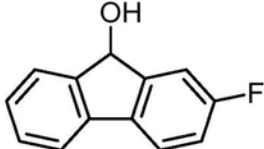
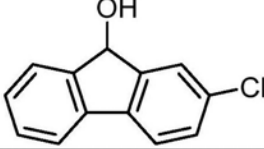
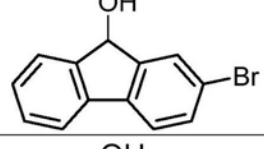
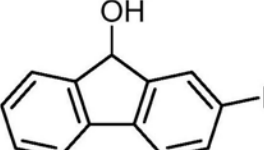
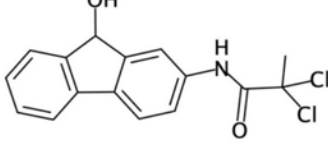
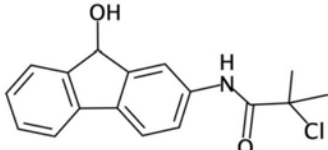
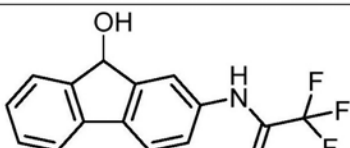
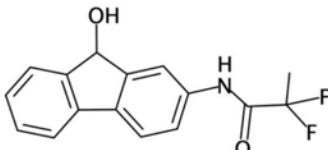
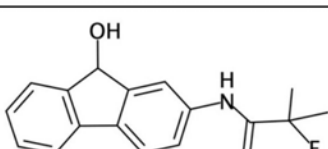
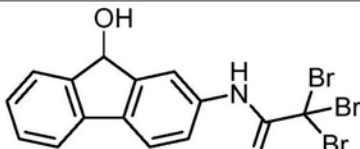
[0330]

1.020	 <chem>O=C1c2cc(F)ccc2c3ccccc13</chem>
1.021	 <chem>CCOC1c2cc(NC(=O)C)ccc2c3ccccc13</chem>
1.022	 <chem>CC(=O)OC1c2cc(NC(=O)C)ccc2c3ccccc13</chem>
1.023	 <chem>CCOC1c2cc(NC(=O)C(C)(C)C)ccc2c3ccccc13</chem>
1.024	 <chem>CC(=O)OC1c2cc(NC(=O)C(C)(C)C)ccc2c3ccccc13</chem>
1.025	 <chem>COC1c2cc(NC(=O)C(C)(C)C)ccc2c3ccccc13</chem>

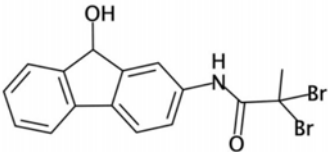
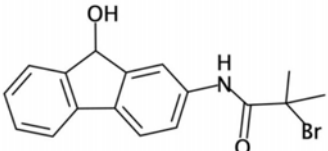
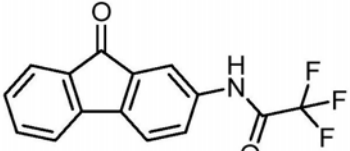
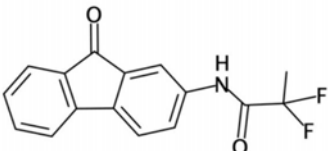
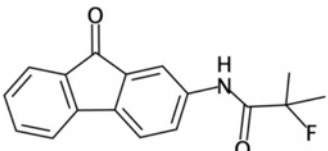
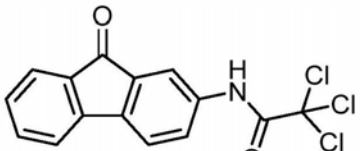
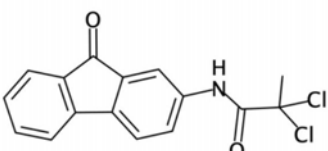
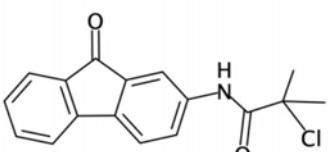
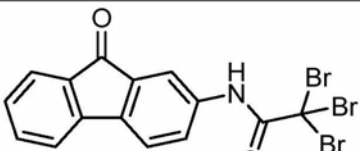
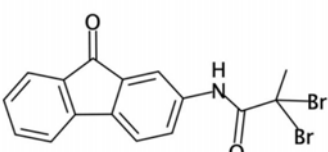
[0331]

1.026	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2C#N</chem>
1.027	 <chem>CC(=O)Oc1ccc2c(c1)c(=O)c3ccccc23OC(=O)C</chem>
1.028	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2N=O</chem>
1.029	 <chem>CC(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2O</chem>
1.030	 <chem>CC(C)(C)C(=O)Oc1ccc2c(c1)c3ccccc23O</chem>
1.031	 <chem>C1CCNCC1C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2O</chem>
1.032	 <chem>Oc1ccc(cc1)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3c2O</chem>

1.033	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2O</chem>
1.034	 <chem>C[Si](Cl)(Cl)C(=O)Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2O</chem>
1.035	 <chem>Nc1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2=O</chem>
[0332] 1.036	 <chem>[O-][N+](=O)c1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2=O</chem>
1.037	 <chem>O=C1C=Cc2ccccc2C1=O</chem>
1.038	 <chem>Clc1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2=O</chem>
1.039	 <chem>BrC1=CC=C2C(=O)C=C1C2=O</chem>
1.040	 <chem>Ic1ccc2c(c1)c3ccccc3C(=O)c2=O</chem>

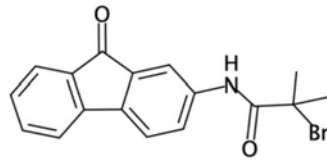
1.041	
1.042	
1.043	
1.044	
1.045	
1.046	
1.047	
1.048	
1.049	
1.050	

[0333]

1.051	
1.052	
1.053	
1.054	
1.055	
1.056	
1.057	
1.058	
1.059	
1.060	

[0334]

[0335]

1.061

[0336] 用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约10-16,000nM的本文公开的式I的化合物或子实施方案,诸如约50-450nM、100-400nM、约150-350nM、约200-300nM、约225-275nM、或约240-260nM,诸如约300-3000nM、500-2000nM、约550-1550nM、约800-1200nM、约900-1100nM、或约950-1050nM,或诸如约10nM、15nM、20nM、25nM、30nM、35nM、40nM、45nM、50nM、55nM、60nM、65nM、70nM、75nM、80nM、85nM、90nM、95nM、100nM、105nM、110nM、115nM、120nM、125nM、130nM、135nM、140nM、145nM、150nM、155nM、160nM、165nM、170nM、175nM、180nM、185nM、190nM、195nM、200nM、205nM、210nM、215nM、220nM、225nM、230nM、240nM、245nM、250nM、255nM、260nM、265nM、270nM、275nM、280nM、285nM、290nM、295nM、300nM、325nM、350nM、400nM、425nM、450nM、475nM、500nM、525nM、550nM、575nM、600nM、625nM、650nM、675nM、700nM、725nM、750nM、775nM、800nM、825nM、850nM、875nM、900nM、925nM、950nM、975nM、1000nM、1100nM、1200nM、1300nM、1400nM、1500nM、1600nM、1700nM、1800nM、1900nM、2000nM、2100nM、2200nM、2300nM、2400nM、2500nM、2600nM、2700nM、2800nM、2900nM、3000nM、3100nM、3200nM、3300nM、3400nM、3500nM、3600nM、3700nM、3800nM、3900nM、4000nM、5000nM、6000nM、7000nM、8000nM、9000nM、10,000nM、11,000nM、12,000nM、13,000nM、14,000nM、15,000nM、16,000nM、或更多中的任何一种的本文公开的式I的化合物或子实施方案,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,用于本发明的方法的培养基组合物可以包含约500nM的本文公开的式I的化合物或子实施方案。在一些实施方案中,用于本发明的方法的培养基组合物可以包含约800nM的本文公开的式I的化合物或子实施方案。在一些实施方案中,用于本发明的方法的培养基组合物可以包含约1,600nM的本文公开的式I的化合物或子实施方案。在一些实施方案中,用于本发明的方法的培养基组合物可以包含约8,000nM的本文公开的式I的化合物或子实施方案。

[0337] 化合物的制备

[0338] 本发明的某些化合物可以按照如本文件的实施例部分中描述的方法来制备。另外,还描述了可用于制备本发明化合物的某些中间体化合物的合成。

[0339] B. 细胞因子和生长因子

[0340] 用于本文公开的方法的细胞培养基(例如基础培养基或补料培养基)可以含有一种或多种细胞因子或生长因子。这些试剂促进HSC的存活、维持、扩增或增强,并且可以通过可商购源获得。

[0341] 用于培养HSC的细胞培养基可以包含血小板生成素(TPO)。血小板生成素是由肝脏和肾脏产生的糖蛋白激素,其调节血小板的产生。它刺激巨核细胞的产生和分化,巨核细胞是萌生大量血小板中的骨髓细胞。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约50-250ng/mL的TPO,诸如约75-225ng/mL、约100-200ng/mL、或约125-175ng/mL,或诸如约75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、141ng/mL、142ng/mL、143ng/mL、144ng/mL、145ng/mL、146ng/mL、147ng/mL、148ng/mL、149ng/mL、150ng/mL、151ng/mL、152ng/mL、

153ng/mL、154ng/mL、155ng/mL、156ng/mL、157ng/mL、158ng/mL、159ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、245ng/mL、或250ng/mL或更多中的任何一种的TPO,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中TPO的浓度是约150ng/mL。

[0342] 本文公开的任何细胞培养基还可以包含干细胞因子(也称为SCF、KIT-配体、KL、或steel因子)。SCF是结合至c-KIT受体(CD117)并且在骨髓中HSC的调节中发挥作用的细胞因子。SCF已显示增加HSC的体外存活,并且有助于体内HSC的自我更新和维持。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约5-100ng/mL的SCF,诸如约10-90ng/mL、约20-80ng/mL、约30-70ng/mL、约40-60ng/mL、或约45-55ng/mL,或诸如约5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL、49ng/mL、50ng/mL、51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL、59ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL或更多中的任何一种的SCF,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含100ng/mL或更高的浓度。因此,SCF的浓度还包括110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、200ng/mL、或更多SCF,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中SCF的浓度是约100ng/mL。

[0343] 本文公开的细胞培养基还可以包含胰岛素样生长因子1(IGF-1;也称为生长调节素C)。IGF-1是在分子结构上与胰岛素相似的激素。它在儿童生长中起重要作用,并且在成人中具有合成代谢作用。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约100-400ng/mL的IGF-1,诸如约125-375ng/mL、约150-350ng/mL、约175-325ng/mL、约200-300ng/mL、约225-275ng/mL、约240-260ng/mL、或约245-255ng/mL,或诸如约100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的IGF-1,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中IGF-1的浓度是约250ng/mL

[0344] 本文提供的用于培养HSC的细胞培养基可以进一步包含fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。FLT3L是刺激细胞生长、增殖和分化的细胞因子。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约20-400ng/mL的FLT3L,诸如约40-375ng/mL、约60-350ng/mL、约80-325ng/mL、约100-300ng/mL、约140-275ng/mL、约160-260ng/mL、或约180-255ng/mL,或诸如

约20ng/mL、40ng/mL、60ng/mL、80ng/mL、100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的FLT3L,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中FLT3L的浓度是约100ng/mL。

[0345] 本文提供的用于培养HSC的细胞培养基可以进一步包含人类生长激素(HGH)。HGH是刺激细胞生长、增殖和分化的蛋白激素。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约100-400ng/mL的EGF,诸如约125-375ng/mL、约150-350ng/mL、约175-325ng/mL、约200-300ng/mL、约225-275ng/mL、约240-260ng/mL、或约245-255ng/mL,或诸如约100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的EGF,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中HGH的浓度是约250ng/mL。

[0346] 本文提供的用于培养HSC的细胞培养基可以进一步包含表皮生长因子(EGF)。EGF是一种生长因子,其通过与其受体EGFR结合来刺激细胞生长、增殖和分化。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约100-400ng/mL的EGF,诸如约125-375ng/mL、约150-350ng/mL、约175-325ng/mL、约200-300ng/mL、约225-275ng/mL、约240-260ng/mL、或约245-255ng/mL,或诸如约100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、

335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的EGF,包括落入这些浓度之间的值。

[0347] 本文公开的任何细胞培养基还可以包含肝细胞生长因子(HGF)。HGF是旁分泌细胞生长、运动性和形态发生因子。它由间充质细胞分泌,并且主要作用于上皮细胞和内皮细胞,但也作用于造血祖细胞和T细胞。已显示HGF在胚胎器官发育中,特别是在肌生成中、在成年器官再生中和在伤口愈合中具有重要作用。用于本发明的方法的细胞培养基组合可以包含约100-400ng/mL的HGF,诸如约125-375ng/mL、约150-350ng/mL、约175-325ng/mL、约200-300ng/mL、约225-275ng/mL、约240-260ng/mL、或约245-255ng/mL,或诸如约100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的HGF,包括落入这些浓度之间的值。

[0348] 本文公开的细胞培养基还可以含有多效生长因子(PTN)。PTN是受发育调节的蛋白质,已显示其推测通过激活肿瘤血管生成而参与肿瘤的生长和转移。用于本发明的方法的细胞培养基组合可以包含约100-400ng/mL的PTN,诸如约125-375ng/mL、约150-350ng/mL、约175-325ng/mL、约200-300ng/mL、约225-275ng/mL、约240-260ng/mL、或约245-255ng/mL,或诸如约100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、241ng/mL、242ng/mL、243ng/mL、244ng/mL、245ng/mL、246ng/mL、247ng/mL、248ng/mL、249ng/mL、250ng/mL、251ng/mL、252ng/mL、253ng/mL、254ng/mL、255ng/mL、256ng/mL、257ng/mL、258ng/mL、259ng/mL、260ng/mL、265ng/mL、270ng/mL、275ng/mL、280ng/mL、285ng/mL、290ng/mL、295ng/mL、300ng/mL、305ng/mL、310ng/mL、315ng/mL、320ng/mL、325ng/mL、330ng/mL、335ng/mL、340ng/mL、345ng/mL、350ng/mL、355ng/mL、360ng/mL、365ng/mL、370ng/mL、375ng/mL、380ng/mL、385ng/mL、390ng/mL、395ng/mL、或400ng/mL或更多中的任何一种的PTN,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,PTN不改善造血干细胞的维持或增强。

[0349] 在进一步的实施方案中,本文公开的细胞培养基组合可以另外含有碱性成纤维细胞生长因子(bFGF、FGF2或FGF- β)。bFGF是人类胚胎干细胞培养基的关键组分。然而,尽管生长因子是细胞保持未分化状态所必需的,但其进行此过程的机制定义不清。用于本发明

的方法的细胞培养基组合物可以包含约25-225ng/mL的bFGF,诸如约50-200ng/mL、约100-200ng/mL、约100-150ng/mL、或约115-135ng/mL,或诸如约75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、116ng/mL、117ng/mL、118ng/mL、119ng/mL、120ng/mL、121ng/mL、122ng/mL、123ng/mL、124ng/mL、125ng/mL、126ng/mL、127ng/mL、128ng/mL、129ng/mL、130ng/mL、131ng/mL、132ng/mL、133ng/mL、134ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、141ng/mL、142ng/mL、143ng/mL、144ng/mL、145ng/mL、146ng/mL、147ng/mL、148ng/mL、149ng/mL、150ng/mL、151ng/mL、152ng/mL、153ng/mL、154ng/mL、155ng/mL、156ng/mL、157ng/mL、158ng/mL、159ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、245ng/mL、或250ng/mL或更多中的任何一种的bFGF,包括落入这些浓度之间的值。

[0350] 本文公开的任何细胞培养基还可以包含血管生成素1 (ANG1)。ANG1是在胚胎和出生后血管生成中起作用的血管生长因子的血管生成素家族的成员。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约25-225ng/mL的ANG1,诸如约50-200ng/mL、约100-200ng/mL、约100-150ng/mL、或约115-135ng/mL,或诸如约75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、105ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、116ng/mL、117ng/mL、118ng/mL、119ng/mL、120ng/mL、121ng/mL、122ng/mL、123ng/mL、124ng/mL、125ng/mL、126ng/mL、127ng/mL、128ng/mL、129ng/mL、130ng/mL、131ng/mL、132ng/mL、133ng/mL、134ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、141ng/mL、142ng/mL、143ng/mL、144ng/mL、145ng/mL、146ng/mL、147ng/mL、148ng/mL、149ng/mL、150ng/mL、151ng/mL、152ng/mL、153ng/mL、154ng/mL、155ng/mL、156ng/mL、157ng/mL、158ng/mL、159ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、195ng/mL、200ng/mL、205ng/mL、210ng/mL、215ng/mL、220ng/mL、225ng/mL、230ng/mL、235ng/mL、240ng/mL、245ng/mL、或250ng/mL或更多中的任何一种的ANG1,包括落入这些浓度之间的值。

[0351] 白介素10 (IL-10) 可以是本文公开的任何细胞培养基组合物的组分。IL-10是在免疫调节和炎症中具有多种多效性作用的细胞因子。它下调在巨噬细胞上Th1细胞因子、MHC II类抗原和共刺激分子的表达。它还增强B细胞的存活、增殖和抗体产生。IL-10可以阻断NF- κ B的活性,并且参与JAK-STAT信号传导途径的调节。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约1-25ng/mL的IL-10,诸如约5-20ng/mL、10-20ng/mL、或12-18ng/mL,诸如约1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、15ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mL、19ng/mL、20ng/mL、21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、或25ng/mL中的任何一种的IL-10。

[0352] 白介素3 (IL-3) 可以是本文公开的任何细胞培养基组合物的组分。IL-3是在免疫调节和炎症中具有多种多效性作用的细胞因子。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约1-25ng/mL的IL-3,诸如约5-20ng/mL、10-20ng/mL、或12-18ng/mL,诸如约1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、15ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mL、19ng/mL、20ng/mL、21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、或25ng/mL中的任何一种的IL-3。在一些实施方案中,用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含25ng/mL或更高的浓度。因此,IL-3的浓度还包括

10-140ng/mL、约30-130ng/mL、约50-120ng/mL、约70-110ng/mL、或约95-105ng/mL,或诸如约30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL、49ng/mL、50ng/mL、51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL、59ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、200ng/mL、或更多中的任何一种的IL-3,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中IL-3的浓度是约100ng/mL。

[0353] 白介素6 (IL-6) 可以是本文公开的任何细胞培养基组合物的组分。IL-6是在免疫调节和炎症中具有多种多效性作用的细胞因子。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约1-25ng/mL的IL-6,诸如约5-20ng/mL、10-20ng/mL、或12-18ng/mL,诸如约1ng/mL、2ng/mL、3ng/mL、4ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、15ng/mL、16ng/mL、17ng/mL、18ng/mL、19ng/mL、20ng/mL、21ng/mL、22ng/mL、23ng/mL、24ng/mL、或25ng/mL中的任何一种的IL-6。在一些实施方案中,用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含25ng/mL或更高的浓度。因此,IL-6的浓度还包括10-140ng/mL、约30-130ng/mL、约50-120ng/mL、约70-110ng/mL、或约95-105ng/mL,或诸如约30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL、49ng/mL、50ng/mL、51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL、59ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、110ng/mL、115ng/mL、120ng/mL、125ng/mL、130ng/mL、135ng/mL、140ng/mL、145ng/mL、150ng/mL、155ng/mL、160ng/mL、165ng/mL、170ng/mL、175ng/mL、180ng/mL、185ng/mL、190ng/mL、200ng/mL、或更多中的任何一种的IL-6,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,培养基中IL-6的浓度是约100ng/mL。

[0354] 本文公开的细胞培养基还可以含有血管内皮生长因子165 (VEGF165),其属于PDGF/VEGF生长因子家族。许多细胞类型分泌VEGF165,它是刺激内皮细胞的增殖、迁移和形成的有效力的血管生成因子和促分裂原。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约5-100ng/mL的VEGF165,诸如约10-90ng/mL、约20-80、ng/mL约30-70ng/mL、约40-60ng/mL、或约45-55ng/mL、或诸如约5ng/mL、10ng/mL、15ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、41ng/mL、42ng/mL、43ng/mL、44ng/mL、45ng/mL、46ng/mL、47ng/mL、48ng/mL、49ng/mL、50ng/mL、51ng/mL、52ng/mL、53ng/mL、54ng/mL、55ng/mL、56ng/mL、57ng/mL、58ng/mL、59ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL或更多中的任何一种的VEGF165,包括落入这些浓度之间的值。

[0355] 本文公开的细胞培养基还可以含有血管内皮生长因子C (VEGF-C),其属于PDGF/VEGF生长因子家族。许多细胞类型分泌VEGF-C,其在血管生成和内皮细胞生长中发挥功能,刺激增殖和迁移,并且还对血管的通透性具有作用。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约50-1000ng/mL的VEGF-C,诸如约100-900ng/mL、约200-800、ng/mL约300-700ng/mL、约400-600ng/mL、或约450-550ng/mL,或诸如约50ng/mL、100ng/mL、150ng/mL、200ng/mL、250ng/mL、300ng/mL、350ng/mL、400ng/mL、410ng/mL、420ng/mL、430ng/mL、440ng/mL、450ng/mL、460ng/mL、470ng/mL、480ng/mL、490ng/mL、500ng/mL、510ng/mL、

520ng/mL、530ng/mL、540ng/mL、550ng/mL、560ng/mL、570ng/mL、580ng/mL、590ng/mL、600ng/mL、650ng/mL、700ng/mL、750ng/mL、800ng/mL、850ng/mL、900ng/mL、950ng/mL、1000ng/mL或更多中的任何一种的VEGF-C,包括落入这些浓度之间的值。

[0356] 在又另外的实施方案中,本文公开的细胞培养基组合物可以含有层粘连蛋白,其是细胞外基质的高分子量(约400kDa)蛋白质。它们是作为大多数细胞和器官的蛋白质网络基础的基底层(基底膜的一个层)的主要组分。层粘连蛋白是基底层的重要且生物学活性的部分,影响细胞分化、迁移和粘附。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约500-1000ng/mL的层粘连蛋白,诸如约600-900ng/mL、约700-800ng/mL、约725-775ng/mL、或约745-755ng/mL,或诸如约500ng/mL、525ng/mL、550ng/mL、575ng/mL、600ng/mL、625ng/mL、650ng/mL、675ng/mL、700ng/mL、705ng/mL、710ng/mL、715ng/mL、720ng/mL、725ng/mL、730ng/mL、735ng/mL、740ng/mL、741ng/mL、742ng/mL、743ng/mL、744ng/mL、745ng/mL、746ng/mL、747ng/mL、748ng/mL、749ng/mL、750ng/mL、751ng/mL、752ng/mL、753ng/mL、754ng/mL、755ng/mL、756ng/mL、757ng/mL、758ng/mL、759ng/mL、760ng/mL、765ng/mL、770ng/mL、775ng/mL、780ng/mL、785ng/mL、790ng/mL、795ng/mL、800ng/mL、825ng/mL、850ng/mL、875ng/mL、900ng/mL、925ng/mL、950ng/mL、975ng/mL、1000ng/mL或更多中的任何一种的层粘连蛋白,包括落入这些浓度之间的值。

[0357] C. 其他小分子

[0358] 用于本文公开的方法的细胞培养基可以另外含有各种小分子抑制剂,诸如半胱天冬酶抑制剂、DNA甲基化抑制剂、p38 MAPK抑制剂、糖原合成酶激酶3(GSK3)抑制剂、和/或JAK/STAT抑制剂。在一实施方案中,细胞培养基的DMSO浓度不超过0.025%v/v。

[0359] 在一些实施方案中,用于本文公开的方法的细胞培养基包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂。半胱天冬酶在凋亡(程序性细胞死亡)、坏死和炎症中起重要作用的半胱氨酸蛋白酶家族。截至2009年11月,已在人类中鉴定出12种半胱天冬酶。存在两种类型的凋亡半胱天冬酶:起始者(顶端)胱天蛋白酶和效应者(执行者)半胱天冬酶。起始者半胱天冬酶(例如,CASP2、CASP8、CASP9和CASP10)裂解非活性前形式的效应者半胱天冬酶,从而激活它们。效应者半胱天冬酶(例如,CASP3、CASP6、CASP7)进而裂解细胞内的其他蛋白质底物,以触发凋亡过程。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约1-10 μ g/mL的半胱天冬酶抑制剂,诸如约2-8 μ g/mL、约3-7 μ g/mL、或约4-6 μ g/mL中的任何一种,或诸如约1 μ g/mL、2 μ g/mL、3 μ g/mL、4 μ g/mL、5 μ g/mL、6 μ g/mL、7 μ g/mL、8 μ g/mL、9 μ g/mL、10 μ g/mL或更多中的任何一种的半胱天冬酶抑制剂。在一实施方案中,半胱天冬酶抑制剂是Z-VAD-FMK。

[0360] 用于本文公开的方法的细胞培养基可以包含一种或多种DNA甲基化抑制剂。DNA甲基化是将甲基添加到DNA中的过程,所述过程修饰其功能。当位于基因启动子中时,DNA甲基化典型地起到抑制基因转录的作用。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约300-700nM的DNA甲基化抑制剂,诸如约350-650nM、约400-600nM、约450-550nM、约475-525nM、或约490-510nM,或诸如约300nM、325nM、350nM、400nM、425nM、430nM、435nM、440nM、445nM、450nM、455nM、460nM、465nM、470nM、475nM、480nM、485nM、490nM、491nM、492nM、493nM、494nM、495nM、496nM、497nM、498nM、499nM、500nM、501nM、502nM、503nM、504nM、505nM、506nM、507nM、508nM、509nM、510nM、515nM、520nM、525nM、530nM、535nM、540nM、545nM、550nM、555nM、560nM、565nM、570nM、575nM、600nM、625nM、650nM、675nM、700nM、或更

多中的任何一种的DNA甲基化抑制剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,DNA甲基化抑制剂是表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)。在其他实施方案中,用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约0.25-3 μ M DNA甲基化抑制剂,诸如约0.5-2.5 μ M、约1-2 μ M、或约1.25-1.75 μ M,诸如约0.5 μ M、1 μ M、1.5 μ M、2 μ M、2.5 μ M、或3 μ M或更多中的任何一种的DNA甲基化抑制剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,DNA甲基化抑制剂是Oct4激活化合物1(OAC1)。

[0361] 本文公开的任何细胞培养基还可以包含p38 MAPK抑制剂。p38促分裂原激活的蛋白激酶是一类对诸如细胞因子、紫外线照射、热休克和渗透休克的应激刺激有反应的促分裂原激活的蛋白激酶,并且参与细胞分化、凋亡和自噬。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约400-800nM的p38MAPK抑制剂,诸如约500-700nM、约550-650nM、约600-650nM、或约615-635nM,或诸如约400nM、425nM、450nM、475nM、500nM、525nM、550nM、575nM、600nM、605nM、610nM、615nM、616nM、617nM、618nM、619nM、620nM、621nM、622nM、623nM、624nM、625nM、626nM、627nM、628nM、629nM、630nM、631nM、632nM、633nM、634nM、635nM、640nM、645nM、650nM、655nM、660nM、665nM、670nM、675nM、680nM、685nM、690nM、695nM、700nM、725nM、750nM、775nM、800nM、或更多中的任何一种的p38 MAPK抑制剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,p38 MAPK抑制剂是BIRB796。

[0362] 在又另外的实施方案中,本文公开的细胞培养基组合物可以含有糖原合成酶激酶3(GSK3)抑制剂。GSK3是介导在丝氨酸和苏氨酸的氨基酸残基上添加磷酸分子的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。GSK-3使蛋白质磷酸化通常抑制其下游靶标的活性。GSK-3在许多中央细胞内信号传导途径(包括细胞增殖、迁移、葡萄糖调节、和凋亡)中是活性的。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约0.25-2 μ M的GSK3抑制剂,诸如约0.5-1.5 μ M或1.75-1.25 μ M,诸如约0.25 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、0.6 μ M、0.7 μ M、0.8 μ M、0.9 μ M、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、或2 μ M或更多的GSK3抑制剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,GSK3抑制剂是CHIR99021。

[0363] 在进一步的实施方案中,本文公开的细胞培养基组合物可以另外含有视黄酸受体(RAR)拮抗剂,或者所述培养基可以包含控制量的或减少量的视黄酸以限制视黄酸信号传导。RAR是核受体以及被全反式视黄酸和9-顺式视黄酸两者激活的转录因子。在一些实施方案中,通过限制培养基中视黄酸的量来减少视黄酸信号传导。

[0364] 在进一步的实施方案中,本文公开的细胞培养基组合物可以另外含有视黄酸受体(RAR)拮抗剂。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约10-300nM的RAR拮抗剂,诸如约25-175nM、约50-150、或约75-125,或诸如约10nM、15nM、20nM、25nM、30nM、35nM、40nM、45nM、50nM、55nM、60nM、65nM、70nM 75nM、80nM、85nM、90nM、95nM、100nM、105nM、110nM、115nM、120nM、125nM、130nM、135nM、140nM、145nM、150nM、155nM、160nM、165nM、170nM、175nM、180nM、185nM、190nM、191nM、192nM、193nM、194nM、195nM、196nM、197nM、198nM、199nM、200nM、201nM、202nM、203nM、204nM、205nM、206nM、207nM、208nM、209nM、210nM、215nM、220nM、225nM、230nM、235nM、240nM、241nM、242nM、243nM、244nM、245nM、246nM、247nM、248nM、249nM、250nM、251nM、252nM、253nM、254nM、255nM、256nM、257nM、258nM、259nM、260nM、265nM、270nM、275nM、280nM、285nM、290nM、295nM、300nM或更多中的任何一种的RAR拮抗剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,RAR拮抗剂是

ER50891。在一些实施方案中,ER50891的浓度是约100nM。

[0365] 本文公开的细胞培养基还可以包含JAK/STAT抑制剂。JAK-STAT信号传导途径将信息从细胞外化学信号传递到细胞核,从而导致参与免疫、增殖、分化、凋亡和肿瘤发生的基因的DNA转录和表达。用于本发明的方法的细胞培养基组合物可以包含约300-700nM的JAK/STAT抑制剂,诸如约350-650nM、约400-600nM、约450-550nM、约475-525nM、或约490-510nM,或诸如约300nM、325nM、350nM、400nM、425nM、430nM、435nM、440nM、445nM、450nM、455nM、460nM、465nM、470nM、475nM、480nM、485nM、490nM、491nM、492nM、493nM、494nM、495nM、496nM、497nM、498nM、499nM、500nM、501nM、502nM、503nM、504nM、505nM、506nM、507nM、508nM、509nM、510nM、515nM、520nM、525nM、530nM、535nM、540nM、545nM、550nM、555nM、560nM、565nM、570nM、575nM、600nM、625nM、650nM、675nM、700nM、或更多中的任何一种的JAK/STAT抑制剂,包括落入这些浓度之间的值。在一些实施方案中,JAK/STAT抑制剂是托法替尼。

[0366] 除上面描述的抑制剂分子之外,本文公开的任何细胞培养基组合物还可以含有胎牛血清(FBS),其浓度范围为从1-20%v/v,诸如约2-18%v/v、约5-15%v/v、约7.5-12.5%v/v,或诸如约1%v/v、2%v/v、3%v/v、4%v/v、5%v/v、6%v/v、7%v/v、8%v/v、9%v/v、10%v/v、11%v/v、12%v/v、13%v/v、14%v/v、15%v/v、16%v/v、17%v/v、18%v/v、19%v/v、或20%v/v或更多中任何一种的FBS,包括落入这些百分比之间的值。在一些实施方案中,所述FBS是热灭活的FBS。在一些实施方案中,培养基中FBS的浓度是约10%v/v。

[0367] 除上面描述的抑制剂分子之外,本文公开的任何细胞培养基组合物还可以含有添加的盐,例如KCl、NaCl、MgCl或CaCl₂。在一个实施例中,可以添加CaCl₂以达到以下范围的浓度:从300-380mOsm,诸如约300mOsm、约310mOsm、约320mOsm、约330mOsm、约340mOsm、约350mOsm、约360mOsm、约370mOsm、约380mOsm、或更多CaCl₂,包括落入这些数字之间的值。高同渗容摩CaCl₂也可用于选择针对非多能细胞,选择用于HSC表型。

[0368] 除上面描述的抑制剂分子之外,可以调节本文公开的任何细胞培养基组合物以包括总体上较高的同渗容摩。多能干细胞可以更好地适应以承受非典型同渗容摩(例如,可以针对非干细胞表型选择高同渗容摩培养基。)可以例如通过添加盐(如上)或通过葡萄糖来调节同渗容摩。

[0369] IV. 本发明的方法

[0370] A. 维持和/或增强在培养物中的造血干细胞的扩增

[0371] 本文提供了用于维持和/或增强在培养物中的造血干细胞(HSC)的扩增的方法。所述方法涉及使在培养物中的CD34⁺细胞源与式I、I-1、I-2、Ia、Ia'、Ia1、Ia1'、Ia2、Ia2'、Ib、Ib1、Ib2、Ic、Ic1、Ic2、II、IIa、IIa'、IIa1、IIb、IIb1、IIc、IIc1、III、IIIa、IIIa'、或IIIa1的化合物或表1的化合物接触。在一些实施方案中,本文提供的方法不包括四次跨膜蛋白。在一些实施方案中,本文提供的方法还包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂是ER50891。

[0372] 1. CD34⁺细胞源

[0373] 本发明的方法需要CD34⁺血细胞或在一些实施例中CD34低/-、CD133⁺细胞的源。这些细胞可以从例如像骨髓、脐带血、胎盘血、动员外周血、非动员外周血等或其组合的组织源获得。

[0374] 在一些实施方案中,造血干细胞和/或祖细胞源自一种或多种CD34⁺细胞源。在某些实施方案中,CD34⁺细胞可以表达或缺乏细胞标记物CD133。因此,在具体实施方案中,可用于本文公开的方法的造血细胞是CD34⁺CD133⁺或CD34⁺CD133⁻。在其他实施方案中,CD34⁺细胞可以表达或缺乏细胞标记物CD90。因此,在这些实施方案中,可用于本文公开的方法的造血细胞是CD34⁺CD90⁺或CD34⁺CD90⁻。因此,可以在存在指示未分化状态的标记物的基础上或在不存在指示已发生至少一些谱系分化的谱系标记物的基础上选择CD34⁺细胞或在一些实施例中CD34低⁻、CD133⁺细胞的群体用于本文公开的方法。

[0375] 用于本文提供的方法的CD34⁺细胞可以从单个个体(例如从非动员外周血源)或从多个个体(例如可以合并)获得。在一些实施方案中,来自单个个体的CD34⁺细胞源于非动员外周血、动员外周血、胎盘血、或脐带血,当从多个个体获得并且合并CD34⁺细胞时,优选从同一组织源获得造血细胞。因此,在各种实施方案中,合并的造血细胞全部来自例如胎盘、脐带血、外周血(动员的或非动员的)等。

[0376] 有趣的是,通过本发明的方法增强和扩增的细胞例如在表型上类似于脐带血。因此,有可能使用通过本文描述的方法扩增和增强的细胞作为用于进一步扩增和增强的源。例如,有可能在初始扩增和增强后允许或温和地激励细胞分化。通过遵循在初始扩增/增强步骤中使用的本发明的方法,可以允许这些细胞扩增并且然后将其从分化或接近分化的状态返回。可以返回到多能状态的分化或接近分化的细胞的这种扩增可以经多个周期发生。

[0377] 可以使用本领域已知的任何常规手段从源中分离CD34⁺细胞或在一些实施例中CD34低⁻、CD133⁺细胞,所述常规手段诸如但不限于针对干细胞标记物的阳性选择、针对谱系标记物的阴性选择、尺寸排阻、检测细胞中的代谢差异、检测细胞清除或累积的物质差异、粘附差异、在专门支持干细胞的条件下直接培养血沉棕黄层。用于本发明的方法的CD34⁺细胞源可以含有许多造血祖细胞的亚种,包括但不限于以下中的一种或多种:CD34⁺造血祖细胞;CD34⁺早期造血祖细胞和/或干细胞;CD133⁺早期造血祖细胞和/或干细胞;CD90⁺早期造血祖细胞和/或干细胞;CD45RA⁻早期造血祖细胞和/或干细胞;和/或CD38低⁻早期造血祖细胞和/或干细胞。

[0378] 2. 维持在培养物中的HSC

[0379] 在上面描述的任何细胞培养基中培养源自上面描述的源的CD34⁺细胞。这些培养基维持并且增强造血干细胞表型。此外,添加其中公开的式I的化合物或子实施方案强化了这些作用。具体地,在培养基中的本文描述的式I的化合物或子实施方案使用增加HSC的扩增速率,同时维持(并且通常改善)所有测量的干细胞标记物(诸如但不限于CD133和CD90阳性细胞)。在培养少至3天后可以看到这些改善。在一些实施方案中,本文提供的培养基不包括四次跨膜蛋白。在一些实施方案中,本文提供的培养基还包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂是ER50891。

[0380] 特别地,与不在本文描述的任何培养基中培养的源细胞相比,在本文描述的任何细胞培养基中培养的源细胞在培养物中约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、或50天或更多中的任何一种后展现出增加的CD133⁺和/或CD90⁺阳性细胞数目。具体地,与不在本文描述的任何培养基中培养的源细胞相比,使用本文公开的方法在本文描述的培养基中培养的源细胞在培养物中约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、或50天或更多中的任何一种后展现出CD133⁺和/或CD90⁺阳性细胞数目的

大约1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、7.5、或10或更多倍。

[0381] 与不在本文描述的任何培养基中培养的源细胞相比,在本文描述的细胞培养基中培养的源细胞在培养物中约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、或50天或更多中的任何一种后还展现出增加的CD90+/CD38低/-细胞数目。具体地,与不在本文描述的任何培养基中培养的源细胞相比,使用本文公开的方法在本文描述的培养基中培养的源细胞在培养物中约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、或50天或更多中的任何一种后展现出CD90+/CD38低/-细胞数目的大约1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、7.5、10、12.5、15、17.5、或20或更多倍。

[0382] 本文公开的细胞培养方法包括在低氧条件下培养细胞。如本文所用,短语“低氧条件”是指培养的细胞所暴露的气氛,其具有少于约10%氧气,诸如约10%、9.5%、9%、8.5%、8%、7.5%、7%、6.5%、6%、5.5%、或5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.75%、2.5%、2.25%、2%、1.75%、1.5%、1.25%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、或0.5%或更少中的任何一种的氧气。“低氧条件”也可以指在0.5%与10%之间的任何范围的氧气。细胞培养中大气氧的控制可以通过本领域已知的任何手段进行,诸如通过添加氮气。

[0383] 本文公开的细胞培养方法包括在大气氧条件下培养细胞。如本文所用,短语“大气氧条件”是指包含约20%氧气的气氛。

[0384] 本发明还考虑了通过本文描述的方法制造的细胞群体。本文提供的含有HSC的细胞群体赋予了在脐带血中发现的优点。本领域技术人员将容易认识到来自脐带血的干细胞特征以及其中的有利特性。在一些实施方案中,本文提供的含有HSC的细胞群体的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%是扩增的HSC细胞。在一些实施方案中,细胞群体中的扩增的HSC细胞已在延长的时间段内保留了其干细胞表型。例如,在一些实施方案中,含有HSC的细胞群体包括具有包括CD45+、CD34+、CD133+、CD90+、CD45RA-、和/或CD38低/-的细胞表面表型的扩增的HSC细胞,并且已经在体外培养了至少3、7、10、13、14、20、25、30、40、或50或更多天。在一些实施方案中,含有HSC的细胞群体包括具有包括CD133+和/或CD90+的细胞表面表型的扩增的HSC细胞,并且已经在体外培养了至少3、7、10、13、14或更多天。

[0385] B. 治疗方法

[0386] 本文提供了用于治疗需要造血重构的个体的方法。所述方法涉及向所述个体给予含有根据本发明的方法衍生的任何培养的HSC的治疗剂。

[0387] 本领域普通技术人员可以容易地确定本文公开的用于治疗性给予的培养的HSC的适当浓度或剂量。普通技术人员将认识到,优选的剂量是在有需要的患者中产生诸如预防、治疗和/或减少疾病、障碍和损伤的治疗性作用的剂量。当然,适当的细胞剂量将需要在使用时基于若干变量进行经验确定,所述变量包括但不限于所治疗疾病、损伤、障碍或病症的严重程度和类型;患者年龄、体重、性别、健康;给予患者的其他药物和治疗方法等。

[0388] 有效量的细胞可以以一个剂量给予,但不限于一个剂量。因此,给予可以是两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次、十一次、十二次、十三次、十四次、十五次、十六次、十七次、十八次、十九次、二十次或更多次给予药物组合物。当本发明的方法中多于一

次给予治疗剂时,可以将给予间隔为一分钟、两分钟、三、四、五、六、七、八、九、十或更多分钟的时间间隔,约一个小时、两个小时、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时等的间隔。在小时的上下文中,术语“约”意指加或减在30分钟内的任何时间间隔。也可以将给予间隔为一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天、十天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天及其组合的时间间隔。本发明不限于在时间上等距的给药间隔,但包括非等距间隔的剂量。

[0389] 例如一次/周、两次/周、三次/周、四次/周、五次/周、六次/周、七次/周、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次等的给药时间表可用于本发明。给药时间表包括例如一周、两周、三周、四周、五周、六周、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、十个月、十一个月和十二个月的总时间段的给药。

[0390] 提供以上给药时间表的周期。所述周期可以以约例如每七天;每14天;每21天;每28天;每35天;42天;每49天;每56天;每63天;每70天等进行重复。周期之间可能出现非给药间隔,其中所述间隔可以是约例如七天;14天;21天;28天;35天;42天;49天;56天;63天;70天等。在此上下文中,术语“约”意指加或减一天、加或减两天、加或减三天、加或减四天、加或减五天、加或减六天、或加或减七天。

[0391] 可以将源自本发明的方法的细胞使用本领域的标准技术冷冻保存,并且储存以备后用。源自本发明方法的细胞的集合可以一起储存在冷冻保存的细胞和组织库中。

[0392] 可以根据本文公开的任何方法以任何常规方式使用任选地包含赋形剂和助剂的一种或多种生理学上可接受的载体来配制源自本发明的方法的细胞以用于给予。适当的配制取决于所选择的给予途径。也可以以一种或多种生理学上可接受的载体向个体给予所述组合物。用于细胞的载体可以包括但不限于生理盐水溶液、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、含有生理浓度的盐混合物的乳酸化林格氏溶液、或细胞培养基。

[0393] 本发明的HSC群体和包含所述HSC群体的治疗剂可以用于在骨髓移植中强化或替代骨髓细胞。人类自体 and 同种异体骨髓移植目前被用于诸如白血病、淋巴瘤和其他威胁生命的障碍的疾病的疗法。然而,这些程序的缺点是必须除去大量供体骨髓以确保有足够的细胞用于植入。

[0394] 本发明的HSC群体和包含所述HSC群体的治疗剂可以提供干细胞和祖细胞,这将减少对大量骨髓捐献的需求。根据本发明的方法,也将有可能获得少量的骨髓捐献,并且然后在输注或移植到接受者之前扩增在胎盘中培养和扩增的干细胞和祖细胞的数目。可替代地,可以根据本发明的方法仅使用非动员外周血来获得足够数目的HSC,从而全部地完全消除对骨髓捐献的需要。

[0395] 本发明的组合物和方法可用于干细胞的扩增。在一些实施方案中,与传统的扩增方法相比,扩增可以是快速的。在一些实施方案中,可以在数小时、数天或数周的过程中进行扩增(例如,选择性扩增可以进行约2小时、4小时、6小时、8小时、12小时、16小时、20小时、一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、九天、十天、11天、12天、13天、两周、三周、四周或更多。在一些实施方案中,就总细胞计数而言,干细胞群体可以扩增两倍、三倍、四倍、五倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、250倍、500倍、750倍、1000倍、1250倍、1500倍、1750倍、2000倍或多。在一些实施方案中,就在更广泛的细胞群体

中具有干细胞表型的细胞的相对数目而言,干细胞群体可以是扩增的(例如,具有干细胞表型的细胞可以占细胞群体的约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、或100%)。可以通过许多度量来测量扩增,所述度量包括通过加倍时间,例如通过总细胞数目加倍(例如,从500个细胞至1,000个细胞)所需的时间量,或群体的相对百分比加倍(例如,从10%干细胞至20%干细胞)所需的时间。

[0396] 在另一个实施方案中,本发明的HSC群体和包含所述HSC群体的治疗剂可以用于除化疗之外的补充治疗。用于靶向并且破坏癌细胞的大多数化疗剂通过杀死所有增殖细胞(即经历细胞分裂的细胞)而起作用。由于骨髓是体内最活跃的增殖组织之一,因此造血干细胞经常被化疗剂损害或破坏并且因此,血细胞的产生减少或停止。必须以一定间隔终止化疗,以在恢复化疗之前允许患者的造血系统补充血细胞供应。可能需要一个月或更久使以前静止的干细胞将白血细胞计数增殖并且增加至可接受的水平,使得可以恢复化疗(再次进行时,骨髓干细胞被破坏)。

[0397] 然而,尽管血细胞在化疗治疗之间再生,但是癌症有时间生长并且由于自然选择而可能变得更耐受化疗药物。因此,给予的化疗越久并且治疗之间的持续时间越短,成功杀死癌症的几率就越大。为了缩短化疗治疗之间的时间,可以将根据本发明的方法培养的本发明的HSC群体和包含所述HSC群体的治疗剂引入个体中。此类治疗将减少个体将展现出低血细胞计数的时间,并且因此将允许更早地恢复化疗治疗。

[0398] C. 用于生产细胞培养基的方法

[0399] 本文进一步提供了用于生产用于培养造血干细胞(HSC)的细胞培养基(诸如本文公开的任何细胞培养基)的方法。所述方法涉及将基础培养基或补料培养基;和本文公开的式I的化合物或子实施方案组合。在一些实施方案中,本文提供的方法还包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂是ER50891。在另外的实施方案中,所述方法还包括将干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、fms相关酪氨酸激酶3配体(Flt3l)和/或白介素6(IL-6)中的一种、两种、三种、全部四种组合。所述方法还可以包括将半胱天冬酶抑制剂、DNA甲基化抑制剂、p38 MAPK抑制剂、GSK3抑制剂、RAR受体拮抗剂、JAK/STAT途径的抑制剂、和/或FBS(诸如,热灭活的FBS)中的一种或多种组合。在一些实施方案中,本文提供的方法不包括四次跨膜蛋白。

[0400] 如本文所用的“基础培养基”是用于培养细胞的培养基,其本身直接用于培养细胞并且不用作其他培养基的添加剂,尽管可以将各种组分添加至基础培养基中。基础培养基的例子包括但不限于DMEM培养基、IMDM培养基、StemSpan无血清扩增培养基(SFEM)、199/109培养基、Ham的F10/F12培养基、McCoy的5A培养基、 α MEM培养基(不含酚红以及含酚红)、和RPMI 1640培养基。可以例如通过添加盐、葡萄糖或其他添加剂来修饰基础培养基。

[0401] “补料培养基”是在CD34+细胞源(例如骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血细胞)的培养物中用作补料的培养基。与基础培养基一样,补料培养基是针对所培养的特定细胞的需要来设计的。因此,基础培养基可以用作用于设计补料培养基的基础。补料培养基可以具有较高浓度的基础培养基的大多数(但不是全部)组分。例如,诸如盐的一些组分可以保持在基础培养基浓度的约1X,因为人们想要使补料与基础培养基保持等渗。因此,在一些实施方案中,添加各种组分以保持补料培养基的生理性,并且添加其他组分,因为它们将

营养物补充到细胞培养物中。其他组分(例如营养物)可以是其在基础培养基中的正常浓度的约2X、3X、4X、5X、6X、7X、8X、9X、10X、12X、14X、16X、20X、30X、50X、100X或更多。

[0402] V. 系统和试剂盒

[0403] 本文还提供了用于维持和/或增强在培养物中的造血干细胞的扩增的系统。此系统包括在培养物中的CD34+细胞源(诸如来自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血中的一种或多种的CD34+细胞)和本文描述的任何细胞培养基组合物。在特定的实施方案中,本发明的系统维持低氧培养条件。因此,所述系统提供了培养的细胞所暴露的气氛,其具有少于约10%氧气,诸如约10%、9.5%、9%、8.5%、8%、7.5%、7%、6.5%、6%、5.5%、或5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.75%、2.5%、2.25%、2%、1.75%、1.5%、1.25%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、或0.5%或更少中的任何一种的氧气。在一些实施方案中,所述系统提供了培养的细胞所暴露的气氛,其具有在0.5%与10%之间的任何范围的氧气。所述系统中大气氧的控制可以通过本领域已知的任何手段(诸如通过添加氮气)来完成。

[0404] 在另外的方面,本文公开的发明提供了一种或多种试剂盒。这些试剂盒可以包括基础培养基或补料培养基(诸如但不限于DMEM培养基、IMDM培养基、StemSpan无血清扩增培养基(SFEM)、199/109培养基、Ham的F10/F12培养基、McCoy的5A培养基、 α MEM培养基(不含酚红以及含酚红)、和RPMI1640培养基)以及本文公开的式I的化合物或子实施方案。在一些实施方案中,本文提供的试剂盒不包括四次跨膜蛋白。

[0405] 所述试剂盒还可以包括通过使用试剂盒的细胞培养基组分培养细胞而维持和/或增强在培养物中的HSC的扩增的书面说明书。所述试剂盒还可以包括包含到细胞培养基中的另外的组分,诸如以下中的一种或多种:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PDN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、O₆ct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂、JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)(包括热灭活的FBS)。

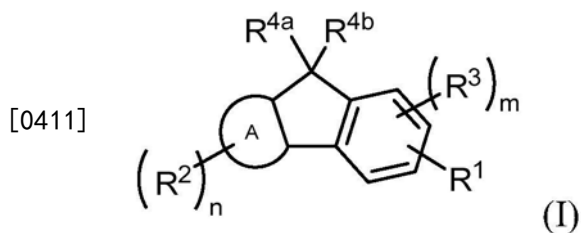
[0406] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。在一些实施方案中,所述RAR抑制剂或调节剂是ER50891。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、和胎牛血清(FBS)。

[0407] 在整个本说明书给出的每个最大数值限制旨在包括较低的数值限制,如同此类较低数值限制在本文中被明确写出一样。在整个本说明书中给出的每个最小数值限制将包括每个较高的数值限制,如同此类较高数值限制在本文中被明确写出一样。在本说明书中给出的每个数值范围将包括落入此类较宽数值范围内的每个较窄数值范围,如同此类较窄数值范围在本文中均被明确写出一样。

[0408] 可以通过参考以下实施例来进一步理解本发明,所述实施例是通过说明的方式提供的并且不意在限制。

[0409] VI. 本公开文本的特定实施方案

[0410] 实施方案1. 一种式I的化合物



[0412] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物；其中

[0413] A是选自苯基、C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和杂芳基的稠合环状部分；

[0414] 其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员，并且每个杂芳基包含具有1至3个氮原子环成员的5至6个环成员；

[0415] R¹选自-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-R^{1b}、-NR^b-X¹-C(O)-R^{1a}、-C(O)-X¹-NR^b-R^{1a}、-X¹-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-R^{1a}、-NR^b-C(O)-X¹-C(O)-R^{1b}、-C(O)-NR^b-X¹-C(O)-R^{1b}、-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-X¹-NR^b-C(O)-O-R^{1a}、-X¹-O-C(O)-NR^b-R^{1a}、-NR^b-R^{1a}、和-C(O)-R^{1a}；

[0416] R^{1a}选自H、C₁₋₁₀烷基；C₁₋₁₀卤代烷基；

[0417] R^{1b}选自-OR^a、-NR^aR^b、

[0418] 每个R²独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{2a}、-NR^b-C(O)-R^{2a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b；

[0419] 每个R³独立地选自卤素、-CN、-C₁₋₈烷基、-C₂₋₈烯基、C₂₋₈炔基、C₁₋₈卤代烷基、-C₁₋₈烷氧基、-X¹-C₁₋₈烷氧基、-C(O)-R^{3a}、-SR^a、-X¹-SR^a、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、-X¹-NR^aR^b、-S(O)₂R^a、-S(O)₂NR^aR^b、-X¹-S(O)₂R^a、和-X¹-S(O)₂NR^aR^b；

[0420] 每个R^{2a}和R^{3a}独立地选自H、C₁₋₁₀烷基、C₁₋₁₀卤代烷基、-OR^a、-X¹-OR^a、-NR^aR^b、和-X¹-NR^aR^b；

[0421] R^{4a}选自-OR^a和-NR^aR^b；

[0422] R^{4b}是H；或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代或脞部分；

[0423] 每个R^a和R^b独立地选自H和C₁₋₄烷基；

[0424] 每个X¹是C₁₋₄亚烷基；

[0425] 下标n是从0至3的整数；并且

[0426] 下标m是从0至2的整数。

[0427] 实施方案2. 根据实施方案1所述的化合物，其中A是选自C₃₋₆环烷基、杂环烷基、和苯基的稠合环状部分，其中每个杂环烷基包含具有1至3个氮原子环成员的从3至6个环成员。

[0428] 实施方案3. 根据实施方案1所述的化合物，其中A是选自C₃₋₆环烷基和苯基的稠合环状部分。

[0429] 实施方案4. 根据实施方案1所述的化合物，其中A是稠合C₃₋₆环烷基。

[0430] 实施方案5. 根据实施方案1至4中任一项所述的化合物，其中R^{4a}是-OR^a；R^{4b}是H；或将R^{4a}和R^{4b}组合以形成氧代部分

[0431] 实施方案6. 根据实施方案1至4中任一项所述的化合物，其中R^{4a}是-OR^a；并且R^{4b}是H。

[0432] 实施方案7. 根据实施方案1至4中任一项所述的化合物, 其中 R^{4a} 是 $-NR^aR^b$; 并且 R^{4b} 是H。

[0433] 实施方案8. 根据实施方案1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^1 选自 $-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-X^1-C(O)-R^{1a}$ 、 $-C(O)-X^1-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-X^1-NR^b-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NR^b-C(O)-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-C(O)-NR^b-X^1-C(O)-R^{1b}$ 、 $-NR^b-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-NR^b-R^{1a}$ 、 $-NR^b-R^{1a}$ 、和 $-C(O)-R^{1a}$ 。

[0434] 实施方案9. 根据实施方案1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^1 选自 $-C(O)-NH-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-O-C(O)-NH-R^{1a}$ 、 $-NH-R^{1a}$ 、和 $-C(O)-R^{1a}$ 。

[0435] 实施方案10. 根据实施方案1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、和 $-NR^b-R^{1a}$ 。

[0436] 实施方案11. 根据实施方案1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 和 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 。

[0437] 实施方案12. 根据实施方案1至7中任一项所述的化合物, 其中 R^1 是 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 。

[0438] 实施方案13. 根据实施方案1至12中任一项所述的化合物, 其中每个 R^2 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{2a}$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{2a}$ 、 $-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ 。

[0439] 实施方案14. 根据实施方案1至13中任一项所述的化合物, 其中每个 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 $-C_{1-8}$ 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-C(O)-R^{3a}$ 、 $-SR^a$ 、 $-X^1-SR^a$ 、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、和 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ 。

[0440] 实施方案15. 根据实施方案1至14中任一项所述的化合物, 其中每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、 $-X^1-NR^aR^b$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)_2NR^aR^b$ 、 $-X^1-S(O)_2R^a$ 、和 $-X^1-S(O)_2NR^aR^b$ 。

[0441] 实施方案16. 根据实施方案1至14中任一项所述的化合物, 其中每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-X^1-C_{1-8}$ 烷氧基、 $-OR^a$ 、 $-NR^b-C(O)-R^{2a}-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ 。

[0442] 实施方案17. 根据实施方案1至14中任一项所述的化合物, 其中每个 R^2 和 R^3 独立地选自卤素、 $-C_{1-8}$ 烷基、 C_{1-8} 卤代烷基、 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 、和 $-X^1-NR^aR^b$ 。

[0443] 实施方案18. 根据实施方案1至14中任一项所述的化合物, 其中每个 R^2 和 R^3 独立地选自 $-OR^a$ 、 $-X^1-OR^a$ 、 $-NR^aR^b$ 或 $-X^1-NR^aR^b$ 。

[0444] 实施方案19. 根据实施方案1至18中任一项所述的化合物, 其中 R^{1a} 是 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 卤代烷基。

[0445] 实施方案20. 根据实施方案1至18中任一项所述的化合物, 其中 R^{1a} 是 C_{1-6} 烷基。

[0446] 实施方案21. 根据实施方案1至18中任一项所述的化合物, 其中 R^{1b} 是 $-OR^a$ 。

[0447] 实施方案22. 根据实施方案1至18中任一项所述的化合物, 其中 R^{1b} 是 $-OH$ 。

[0448] 实施方案23. 根据实施方案1至22中任一项所述的化合物, 其中每个 R^a 和 R^b 独立地选自H和 C_{1-2} 烷基。

[0449] 实施方案24. 根据实施方案1至23中任一项所述的化合物, 其中每个 X^1 是 C_{1-2} 亚烷基。

[0450] 实施方案25. 根据实施方案1至23中任一项所述的化合物, 其中每个 X^1 是 C_1 亚烷基。

[0451] 实施方案26. 根据实施方案1至25中任一项所述的化合物, 其中下标n是从1至3的整数。

[0452] 实施方案27. 根据实施方案1至25中任一项所述的化合物, 其中下标n是1。

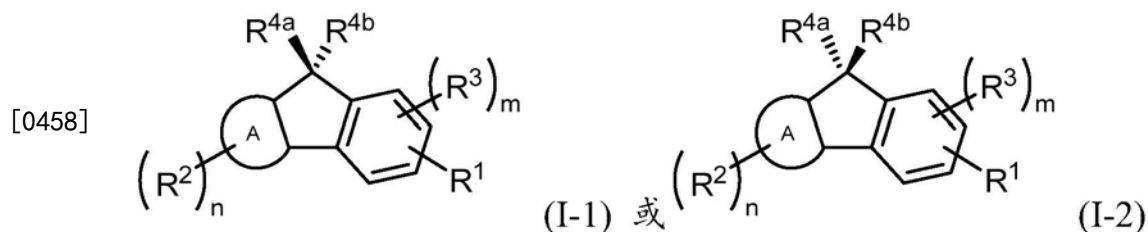
[0453] 实施方案28. 根据实施方案1至25中任一项所述的化合物, 其中下标n是0。

[0454] 实施方案29. 根据实施方案1至28中任一项所述的化合物, 其中下标m是从1至2的整数。

[0455] 实施方案30. 根据实施方案1至28中任一项所述的化合物, 其中下标m是0。

[0456] 实施方案31. 根据实施方案1至28中任一项所述的化合物, 其中下标m是1。

[0457] 实施方案32. 根据实施方案1至31中任一项所述的化合物, 其中所述式I的化合物具有式I-1或I-2的结构

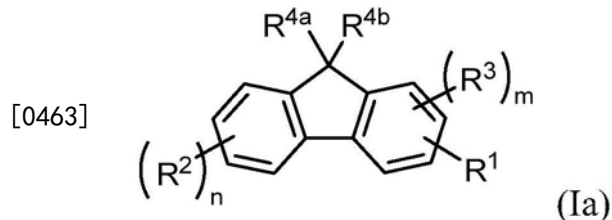


[0459] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物, 其中

[0460] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

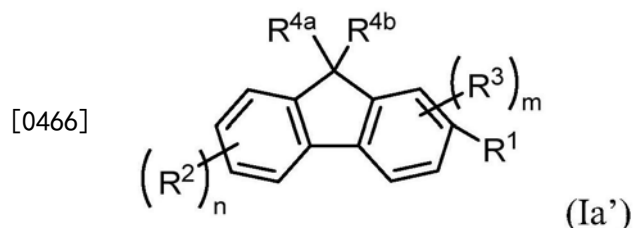
[0461] R^{4b} 是H。

[0462] 实施方案33. 根据实施方案1或8至31中任一项所述的化合物, 其中所述式I的化合物具有式Ia的结构



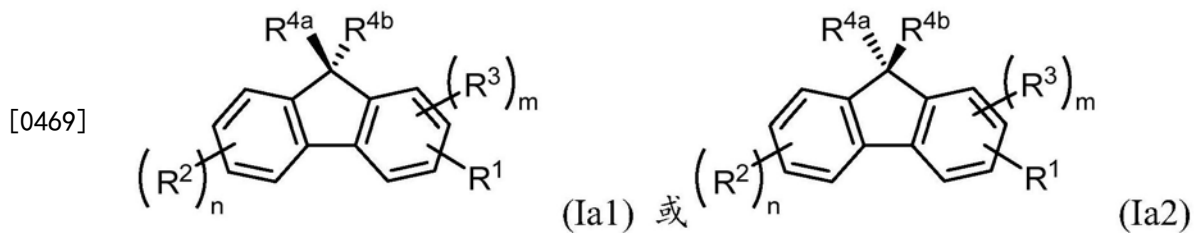
[0464] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0465] 实施方案34. 根据实施方案33所述的化合物, 其中所述式Ia的化合物具有式Ia'的结构



[0467] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0468] 实施方案35. 根据实施方案33所述的化合物, 其中所述式Ia的化合物具有式Ia1或Ia2的结构

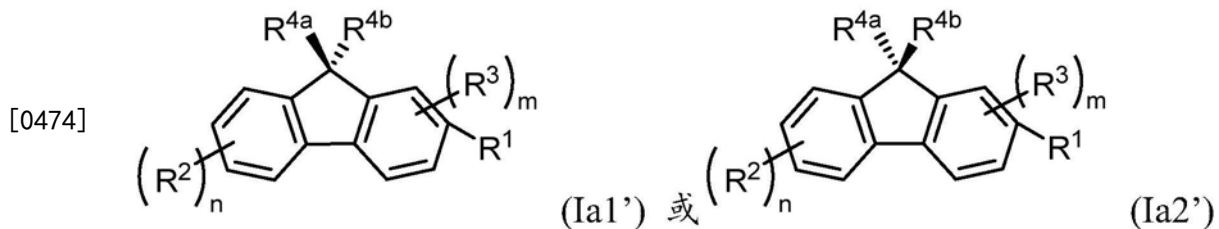


[0470] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0471] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

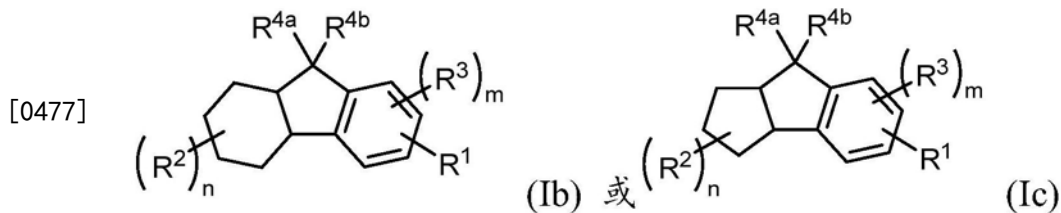
[0472] R^{4b} 是H。

[0473] 实施方案36.根据实施方案35所述的化合物,其中所述式Ia1或Ia2的化合物具有式Ia1'或Ia2'的结构



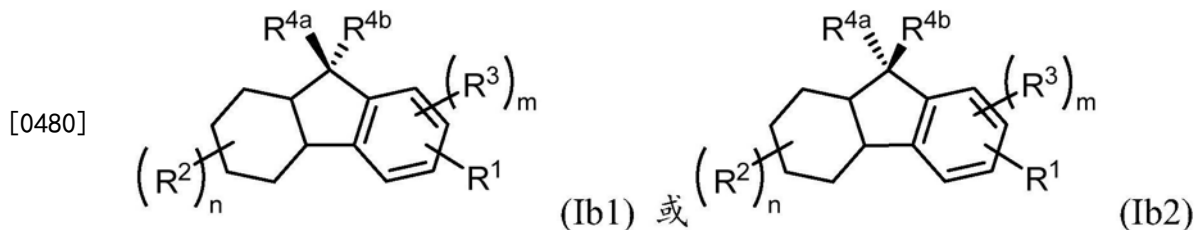
[0475] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0476] 实施方案37.根据实施方案1或8至31中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式Ib或Ic的结构



[0478] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0479] 实施方案38.根据实施方案37所述的化合物,其中所述式Ib的化合物具有式Ib1或Ib2的结构。

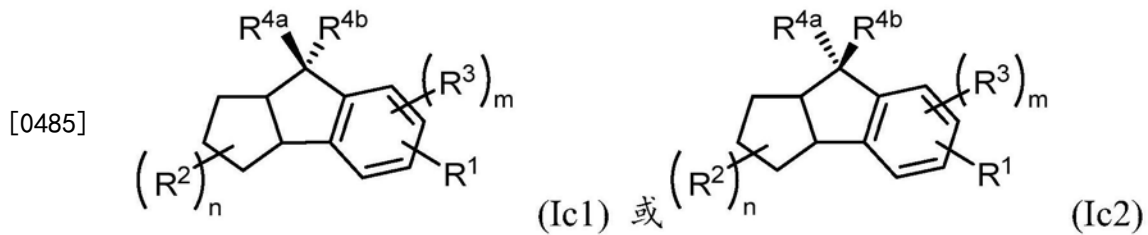


[0481] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

[0482] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

[0483] R^{4b} 是H。

[0484] 实施方案39.根据实施方案37所述的化合物,其中所述式Ic的化合物具有式Ic1或Ic2的结构。



[0486] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中

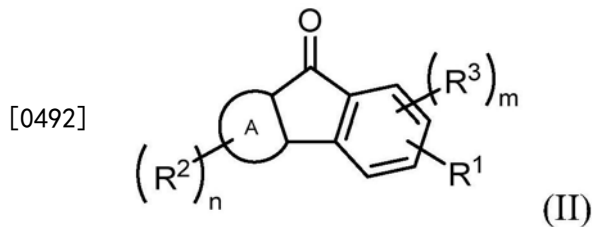
[0487] R^{4a} 选自 $-OR^a$ 和 $-NR^aR^b$;

[0488] R^{4b} 是H。

[0489] 实施方案40. 根据实施方案32至39中任一项所述的化合物,其中 R^{4a} 是 $-OH$ 或 $-NH_2$ 。

[0490] 实施方案41. 根据实施方案32至39中任一项所述的化合物,其中 R^{4a} 是 $-OH$ 。

[0491] 实施方案42. 根据实施方案1至31中任一项所述的化合物,其中所述式I的化合物具有式II的结构



[0493] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0494] 实施方案43. 根据实施方案42所述的化合物,其中

[0495] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$ 、 $-NH-C(O)-O-R^{1a}$ 、 $-NH-X^1-C(O)-R^{1a}$ 、和 $-NH-R^{1a}$;

[0496] 每个 R^2 和 R^3 独立地选自 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-X^1-NH_2$ 、 $-X^1-OH$;

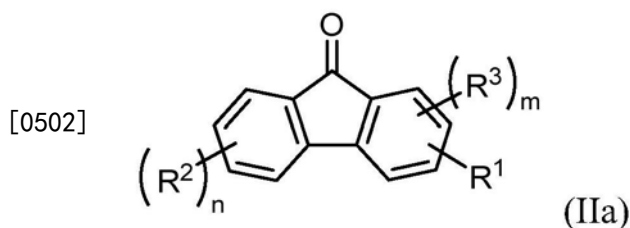
[0497] R^{1a} 选自 C_{1-6} 烷基;和 C_{1-6} 卤代烷基;

[0498] 每个 X^1 是 C_{1-2} 亚烷基;

[0499] 下标n是从0至2的整数;并且

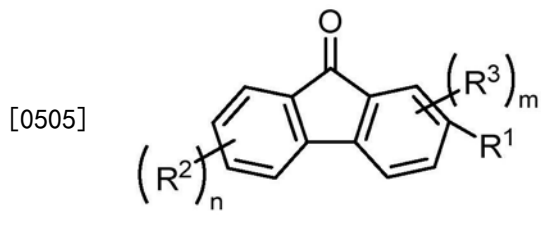
[0500] 下标m是0或1。

[0501] 实施方案44. 根据实施方案42或实施方案43所述的化合物,其中所述式II的化合物具有式IIa的结构



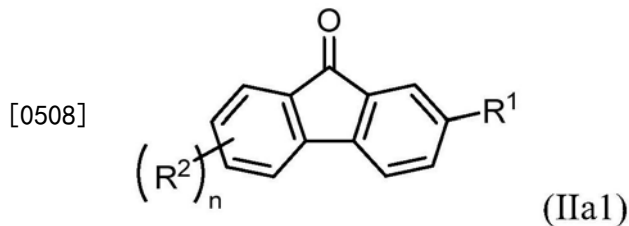
[0503] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0504] 实施方案45. 根据实施方案44所述的化合物,其中所述式IIa的化合物具有式IIa'的结构



[0506] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0507] 实施方案46. 根据实施方案44所述的化合物, 其中所述式IIa的化合物具有式IIa1的结构



[0509] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0510] 实施方案47. 根据实施方案45或实施方案46所述的化合物, 其中

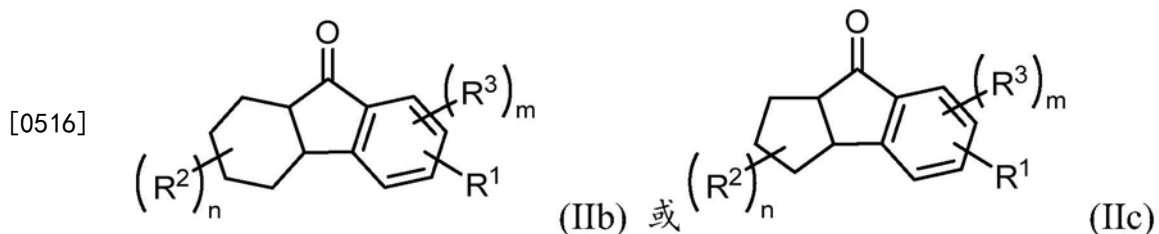
[0511] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$;

[0512] R^2 独立地选自 $-NH_2$ 或 $-OH$;

[0513] R^{1a} 选自 C_{1-6} 烷基; 和 C_{1-6} 卤代烷基; 并且

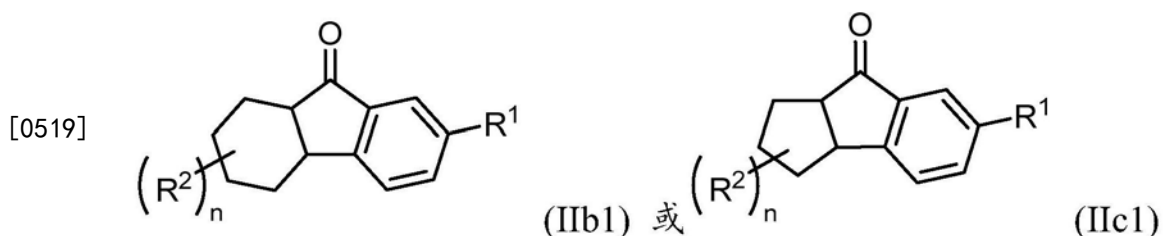
[0514] 下标n是0或1。

[0515] 实施方案48. 根据实施方案42或实施方案43所述的化合物, 其中所述式II的化合物具有式IIb或IIc的结构



[0517] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0518] 实施方案49. 根据实施方案48所述的化合物, 其中所述式IIb或IIc的化合物具有式IIb1或IIc1的结构



[0520] 或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0521] 实施方案50. 根据实施方案49所述的化合物, 其中

[0522] R^1 选自 $-NH-C(O)-R^{1a}$;

[0523] R^2 独立地选自 $-NH_2$ 或 $-OH$;

- [0524] R^{1a}选自C₁₋₆烷基;和C₁₋₆卤代烷基;并且
- [0525] 下标n是0或1。
- [0526] 实施方案51.根据实施方案1所述的化合物,其中所述化合物选自表1。
- [0527] 实施方案52.一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的方法,所述方法包括使在培养物中的CD34+细胞源与有效量的根据实施方案1-51中任一项所述的化合物接触,从而扩增在所述培养物中的造血干细胞。
- [0528] 实施方案53.根据实施方案52所述的方法,其中所述CD34+细胞源选自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血。
- [0529] 实施方案54.根据实施方案52所述的方法,其中所述CD34+细胞源是非动员外周血。
- [0530] 实施方案55.根据实施方案53或实施方案54所述的方法,其中所述CD34+细胞源包含以下中的一种或多种:(a) CD34+造血祖细胞;(b) CD34+早期造血祖细胞和/或干细胞;(c) CD133+早期造血祖细胞和/或干细胞;和/或(d) CD90+早期造血祖细胞和/或干细胞。
- [0531] 实施方案56.根据实施方案52-55中任一项所述的方法,其进一步包括视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。
- [0532] 实施方案57.根据实施方案11所述的方法,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。
- [0533] 实施方案58.根据实施方案52-57中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在低氧条件下培养所述细胞。
- [0534] 实施方案59.根据实施方案58所述的方法,其中低氧条件包括含有约5%或更少氧气的气氛。
- [0535] 实施方案60.根据实施方案52-59中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与选自以下的一种或多种试剂接触:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、肝细胞生长因子(HGF)、p38 MAPK抑制剂、表皮生长因子(EGF)、JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂。
- [0536] 实施方案61.根据实施方案52-59中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)接触。
- [0537] 实施方案62.根据实施方案52-59中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞与血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)接触。
- [0538] 实施方案63.根据实施方案52-62中任一项所述的方法,其中所述方法使所述造血干细胞表型稳定。
- [0539] 实施方案64.根据实施方案63所述的方法,其中所述造血干细胞表型包括CD45+、CD34+、CD133+、CD90+、CD45RA-、CD38低/-,并且关于包括CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56的主要造血谱系标记物呈阴性。
- [0540] 实施方案65.根据实施方案52-64中任一项所述的方法,其中与未与根据实施方案1-51中任一项所述的化合物接触的在培养物中的细胞相比,CD133+和/或CD90+阳性细胞增加。

[0541] 实施方案66. 根据实施方案65所述的方法, 其中培养7天后, 与未与根据实施方案1-51任一项所述的化合物接触的在培养物中的细胞相比, 所述细胞展现出CD133+和/或CD90+阳性细胞数目的至少约两倍。

[0542] 实施方案67. 根据实施方案52-66中任一项所述的方法, 其中所述CD34+细胞源是人类。

[0543] 实施方案68. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的培养基, 其包含:

[0544] (a) (i) 基础培养基或(ii) 补料培养基; 和

[0545] (b) 根据实施方案1-51中任一项所述的化合物。

[0546] 实施方案69. 根据实施方案68所述的培养基, 其中所述培养基进一步包含(c) 视黄酸受体(RAR) 抑制剂或调节剂。

[0547] 实施方案70. 根据实施方案69所述的培养基, 其中所述视黄酸受体(RAR) 抑制剂或调节剂是ER50891。

[0548] 实施方案71. 根据实施方案68-70中任一项所述的培养基, 其中所述培养基进一步包含(c) 选自以下的一种或多种试剂: 血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PTN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、O₆ct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)。

[0549] 实施方案72. 根据实施方案71所述的培养基, 其中所述FBS是热灭活的。

[0550] 实施方案73. 根据实施方案68-70中任一项所述的培养基, 其中所述培养基进一步包含(c) 血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。

[0551] 实施方案74. 根据实施方案68-70中任一项所述的培养基, 其中所述培养基进一步包含(c) 血小板生成素(TPO) 和干细胞因子(SCF)。

[0552] 实施方案75. 根据实施方案68-74中任一项所述的培养基, 其中所述基础培养基是基础盐培养基。

[0553] 实施方案76. 根据实施方案72所述的培养基, 其中所述基础盐培养基是 α MEM。

[0554] 实施方案77. 根据实施方案75所述的培养基, 其中所述基础盐培养基包含足够量的CaCl₂, 以将所述基础盐培养基调节至320-380mOsm。

[0555] 实施方案78. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的方法, 所述方法包括使在培养物中的CD34+细胞源与根据实施方案68-77中任一项所述的培养基接触, 从而扩增在所述培养物中的造血干细胞。

[0556] 实施方案79. 一种用于扩增在培养物中的造血干细胞的系统, 所述系统包含(a) 在培养物中的CD34+细胞源; 和(b) 根据实施方案68-77中任一项所述的培养基。

[0557] 实施方案80. 根据实施方案79所述的系统, 其中所述CD34+细胞源选自骨髓、脐带血、动员外周血、和非动员外周血。

[0558] 实施方案81. 根据实施方案80所述的系统, 其中所述CD34+细胞源是非动员外周血。

- [0559] 实施方案82.根据实施方案80或实施方案81所述的系统,其中所述CD34+细胞源包含以下中的一种或多种:(a) CD34+造血祖细胞;(b) CD34+早期造血祖细胞和/或干细胞;(c) CD133+早期造血祖细胞和/或干细胞;和/或(d) CD90+早期造血祖细胞和/或干细胞。
- [0560] 实施方案83.根据实施方案79-82中任一项所述的系统,其进一步包括(c) 含有低氧的气氛。
- [0561] 实施方案84.根据实施方案83所述的系统,其中所述气氛含有约5%或更少的氧气。
- [0562] 实施方案85.根据实施方案79-84中任一项所述的系统,其中所述CD34+细胞源是人类。
- [0563] 实施方案86.一种试剂盒,其包括:
- [0564] (a) (i) 基础培养基或(ii) 补料培养基;和
- [0565] (b) 根据实施方案1-51中任一项所述的化合物。
- [0566] 实施方案87.根据实施方案86所述的试剂盒,其进一步包括(c) 维持和/或扩增在培养物中的造血干细胞的书面说明书。
- [0567] 实施方案88.根据实施方案86或实施方案87所述的试剂盒,其进一步包括(d) 视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。
- [0568] 实施方案89.根据实施方案88所述的培养基,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。
- [0569] 实施方案90.根据实施方案86-89所述的试剂盒,其进一步包括选自以下的一种或多种试剂:血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PDN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、Oct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6、人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)。
- [0570] 实施方案91.根据实施方案90所述的试剂盒,其中所述FBS是热灭活的。
- [0571] 实施方案92.根据实施方案86-89中任一项所述的试剂盒,其进一步包括(d) 血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。
- [0572] 实施方案93.根据实施方案86-89中任一项所述的试剂盒,其进一步包括(d) 血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)。
- [0573] 实施方案94.根据实施方案86-93中任一项所述的试剂盒,其中所述基础培养基是基础盐培养基。
- [0574] 实施方案95.根据实施方案94所述的试剂盒,其中所述基础盐培养基是 α MEM。
- [0575] 实施方案96.根据实施方案94所述的试剂盒,其中所述基础盐培养基包含320-380mOsm CaCl_2 。
- [0576] 实施方案97.一种造血干细胞群体,其通过根据实施方案52-67或78中任一项所述的方法产生。
- [0577] 实施方案98.一种治疗剂,其包含根据实施方案97所述的造血干细胞群体。
- [0578] 实施方案99.一种治疗需要造血重构的个体的方法,其包括向所述个体给予根据

实施方案98所述的治疗剂。

[0579] 实施方案100.根据实施方案99所述的方法,其中所述个体是骨髓供体或接受者。

[0580] 实施方案101.根据实施方案100所述的方法,其中所述个体被诊断患有癌症。

[0581] 实施方案102.根据实施方案101所述的方法,其中所述方法用作除化疗之外的补充治疗。

[0582] 实施方案103.根据实施方案102所述的方法,其中所述方法用于缩短化疗治疗之间的时间。

[0583] 实施方案104.根据实施方案99所述的方法,其中所述个体被诊断患有自身免疫疾病。

[0584] 实施方案105.一种用于生产用于培养造血干细胞(HSC)的细胞培养基的方法,所述方法包括:将(a)基础培养基或补料培养基;和(b)根据实施方案1-51中任一项所述的化合物组合。

[0585] 实施方案106.根据实施方案105所述的方法,其进一步包括(c)视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂。

[0586] 实施方案107.根据实施方案106所述的方法,其中所述视黄酸受体(RAR)抑制剂或调节剂是ER50891。

[0587] 实施方案108.根据实施方案105-107中任一项所述的方法,其进一步包括血小板生成素(TPO)、干细胞因子(SCF)、和/或fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)。

[0588] 实施方案109.根据实施方案105-107中任一项所述的方法,其进一步包括血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)。

[0589] 实施方案110.根据实施方案105-109中任一项所述的方法,其进一步包括将以下中的一种或多种组合:胰岛素样生长因子1(IGF-1)、红细胞分化因子(EDF)、肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、热休克因子(HSF)、多效生长因子(PTN)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素1(ANG1)、VEGF165、IL-10、层粘连蛋白、一种或多种半胱天冬酶抑制剂、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、Oct4激活化合物1(OAC1)、p38 MAPK抑制剂JAK/STAT抑制剂、IL-3、IL-6人类生长激素(HGH)、fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、VEGF-C和ALK5/SMAD调节剂或抑制剂、和胎牛血清(FBS)。

[0590] 实施方案111.根据实施方案110所述的方法,其中所述FBS是热灭活的FBS。

[0591] 实施方案112.根据实施方案105-108中任一项所述的方法,其进一步包括(d)胰岛素样生长因子1(IGF-1)、人类生长激素(HGH)、和胎牛血清(FBS)。

[0592] 实施方案113.根据实施方案105-112中任一项所述的方法,其中所述基础培养基或补料培养基是 α MEM。

[0593] 实施例

[0594] 提供以下实施例来说明而不是限制所要求保护的发明。

[0595] 下面使用的试剂和溶剂可以从商业源(诸如MilliporeSigma(美国密苏里州圣路易斯))获得。

[0596] 在Varian Mercury 400MHz NMR光谱仪上记录 ^1H -NMR光谱。化学位移在内部参考在CDC13中的残余质子共振(7.26ppm),并且按以下顺序列出:多重性(s,单峰;d,双重峰;t,三重峰;q,四重峰;m,多重峰)和质子数。在100MHz记录 ^{13}C NMR。质子。碳化学位移在内部参

考在CDC13中的氘代溶剂信号(77.20ppm)。

[0597] 质谱分析结果报告为质量与电荷的比率,然后是每种离子的相对丰度(在括号中)。在实施例中,报告了含有最常见原子同位素的M+H(或,如所指出的,M-H)离子的单个m/z值。在所有情况下,同位素模式对应于所预期的公式。在Shimadzu LC-MS2020上使用Agilent C18柱(Eclipse XDB-C18,5 μ m,2.1x 50mm)以1mL/min的流速进行电喷雾电离(ESI)质谱分析。流动相A:在水中的0.1%甲酸;流动相B:在乙腈中的0.1%甲酸。通常,将分析物以0.1mg/mL溶解在甲醇中,并且用递送溶剂将1微升输注到质谱仪中,所述质谱仪从100至1500道尔顿进行扫描。所有化合物都可以以正ESI模式进行分析,或以负ESI模式进行分析。

[0598] 在Agilent 1200HPLC上用Zorbax Eclipse XDB C18柱(2.1x 150mm)以1mL/min的流速进行分析型HPLC。流动相A:在水中的0.1%TFA;流动相B:在乙腈中的0.1%TFA。

[0599] 在Varian ProStar上使用Hamilton C18 PRP-1柱(15x 250mm)以20mL/min的流速进行制备型HPLC。流动相A:在水中的0.1%TFA;流动相B:在乙腈中的0.1%TFA。

[0600] 在本发明的实施例和整个说明书中使用以下缩写:

- [0601] THF: 四氢呋喃
[0602] TLC: 薄层色谱法
[0603] TFA: 三氟乙酸
[0604] TEA: 三乙胺
[0605] Tol: 甲苯
[0606] DCM: 二氯甲烷
[0607] DCE: 1,2-二氯乙烷
[0608] DMF: 二甲基甲酰胺
[0609] DMSO: 二甲基亚砷
[0610] DPPA: 叠氮基磷酸二苯酯
[0611] MeOH: 甲醇
[0612] BINAP: (2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘基)
[0613] Pd₂(dba)₃: 三(二亚苄基丙酮)二钯(0)
[0614] PPA 多磷酸
[0615] PDC 重铬酸吡啶啉(Cornforth试剂)
[0616] PE: 石油醚
[0617] EA: 乙酸乙酯
[0618] XPhos: 2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯
[0619] LCMS: 液相色谱-质谱法
[0620] HPLC: 高压液相色谱法
[0621] t-Bu: 叔丁基
[0622] Et 乙基
[0623] OAc: 乙酸酯
[0624] Piv 新戊基(t-BuC(0)-)

[0625] 可以使用本领域技术人员已知的多种反应如下所描述来合成在本发明范围内的

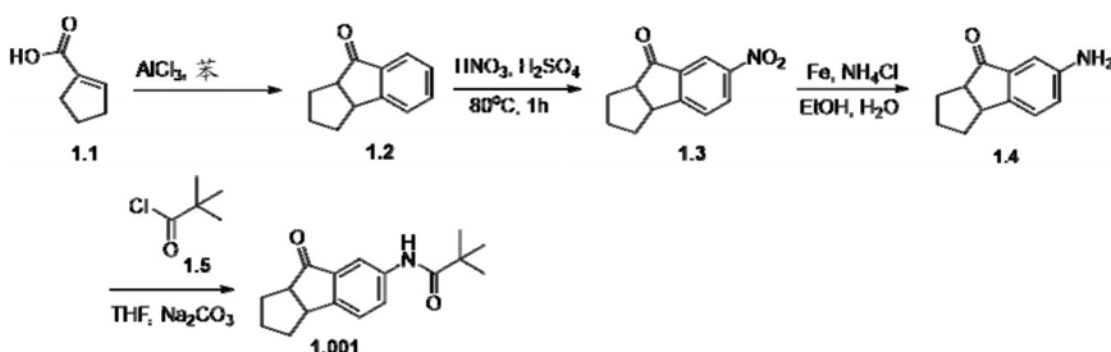
化合物。本领域技术人员还将认识到,可以使用替代方法来合成本发明的目标化合物,并且在本文的正文中描述的方法不是穷举的,但是确实提供了广泛可适用的且实用的得到感兴趣的化合物的途径。

[0626] 本专利要求保护的某些分子可以以不同的对映异构体形式和非对映异构体形式存在,并且这些化合物的所有此类变体均在本公开文本的范围内。

[0627] 在此本文中用于合成关键化合物的实验程序的详细描述导致产生通过鉴定它们的物理数据以及通过与它们相关联的结构描述所描述的分子。

[0628] 本领域技术人员还将认识到,在有机化学中的标准后处理程序中,经常使用酸和碱。在本专利中描述的实验程序的过程中,如果母体化合物具有必要的固有酸度或碱度,则有时产生其盐。

[0629] 实施例1:N-(8-氧代-1,2,3,3a,8,8a-六氢环戊二烯并[a]茚-6-基)新戊酰胺(化合物1.001)的合成



[0630]

[0631] 将化合物1.1 (4.9g, 437mmol, 1.0当量) 在苯 (50mL) 中的混合物和 AlCl_3 (17.5g, 1311mmol, 3.0当量) 添加3次, 然后在回流下加热3h。将反应通过3M HCl 淬灭并且将水溶液用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层干燥并且浓缩至残余物, 将其通过柱色谱法纯化 ($\text{PE}/\text{EA}=100:1$) 以给出化合物1.2 (3.4g, 45%)。

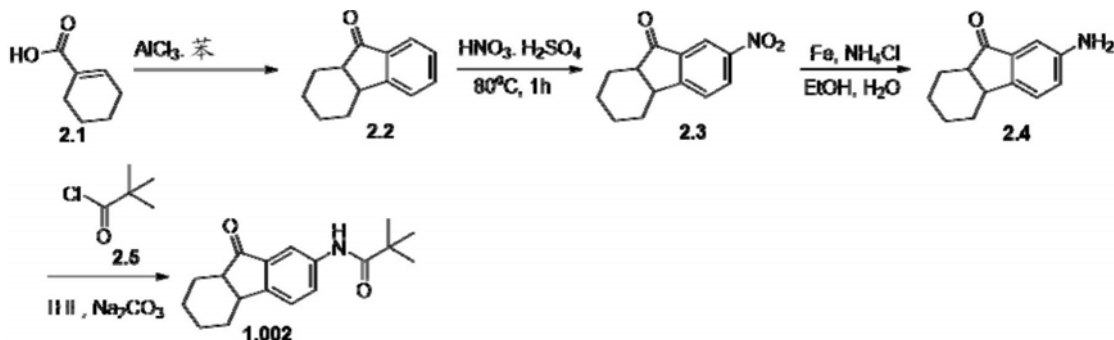
[0632] 将化合物1.2 (3.4g, 19.7mmol, 1.0当量) 在浓 HNO_3 (32mL) 和浓 H_2SO_4 (4mL) 中的混合物在 80°C 下加热1h。添加水并且将粗混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层干燥并且浓缩至残余物, 将其通过柱色谱法纯化 ($\text{PE}/\text{EA}=30:1$) 以给出呈黄色固体的化合物1.3 (2.7g, 63%)。

[0633] 在氮气气氛下将1.3 (2.7g, 12.44mmol, 1.0当量)、铁粉 (3.5g, 62.2mmol, 5.0当量)、 NH_4Cl (6.65g, 10.0mmol, 10.0当量) 在乙醇/水 ($v/v=2:1$, 20mL/10mL) 中的混合物在 80°C 下搅拌1h。反应完全后, 将固体滤出并且将滤液在真空中浓缩以提供1.4 (1.8g, 77%)。

[0634] 向1.4 (50mg, 0.267mmol, 1.0当量) 在 THF (5mL) 中的混合物中添加 Na_2CO_3 (114mg, 1.07mmol, 4.0当量) 和1.5 (65mg, 0.535mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。然后将混合物过滤, 添加 H_2O (3mL), 用 EA (2x 9mL) 萃取。将残余物经 Na_2SO_4 干燥并且在减压下浓缩以给出残余物, 将其通过制备型纯化以给出呈白色固体的化合物1.001 (40mg, 56%)。LCMS: $[\text{M}+1]=272$ 。 ^1H NMR (400MHz, DMSO): δ 9.32 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.08–7.82 (m, 1H), 7.31–7.29 (m, 1H), 3.39–3.37 (m, 1H), 3.01–2.98 (m, 1H), 2.51–2.50 (m, 2H), 2.19–2.10 (m, 1H), 1.84–1.79 (m, 1H), 1.78–1.40 (m, 2H), 1.12 (s, 9H)。

[0635] 实施例2:N-(9-氧代-2,3,4,4a,9,9a-六氢-1H-茚-7-基)新戊酰胺(化合物1.002)

的合成



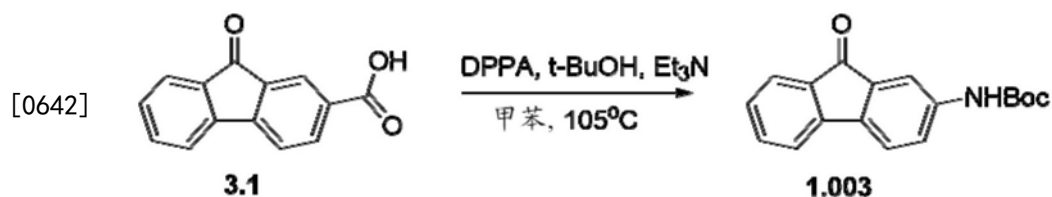
[0637] 将化合物2.1 (400mg, 3.2mmol, 1.0当量) 和 AlCl_3 (1.27g, 9.5mmol, 3.0当量) 在苯 (10mL) 中的混合物在回流下加热2h。将反应通过3M HCl淬灭并且将水溶液用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层干燥并且浓缩至残余物, 将其通过柱色谱法纯化 (PE/EA=100:1) 以给出化合物2.2 (150mg, 25%)。

[0638] 将化合物2.2 (140mg, 0.75mmol, 1.0当量) 在浓 HNO_3 (1.3mL) 和浓 H_2SO_4 (0.16mL) 中的混合物在 80°C 下加热2h。添加水并且将粗混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层干燥并且浓缩至残余物, 将其通过柱色谱法纯化 (PE/EA=30:1) 以给出呈白色固体的化合物2.3 (51mg, 29%)。

[0639] 在氮气气氛下将2.3 (51mg, 0.22mmol, 1.0当量)、铁粉 (62mg, 1.1mmol, 5.0当量)、 NH_4Cl (118mg, 2.2mmol, 10.0当量) 在乙醇/水 (v/v=2:1, 5mL/2.5mL) 中的混合物在 80°C 下搅拌1h。反应完全后, 将固体滤出并且将滤液在真空中浓缩以提供2.4 (30mg, 68%)。

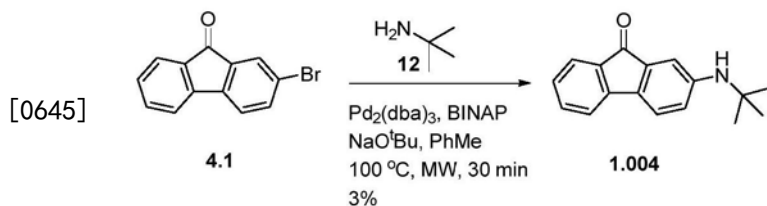
[0640] 向2.4 (30mg, 0.15mmol, 1.0当量) 在THF (3mL) 中的混合物中添加 Na_2CO_3 (63.6mg, 0.60mmol, 4.0当量) 和2.5 (36mg, 0.30mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。然后将混合物过滤, 添加 H_2O (5mL), 用EA (5x 3mL) 萃取。将残余物经 Na_2SO_4 干燥并且在减压下浓缩以给出残余物, 将其通过制备型TLC纯化以给出呈白色固体的化合物1.002 (12mg, 28%)。LCMS: $[\text{M}+1]=286$ 。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 9.36 (s, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.91–7.85 (m, 1H), 7.30–7.27 (m, 1H), 3.15 (s, 1H), 2.61 (s, 1H), 2.18–2.21 (m, 1H), 1.74–1.72 (m, 4H), 1.58–1.53 (m, 3H), 1.23 (s, 9H)。

[0641] 实施例3: (9-氧代-9H-芴-2-基)氨基甲酸叔丁酯(化合物1.003)的合成



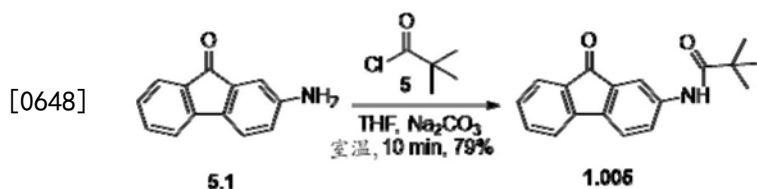
[0643] 在室温下向化合物3.1 (224mg, 1mmol, 1.0当量)、 Et_3N (158mg, 1.55mmol, 1.55当量) 和 t-BuOH (120mg, 1.62mmol, 1.62当量) 在甲苯 (100mL) 中的混合物中添加DPPA (413mg, 1.5mmol, 1.5当量)。将混合物在 105°C 下回流1h。通过LCMS监测反应。将反应混合物用水 (20mL) 稀释, 过滤。将滤液用EA (2x 20mL) 萃取。将有机层合并, 用水 (30mL)、盐水 (30mL) 洗涤, 干燥, 过滤并且浓缩以给出残余物, 将其通过制备型TLC纯化 (PE/EA=5:1) 以给出呈黄色固体的化合物1.003 (54mg, 18%)。LCMS: $[\text{M}+\text{Na}]=318$ 。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 9.67 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.75–7.63 (m, 2H), 7.59–7.52 (m, 3H), 7.29–7.25 (m, 1H), 1.47 (s, 9H)。

[0644] 实施例4:2-(叔丁基氨基)-9H-芴-9-酮(化合物1.004)的合成



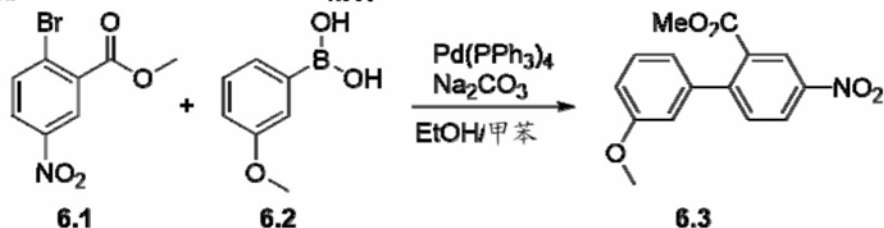
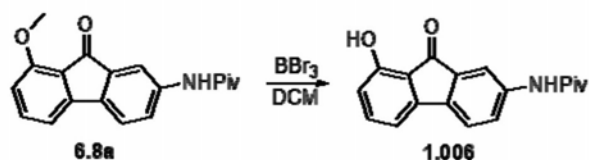
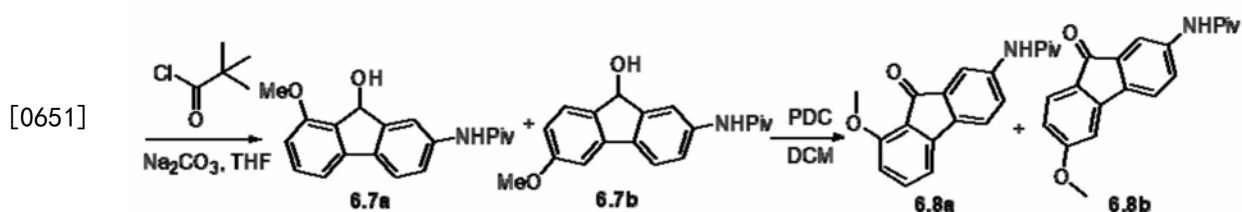
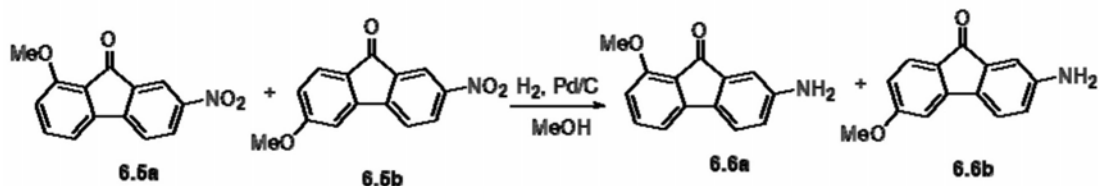
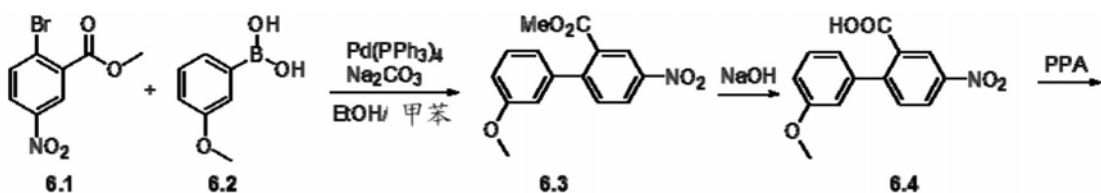
[0646] 向化合物4.1 (200mg, 0.772mmol, 1.0当量) 在PhMe (5mL) 中的混合物中添加化合物12 (67mg, 0.927mmol, 1.2当量)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.3mg, 0.00579mmol, 0.0075当量)、BINAP (1.2mg, 0.00193mmol, 0.0025当量) 和NaOtBu (104mg, 1.08mmol, 1.4当量)。将混合物在100 °C下微波处理30min。通过LCMS监测反应。然后将混合物用水 (5mL) 淬灭。将沉淀的固体过滤, 用THF (5mL) 洗涤。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈橙色固体的化合物1.004 (5mg, 3%)。LCMS: $[\text{M}+1] = 252$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7.50-7.35 (m, 4H), 7.15-7.10 (m, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.83 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.83 (s, 1H), 1.32 (s, 9H)。

[0647] 实施例5:N-(9-氧代-9H-芴-2-基)新戊酰胺(化合物1.005)的合成

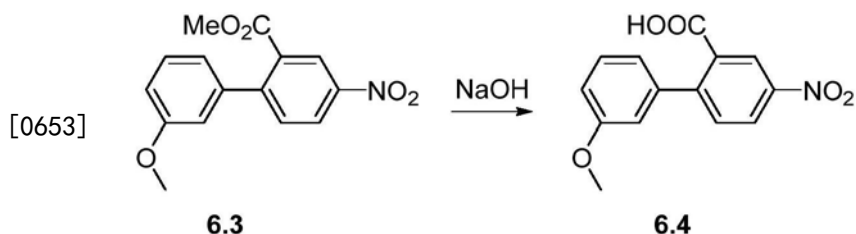


[0649] 在0 °C下在氮气气氛下向化合物5.1 (1.5g, 7.7mmol, 1.0当量) 和TEA (2.33g, 23mmol, 3.0当量) 在DCM (50mL) 中的混合物中添加化合物5 (1.1g, 9mmol, 1.2当量)。将混合物在室温下搅拌1h。通过TLC监测反应。然后将混合物过滤, 添加 H_2O (20mL), 用DCM (3x 50mL) 萃取。将残余物用EA处理并且过滤以给出呈橙色固体的化合物1.005 (1.7g, 79%)。TLC: DCM:MeOH=20:1, UV 254nm。Rf (化合物5.1)=0.3。Rf (化合物1.005)=0.8。LCMS: $[\text{M}+1] = 280$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.43 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.85-7.83 (m, 1H), 7.73-7.69 (m, 2H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.35-7.26 (m, 1H), 1.24 (s, 9H)。

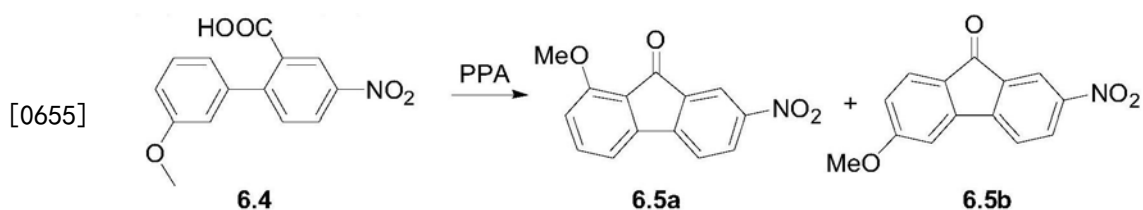
[0650] 实施例6:N-(6-甲氧基-9-氧代-9H-芴-2-基)新戊酰胺(化合物1.006)的合成



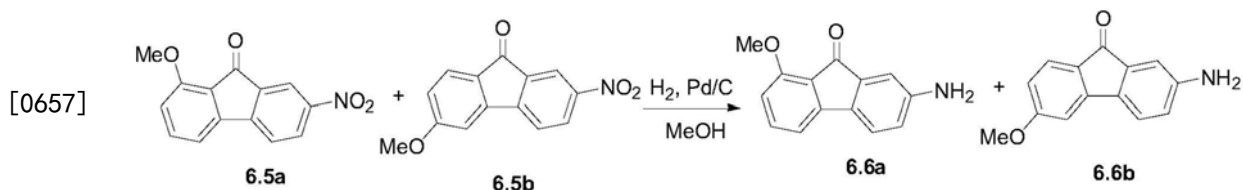
[0652] 在氮气气氛下向化合物6.1 (2.0g, 7.7mmol, 1.0当量) 在甲苯 (20mL) /EtOH (5mL) /H₂O (5mL) 中的溶液中添加化合物6.2 (1.29g, 8.5mmol, 1.1当量)、Pd (PPh₃)₄ (92mg, 0.8mmol, 0.1当量) 和Na₂CO₃ (2.4g, 23.1mmol, 3.0当量)。将混合物在90℃下搅拌2h。然后将混合物过滤并且用EA和H₂O萃取, 分离并且将有机层用盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法在硅胶上纯化 (PE/EA, 20:1-15:1) 以给出化合物呈黄色油状物的6.3 (2.2g, 100%)。TLC:PE:EA=8:1, R_f(6.1)=0.7, R_f(6.3)=0.5。



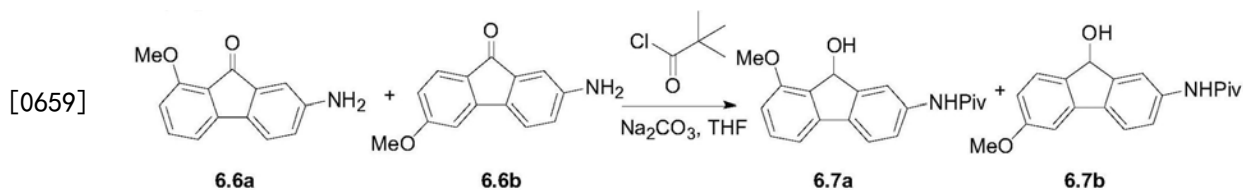
[0654] 向化合物6.3 (2.2g, 7.7mmol, 1.0当量) 在MeOH (20mL) /THF (20mL) 中的溶液中添加 2.5M NaOH (6.2mL, 15.4mmol, 2.0当量)。将混合物在室温下搅拌2h。然后向混合物中添加1M HCl以调节pH=3, 过滤并且在真空中干燥以给出呈白色固体的化合物6.4 (1.78g, 85%)。TLC:PE:EA=1:3, R_f(6.3)=1, R_f(6.4)=0.1。



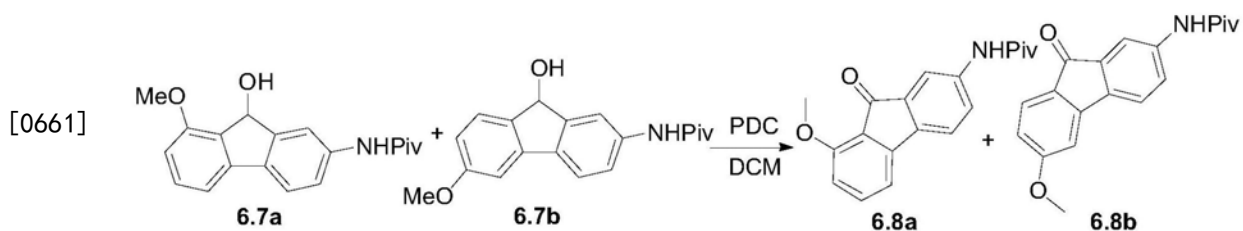
[0656] 将化合物6.4 (1.7g, 6.2mmol, 1.0当量) 添加在PPA (30mL) 中, 将混合物在120℃下搅拌4h。然后将混合物倒入冰水中, 过滤并且用H₂O和MeOH洗涤, 然后过滤并且在真空中干燥以给出呈黄色固体的化合物6.5a和6.5b (1.4g, 89%) 的混合物。TLC: PE: EA = 1: 3, R_f (6.4) = 0.1, R_f (6.5) = 0.8, 0.9。



[0658] 向化合物6.5a和6.5b (0.7g, 2.7mmol, 1.0当量) 在MeOH (30mL) / THF (30mL) 中的溶液中添加Pd/C (70mg, 10%wt)。在H₂下将所得溶液在室温下搅拌3h。将混合物过滤并且在真空中浓缩以给出呈棕色固体的化合物6.6a和6.6b (0.57g, 92%) 的混合物。TLC: PE: EA = 1: 1, R_f (6.5) = 0.6, R_f (6.6) = 0.4。



[0660] 在氮气气氛下向化合物6.6a和6.6b (0.57g, 2.5mmol, 1.0当量) 在干THF (20mL) 中的溶液中添加Na₂CO₃ (1.06g, 10.0mmol, 4.0当量), 然后添加新戊酰氯 (1.5g, 12.7mmol, 5.0当量)。将混合物在室温下搅拌0.5h。然后将混合物用EA和H₂O稀释, 分离并且将有机层用饱和NaHCO₃水溶液和盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法在硅胶上纯化 (PE/EA, 6: 1-2: 1) 以给出呈黄色固体的化合物6.7a和6.7b (0.46g, 56%) 的混合物。TLC: PE: EA = 1: 1, R_f (6.6) = 0.4, R_f (6.7) = 0.5。

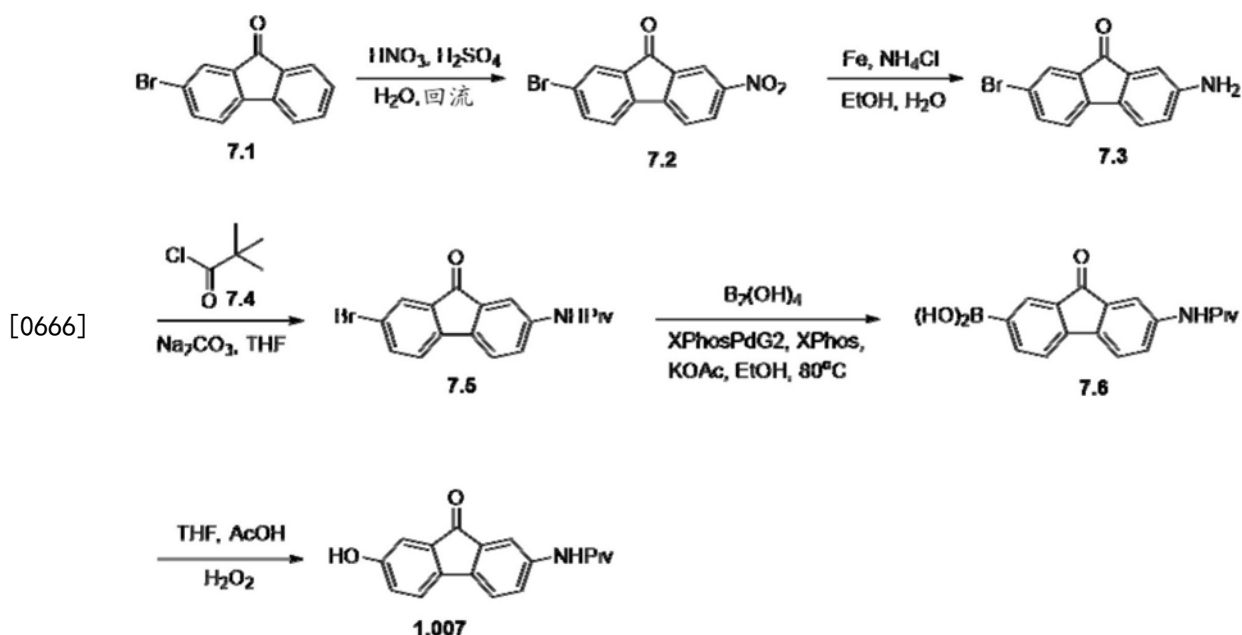


[0662] 向化合物6.7a和6.7b (0.45g, 1.45mmol, 1.0当量) 在DCM (30mL) 中的溶液中添加PDC (1.6g, 4.34mmol, 3.0当量) 和SiO₂ (1g)。将混合物在室温下搅拌2h。然后将混合物过滤并且在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法在硅胶上纯化 (PE/EA, 6: 1-2: 1) 以给出呈黄色固体的化合物6.8a (0.17g, 38%) 和6.8b (0.28g, 62%)。TLC: PE: EA = 2: 1, R_f (6.7) = 0.2, R_f (6.8) = 0.3



[0664] 向化合物6.8a (100mg, 0.32mmol, 1.0当量) 在DCM (30mL) 中的溶液中添加2M BBr₃ (1.6mL, 3.2mmol, 10.0当量)。将混合物在室温下搅拌0.5h。然后将混合物用MeOH淬灭并且用DCM和H₂O萃取, 分离并且将有机层用饱和NaHCO₃水溶液和盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈黄色固体的化合物1.006 (51mg, 41%)。TLC: PE:EA=1:1, R_f (6.8a)=0.5, R_f (1.006)=0.8。LCMS: [M+]⁺=296。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 8.31 (s, 1H), 7.78-7.75 (m, 1H), 7.59-7.58 (m, 1H), 7.40-7.38 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.30-7.27 (m, 1H), 6.92-6.90 (m, 1H), 6.67-6.64 (m, 1H), 1.27 (s, 9H)。

[0665] 实施例7: N-(7-羟基-9-氧代-9H-芴-2-基)新戊酰胺 (化合物1.007) 的合成



[0667] 将7.1 (1.3g, 5mmol, 1.0当量) 和水 (6mL) 的混合物在110℃下加热。然后逐滴添加HNO₃ (65%, 6mL) 和H₂SO₄ (96%, 9mL)。将混合物在110℃下加热6h。添加水并且将粗产物过滤, 用水洗涤, 并且干燥。将化合物与丙酮一起磨碎以给出呈黄色固体的化合物7.2 (1g, 67%)。

[0668] 在氮气气氛下将2 (100mg, 0.32mmol, 1.0当量)、铁粉 (92mg, 1.64mmol, 5.0当量)、NH₄Cl (175mg, 3.28mmol, 10.0当量) 在乙醇/水 (v/v=2:1, 6mL/3mL) 中的混合物在80℃下搅拌1h。反应完全后, 将固体滤出并且将滤液在真空中浓缩。然后将残余物通过制备型TLC纯化 (PE/EA, 1:1) 以提供7.3 (70mg, 78%)。

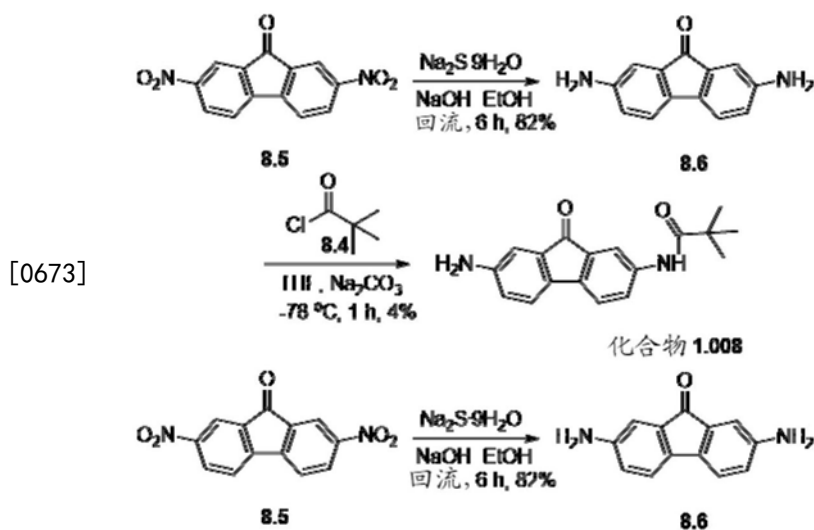
[0669] 向7.3 (70mg, 0.255mmol, 1.0当量) 在THF (5mL) 中的混合物中添加Na₂CO₃ (108mg, 1.02mmol, 4.0当量) 和7.4 (62mg, 0.51mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。然后将混合物过滤, 添加H₂O (6mL), 用EA (2x 8mL) 萃取。将残余物经Na₂SO₄干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化以给出呈黄色固体的7.5 (80mg, 88%)。

[0670] 将化合物7.5 (40mg, 0.112mmol, 1.0当量)、B₂(OH)₄ (50mg, 0.556mmol, 5.0当量)、

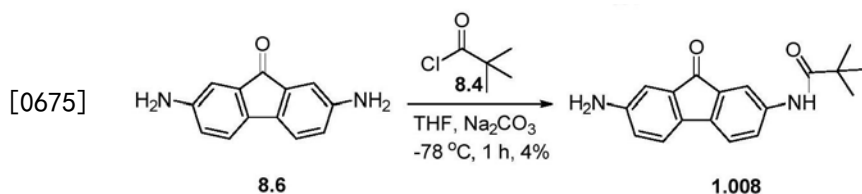
XPhosPdG2 (10mg, 0.011mmol, 0.1当量)、XPhos (12mg, 0.022mmol, 0.2当量)、KOAc (54mg, 0.556mmol, 5.0当量) 在EtOH (6mL) 中的混合物用N₂脱气三次并且加热至80℃持续3h。通过TLC监测反应。除去溶剂以提供呈黄色固体的粗化合物7.6 (40mg)。

[0671] 将化合物7.6溶解在THF (5mL) 和乙酸 (0.4mL) 中并且用过氧化氢 (1.6mL) 处理。将反应搅拌15min并且然后用饱和NaHSO₃水溶液淬灭。将反应用EtOAc (2 x 10mL) 萃取。将有机层合并, 经Na₂SO₄干燥, 并且在真空中浓缩至残余物, 将其通过制备型TLC纯化 (PE/EA=1:1) 以给出呈黄色固体的化合物1.007 (10.5mg, 32%)。LCMS: [M+1]=296。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ9.97 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.77-7.15 (m, 1H), 7.53-7.47 (m, 2H), 6.94-6.90 (m, 2H), 1.25-1.23 (m, 9H)。

[0672] 实施例8: N-(7-氨基-9-氧代-9H-芴-2-基) 新戊酰胺 (化合物1.008) 的合成

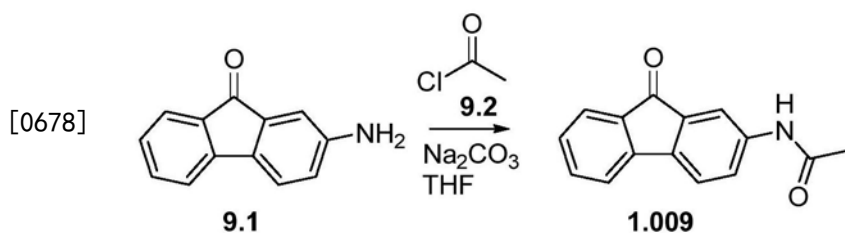


[0674] 向化合物8.5 (5g, 18.5mmol, 1.0当量) 在EtOH (200mL) 中的混合物中添加在H₂O (345mL) 中的Na₂S · 9H₂O (20g, 83.2mmol, 4.5当量) 和NaOH (8g, 200mmol, 10.8当量)。将混合物在室温下回流5h, 然后在0℃下搅拌过夜。通过TLC监测反应。然后将混合物过滤, 用H₂O (2x 50mL)、5%NaOH (2x 50mL)、H₂O (3x 50mL)、冷EtOH (2x 25mL)、醚 (25mL) 和己烷 (20mL) 洗涤以给出化合物8.6 (3.2g, 82%)。



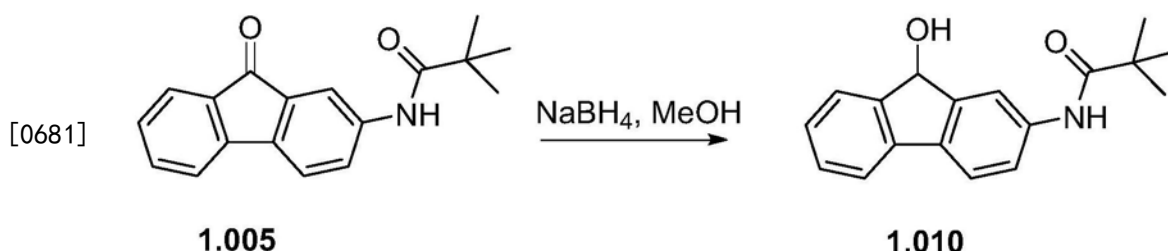
[0676] 向化合物8.6 (200mg, 0.952mmol, 1.0当量) 在THF (10mL) 中的混合物中添加Na₂CO₃ (202mg, 1.9mmol, 2.0当量) 和化合物8.4 (114mg, 0.952mmol, 1.0当量)。将混合物在-78℃下搅拌1h。通过TLC监测反应。然后将混合物用水 (10mL) 淬灭。将沉淀的固体过滤, 用THF (10mL) 洗涤。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈黑色固体的化合物1.008 (5mg, 4%)。LCMS: [M+42]=336。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ9.30 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.70 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.45-7.30 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.73 (d, J=8.0Hz, 1H), 1.22 (s, 9H)。

[0677] 实施例9: N-(9-氧代-9H-芴-2-基) 乙酰胺 (化合物1.009) 的合成



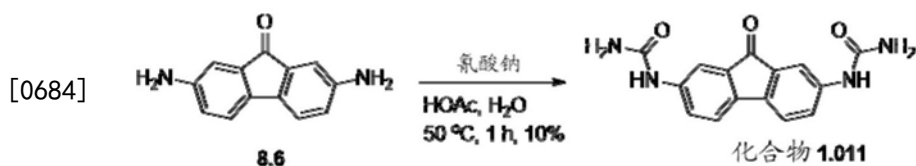
[0679] 向9.1 (50mg, 0.26mmol, 1.0当量) 在THF (3mL) 中的混合物中添加Na₂CO₃ (83mg, 0.78mmol, 3.0当量) 和9.2 (41mg, 0.52mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。然后将混合物过滤, 添加H₂O (5mL), 用EA (3x 5mL) 萃取。将残余物与MeOH一起磨碎以给出呈红色固体的化合物1.009 (35mg, 58%)。LCMS: [M+1] = 238。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ10.19 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.70-7.65 (m, 3H), 7.57-7.54 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 1H), 2.06 (s, 3H)。

[0680] 实施例10: 3,3-二甲基-3,6-二氢-2H-1,4-噁嗪4-氧化物 (化合物1.010) 的合成



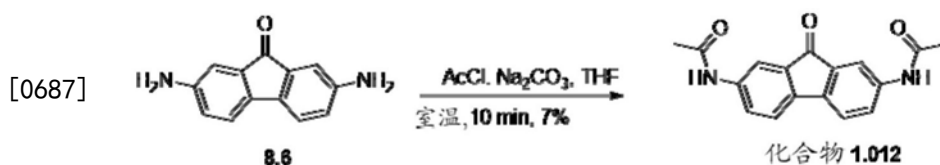
[0682] 如实施例5中所描述制备化合物1.005。向化合物1.005 (62mg, 0.22mmol) 在甲醇 (3mL) 中的混合物中添加NaBH₄ (10mg, 0.26mmol)。在LC-MS和TLC分析中未观察到起始材料后, 将反应混合物浓缩以除去甲醇。将所得残余物通过pTLC在硅胶上纯化以给出39mg产物 (化合物1.010), 63%产率。TLC: 己烷/乙酸乙酯 = 3/1; R_f (起始材料) = 0.6; R_f (化合物1.010) = 0.2; LC-MS (ESI): 282.4 [M+H]⁺; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ7.82 (s, 1H), 7.64-7.53 (m, 4H), 7.34-7.26 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 1.32 (s, 9H)。

[0683] 实施例11: 1,1'-(9-氧代-9H-芴-2,7-二基)二脲 (化合物1.011) 的合成



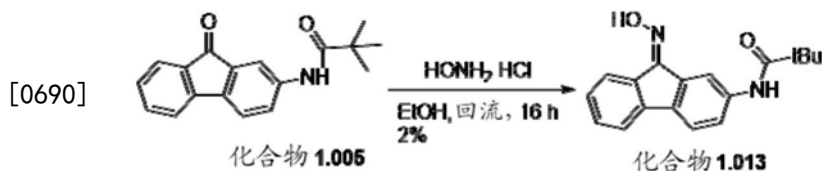
[0685] 如实施例8中所描述制备化合物8.6。向化合物8.6 (50mg, 0.238mmol, 1.0当量) 在HOAc/H₂O (5mL/10mL) 中的混合物中添加在H₂O (6mL) 中的氰酸钠 (61.97mg, 0.952mmol, 4.0当量)。将混合物在50°C下搅拌2h。通过TLC监测反应。然后将混合物用水 (5mL) 淬灭。将沉淀的固体过滤, 用EA (20mL) 萃取。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈棕色固体的化合物1.013 (7mg, 10%)。LCMS: [M+42] = 338。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ8.74 (s, 2H), 7.71 (s, 2H), 7.45-7.30 (m, 4H), 5.92 (s, 4H)。

[0686] 实施例12: N,N'-(9-氧代-9H-芴-2,7-二基)二乙酰胺 (化合物1.012) 的合成



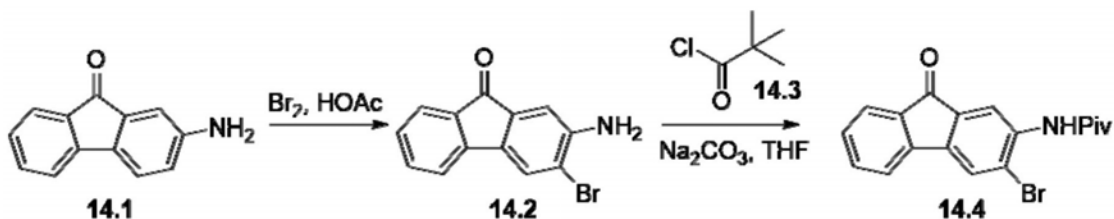
[0688] 如实施例8中所描述制备化合物8.6。向化合物8.6 (50mg, 0.238mmol, 1.0当量) 在 THF (10mL) 中的混合物中添加 Na_2CO_3 (100.95mg, 0.952mmol, 4.0当量) 和 AcCl (74.82mg, 0.952mmol, 4.0当量)。将混合物在室温下搅拌10min。通过TLC监测反应。然后将混合物用水 (10mL) 淬灭。将沉淀的固体过滤, 用THF (10mL) 洗涤。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈红色固体的化合物1.012 (5mg, 7%)。LCMS: $[\text{M}+42] = 336$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO): δ 10.17 (s, 2H), 7.90 (s, 2H), 7.65-7.55 (m, 4H), 2.07 (s, 6H)。

[0689] 实施例13: N-(9-(羟基亚氨基)-9H-茚-2-基)新戊酰胺(化合物1.013)的合成

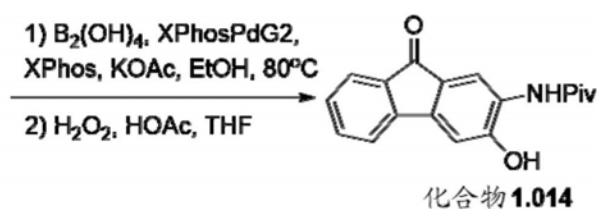


[0691] 如实施例5中所描述制备化合物1.005。向化合物1.005 (200mg, 0.72mmol, 1.0当量) 在EtOH (5mL) 中的混合物中添加 $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$ (100mg, 1.44mmol, 2.0当量)。将混合物在室温下回流16h。通过TLC监测反应。然后将混合物用水 (5mL) 淬灭。将沉淀的固体过滤。将残余物经 Na_2SO_4 干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化 (PE:EA, 5:1) 4次以给出呈黄色固体的化合物1.013 (4mg, 2%)。TLC: PE:EA=2:1, UV 254nm。Rf (化合物1.013) = 0.5。LCMS: $[\text{M}+42] = 336$ 。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD): δ 8.34 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.70-7.60 (m, 2H), 7.55-7.50 (m, 1H), 7.42-7.36 (m, 1H), 7.28-7.24 (m, 1H), 1.31 (s, 9H)。

[0692] 实施例14: N-(3-羟基-9-氧代-9H-茚-2-基)新戊酰胺(化合物1.014)的合成



[0693]



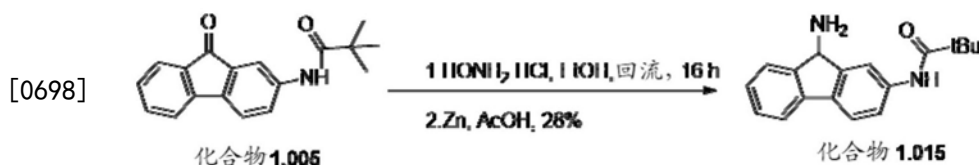
[0694] 将化合物14.1 (100mg, 0.51mmol, 1.0当量) 溶解在HOAc (2.0mL) 中。在室温下逐滴添加 Br_2 (100mg, 0.61mmol, 1.2当量)。将混合物在室温下搅拌1h。添加水并且将固体过滤, 将其用水洗涤以给出呈黄色固体的化合物14.2 (140mg, 81%)。

[0695] 向14.2 (140mg, 0.42mmol, 1.0当量) 在THF (3mL) 中的混合物中添加 Na_2CO_3 (134mg, 1.26mmol, 3.0当量) 和14.3 (100mg, 0.84mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。然后将混合物过滤, 添加 H_2O (5mL), 用EA (3x 5mL) 萃取。将残余物经 Na_2SO_4 干燥并且在减压下浓缩以给出呈黄色固体的14.4 (100mg, 66%)。

[0696] 将化合物14.4 (100mg, 0.28mmol, 1.0当量)、 $\text{B}_2(\text{OH})_4$ (125mg, 1.40mmol, 5.0当量)、XPhosPdG2 (23mg, 0.03mmol, 0.1当量)、XPhos (29mg, 0.06mmol, 0.2当量)、KOAc (137mg,

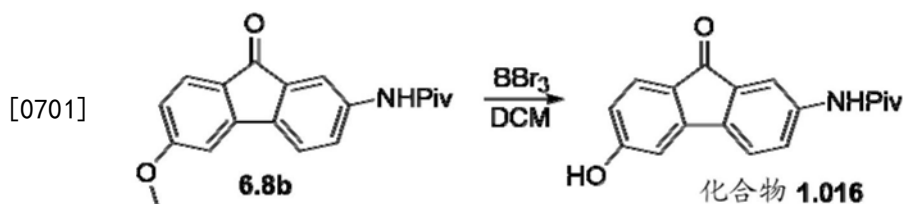
1.40mmol, 5.0当量) 在EtOH (10mL) 中的混合物用N₂脱气三次并且加热至80℃持续6h。通过TLC监测反应。除去溶剂以给出粗黄色残余物。将此粗油状物溶解在THF (4mL) 和乙酸 (0.5mL) 中, 并且用过氧化氢 (2mL) 处理。将反应搅拌15min并且然后用饱和NaHSO₃水溶液淬灭。将反应用EtOAc (3x 40mL) 萃取。将有机层合并, 经Na₂SO₄干燥, 并且在真空中浓缩至残余物, 将其通过制备型HPLC纯化以给出呈黄色固体的化合物1.014 (15mg, 18%)。LCMS: [M+1] = 296。¹H NMR (400MHz, DMSO) : δ8.56 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.66-7.65 (m, 1H), 7.58-7.52 (m, 2H), 7.36-7.32 (m, 1H), 7.23 (s, 1H), 1.27 (m, 9H)。

[0697] 实施例15: N-(9-氨基-9H-芴-2-基) 新戊酰胺 (化合物1.015) 的合成



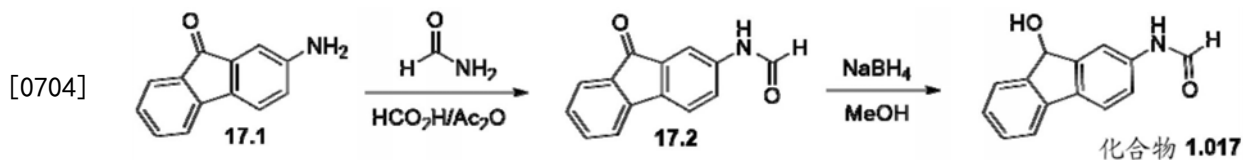
[0699] 如实施例5中所描述制备化合物1.005。向化合物1.005 (50mg, 0.18mmol, 1.0当量) 在EtOH (3mL) 中的混合物中添加HONH₂ · HCl (100mg, 1.44mmol, 8.0当量)。将混合物在室温下回流过夜。然后将混合物浓缩并且溶解在AcOH (6mL) 中。向混合物中添加Zn (120mg, 1.85mmol, 10.0当量)。将混合物在80℃下回流2h。通过TLC监测反应。然后将混合物过滤, 经Na₂SO₄干燥并且在减压下浓缩。将残余物用EA处理并且过滤以给出呈白色固体的AcOH形式的化合物1.015 (14mg, 28%)。LCMS: [M+42] = 322。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ9.28 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.35-7.25 (m, 2H), 4.72 (s, 1H), 1.90 (s, 3H), 1.25 (s, 9H)。

[0700] 实施例16: N-(6-羟基-9-氧代-9H-芴-2-基) 新戊酰胺 (化合物1.016) 的合成



[0702] 如实施例6中所描述制备化合物6.8b。向化合物6.8b (230mg, 0.74mmol, 1.0当量) 在DCM (30mL) 中的溶液中添加2M BBr₃ (3.7mL, 7.4mmol, 10.0当量)。将混合物在室温下搅拌0.5h。然后将混合物用MeOH淬灭并且用DCM和H₂O萃取, 分离并且将有机层用饱和NaHCO₃水溶液和盐水洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈黄色固体的化合物1.016 (4.7mg, 5%)。LCMS: [M+1]⁺ = 296。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ7.76-7.75 (m, 1H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.49-7.42 (m, 2H), 6.95-6.94 (m, 1H), 6.61-6.58 (m, 1H), 1.29 (s, 9H)。

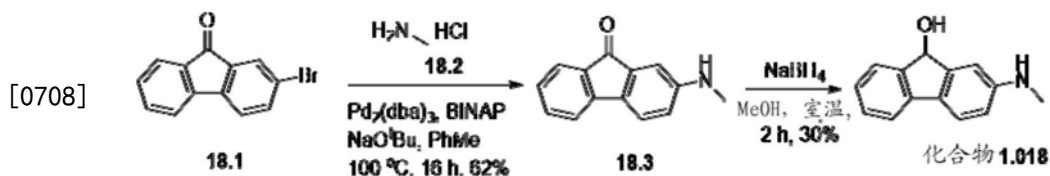
[0703] 实施例17: N-(9-羟基-9H-芴-2-基) 甲酰胺 (化合物1.017) 的合成



[0705] 向化合物17.1 (100mg, 0.513mmol, 1.0当量) 在甲酸 (3mL) 中的混合物中添加Ac₂O (3滴)。将混合物在室温下搅拌0.5h。将反应通过水淬灭并且过滤。将滤饼溶解在EA中, 并且其用Na₂SO₄干燥。除去EA以给出呈浅黄色固体的化合物17.2 (105mg, 92%)。

[0706] 在0℃下向化合物17.2 (105mg, 0.471mmol, 1.0当量) 在MeOH (10mL) 中的混合物中添加NaBH₄ (54mg, 1.41mmol, 3.0当量)。将混合物搅拌0.5h。将混合物用EA和水萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥并且在压力下浓缩以给出残余物, 将其通过MeOH洗涤以给出呈白色固体的化合物1.017 (70mg, 66%)。LCMS: [M-1]⁻ = 224。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ 10.23 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.68-7.66 (m, 2H), 7.51 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.36-7.18 (m, 2H), 5.81 (m, 1H), 5.41 (d, J=7.6Hz, 1H)。

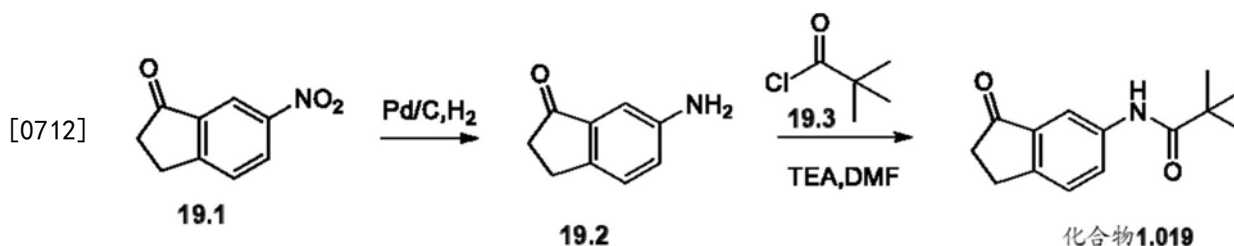
[0707] 实施例18: 2-(甲基氨基)-9H-茛-9-醇(化合物1.018)的合成



[0709] 将化合物18.1 (1g, 3.88mmol, 1.0当量)、化合物18.2 (520mg, 7.76mmol, 2.0当量)、Pd₂(dba)₃ (348mg, 0.38mmol, 0.1当量)、BINAP (486mg, 0.78mmol, 0.2当量) 和NaO^tBu (1.49g, 15.52mmol, 4.0当量) 在PhMe (10mL) 中的混合物中在100℃下回流16h。通过TLC监测反应。然后将混合物用H₂O (10mL) 稀释, 用EA (3x 10mL) 萃取。将有机层用盐水洗涤。将残余物经Na₂SO₄干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法在硅胶上纯化(PE/EA, 5:1) 以给出化合物18.3 (500mg, 62%)。TLC: PE:EA=5:1, UV 254nm。R_f (化合物18.1) = 0.7。R_f (化合物18.3) = 0.5。

[0710] 在氮气气氛下向化合物18.3 (500mg, 2.39mmol, 1.0当量) 在MeOH (5mL) 中的混合物中添加NaBH₄ (181mg, 4.78mmol, 2.0当量)。将混合物在室温下搅拌2h。通过TLC监测反应。然后将混合物用H₂O淬灭, 用EA (2x10mL) 萃取。将有机层用盐水洗涤。将残余物经Na₂SO₄干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化以给出呈黄色固体的化合物1.018 (150mg, 30%)。LCMS: [M+42]⁺ = 253,¹H NMR (400MHz, d₆-DMSO): δ 7.64-7.60 (m, 2H), 7.52-7.48 (m, 1H), 7.30-7.25 (m, 1H), 7.24-7.20 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.93-6.89 (m, 1H), 5.40 (s, 1H), 2.83 (s, 3H)。

[0711] 实施例19: N-(3-氧代-2,3-二氢-1H-茛-5-基)乙酰胺(化合物1.019)的合成

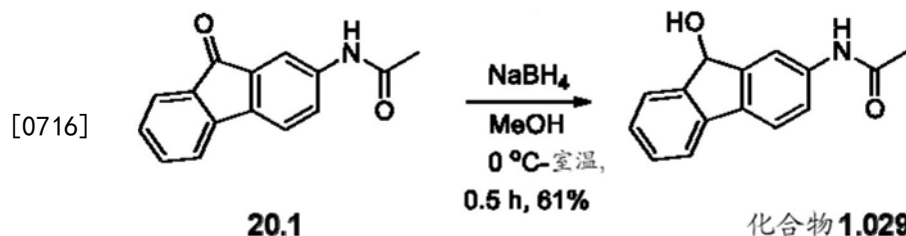


[0713] 向化合物19.1 (1g, 5.6mmol, 1.0当量) 在CH₃OH (20mL) 中的溶液中添加Pd/C (100mg, 10%wt)。在H₂下将所得溶液在室温下搅拌14h。将混合物过滤以得到滤液, 在真空中除去以给出呈棕色固体的化合物19.2 (0.8g, 96%), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

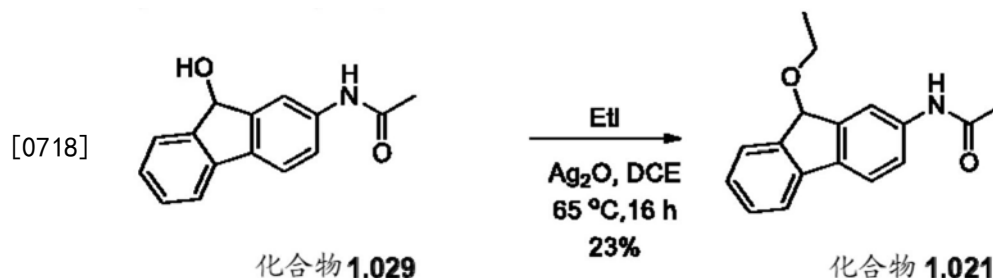
[0714] 在0℃下在N₂下向化合物19.2 (100mg, 0.68mmol, 1.0当量) 和TEA (206mg, 2.04mmol, 3.0当量) 在DMF (10mL) 中的混合物中缓慢添加化合物19.3。将混合物温热至室温并且搅拌14h。将反应混合物倒入50ml水中并且用EA (3x 50mL) 萃取。将有机相用盐水洗涤并且经无水Na₂SO₄干燥。将混合物在减压下浓缩以得到残余物, 将残余物通过柱色谱法在硅

胶上纯化(PE:EA=3:1)以获得呈白色固体的化合物1.019(70mg,45%)。TLC:PE:EA=3:1, R_f(化合物1.019)=0.4,LC-MS:[M+MeCN+H]⁺=273.15。¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ8.06(dd,J=4.0和8.0Hz,1H),7.66(d,J=4.0,1H),7.54(s,1H),7.44(d,J=8.0Hz,2H),3.10(m,J=8.0Hz,2H)。

[0715] 实施例20:N-(9-乙氧基-9H-芴-2-基)乙酰胺(化合物1.021)和N-(9-羟基-9H-芴-2-基)乙酰胺(化合物1.029)的合成

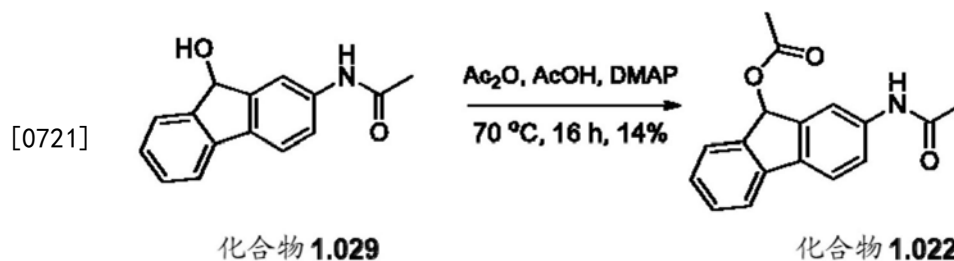


[0717] 在0°C下向化合物20.1(100mg,0.42mmol,1.0当量)在四氢呋喃/甲醇(3mL/1mL)中的混合物中添加硼氢化钠(32mg,0.84mmol,2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌30min。通过TLC监测反应。然后向混合物中添加水(3mL)、乙酸乙酯(3mL)并且过滤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得呈白色固体的化合物1.029(61mg,61%)。TLC:石油醚:乙酸乙酯,1:1,UV 254nm。R_f:(化合物20.1)=0.5;R_f:(化合物1.029)=0.2。LCMS:[M-1]:238。¹H NMR(DMSO,400MHz):δ9.84(s,1H),7.89(s,1H),7.65-7.62(m,2H),7.52-7.48(t,J=8.0Hz,2H),7.33-7.29(t,J=7.4Hz,1H),7.23-7.20(t,J=7.2Hz,1H),5.79(s,1H),5.39(s,1H)和2.04-2.03(d,J=1.6Hz,3H)。



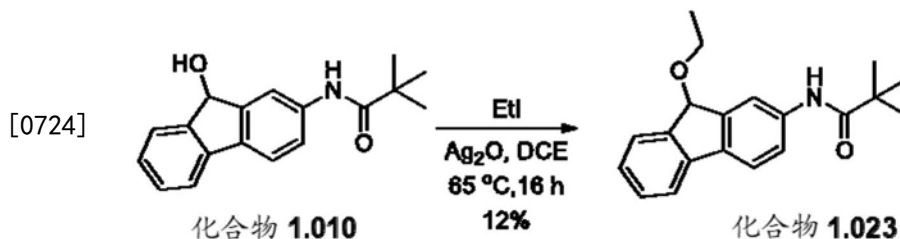
[0719] 将化合物1.029(80mg,0.33mmol,1.0当量)、氧化银(465mg,2.0mmol,6.0当量)和碘乙烷(156mg,1.0mmol,3.0当量)在1,2-二氯乙烷(5mL)中的混合物在60°C下搅拌16h。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化以获得呈浅黄色固体的化合物1.021(20mg,12%)。LCMS:[M+1]:268。¹H NMR(DMSO,400MHz):δ10.05(s,1H),7.89(s,1H),7.70-7.68(d,J=8.0Hz,2H),7.57-7.52(m,2H),7.38-7.35(t,J=7.2Hz,1H),7.27-7.23(t,J=7.4Hz,1H),5.52(s,1H),3.36-3.32(m,2H),2.05(s,3H)和1.10-1.07(t,J=7.0Hz,3H)。

[0720] 实施例21:乙酸2-乙酰胺基-9H-芴-9-基酯(化合物1.022)的合成



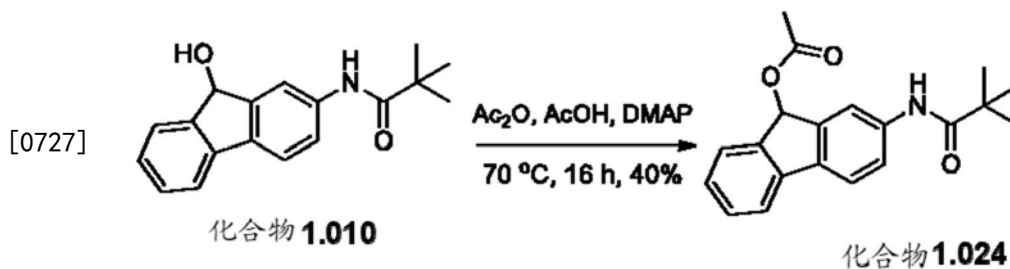
[0722] 将化合物1.029 (50mg, 0.21mmol, 1.0当量) 和4-二甲基氨基吡啶 (2.44mg, 0.02mmol, 0.1当量) 在乙酸/乙酸酐 (1mL/1mL) 中的混合物在70°C下搅拌16h。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤, 添加水 (2mL), 用乙酸乙酯 (3x 2mL) 萃取。然后将混合物用甲醇洗涤以获得呈白色固体的化合物1.022 (8mg, 14%)。LCMS: [M+23]: 304。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ 10.07 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.73-7.71 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.65-7.63 (dd, J=8.4Hz, 1.4Hz, 1H), 7.51-7.49 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.42-7.39 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.27-7.23 (t, J=7.4Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 2.14-2.12 (d, J=4.8Hz, 3H) 和2.03 (s, 3H)。

[0723] 实施例22: N-(9-乙氧基-9H-芴-2-基)新戊酰胺 (化合物1.023) 的合成



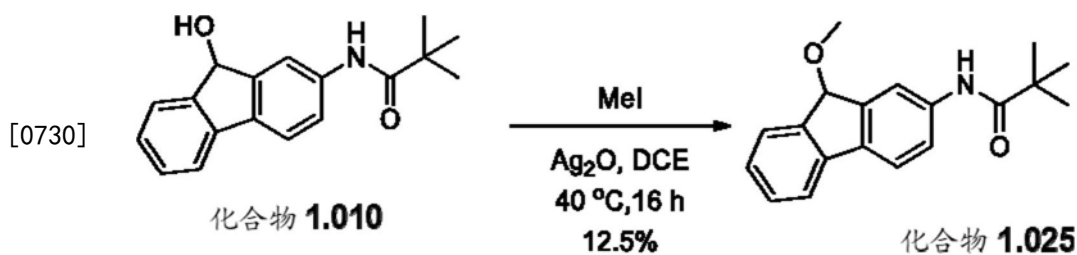
[0725] 如实施例10中所描述制备化合物1.010。将化合物1.010 (100mg, 0.356mmol, 1.0当量)、氧化银 (247mg, 1.068mmol, 3.0当量) 和碘乙烷 (166mg, 1.068mmol, 3.0当量) 在1,2-二氯乙烷 (10mL) 中的混合物在65°C下搅拌16h。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化以获得呈白色固体的化合物1.023 (13mg, 12%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 5:1, UV 254nm。R_f: (化合物1.010) = 0.1; R_f: (化合物1.023) = 0.5。LCMS: [M+1]: 310。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ 9.29 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.72-7.67 (m, 3H), 7.54-7.53 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.38-7.34 (t, J=7.2Hz, 1H), 7.27-7.23 (td, J=7.4Hz, 0.8Hz, 1H), 5.51 (s, 1H), 3.42-3.35 (m, 2H), 1.23 (s, 9H) 和1.18-1.07 (m, 3H)。

[0726] 实施例23: 乙酸2-新戊酰胺基-9H-芴-9-基酯 (化合物1.024) 的合成



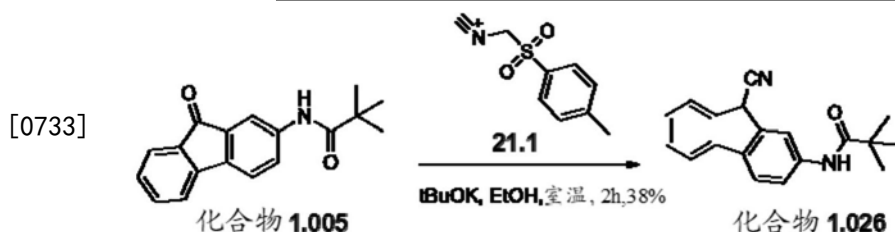
[0728] 如实施例10中所描述制备化合物1.010。将化合物1.010 (50mg, 0.178mmol, 1.0当量) 和4-二甲基氨基吡啶 (21.7mg, 0.178mmol, 1.0当量) 在乙酸/乙酸酐 (3mL/3mL) 中的混合物在70°C下搅拌16h。通过TLC监测反应。然后将混合物过滤, 添加水 (5mL), 用乙酸乙酯 (3x 5mL) 萃取。然后将混合物用甲醇洗涤以获得呈白色固体的化合物1.024 (23mg, 40%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 5:1, UV 254nm。R_f: (化合物1.010) = 0.1; R_f: (化合物1.024) = 0.4。LCMS: [M-1]: 322。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ 9.34 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.74-7.73 (m, 3H), 7.51-7.49 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.26 (m, 1H), 6.68 (s, 1H), 2.15 (s, 3H) 和1.22 (s, 9H)。

[0729] 实施例24: N-(9-甲氧基-9H-芴-2-基)新戊酰胺 (化合物1.025) 的合成



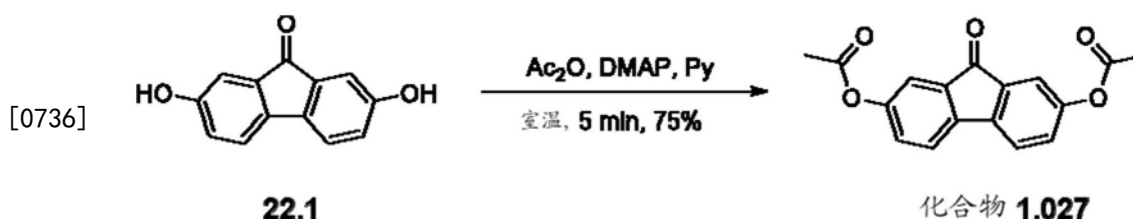
[0731] 如实施例10中所描述制备化合物1.010。将化合物1.010 (50mg, 0.178mmol, 1.0当量)、氧化银 (123.7mg, 0.534mmol, 3.0当量) 和碘甲烷 (38mg, 0.267mmol, 1.5当量) 在1,2-二氯乙烷 (10mL) 中的混合物在40°C下搅拌16h。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化以获得呈白色固体的化合物1.025 (6.6mg, 12.5%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 5:1, UV 254nm。R_f: (化合物1.010) = 0.1; R_f: (化合物1.025) = 0.5。LCMS: [M+23]: 318。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ9.29 (s, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.72-7.70 (m, 3H), 7.54-7.53 (m, 1H), 7.38-7.36 (m, 1H), 7.28-7.27 (m, 1H), 5.51 (s, 1H), 3.09 (s, 3H) 和1.30-1.23 (m, 9H)。

[0732] 实施例25: N-(9-氰基-9H-芴-2-基)新戊酰胺(化合物1.026)的合成



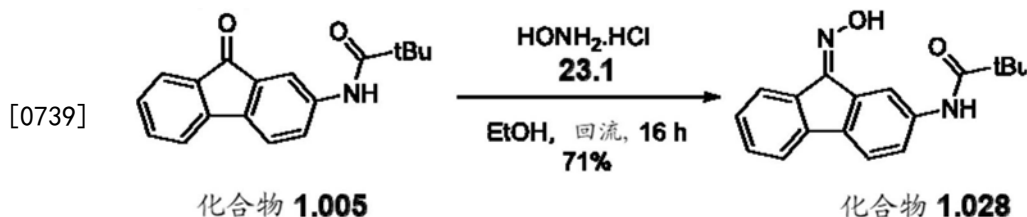
[0734] 向化合物21.1 (52.4mg, 0.27mmol, 1.5当量) 在乙醇 (5mL) 中的混合物中添加tBuOK (30mg, 0.27mmol, 1.5当量) 并且在室温下搅拌5min。向混合物中添加如实施例5中所描述制备的化合物1.005 (50mg, 0.18mmol, 1.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌2h。通过TLC监测反应。然后将混合物过滤, 添加水 (20mL), 用乙酸乙酯 (3x 20mL) 萃取。将有机层用盐水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化以获得呈白色固体的化合物1.026 (20mg, 38%)。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz): δ8.80 (s, 1H), 7.68-7.58 (m, 4H), 7.53-7.33 (m, 4H), 4.56 (s, 1H) 和1.31 (s, 9H)。

[0735] 实施例26: 二乙酸9-氧代-9H-芴-2,7-二基酯(化合物1.027)的合成



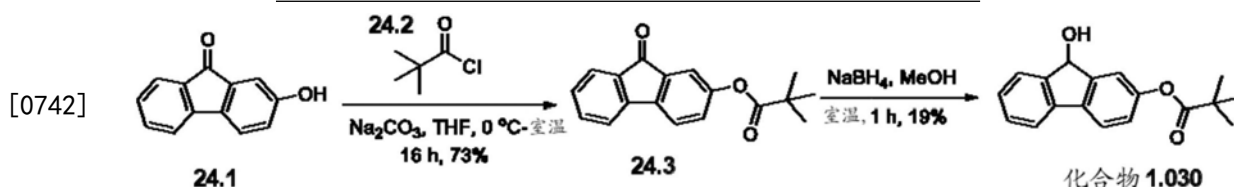
[0737] 将化合物22.1 (50mg, 0.236mmol, 1.0当量)、乙酸酐 (96.28mg, 0.944mmol, 4.0当量) 和4-二甲基氨基吡啶 (2.879mg, 0.0236mmol, 0.1当量) 在吡啶 (10mL) 中的混合物在室温下搅拌5min。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤, 添加水 (5mL), 用乙酸乙酯 (3x 5mL) 萃取。然后将混合物用1N HCl洗涤。将残余物通过制备型HPLC纯化以获得呈黄色固体的化合物1.027 (5.3mg, 7.5%)。LCMS: [M+42]: 338。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ8.85-7.83 (m, 1H), 7.41-7.42 (m, 2H), 7.39-7.37 (m, 2H) 和2.30 (s, 6H)。

[0738] 实施例27: N-(9-(羟基亚氨基)-9H-芴-2-基)新戊酰胺(化合物1.028)的合成



[0740] 如实施例5中所描述制备化合物1.005。向化合物1.005 (200mg, 0.72mmol, 1.0当量) 在乙醇 (5mL) 中的混合物中添加化合物22.1 (100mg, 1.44mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在回流下搅拌16h。通过TLC监测反应。然后将混合物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过柱色谱法在硅胶上纯化以获得呈白色固体的化合物1.028 (150mg, 71%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 2:1, UV 254nm。R_f: (化合物1.005) = 0.4; R_f: (化合物1.028) = 0.2。LCMS: [M+42]: 336。¹H NMR (CD₃OD, 400MHz): δ8.58 (s, 1H), 7.67-7.62 (m, 4H), 7.34-7.32 (m, 1H), 7.24-7.22 (m, 1H), 4.56 (s, 1H) 和1.30 (s, 9H)。

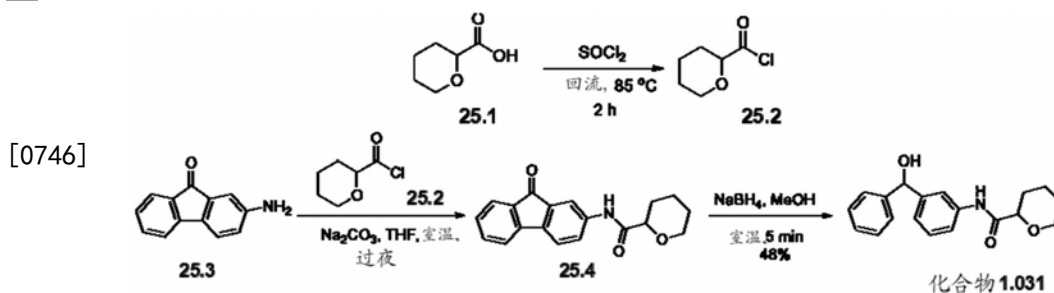
[0741] 实施例28: 新戊酸9-羟基-9H-芴-2-基酯(化合物1.030)的合成



[0743] 将化合物24.1 (100mg, 0.51mmol, 1.0当量) 和碳酸钠 (162mg, 1.53mmol, 3.0当量) 在THF (10mL) 中的溶液冷却至0°C并且添加化合物24.2 (74mg, 0.61mmol, 1.2当量)。将所得混合物从0°C至室温搅拌过夜。通过TLC监测反应混合物的进程。反应完成后, 将混合物过滤, 用水 (1500mL) 稀释并且然后用二氯甲烷 (100mL) 萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型TLC纯化 (PE/EtOAc = 10:1) 以得到呈黄色固体的化合物24.3 (105mg, 73%)。

[0744] 在氮气气氛下向化合物24.3 (105mg, 0.375mmol, 1.0当量) 在甲醇 (5mL) 中的溶液中添加硼氢化钠 (17mg, 0.45mmol, 1.2当量)。将所得溶液在室温下搅拌1小时。通过TLC监测反应混合物的进程。反应完成后, 将混合物在减压下浓缩并且将残余物通过制备型TLC纯化 (PE/EtOAc = 10:1)。获得呈黄色固体的所希望的化合物1.030, 20.1mg, 19%产率。TLC: 己烷/乙酸乙酯 (10:1)。R_f: (化合物24.3) = 0.5; R_f: (化合物1.030) = 0.3; LC-MS: 281.00 [M-1]⁻。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ7.64-7.57 (m, 3H), 7.40-7.27 (m, 3H), 7.08-7.03 (m, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.46 (s, 1H), 1.36 (s, 9H)。

[0745] 实施例29: N-(9-羟基-9H-芴-2-基)四氢-2H-吡喃-2-甲酰胺(化合物1.031)的合成

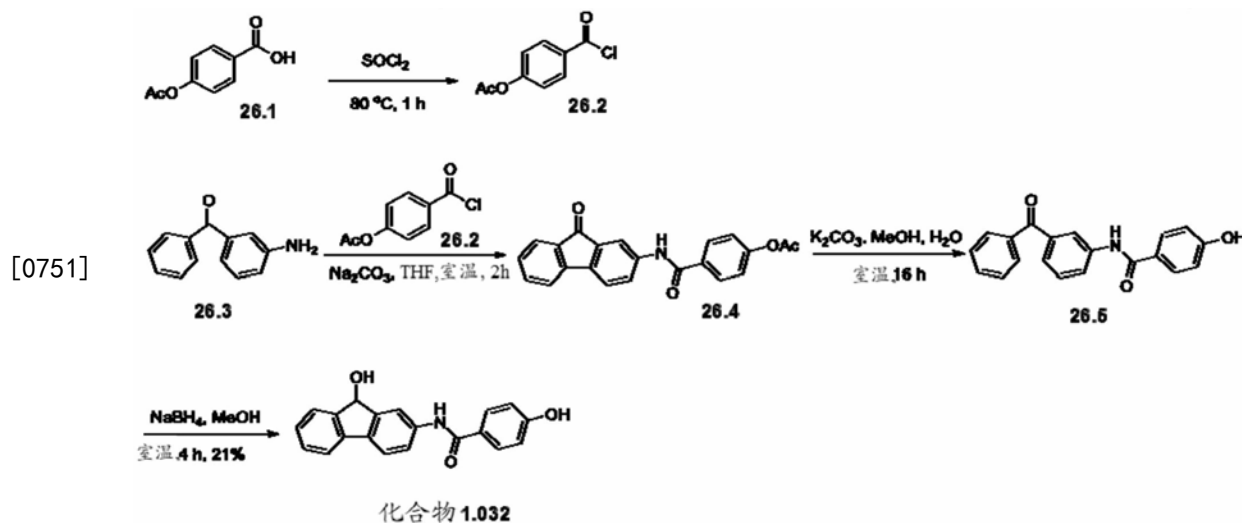


[0747] 在氮气气氛下将化合物25.1 (160mg, 1.23mmol, 1.0当量) 在亚硫酸氯 (5mL) 中的混合物在85℃下回流2h。通过TLC监测反应。然后将混合物用水稀释, 过滤, 用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得化合物25.2 (160mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

[0748] 在0℃下向化合物25.3 (190mg, 1.03mmol, 1.0当量) 和碳酸钠 (436.72mg, 4.12mmol, 4.0当量) 在干四氢呋喃 (10mL) 中的混合物中添加化合物25.2 (160mg, 1.23mmol, 1.2当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌过夜。通过LCMS监测反应。然后将混合物用水稀释, 过滤, 用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得呈黄色固体的化合物25.4 (260mg, 粗品)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 5:1, UV 254nm。R_f: (化合物25.3) = 0.5, R_f: (化合物25.4) = 0.45。

[0749] 在0℃下向化合物25.4 (150mg, 0.488mmol, 1.0当量) 在甲醇 (5mL) 中的混合物中添加硼氢化钠 (92.32mg, 2.44mmol, 4.5当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌5min。通过TLC监测反应。向混合物中添加水, 然后将其过滤并且用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化以获得呈白色固体的化合物1.031 (73mg, 48%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 5:1, UV 254nm。R_f: (化合物25.4) = 0.6; R_f: (化合物1.031) = 0.2。LCMS: [M+1]: 310。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ9.57 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.57 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.33-7.29 (m, 1H), 7.24-7.20 (m, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.02-3.99 (m, 2H), 3.52-3.46 (m, 1H), 1.91-1.81 (m, 2H) 和1.56-1.43 (m, 4H)。

[0750] 实施例30: 4-羟基-N-(9-羟基-9H-芴-2-基) 苯甲酰胺 (化合物1.032) 的合成



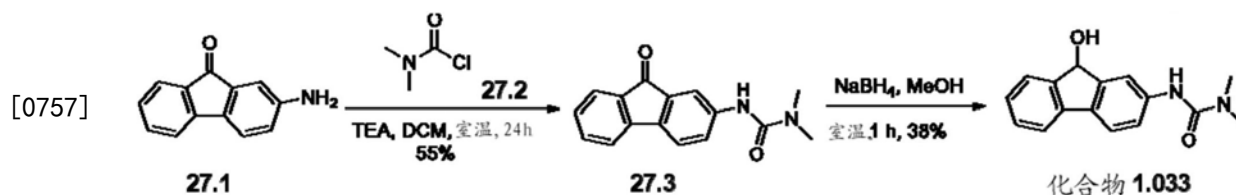
[0752] 在氮气气氛下将化合物26.1 (216mg, 1.2mmol, 1.0当量) 在亚硫酸氯 (2mL) 中的混合物在80℃下搅拌1h。通过TLC监测反应。然后将混合物用甲醇淬灭。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得呈浅黄色油状物的化合物26.2 (245mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

[0753] 在0℃下向化合物26.3 (195mg, 1.0mmol, 1.0当量) 和碳酸钠 (530mg, 5.0mmol, 5.0当量) 在干四氢呋喃 (5mL) 中的混合物中添加化合物26.2 (238.2mg, 1.2mmol, 1.2当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌2h。通过LCMS监测反应。然后将混合物过滤并且将滤液在减压下浓缩以获得呈淡黄色固体的化合物26.4 (530mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

[0754] 向化合物26.4 (530mg, 1.0mmol, 1.0当量) 在四氢呋喃 (5mL) 中的溶液中添加碳酸钾 (276mg, 2.0mmol, 2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌过夜。通过LCMS监测反应。然后将悬浮液过滤并且将滤液在减压下浓缩以获得呈红色固体的化合物26.5 (400mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

[0755] 在0℃下向化合物26.5 (400mg, 1.27mmol, 1.0当量) 在甲醇 (5mL) 中的混合物中添加硼氢化钠 (129mg, 3.81mmol, 3.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌4h。通过TLC监测反应。将溶液通过酸制备型HPLC纯化以获得呈白色固体的化合物1.032 (86.7mg, 21%)。LCMS: [M+1]: 318。¹H NMR (DMSO, 400MHz): δ10.07-10.05 (d, J=9.2Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.84 (m, 2H), 7.60 (m, 3H), 7.52 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 6.85-6.83 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.82-5.80 (d, J=7.6Hz, 1H) 和5.44-5.42 (d, J=7.6Hz, 1H)。

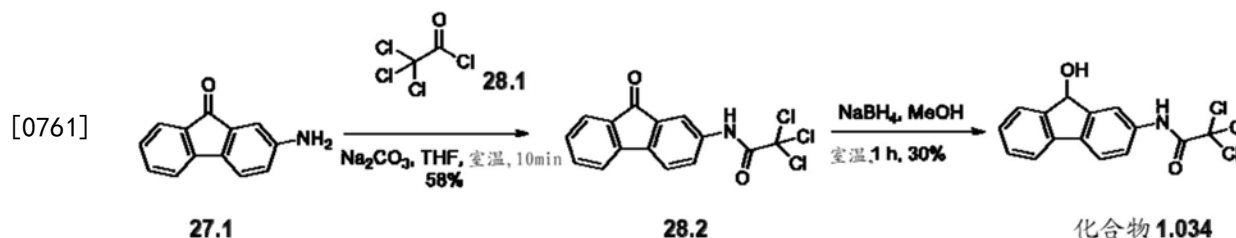
[0756] 实施例31: 3-(9-羟基-9H-芴-2-基)-1,1-二甲基脲 (化合物1.033) 的合成



[0758] 将化合物27.1 (200mg, 1.026mmol, 1.0当量)、化合物27.2 (220mg, 2.05mmol, 2.0当量)、4-二甲基氨基吡啶 (125mg, 1.02mmol, 1.0当量) 和吡啶 (324mg, 4.1mmol, 4.0当量) 在空气下顺序地添加到配备有搅拌棒和隔膜的反应管中。通过注射器添加二氯甲烷 (10mL), 将所得混合物在环境温度下剧烈搅拌24h。此时间之后, 将烧瓶的内容物用乙酸乙酯萃取。将获得的溶液通过硅胶和无水硫酸镁的塞过滤, 并且然后通过旋转蒸发浓缩。将残余物通过快速色谱法纯化, 用己烷/乙酸乙酯洗脱, 以得到化合物27.3 (150mg, 55%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 2:1, UV 254nm R_f: (化合物27.1) = 0.5; R_f: (化合物27.3) = 0.2。

[0759] 在0℃下向化合物27.3 (120mg, 0.45mmol, 1.0当量) 在甲醇 (5mL) 中的混合物中添加硼氢化钠 (68.6mg, 1.8mmol, 4.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌1h。通过TLC监测反应。然后向混合物中添加水, 过滤并且用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩。将残余物用甲醇洗涤以获得呈白色固体的化合物1.033 (46mg, 81%)。TLC: 石油醚: 乙酸乙酯, 3:1, UV 254nm。R_f: (化合物27.3) = 0.5; R_f: (化合物1.033) = 0.3。LCMS: [M+1]: 269。¹H NMR (d₆-DMSO, 400MHz): δ8.33 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.50-7.48 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.44-7.43 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.42-7.41 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.29-7.27 (m, 1H), 7.21-7.19 (m, 1H), 5.74-5.72 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.38-5.36 (d, J=7.6Hz, 1H) 和2.91 (s, 6H)。

[0760] 实施例32: 2,2,2-三氯-N-(9-羟基-9H-芴-2-基)乙酰胺 (化合物1.034) 的合成



[0762] 在0℃下向化合物27.1 (150mg, 0.77mmol, 1.0当量) 和碳酸钠 (326mg, 3.08mmol,

4.0当量)在干四氢呋喃(6mL)中的混合物中添加化合物28.1(277mg,1.54mmol,2.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌10min。通过TLC监测反应。然后将混合物用水稀释,过滤,用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得呈白色固体的化合物28.2(150mg,58%)。TLC:石油醚:乙酸乙酯,2:1,UV 254nm, R_f :(化合物27.1)=0.4; R_f :(化合物28.2)=0.6。

[0763] 向化合物28.2(150mg,0.44mmol,1.0当量)在甲醇(5mL)中的混合物中添加硼氢化钠(68mg,1.76mmol,4.0当量)。在氮气气氛下将混合物在室温下搅拌1h。通过TLC监测反应。然后将混合物用饱和氯化铵淬灭,用水稀释,过滤并且用水洗涤。将残余物经硫酸钠干燥并且在减压下浓缩以获得呈白色固体的化合物1.034(45mg,30%)。LCMS:[M+1]:343。¹H NMR(CDC1₃,400MHz): δ 10.86(s,1H),7.91(s,1H),7.77-7.71(dd,J=16.0Hz 8.0Hz,2H),7.62-7.60(d,J=8.0Hz,1H),7.55-7.54(d,J=7.6Hz,1H),7.35-7.33(m,1H),7.29-7.27(m,1H),5.88-5.86(d,J=7.6Hz,1H)和5.47-5.45(d,J=7.6Hz,1H)。

[0764] 实施例33:使用式I的化合物分离和增强源自非动员外周血的造血干细胞

[0765] 本实施例证明了用式I的化合物对在培养物中的HSC的增强。

[0766] 材料和方法

[0767] 从供体外周血中分离出CD34+细胞。使用ficoll paque进行标准的血沉棕黄层分离。将细胞沉淀并且与未标记的CD64抗体一起孵育。然后使用生物素化的CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD20、CD45RA、CD56、CD235(在一些实施例中,也可以使用CD15、CD25和其他谱系特异性抗体)使细胞经受负耗尽。用抗生蛋白链菌素珠粒耗尽结合这些抗体的细胞。然后,使富集的祖细胞合并物经受针对CD34+的细胞分选。

[0768] 将分离的CD34+细胞在含10%(v/v)热灭活的胎牛血清(FBS)的不含酚红的 α MEM体外培养基中孵育。当测试式I的化合物时,使用两个内部对照:阳性对照(+SF条件物)和基线对照(即,基础条件物(“仅细胞因子”)。用于测试的化合物的培养基组分和浓度描述在表2中。培养物还包含抗生素溶液,其包含青霉素、链霉素和两性霉素B,以避免污染。包括对照,因为所获得的样品中的扩增量因个体而变化。

[0769] 表2:基础条件物(仅细胞因子)培养基中包含的另外组分;阳性对照(+SF条件物);和+式I条件物(其中添加式I的化合物的条件物)。

	- 因子 -	- 浓度 -
基础条件物 (仅细胞因子)	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
+SF条件物 (阳性对照)	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
	小分子	
	SF1670	500 nM
+式I条件物	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
	小分子	
	式I的化合物	63 nM、125 nM、250 nM、 500 nM、1 μM、2 μM、4 μM、8 μM、16 μM 或如图1-23中所指示的。

[0771] 将培养物在3%氧气(由氮气控制)和5%CO₂下孵育。

[0772] 每次需要使培养基恢复新鲜时,单独地添加小分子组分并且保持新鲜。可以将细胞因子一起储存。应至少每几天进行培养基更新。

[0773] 在所指示的天数中,将一半体积的细胞培养物移出用于数据分析(使用BD FACS ARIA II的流式细胞术)。根据测试条件,用新鲜培养基补充培养物体积。报告的数据说明了此程序中引入的稀释因子。

[0774] 对每种测试的化合物(化合物1.001-1.023)进行单独的实验。

[0775] 结果

[0776] 化合物1.001至1.023的扩增作用显示在图1-图23中。每个图中的曲线图报告了在第2天与第7天之间的细胞倍数变化。图中的每个柱报告了在所指出的浓度的测试的式I的化合物下的细胞倍数变化。细虚线报告了基础条件物(即,仅细胞因子)的扩增作用,并且粗虚线报告了+SF条件物(500nM SF1670)的扩增作用。总体而言,这些数据证明,式I的化合物提供了在培养物中的HSC的阳性扩增作用。

[0777] 下表3总结了化合物1.001至1.023(样品化合物)在所指示的浓度下的相对扩增作用。表3中的数据报告为相对扩增作用。相对扩增作用是图1-图23中的每一个中所示的倍数变化的归一化值。其计算如下所示:

[0778] $\frac{\text{样品化合物倍数变化} - \text{基础条件物倍数变化}}{\text{+SF条件物倍数变化} - \text{基础条件物倍数变化}} - \text{相对倍数变化}$

[0779] 表3:用式I的化合物对在含有所指示浓度的化合物1.001-1.023(样品化合物)的培养物中的CD34+/CD133+细胞(“CD133作用”)和CD34+/CD133+/CD90+细胞(“CD90作用”)的处理的相对扩增作用。

化合物	样品化合物的浓度 (μM)	CD133作用	CD90作用
1.001	0.5	+	++
1.002	16	+	++
1.003	0.5	++	++
1.004	8	++	+++
1.005	0.125	++	+++
[0780] 1.006	1	+++	++++
1.007	4	+++	++++
1.008	4	+++	+++++
1.009	2	+++++	+++++
1.010	16	+++++	+++++
1.011	0.125	+	++
1.012	0.25	++	++
1.013	4	+++	+++
1.014	8	++	+++
1.015	2	+++	++++
1.016	16	++	++++
1.017	4	+	++
[0781] 1.018	4	+	++
1.019	8	++	++
1.020	16	++	++
1.021	8	++	++
1.022	32	+++	+++++
1.023	32	+	++

[0782] 下面示出了在表3中呈现的式I的化合物对CD34+/CD133+和CD34+/CD133+/CD90+细胞的相对扩增作用的报告值(例如,+、++、和+++),其中“x”是计算的相对倍数变化。

相对倍数变化	值
$x < 0.2$	+
$0.2 \leq x < 0.55$	++
$0.55 \leq x < 0.9$	+++
$0.9 \leq x < 1.25$	++++
$1.25 \leq x$	+++++

[0784] 实施例34:使用式I的化合物增强在培养物中的源自脐带血的造血干细胞

[0785] 本实施例描述了在化合物1.008的存在下培养时源自脐带血的造血干细胞的培养。通过19天的体外孵育,在培养物中的HSC的数目继续增加。

[0786] 材料和方法

[0787] 将冷冻的脐带血样品解冻并且逐渐达到室温。将解冻的脐带血在不含酚红的 α MEM体外培养基(10% (v/v) 热灭活的胎牛血清(FBS))中孵育。测试四个样品:基础条件物、+SF条件物、+1.008条件物和+1.008/+ER条件物。每种条件物中包含的组分描述在表4中。所测试的每种条件物还包含抗生素溶液,其包含青霉素、链霉素和两性霉素B,以避免污染。

[0788] 表4:基础条件物、+SF条件物、+1.008条件物(不含化合物1.008)、+1.008/+ER条件物的培养基中包含的另外组分。

	- 因子 -	- 浓度 -
[0789] 基础条件物	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
[0790] +SF条件物	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
	小分子	
	SF1670	500 nM
[0790] +1.008/+ER条件物	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
	小分子	
	化合物1.008	250 nM
[0791] +1.008/+ER条件物	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/mL
	SCF	100 ng/mL
	FLT3L	100 ng/mL
	小分子	
	ER50891(RAR受体拮抗剂)	100 nM
	化合物1.008	250 nM

[0791] 将培养物在3%氧气(由氮气控制)和5%CO₂下孵育。

[0792] 每次需要使培养基恢复新鲜时,单独地添加小分子组分并且保持新鲜。可以将细胞因子一起储存。应至少每几天进行培养基更新。

[0793] 在所指示的天数中,将变化量的细胞培养物移出用于数据分析(使用BD FACS ARIA II的流式细胞术)并且以避免细胞过度拥挤。根据测试条件,用新鲜培养基补充培养物体积。报告的数据说明了此程序中引入的稀释因子。

[0794] 结果

[0795] +1.008条件物的流式细胞术分析证明,在培养物中维持造血干细胞并且甚至在19后继续扩增(图24A-E)。实际上,图25A-4E显示,在培养物中19天后,在+1.008的存在下培养的脐带血样品中,存在从第2天起大于50倍的CD34+细胞(图25B)和CD34+/CD133+细胞(图25C)增加、从第2天起约20倍的CD34+/CD133+/CD90+细胞(图25D)增加、以及从第2天起超过12倍的CD34+/CD133+/CD90+/CD38^{低/-}细胞(图25E)增加。添加ER50891甚至进一步提高这些水平。

[0796] 实施例35:使用式I的化合物增强源自脐带血的造血干细胞

[0797] 材料和方法

[0798] 从STEMCELL Technologies购买来自脐带血的CD34+细胞。使用阳性免疫磁分离技术从脐带血样品中分离出原代人类CD34+细胞。将细胞解冻并且逐渐达到室温。将样品洗涤,然后放置在含100ng/ml的FLT3L、TPO、SCF和IL-6中的每种的StemSpan中过夜培养。18至24小时后(第1天),将细胞计数并且进行免疫表型分析(在Invitrogen Attune NxT细胞仪上进行的流式细胞术)。

[0799] 将大约1000个活细胞接种到96孔板的每个孔中;用流式细胞术定量每孔分配的确切细胞数目,用于后续计算。

[0800] 使用不含酚红的 α MEM(10% (v/v) 热灭活的胎牛血清)制备用于测试式I的化合物的培养基。培养条件物还包含抗生素溶液,其包含青霉素、链霉素和两性霉素B,以避免污染。用于测试的化合物的另外的培养基组分和浓度描述在表5中。

[0801] 表5:基础条件物(仅细胞因子)、+式I条件物的培养基中包含的另外组分。

	- 因子 -	- 浓度 -
	细胞因子/生长因子	
基础条件物 (仅细胞因子)	TPO	100 ng/ml
	SCF	100 ng/ml
	FLT3L	100 ng/ml
	IL-6	100 ng/ml
[0802]	细胞因子/生长因子	
+式I条件物	TPO	100 ng/ml
	SCF	100 ng/ml
	FLT3L	100 ng/ml
	IL-6	100 ng/ml
	小分子	
	式I的化合物	所测试的浓度指示在图

[0803]

		26-51和以下段落中。
--	--	--------------

[0804] 在重复孔中以0.5、2、和8 μ M测试化合物1.005、1.006、1.007、1.008、1.009、1.010、1.013、1.014、1.015、1.021、1.022、1.023、1.024、1.025、1.026、1.027、1.028、和1.029。在重复孔中以0.1、0.316、1.0、3.16、和10 μ M测试化合物1.030-1.035。在重复孔中以0.149、0.310、0.647、1.351、2.819、和10 μ M测试化合物1.036。在重复孔中以0.253、0.527、1.100、2.296、4.792、进和10 μ M测试化合物1.037。

[0805] 此实验的所有孵育均在3%氧气(通过氮气控制)和5%CO₂下进行。在培养7天后,收集来自孔的细胞并且分析表型(在Invitrogen Attune NxT细胞仪上进行的流式细胞术)。

[0806] 结果

[0807] 化合物1.005、1.006、1.007、1.008、1.009、1.010、1.013、1.014、1.015、1.021、1.022、1.023、1.024、1.025、1.026、1.027、1.028、1.029、1.030、1.031、1.032、1.033、1.034、1.035、1.036、和1.037的扩增作用显示在图26-图51中。

[0808] 每个图中的曲线图报告了在第1天与第7天之间的细胞倍数变化。图中的每个点报告了在指出的浓度的测试的式I的化合物下所指示数目的重复的平均倍数变化。误差条显示了在所述浓度下测量的最大和最小倍数变化。虚线报告了基础条件物(即仅细胞因子)的扩增作用。总体而言,这些数据证明,用式I的化合物的处理提供了对在培养物中的源自脐带血的HSC的阳性扩增作用。

[0809] 下表6总结了所筛选的化合物在所指示的浓度下的相对扩增作用。表6中的数据报告为相对扩增作用。相对扩增作用是每个图中所示的倍数变化的归一化值。其计算如下所示:

[0810]
$$\frac{\text{样品化合物倍数变化}}{\text{基础条件物倍数变化}} - \text{相对倍数变化}$$

[0811] 表6:用式I的化合物对在含有所指示浓度的所指示化合物的培养物中的CD34+/CD133+细胞(“CD133作用”)和CD34+/CD133+/CD90+细胞(“CD90作用”)的处理的相对扩增作用。

化合物	样品化合物的浓度 (μ M)	CD133作用	CD90作用
1.005	0.5	++	++
1.006	2	++	++

[0812]

	1.007	2	++++	++++
	1.008	8	++++	++++
	1.009	0.5	+++	+++
	1.010	8	+++++	+++++
	1.013	2	++++	+++++
	1.014	8	++	++
	1.015	0.5	++	++
	1.021	8	+	+
	1.022	8	+++	++
	1.023	8	++	++
	1.024	8	+++	++++
[0813]	1.025	8	+++	++++
	1.026	2	++	++
	1.027	2	++	++
	1.028	2	+++	+++
	1.029	8	++++	++++
	1.030	10	+++	+++
	1.031	10	+++	++
	1.032	10	++	++
	1.033	10	+++	++
	1.034	10	+++++	+++++
	1.035	10	+++	+++
	1.036	10	++	+++
	1.037	10	+	++

[0814] 下面示出了在表6中呈现的式I的化合物对CD34+/CD133+和CD34+/CD133+/CD90+细胞的相对扩增作用的报告值(例如,+、++、和+++),其中“x”是计算的相对倍数变化。

[0815] 相对倍数变化	值
$x < 1.44$	+
$1.44 \leq x < 1.8$	++
$1.8 \leq x < 2.16$	+++
$2.16 \leq x < 2.52$	++++
$2.52 \leq x$	+++++

[0816] 实施例36:使用式I的化合物长期增强源自动员外周血、非动员外周血和脐带血的造血干细胞。

[0817] 此实施例证明了使用源自各种源的HSC在培养物中进行21天的增强和扩增。

[0818] 材料和方法

[0819] 从STEMCELL Technologies购买来自动员外周血的CD34+细胞。使用G-CSF动员来自志愿供体的血。在收集前3-5天中,给予志愿者最大10 μ g/kg/天的粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。使用阳性免疫磁分离技术从动员外周血白细胞去除术样品中分离出原代人类CD34+细胞。

[0820] 从STEMCELL Technologies购买来自脐带血的CD34+细胞。使用阳性免疫磁分离技术从脐带血样品中分离出原代人类CD34+细胞。

[0821] 从STEMCELL Technologies购买来自非动员外周血的CD34+细胞。使用阳性免疫磁分离技术从血样品中分离出原代人类CD34+细胞。

[0822] 将冷冻保存的来自每种源的CD34+细胞样品解冻,并且逐渐达到室温。将样品洗涤,然后放置在含100ng/ml的FLT3L、TPO、SCF和IL-6中的每种的StemSpan中过夜培养。

[0823] 将培养物在3%氧气(由氮气控制)和5%CO₂下孵育。

[0824] 24小时后(第1天),将细胞计数并且进行免疫表型分析(在Invitrogen Attune NxT细胞仪上进行的流式细胞术)。用于测试的化合物的培养基组分和浓度描述在表7中。培养条件物还包含抗生素溶液,其包含青霉素、链霉素和两性霉素B,以避免污染。将大约1000个细胞添加到每个脐带血和动员外周血烧瓶(总体积5ml)或96孔板的孔(总体积200μl)中。将大约2000个细胞添加到每个非动员外周血烧瓶(总体积5ml)或96孔板的孔(总体积200μl)中。定量每种条件物分配的确切细胞数目,用于从第1天起后续的倍数变化计算。

[0825] 在第7天和第10天分析孔,在孵育的第14天和第21天分析烧瓶。用流式细胞术定量细胞数目和表型。在第14天,如在第1天那样制备烧瓶的新鲜条件物,并且将细胞按1:20分到新烧瓶中。另外7天后(培养的第21天),再次用流式细胞术定量细胞数目和表型。在第21天计算的细胞数目说明了细胞的传代。

[0826] 表7:基础条件物(仅细胞因子)、+1.010条件物中包含的培养基组分

	- 因子 -	- 浓度 -
	细胞因子/生长因子	
[0827]	基础条件物 (仅细胞因子)	TPO 100 ng/ml
		SCF 100 ng/ml
		FLT3L 100 ng/ml
		IL-6 100 ng/ml
	小分子	
	媒介物对照 (DMSO)	0.05% v/v
	细胞因子/生长因子	
[0828]	+1.010条件物	TPO 100 ng/ml
		SCF 100 ng/ml
		FLT3L 100 ng/ml
		IL-6 100 ng/ml
	小分子	
	化合物1.010	8 μM

[0829] 一式四份地制备96孔板中的条件物;一式两份地制备烧瓶中的条件物。在上面指示的培养天数中,从孔或烧瓶中收集细胞并且分析表型(在Invitrogen Attune NxT细胞仪

上进行的流式细胞术)。

[0830] 结果

[0831] +1.010条件物的流式细胞术分析证明,在培养物中维持来自多种多样的源的造血干细胞并且持续扩增至最多21天(参见图52-图54)。实际上,图52显示,在脐带血中,存在大于300倍的CD34+细胞扩增(图52B)、大于600倍的CD34+/CD133+细胞扩增(图52C)、大于1000倍CD34+/CD133+/CD90+细胞扩增(图52D)、大于1500倍CD34+/CD133+/CD90+/CD38^低-细胞扩增(图52E)和大于200倍CD34+/CD133+/CD90+/CD45RA-细胞扩增(图52F)。在动员外周血中(图53),存在大于20倍的CD34+细胞扩增(图53B)、大于40倍的CD34+/CD133+细胞扩增(图53C)、大于60倍的CD34+/CD133+/CD90+细胞扩增(图53D)、大于60倍的CD34+/CD133+/CD90+/CD38^低-细胞扩增(图53E)和大于30倍的CD34+/CD133+/CD90+/CD45RA-细胞扩增(图53F)。在非动员外周血中(图54),存在大于9倍的CD34+细胞扩增(图54B)、大于40倍的CD133+细胞扩增(图54C)、和大于60倍的CD90+细胞扩增(图54D)、大于200倍的CD34+/CD133+/CD90+/CD38^低-细胞扩增(图54E)和大于30倍的CD34+/CD133+/CD90+/CD45RA-细胞扩增(图54F)。在所有情况下,用化合物1.010进行的扩增远远超过仅用细胞因子进行的扩增。

[0832] 实施例37:使用式I的化合物在大气O₂下增强造血干细胞

[0833] 本实施例证明了使用式I的化合物在大气氧下增强和扩增造血干细胞。

[0834] 材料和方法

[0835] 从STEMCELL Technologies购买来自脐带血的CD34+细胞。使用阳性免疫磁分离技术从脐带血样品中分离出原代人类CD34+细胞。将细胞解冻并且逐渐达到室温。将样品洗涤,然后放置到含100ng/ml的FLT3L、TPO、SCF和IL-6中的每种的StemSpan SFEM中过夜培养。

[0836] 在大气氧(大约20%)和5%CO₂下孵育培养物。

[0837] 18小时后(第1天),将细胞计数并且进行免疫表型分析(在Invitrogen Attune NxT细胞仪上进行的流式细胞术)。使用StemSpan SFEM制备培养基,其中用于测试的化合物的另外组分和浓度描述在表8中。培养条件物还包含抗生素溶液,其包含青霉素、链霉素和两性霉素B,以避免污染。将5mL的相应条件物添加到25cm²烧瓶中。将大约1000个细胞添加到每个烧瓶中;定量每个烧瓶的确切细胞数目,以用于从第1天起后续的倍数变化计算。

[0838] 在孵育的第9天,用流式细胞术定量细胞数目和表型。

[0839] 表8:基础条件物(仅细胞因子)、+化合物1.010条件物的培养基中包含的另外的组分。

	- 因子 -	- 浓度 -
[0840]	基础条件物 (仅细胞因子)	
	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/ml
	SCF	100 ng/ml
	FLT3L	100 ng/ml
	IL-6	100 ng/ml
	小分子	
媒介物对照 (DMSO)	0.01% v/v	
	+1.010条件物	
	细胞因子/生长因子	
	TPO	100 ng/ml
	SCF	100 ng/ml
	FLT3L	100 ng/ml
	IL-6	100 ng/ml
	小分子	
化合物1.010	8 μ M	

[0841] 一式两份地制备条件物。

[0842] 结果

[0843] +1.010条件物的流式细胞术分析证明,当在大气氧下培养9天时,化合物1.010对造血干细胞具有阳性扩增作用。实际上,图55示出了大于150倍的CD34+细胞扩增(图55B)以及大于200倍的CD34+/CD133+细胞扩增(图55C)和CD34+/CD133+/CD90+细胞扩增(图55D)两者。

[0844] 尽管出于清楚理解的目的已经通过说明和举例的方式较为详细地描述了前述发明,但是本领域的技术人员将理解,可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。另外,将本文提供的每个参考文献通过引用以其整体并入,其程度与将每个参考文献通过引用单独并入的程度相同。在本申请与本文中提供的参考文献之间存在冲突的情况下,以本申请为准。

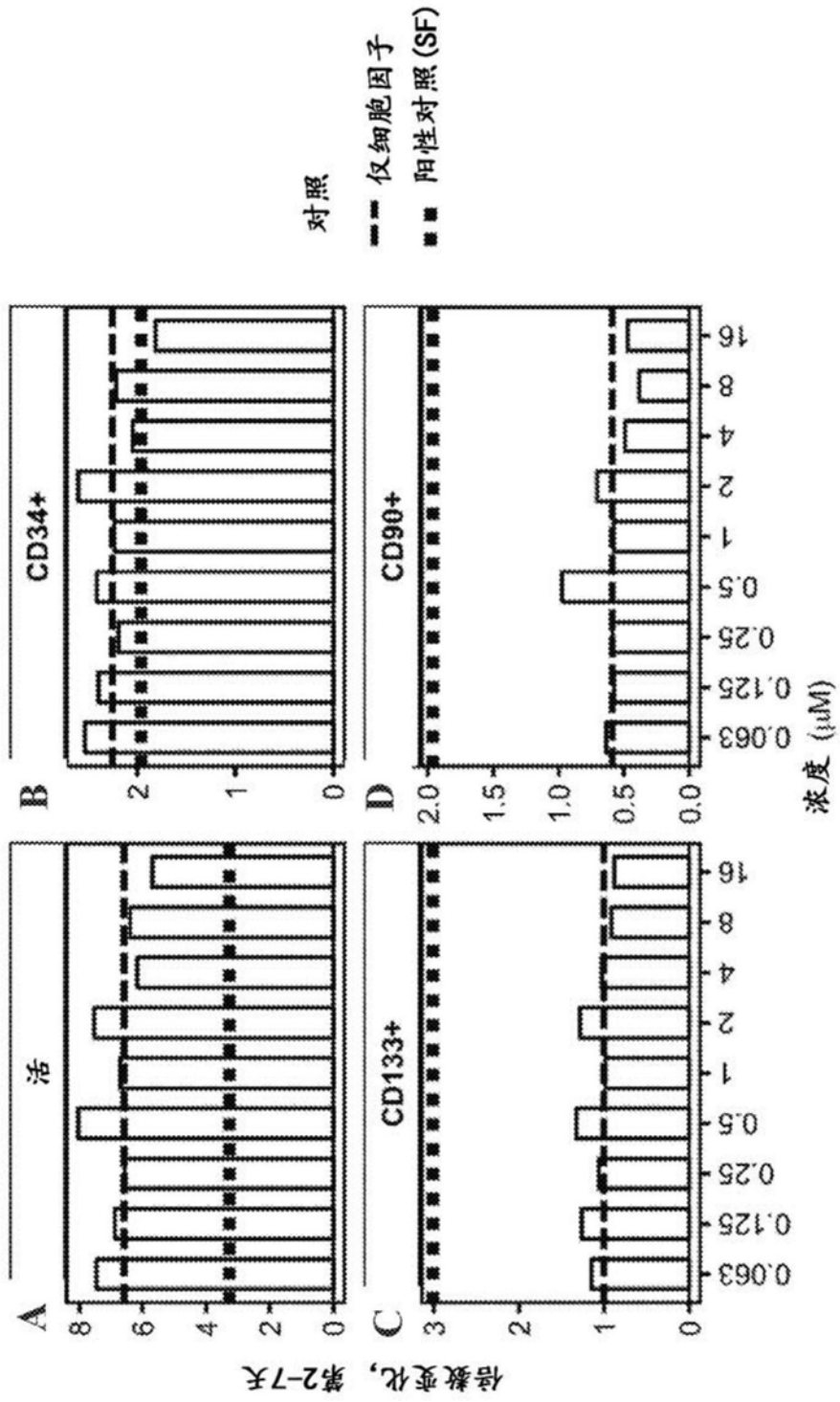


图1A-D

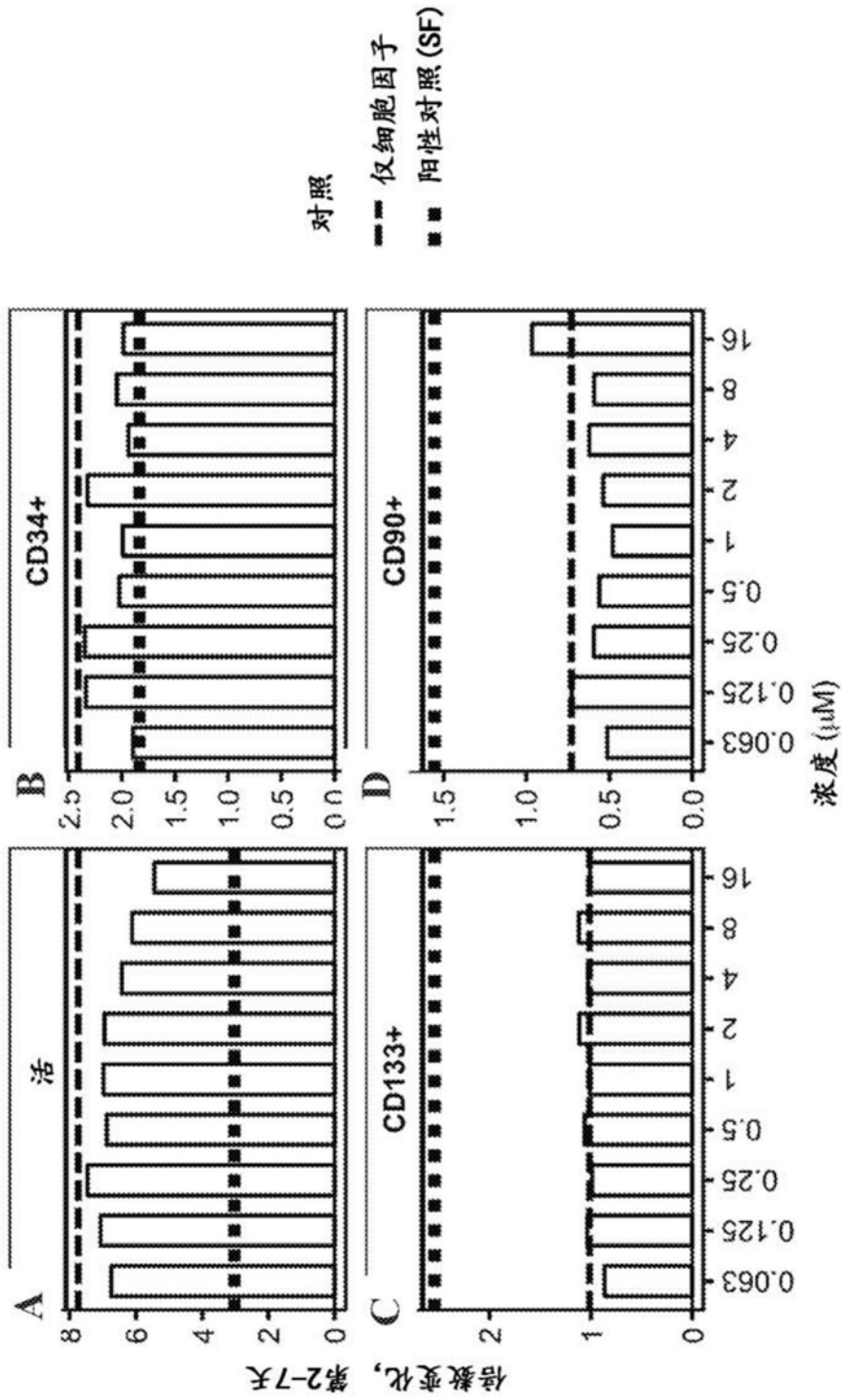


图2A-D

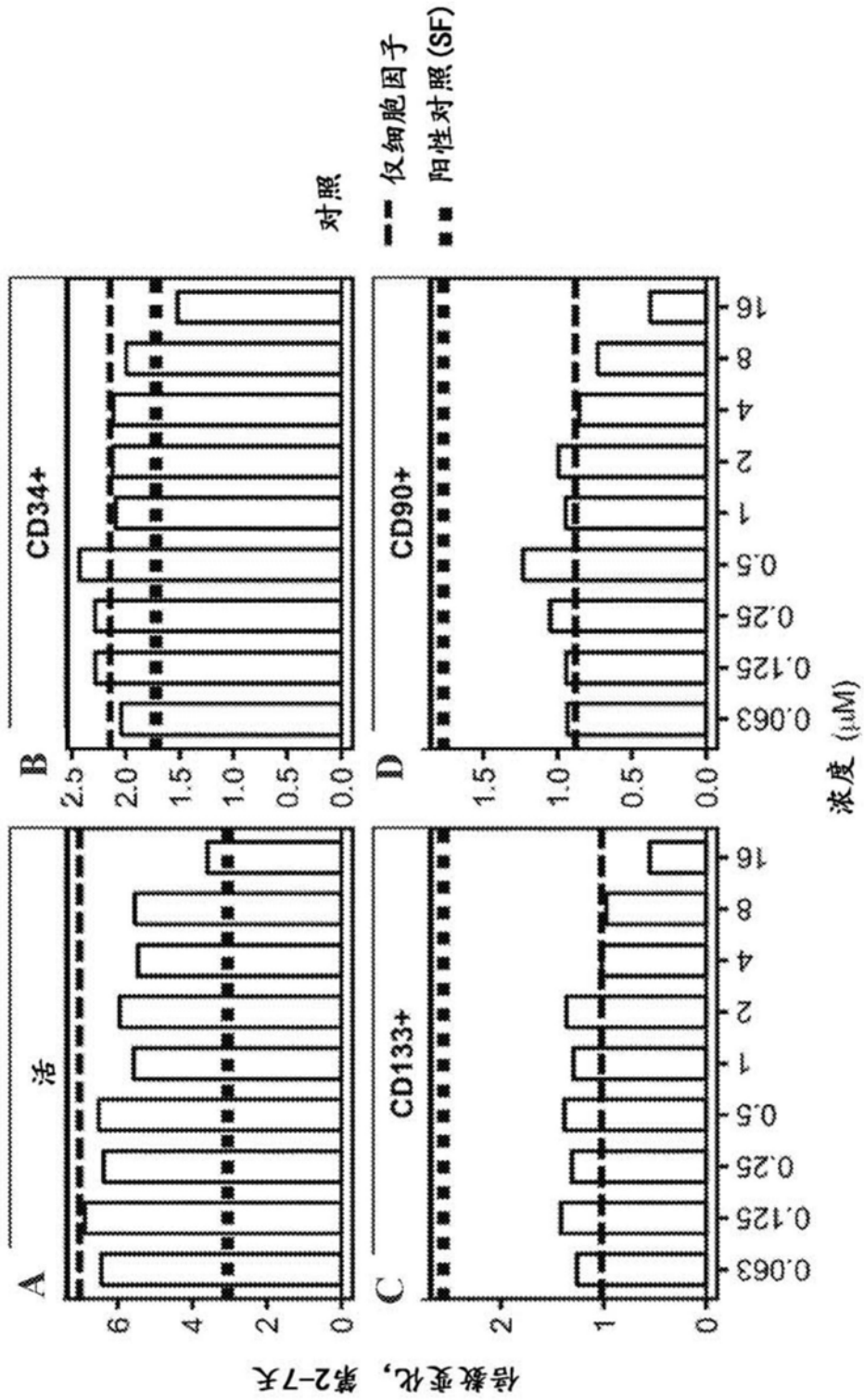


图3A-D

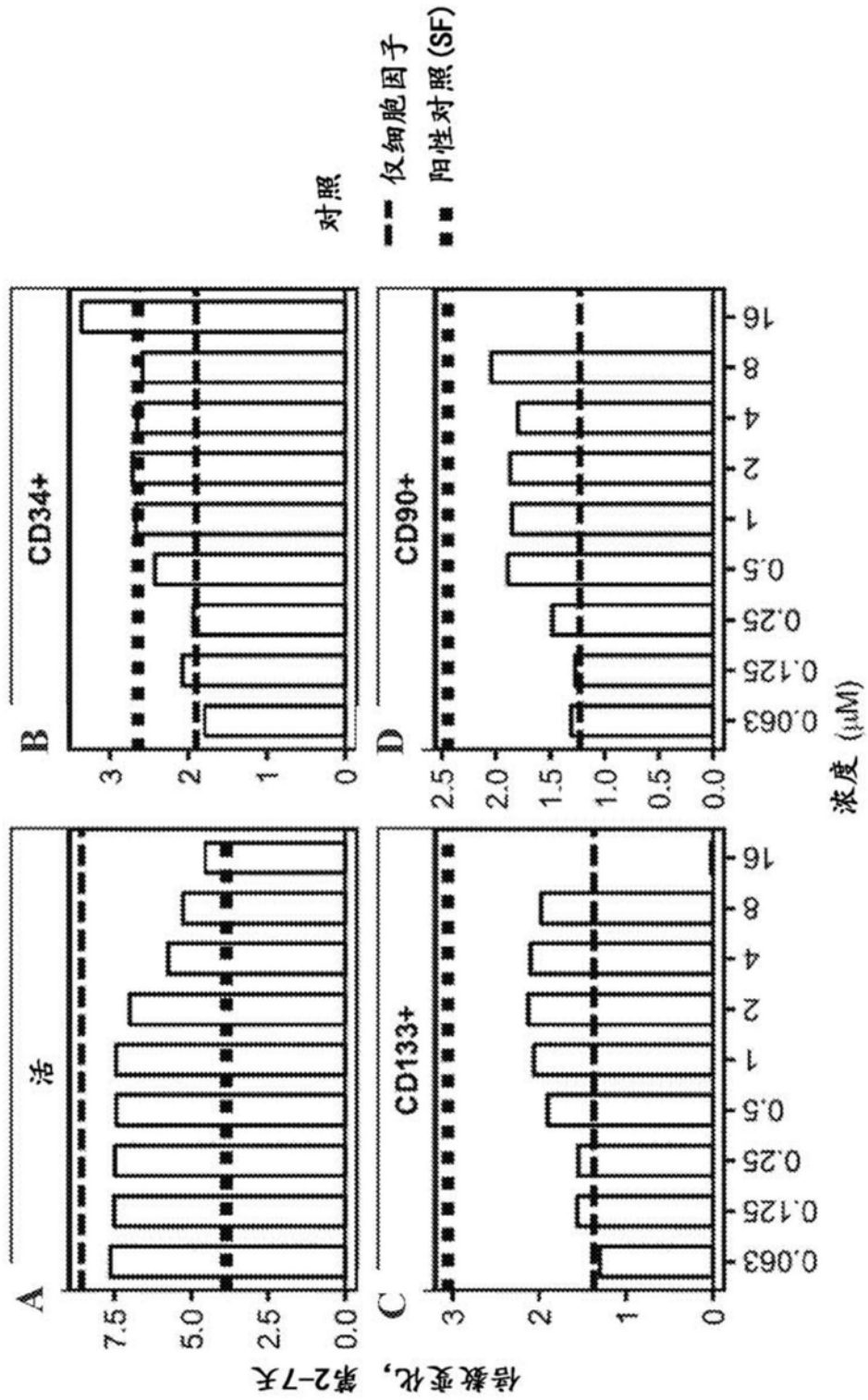


图4A-D

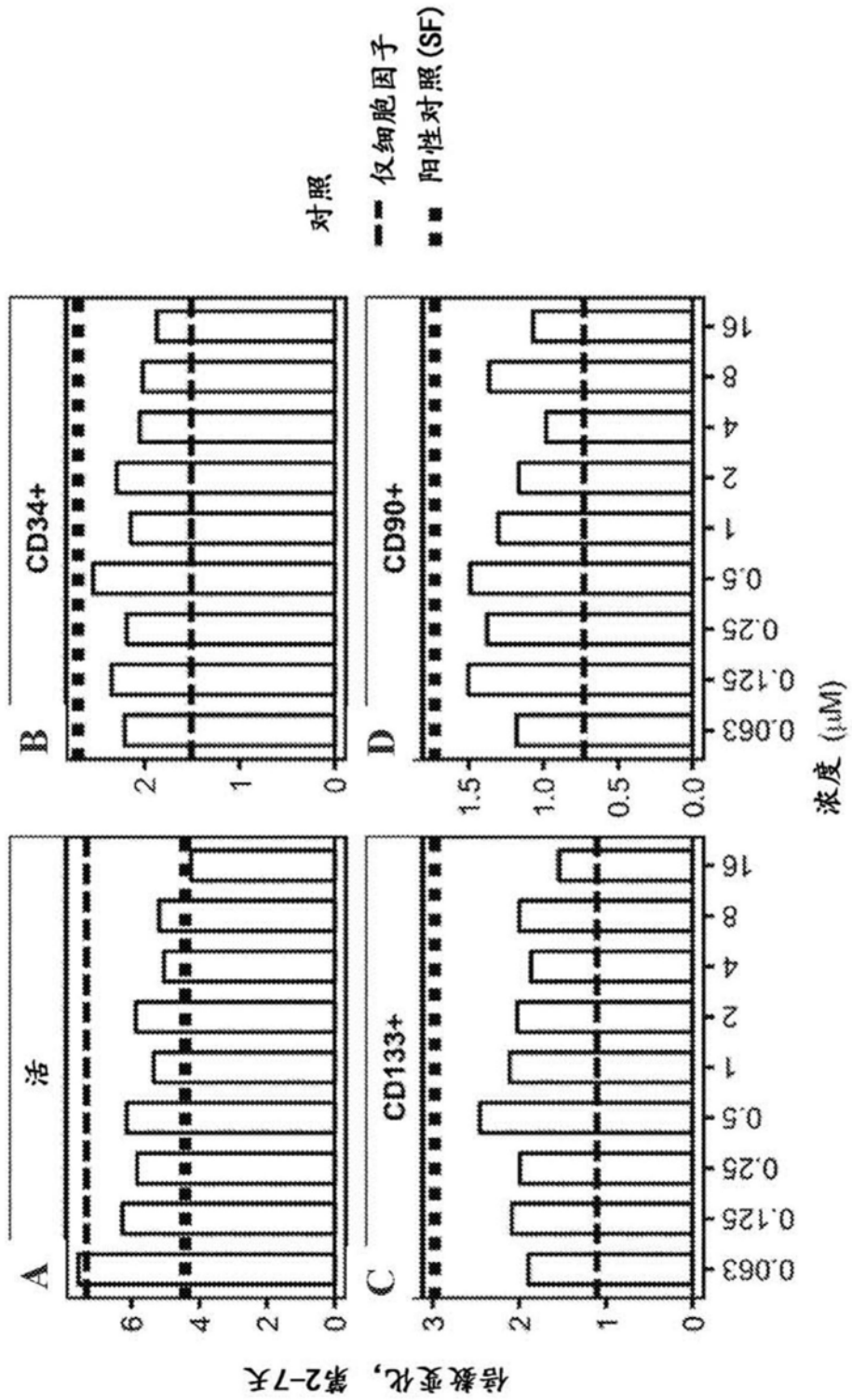


图5A-D

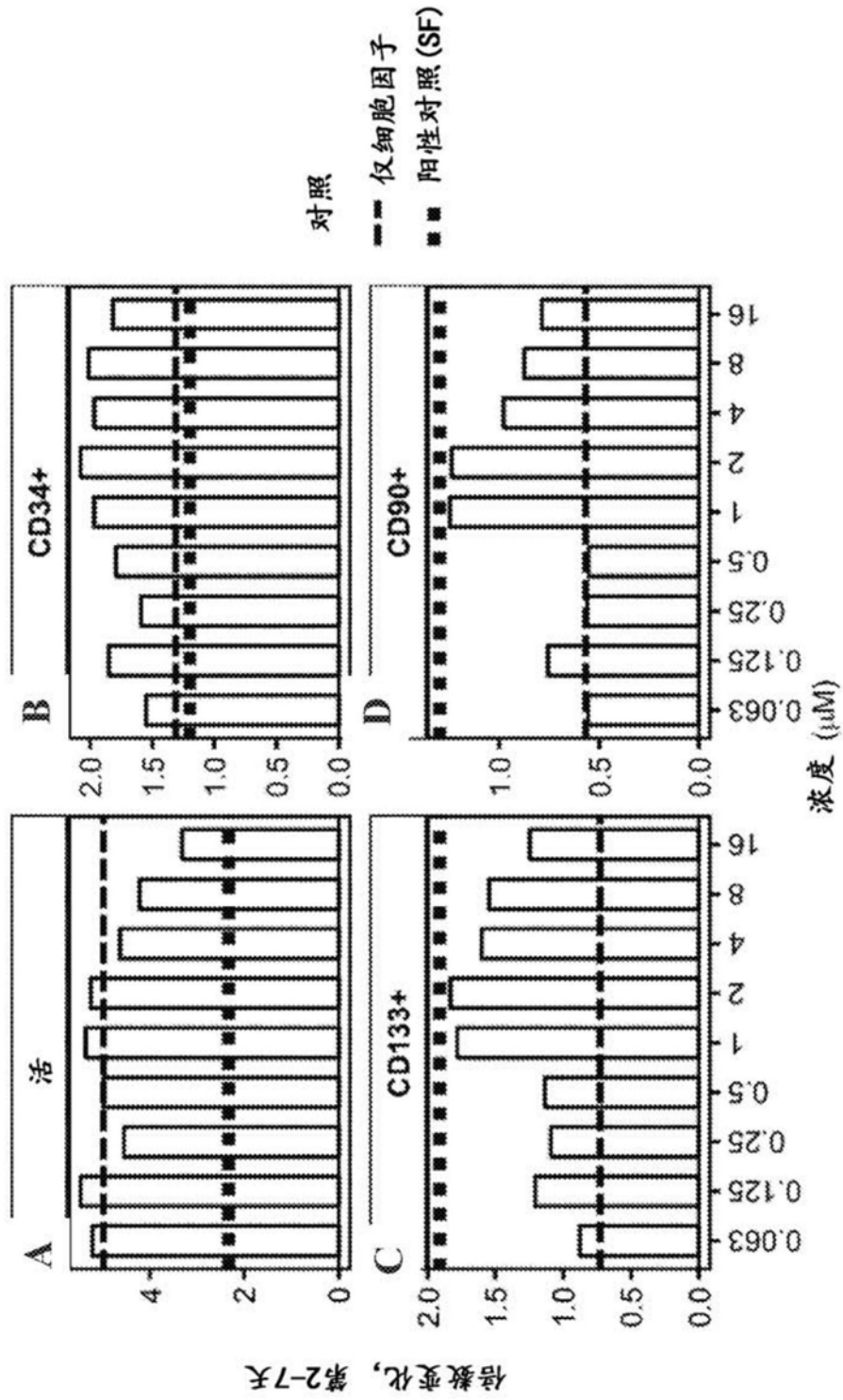


图6A-D

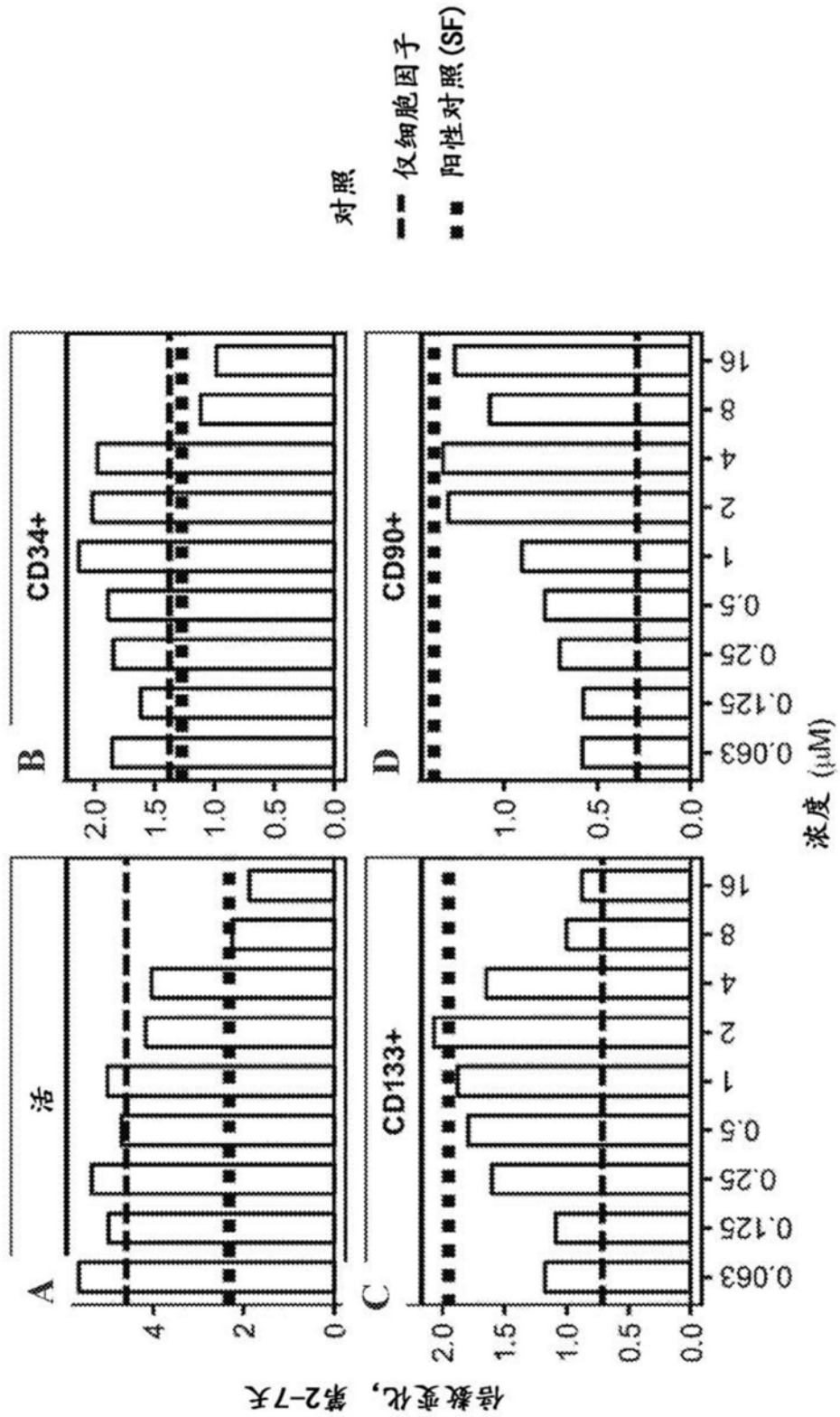


图7A-D

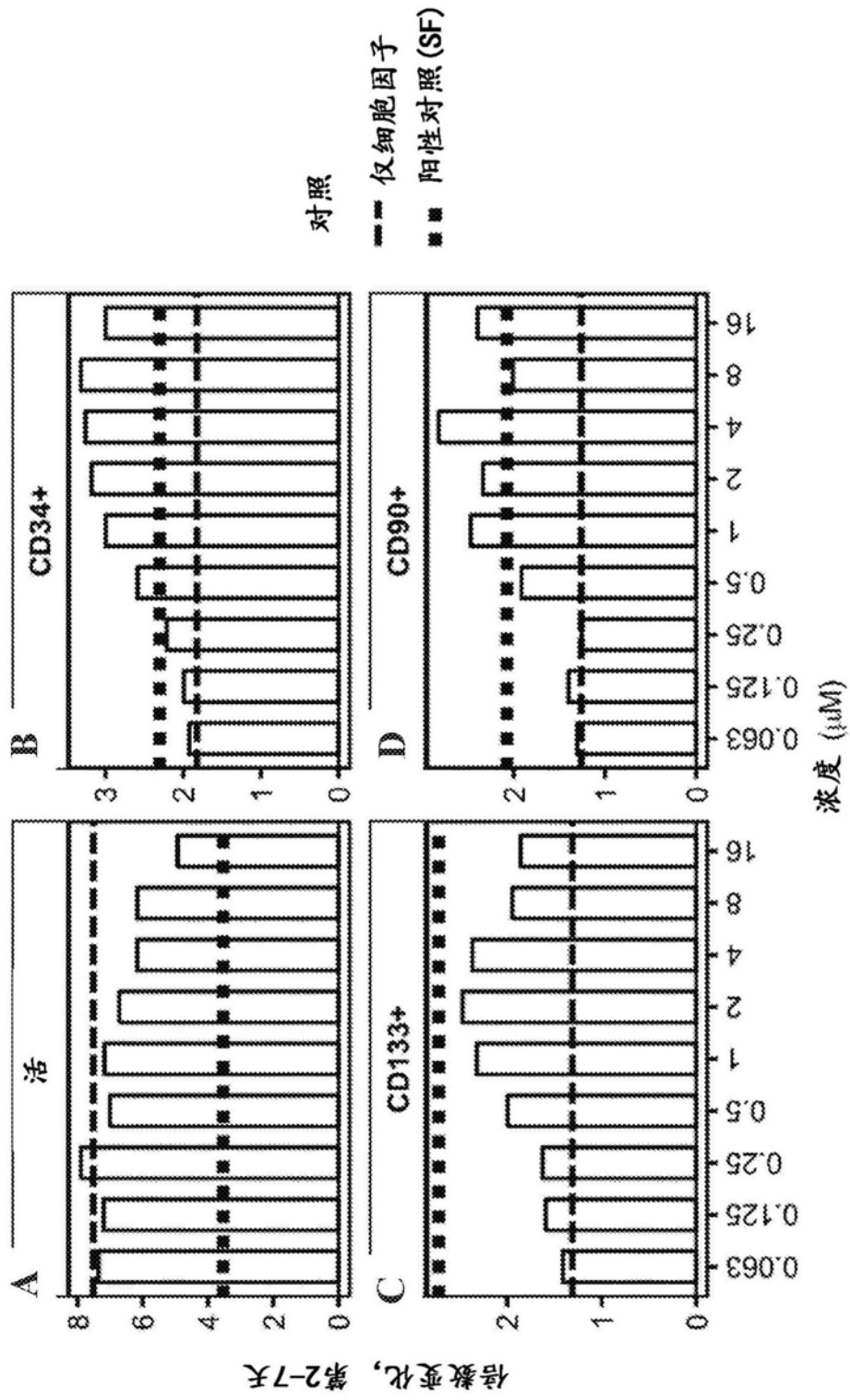


图8A-D

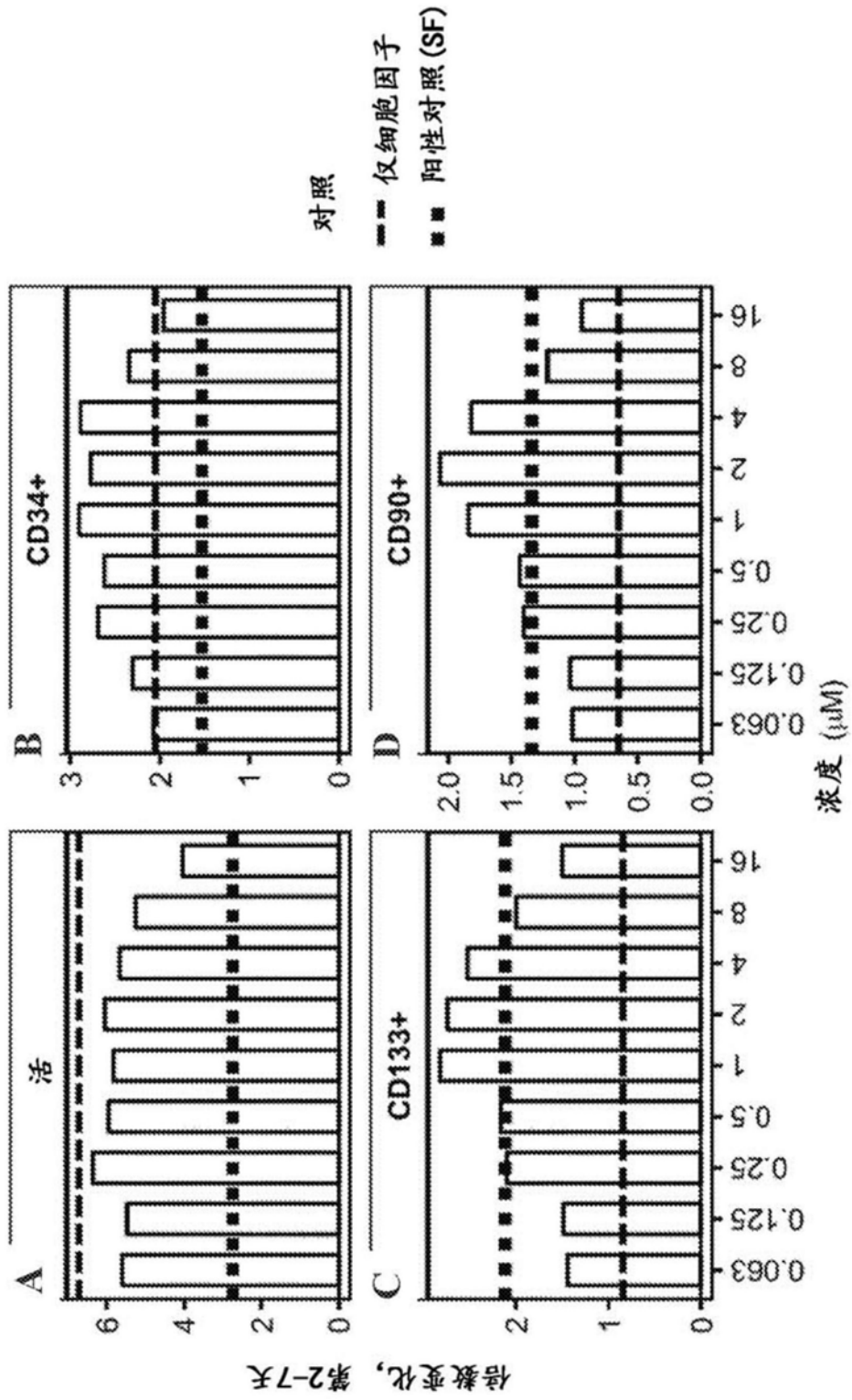


图9A-D

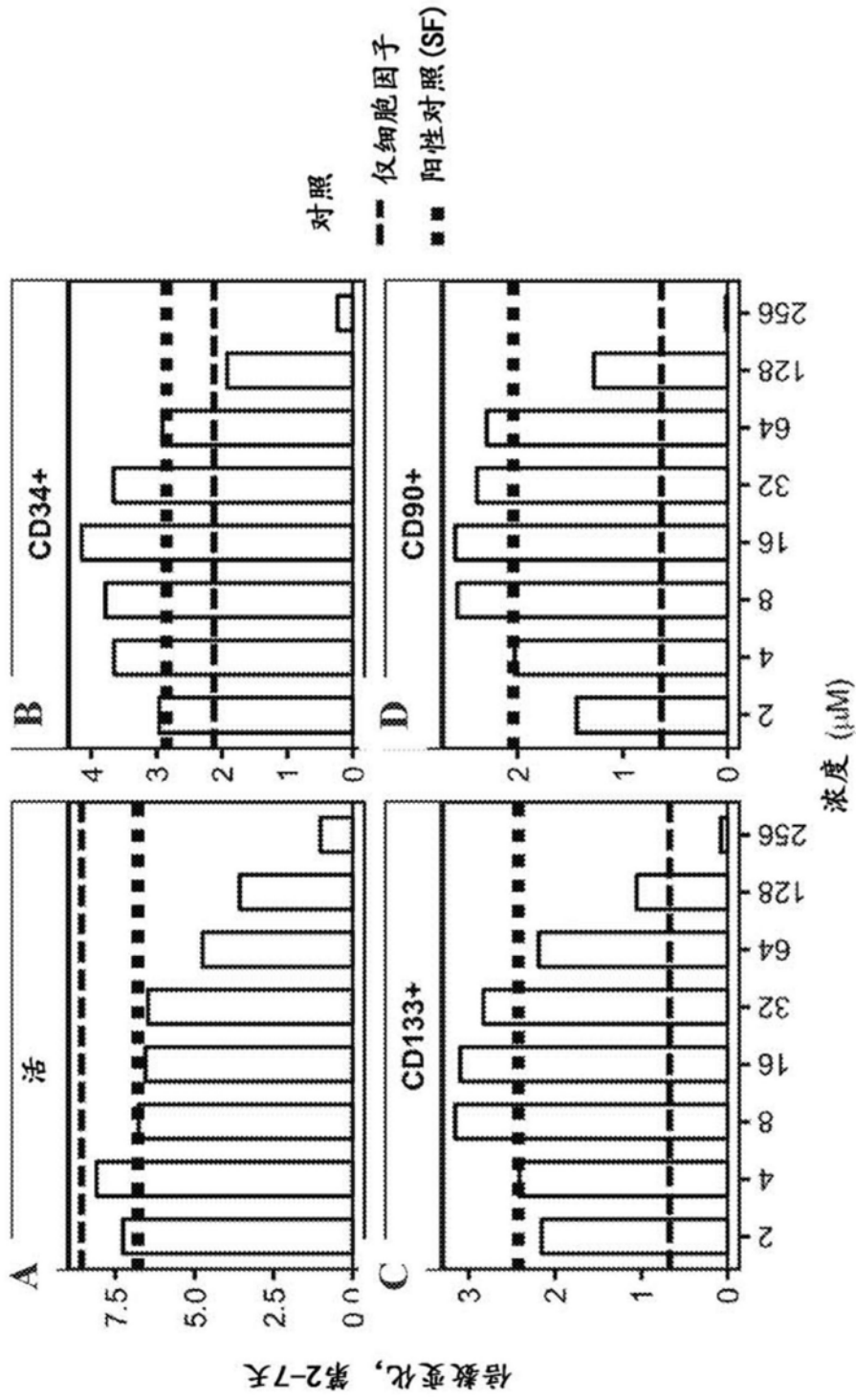


图10A-D

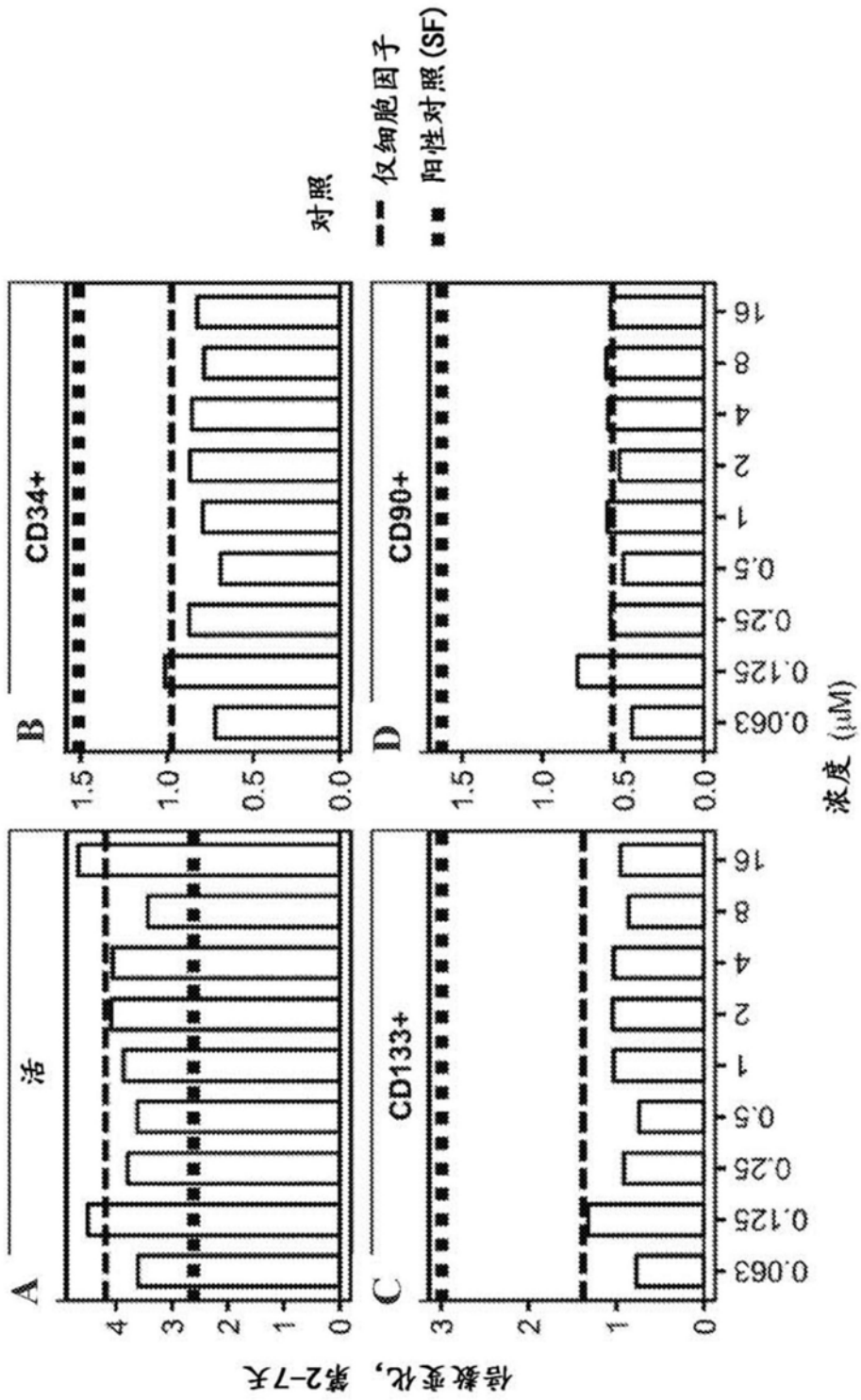


图11A-D

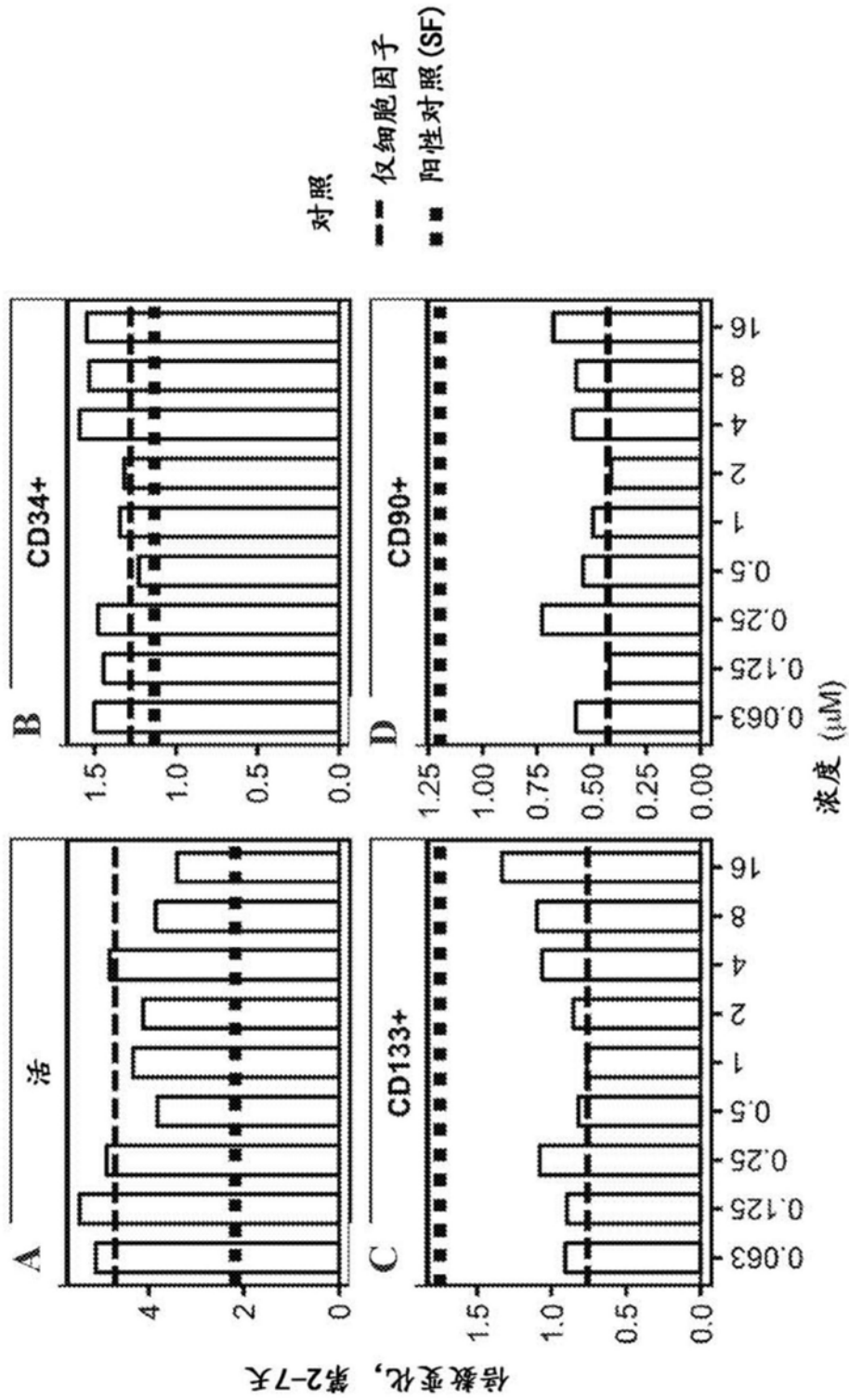


图12A-D

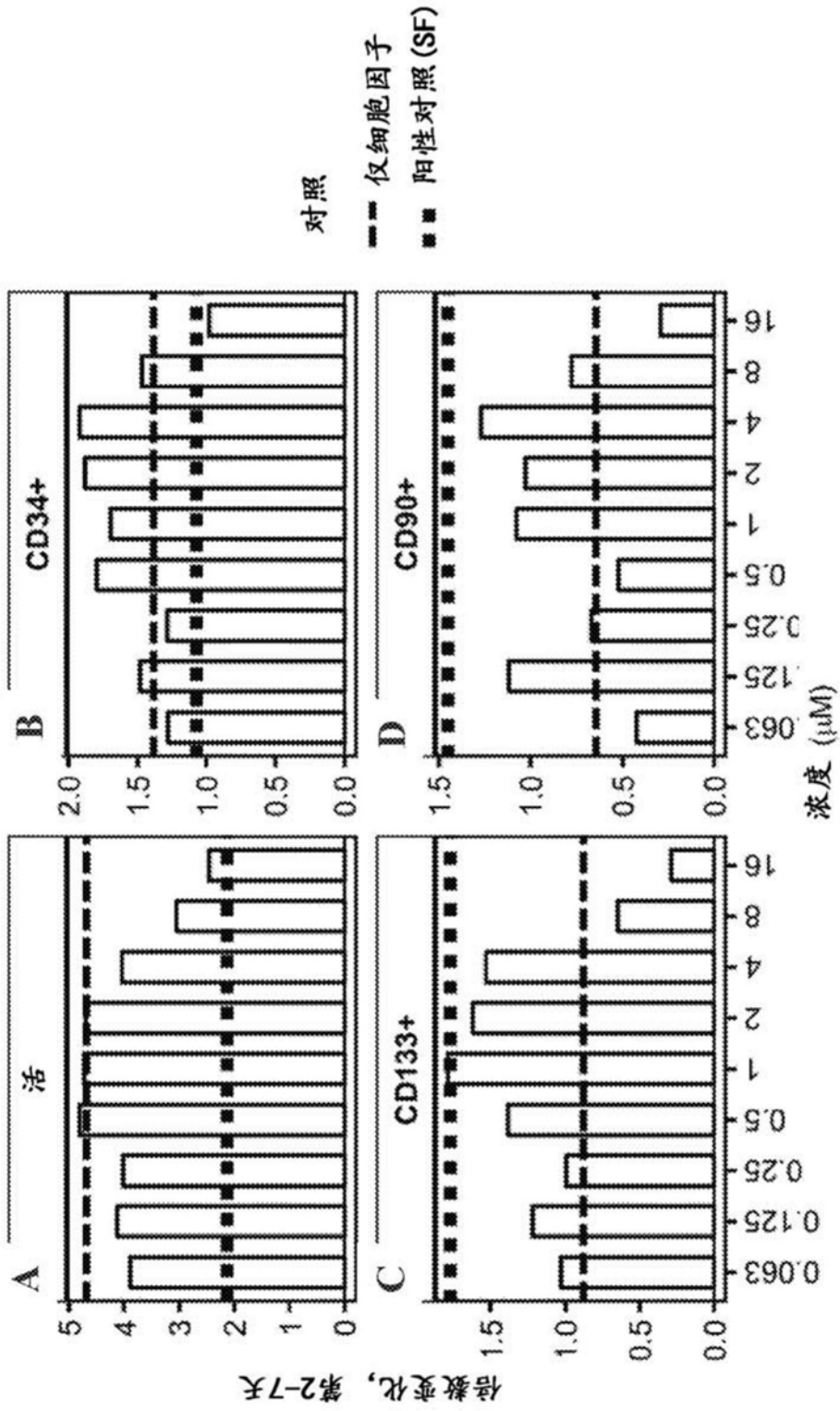


图13A-D

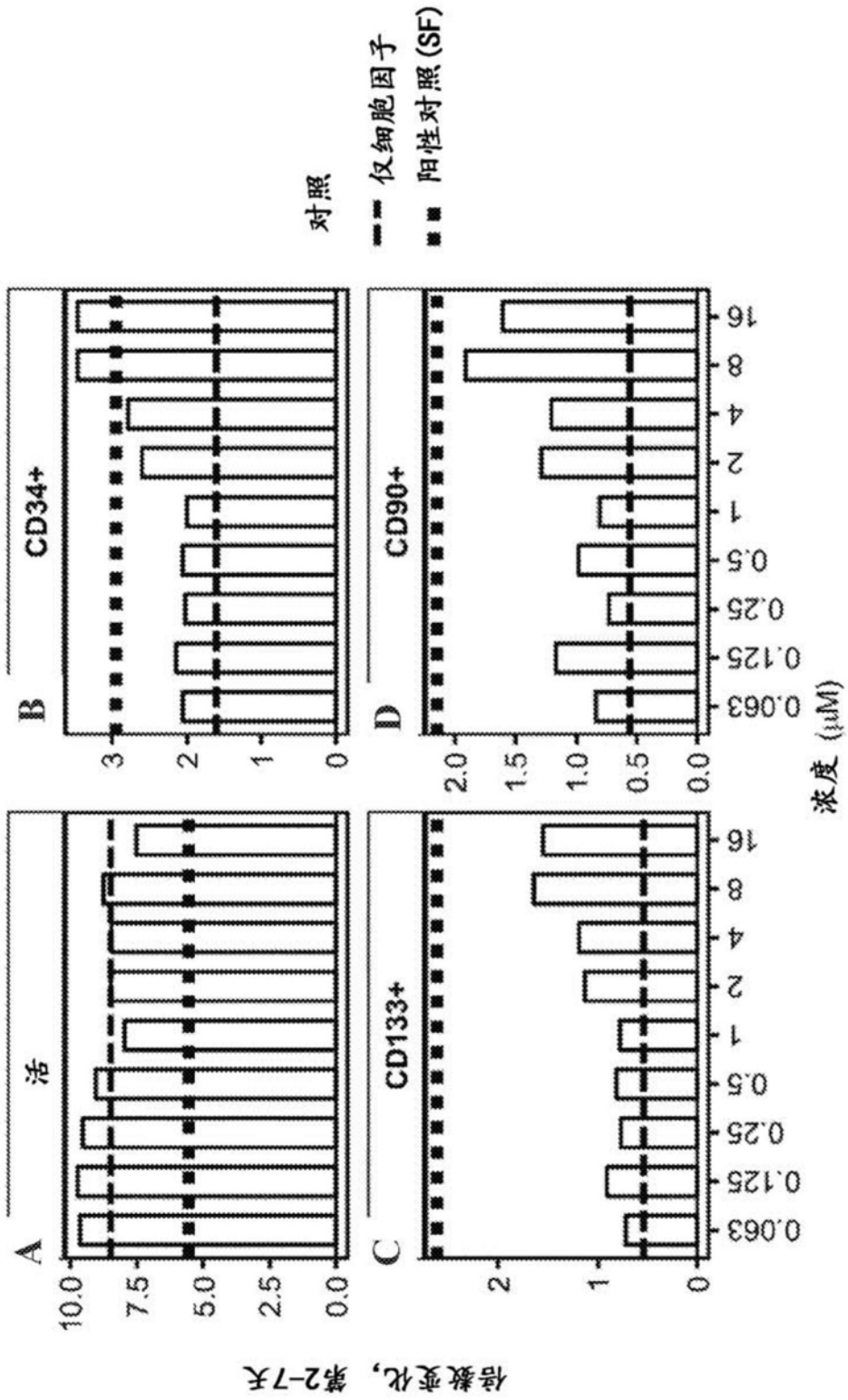


图14A-D

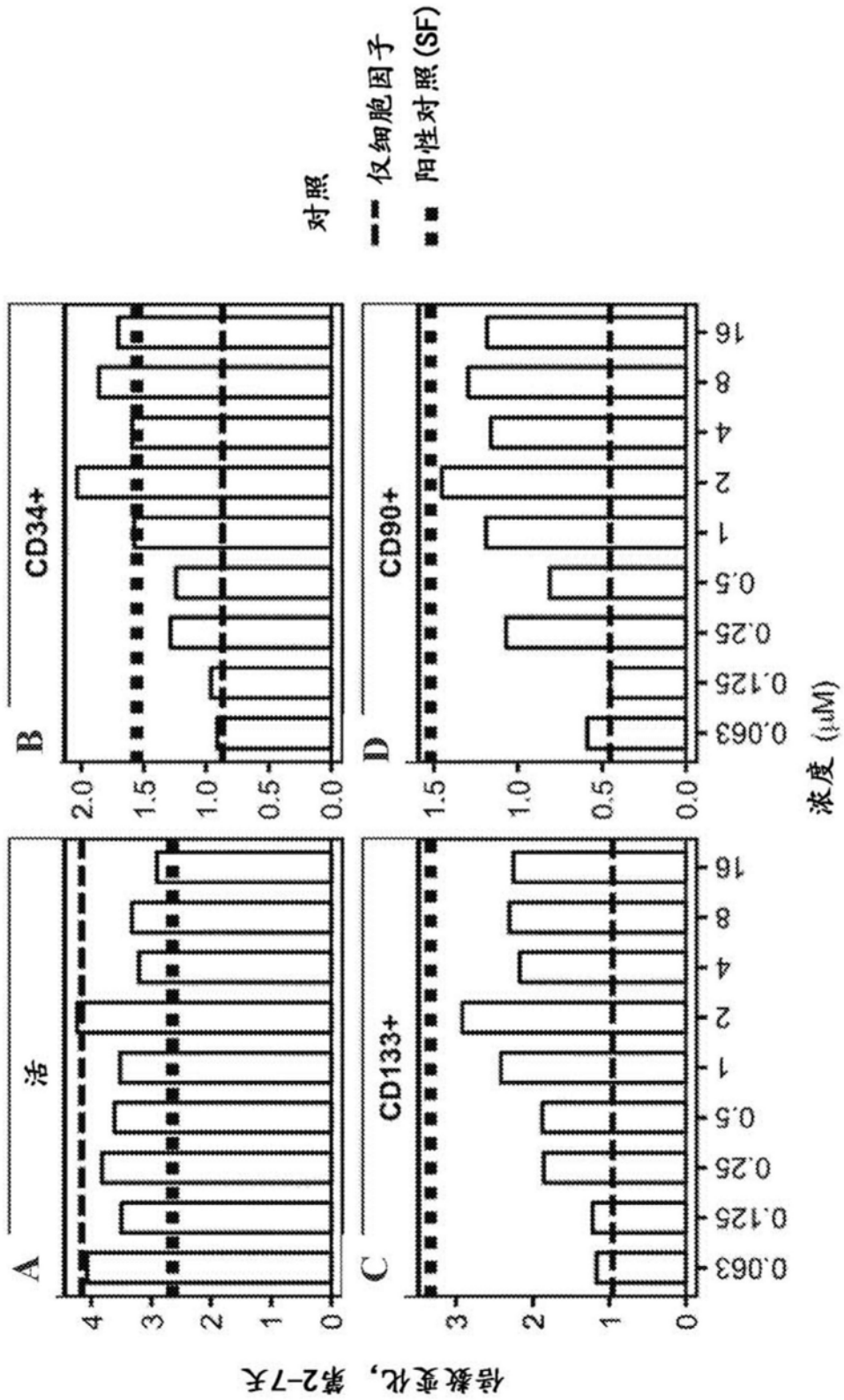


图15A-D

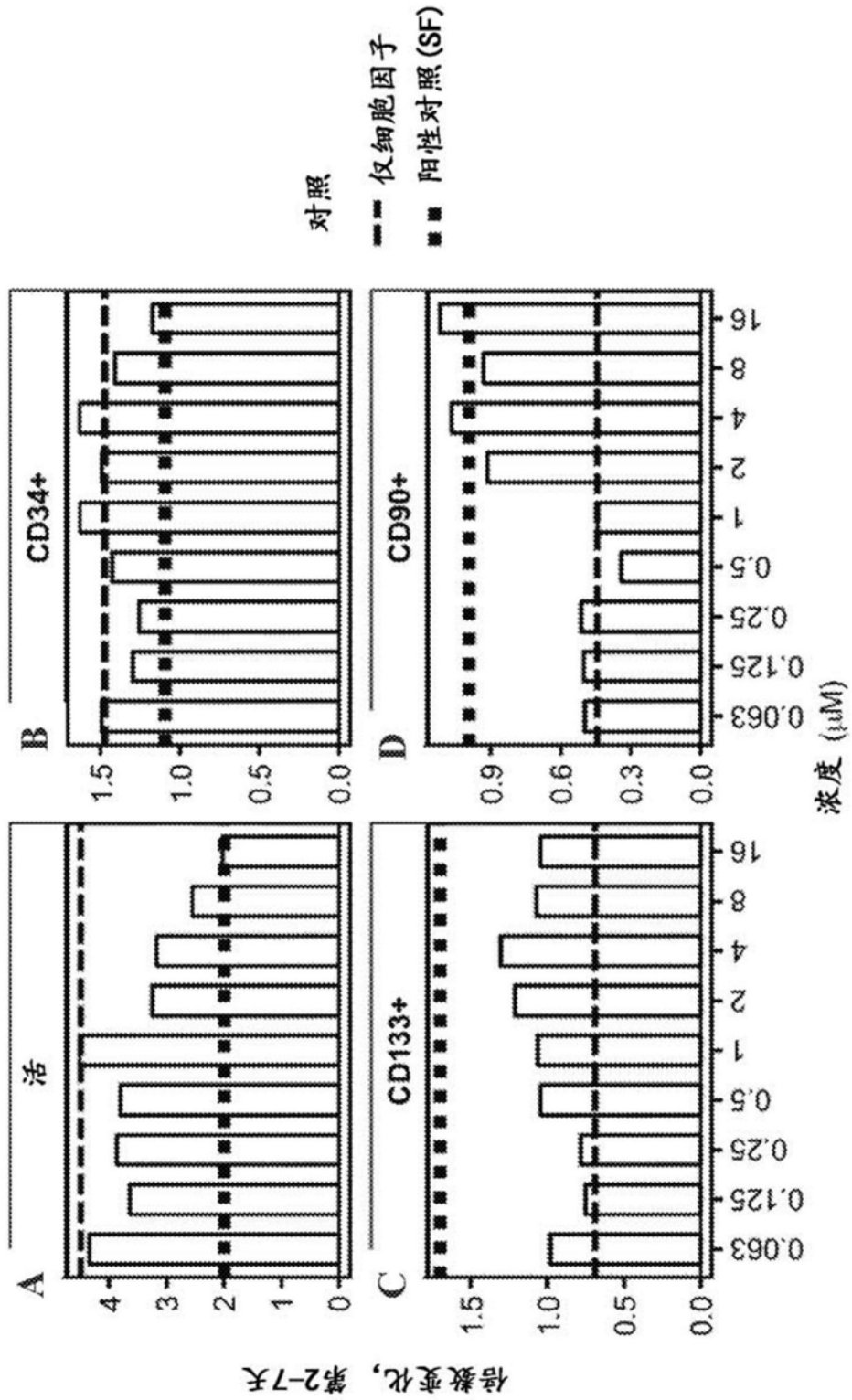


图16A-D

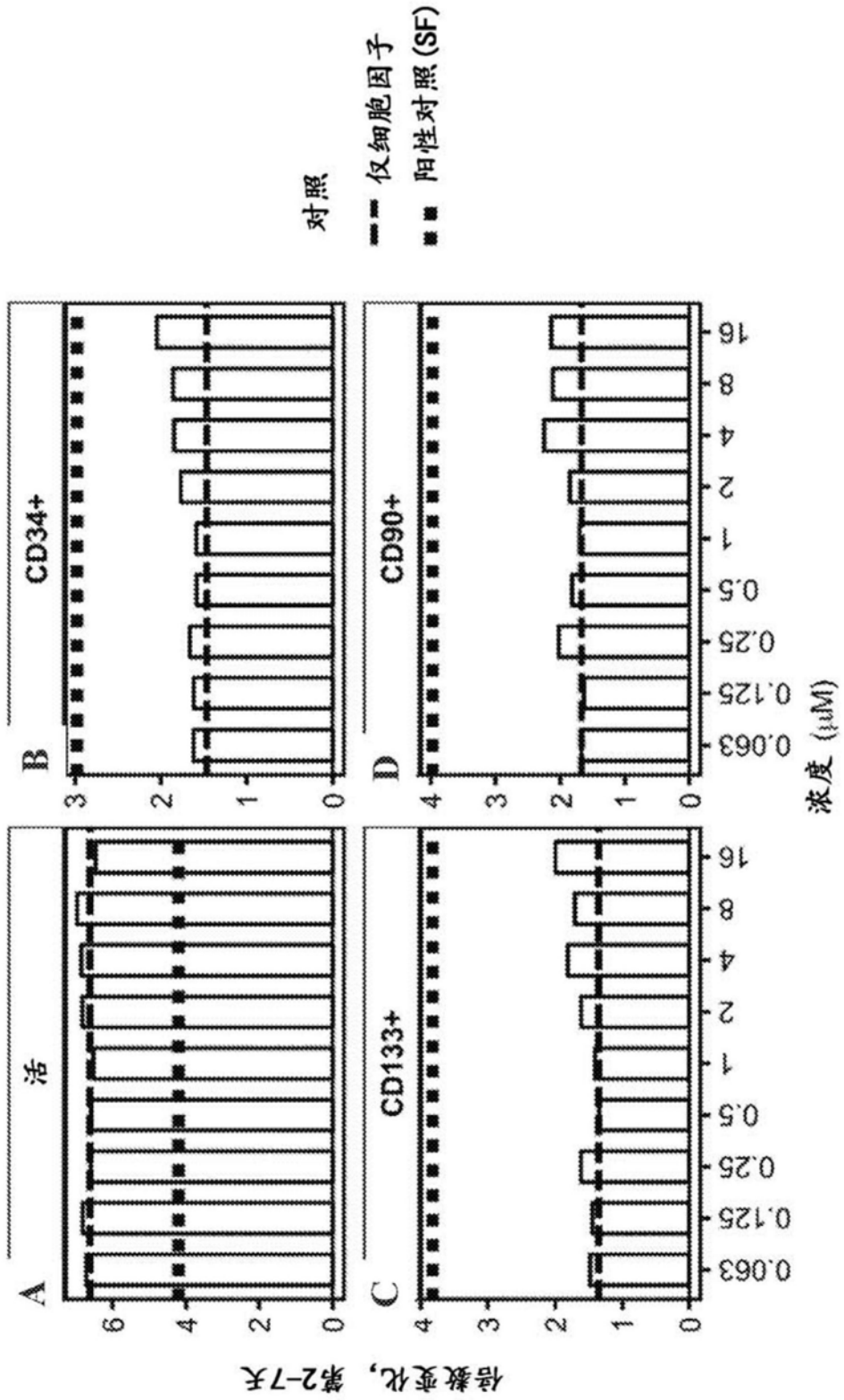


图17A-D

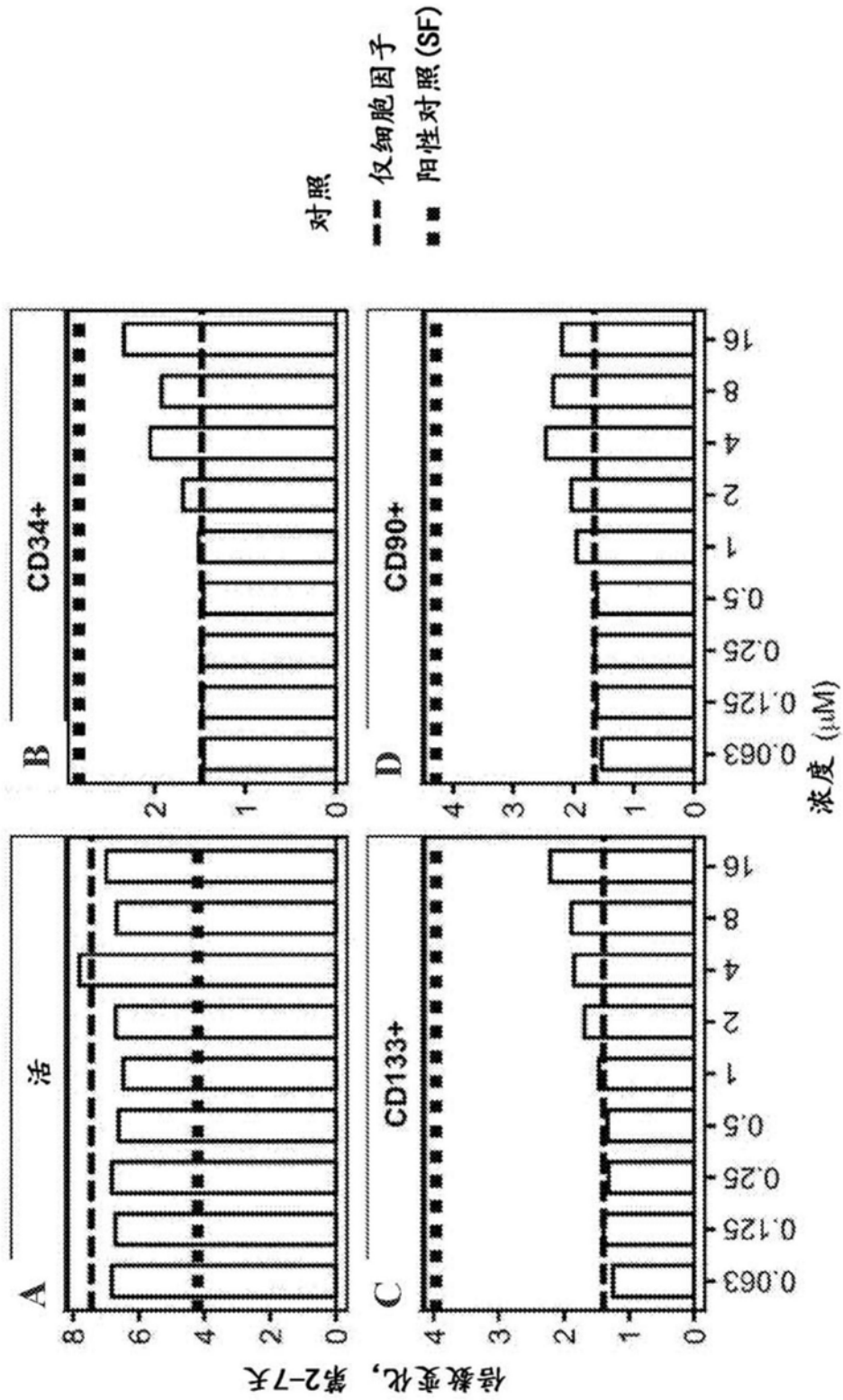


图18A-D

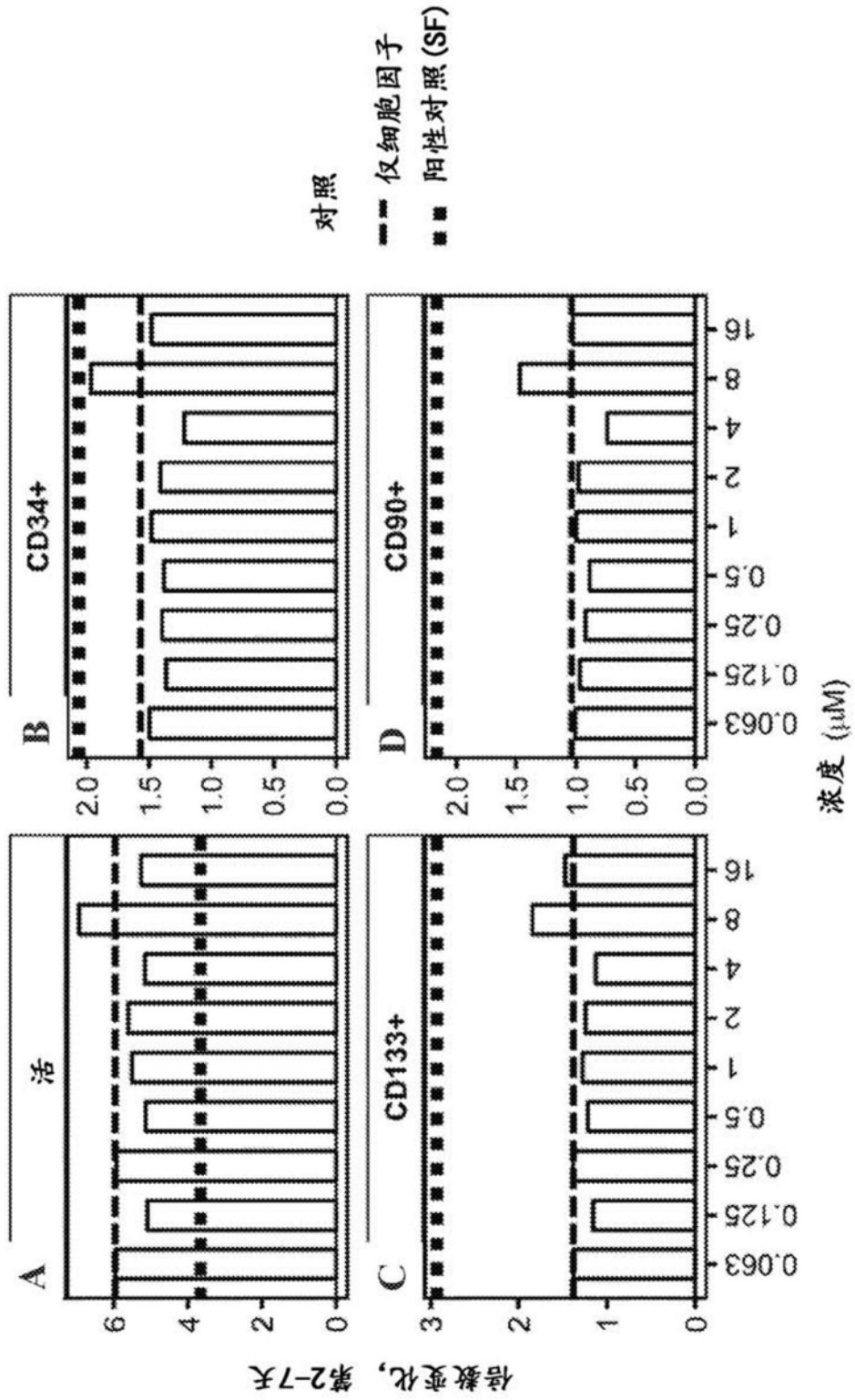


图19A-D

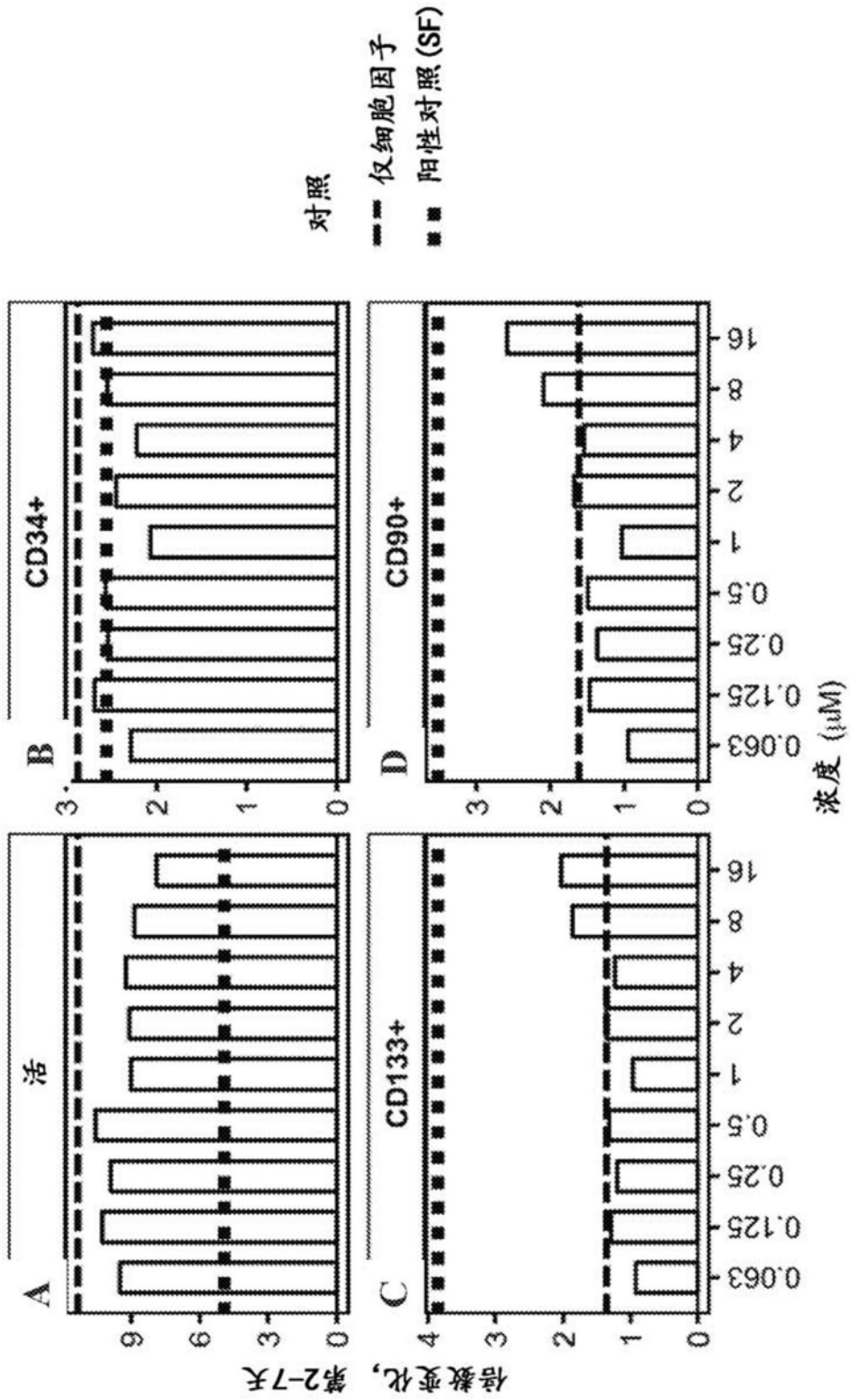


图20A-D

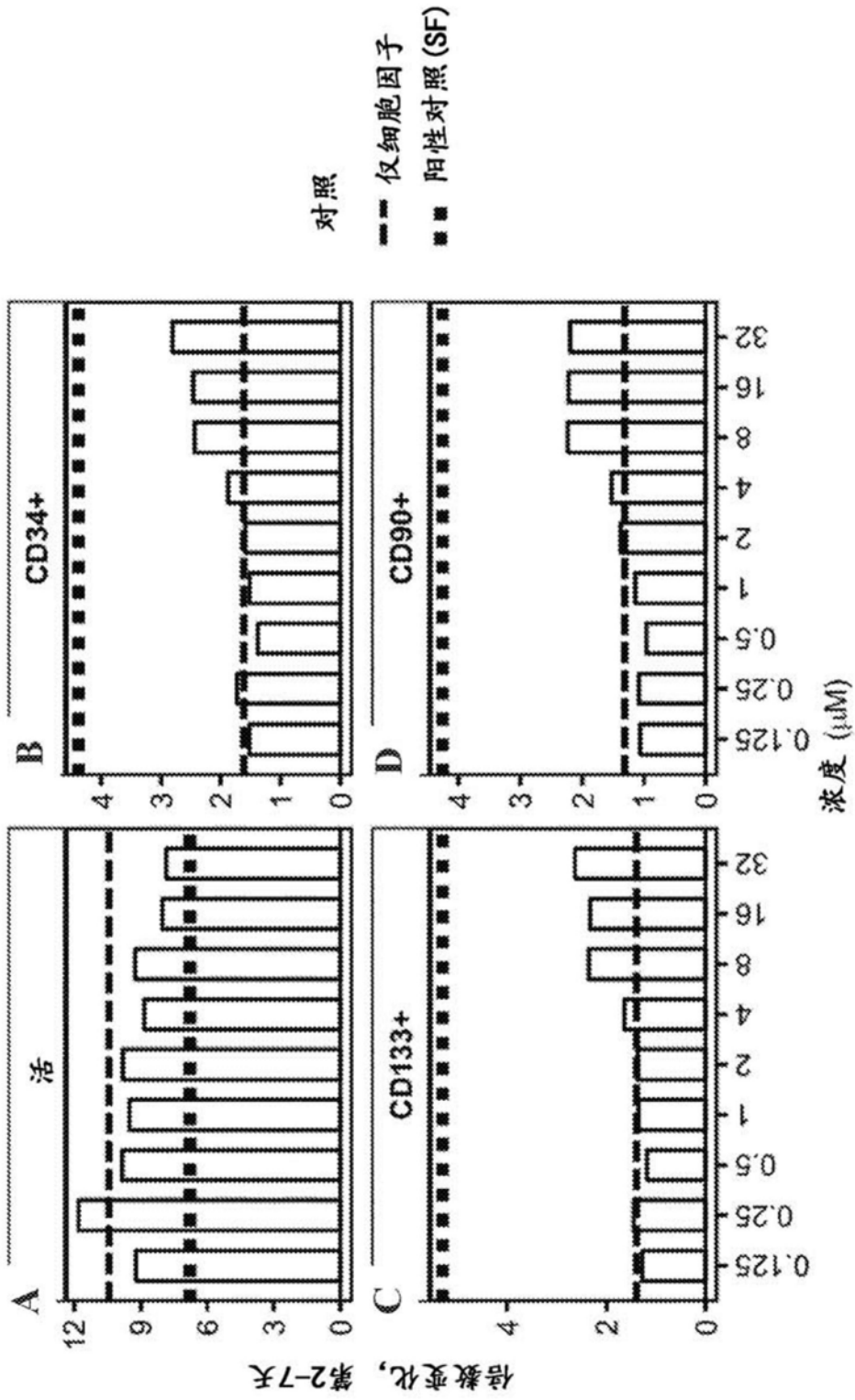


图21A-D

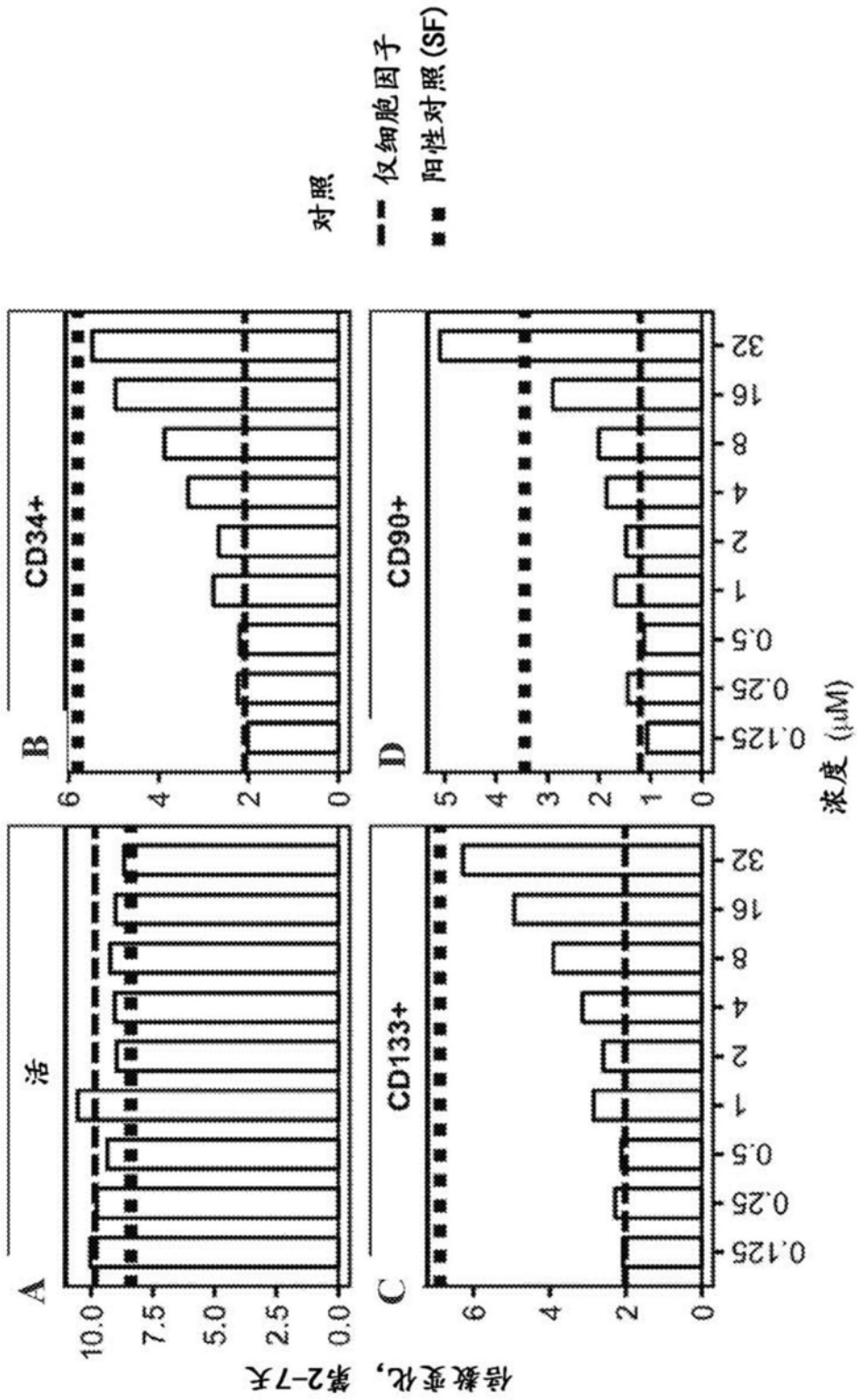


图22A-D

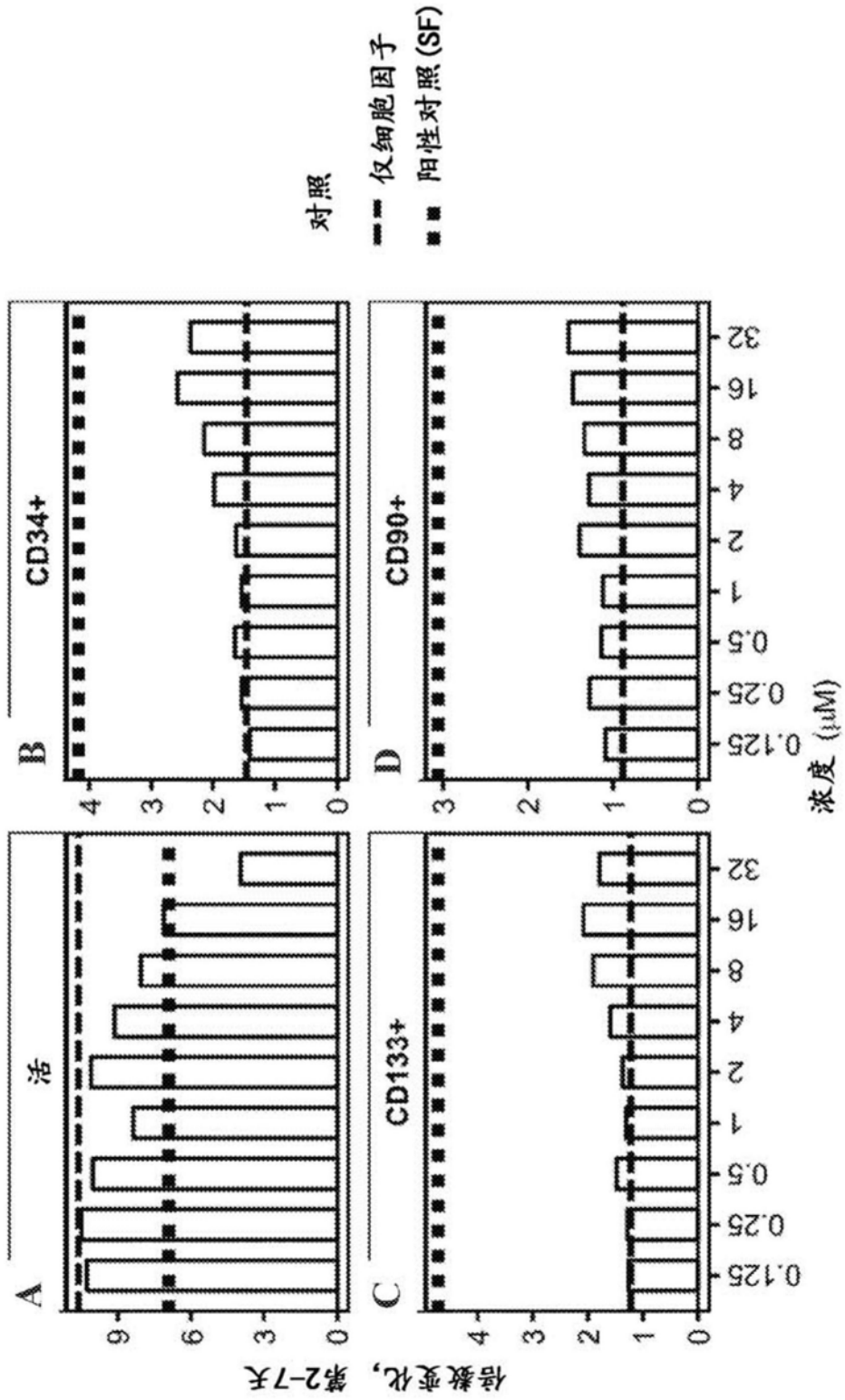


图23A-D

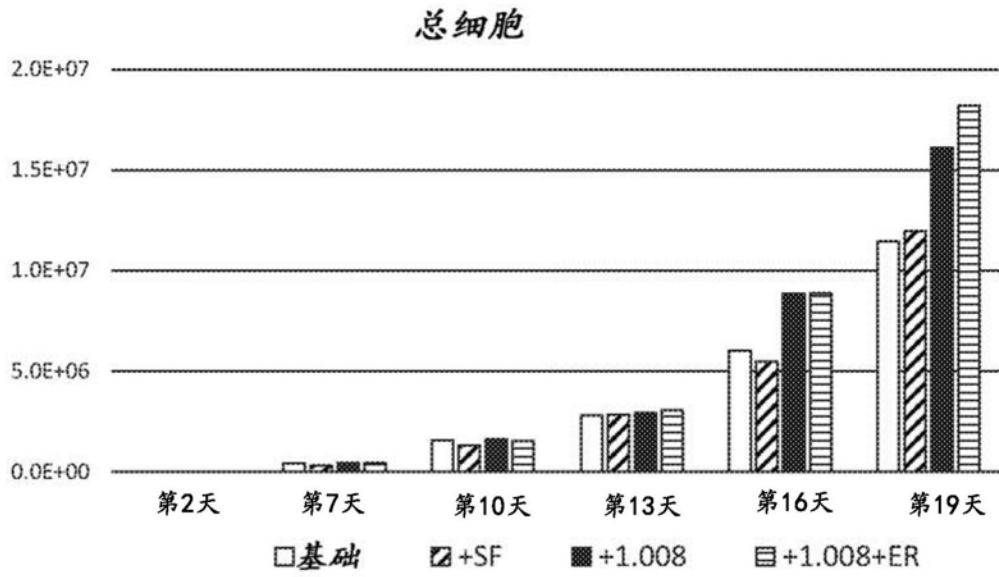


图24A

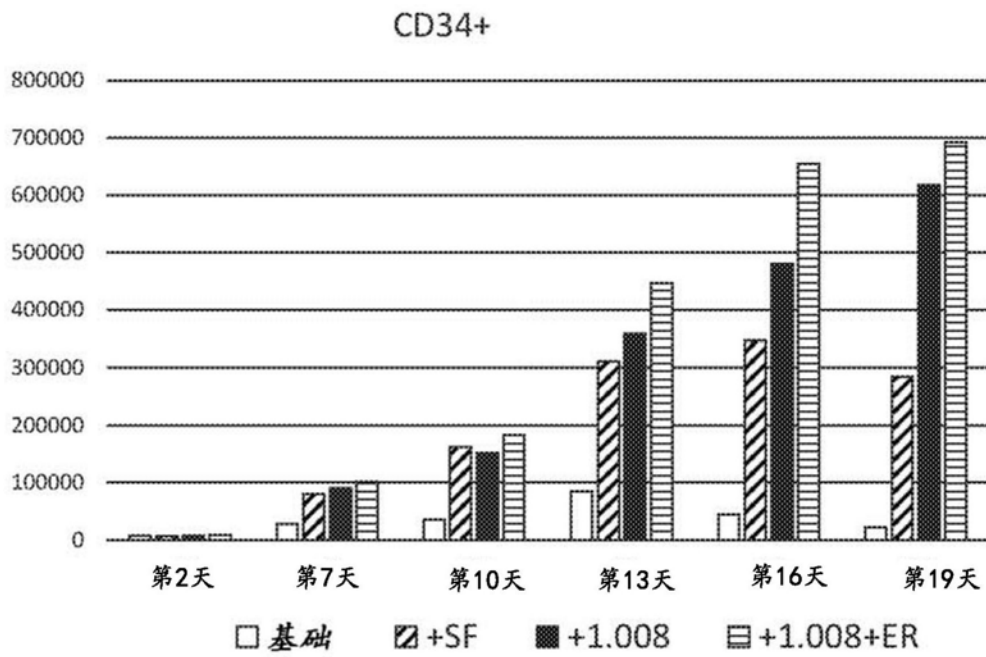


图24B

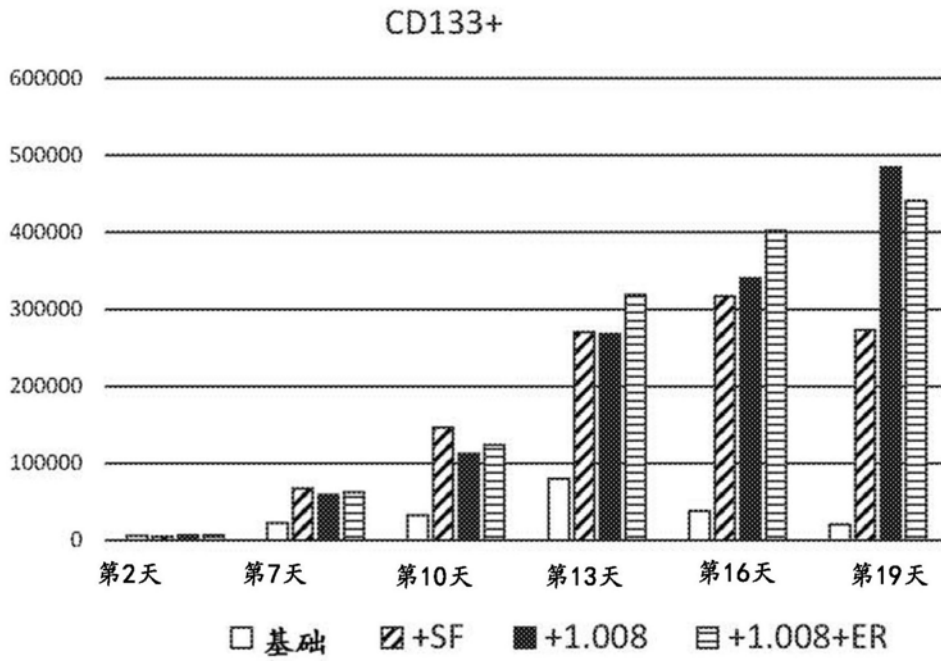


图24C

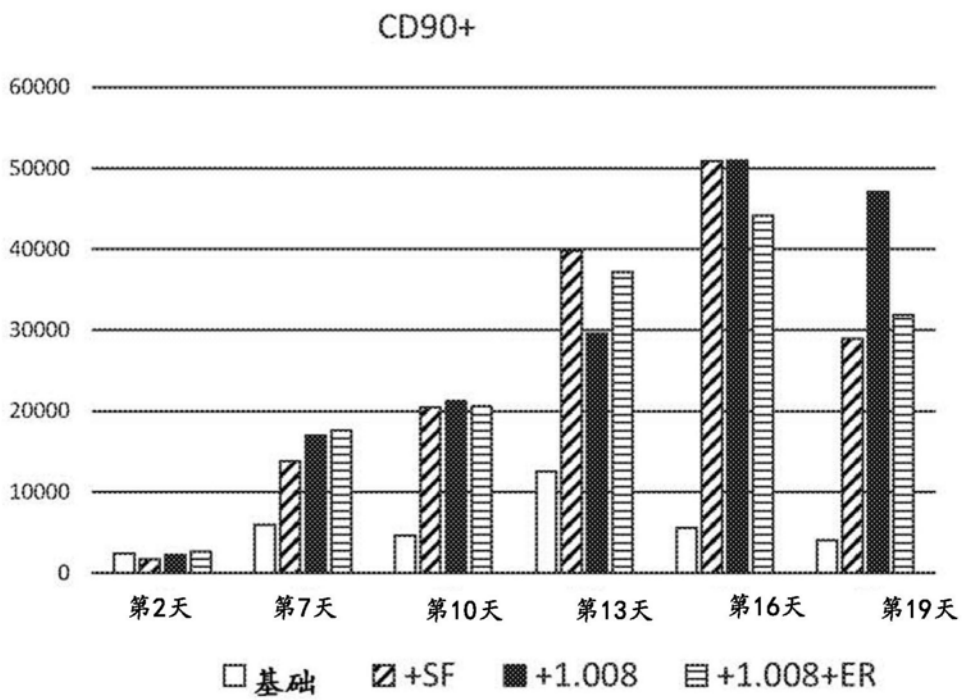


图24D

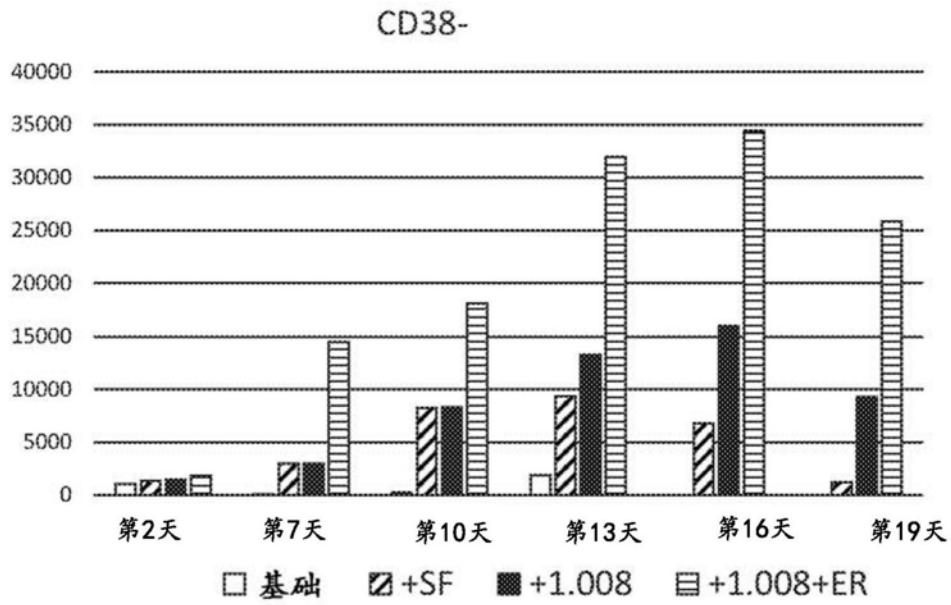


图24E

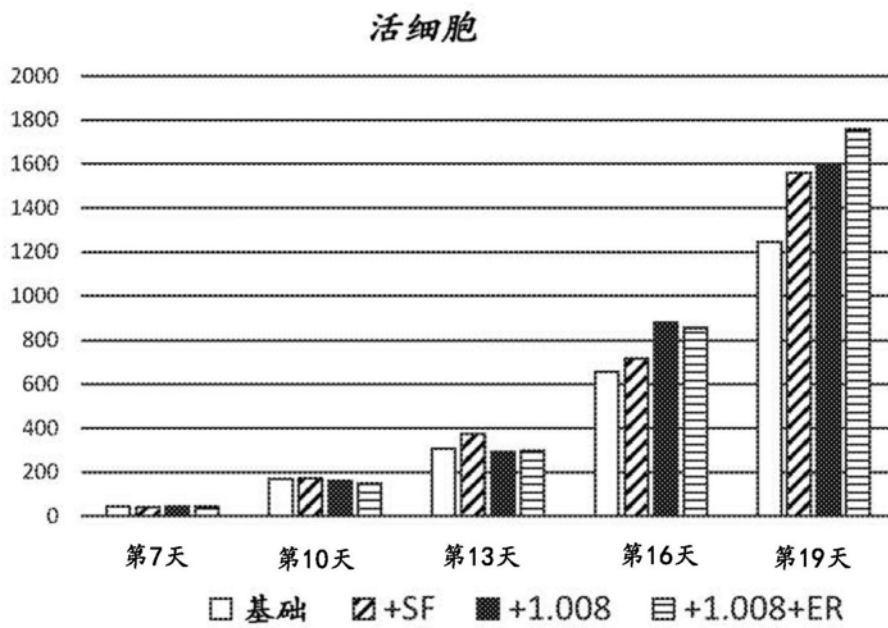


图25A

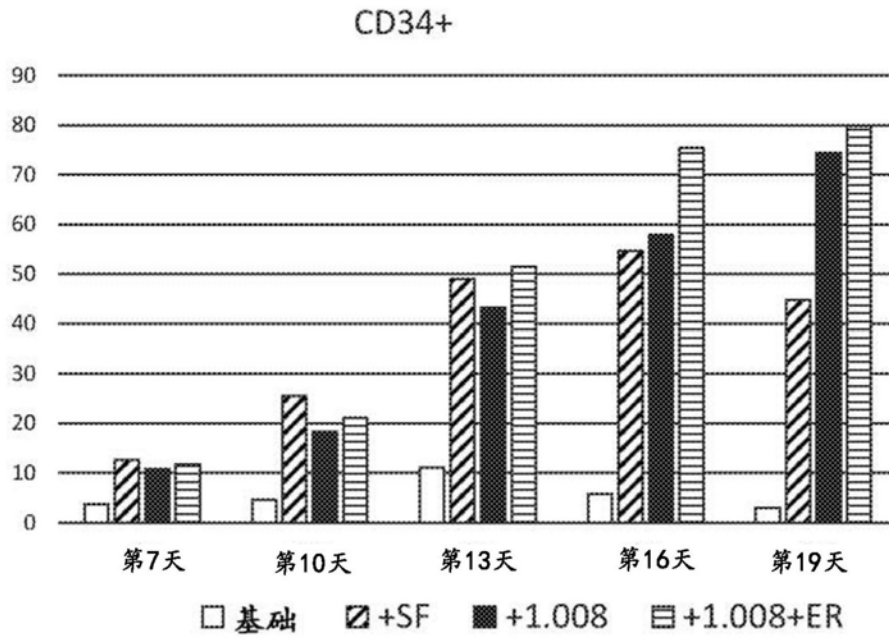


图25B

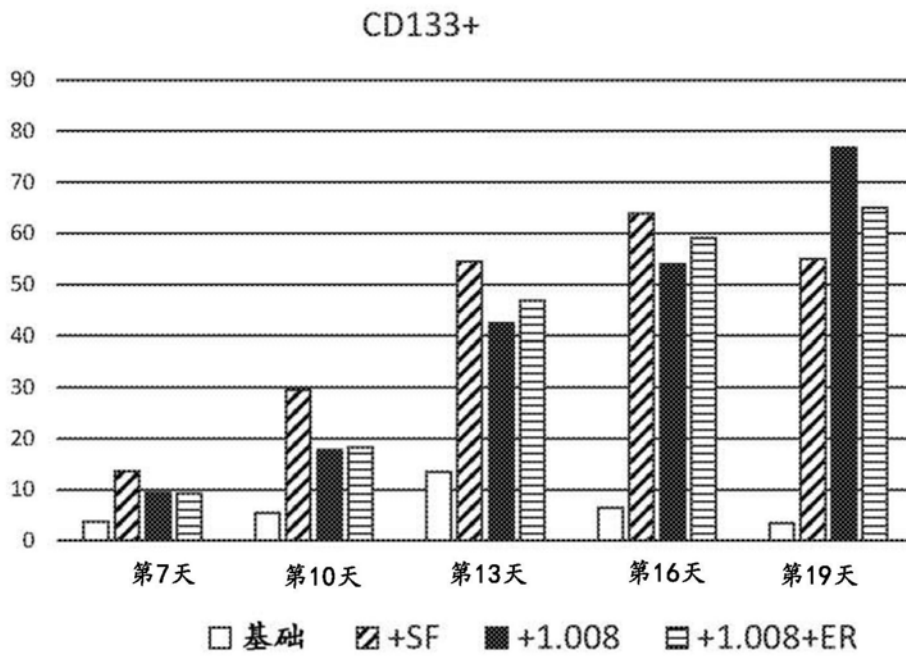


图25C

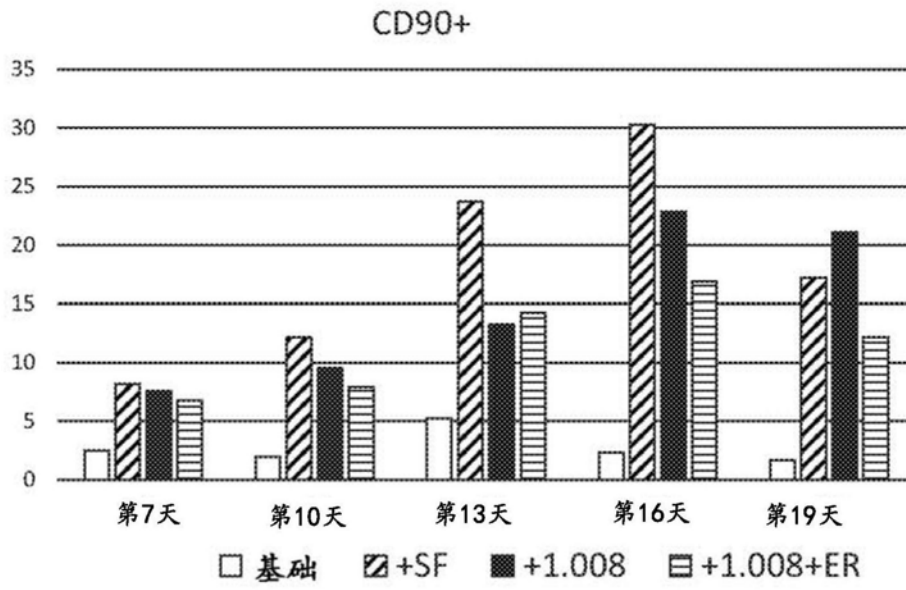


图25D

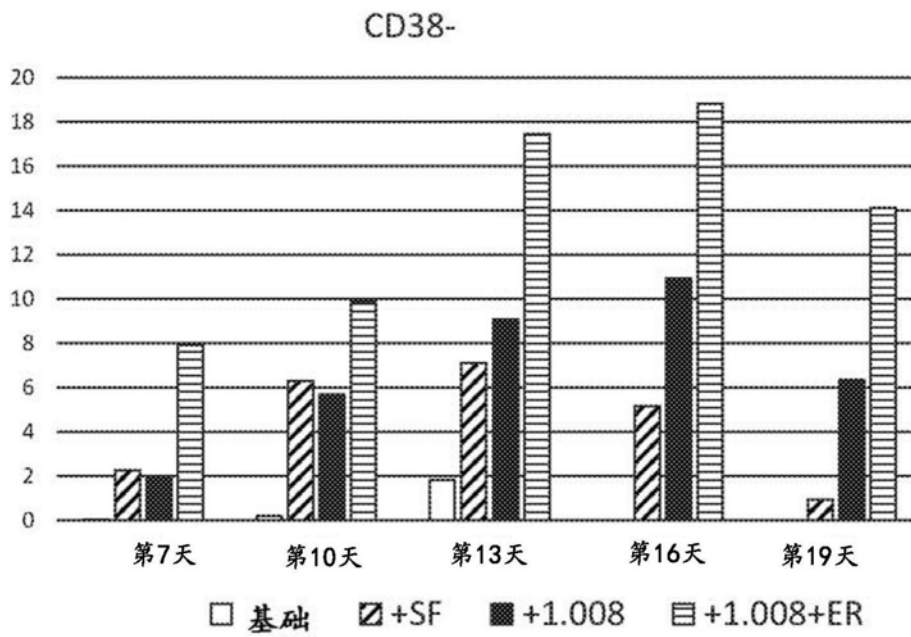


图25E

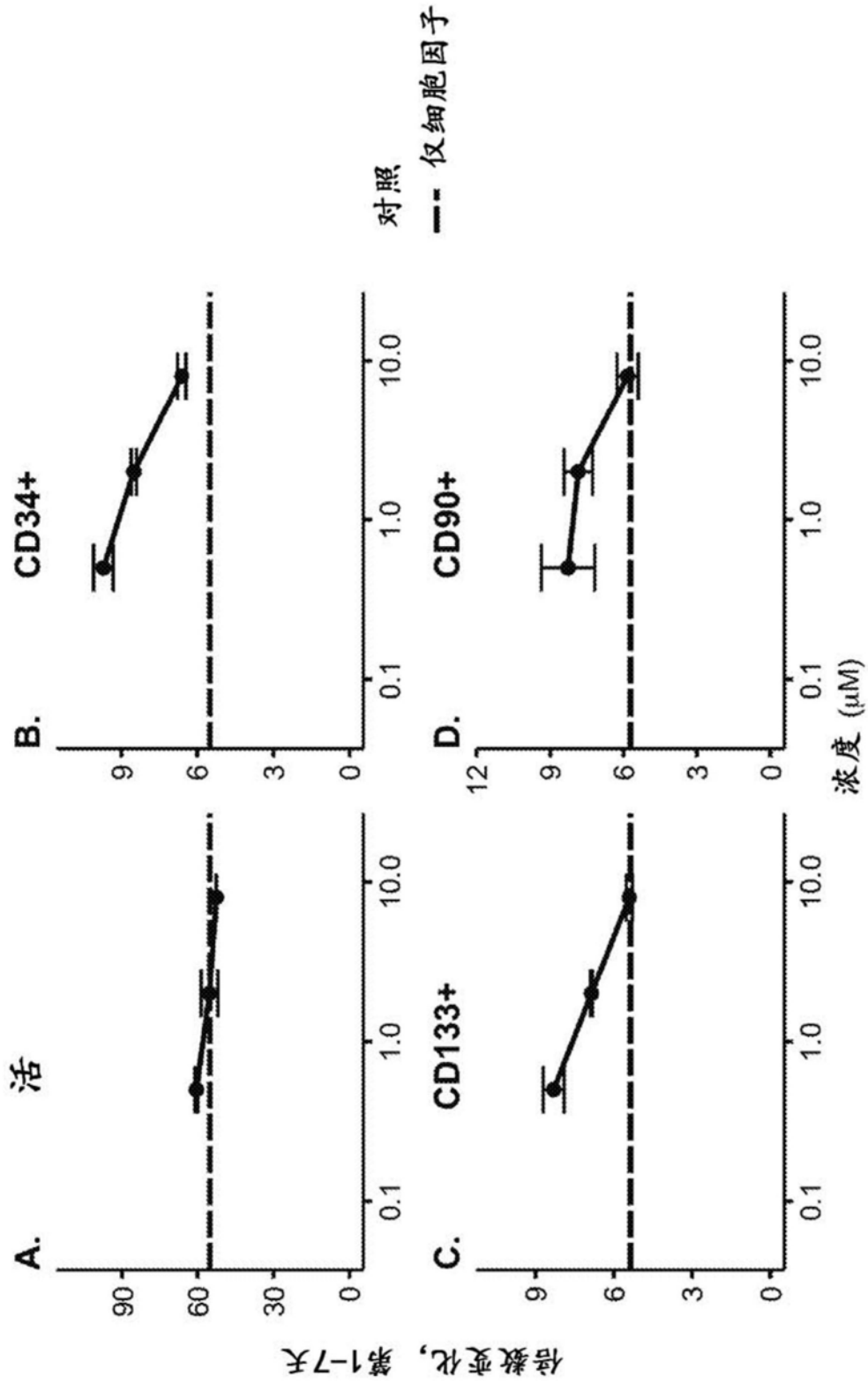


图26A-D

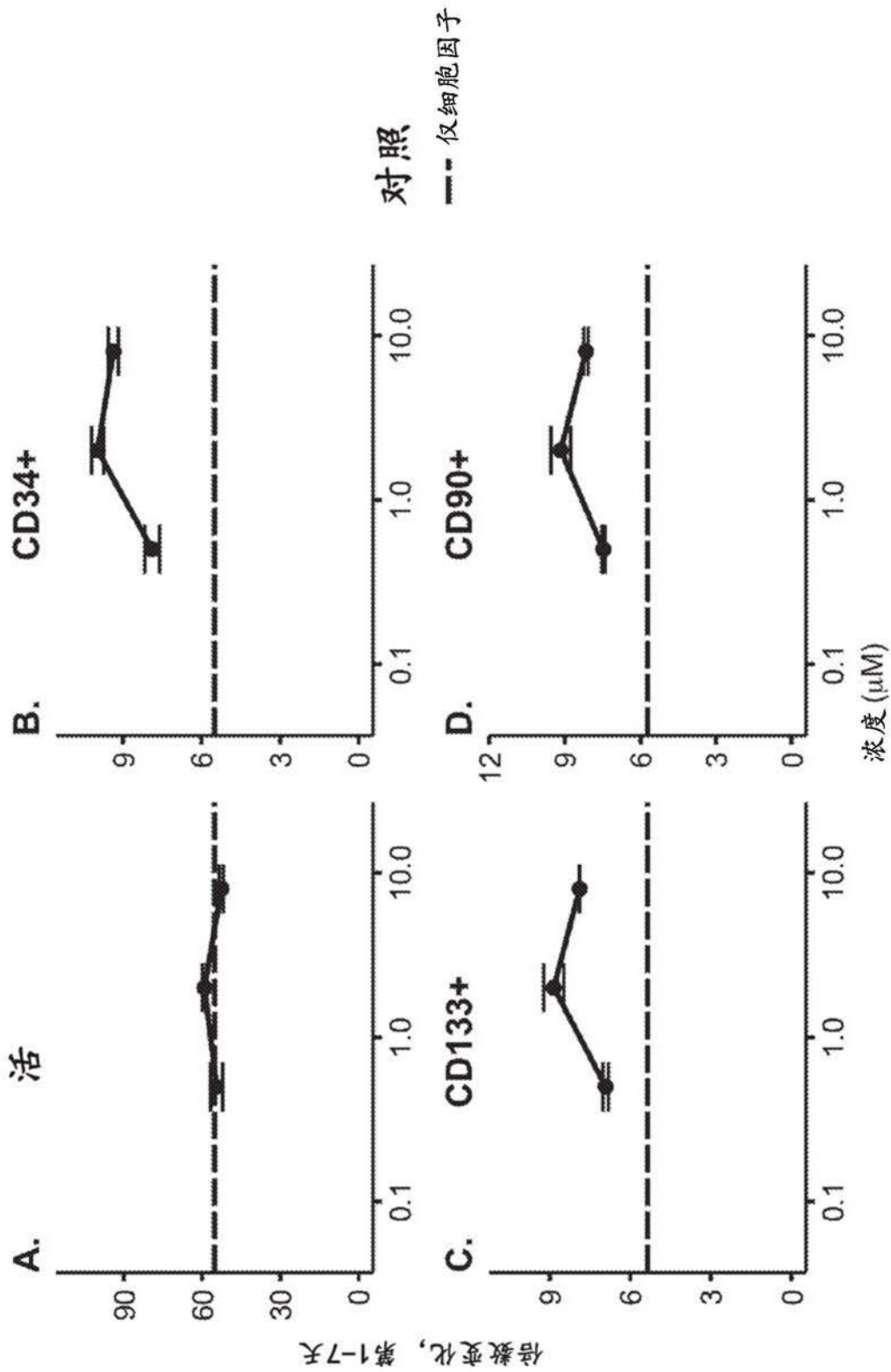


图27A-D

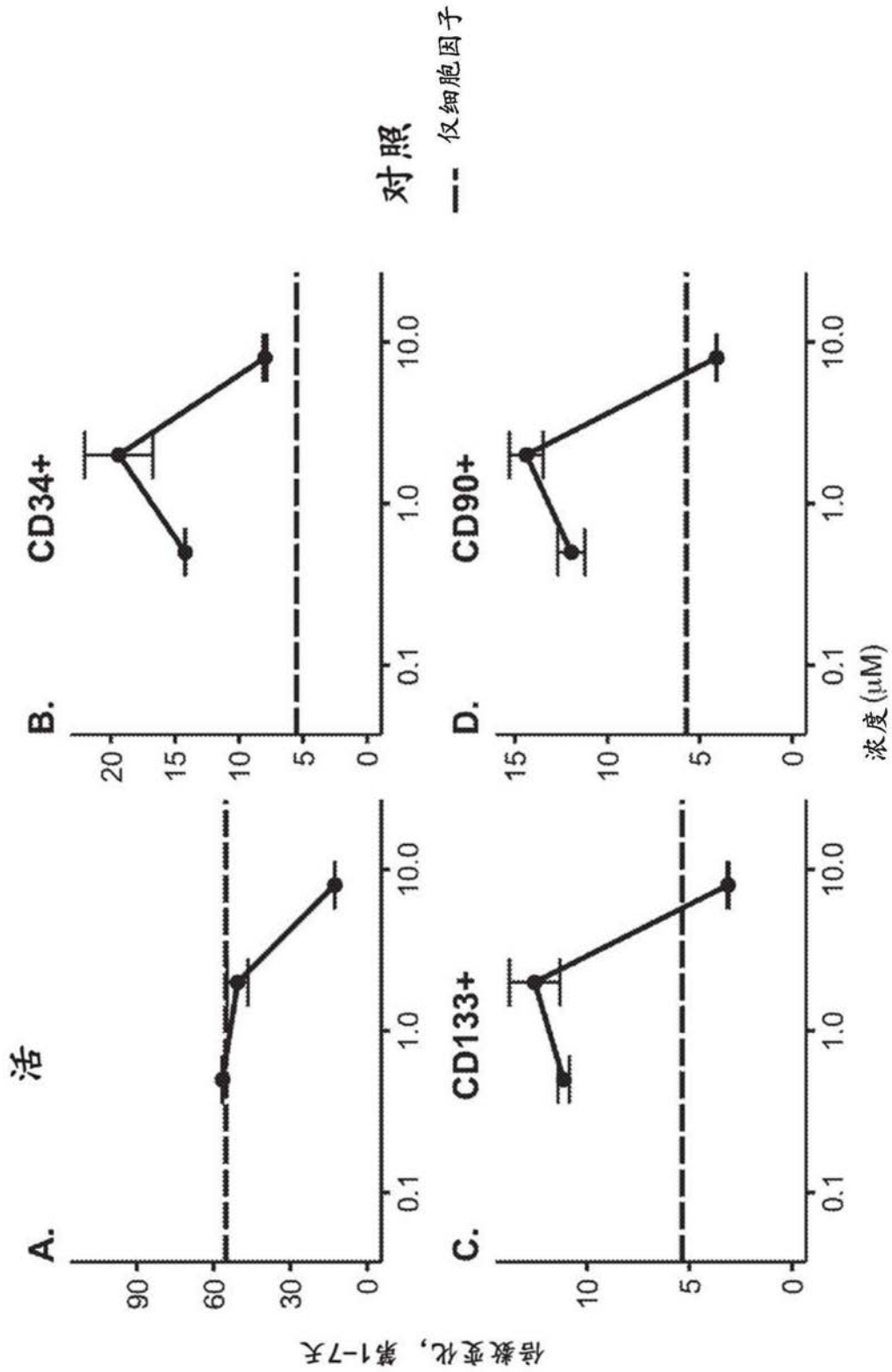


图28A-D

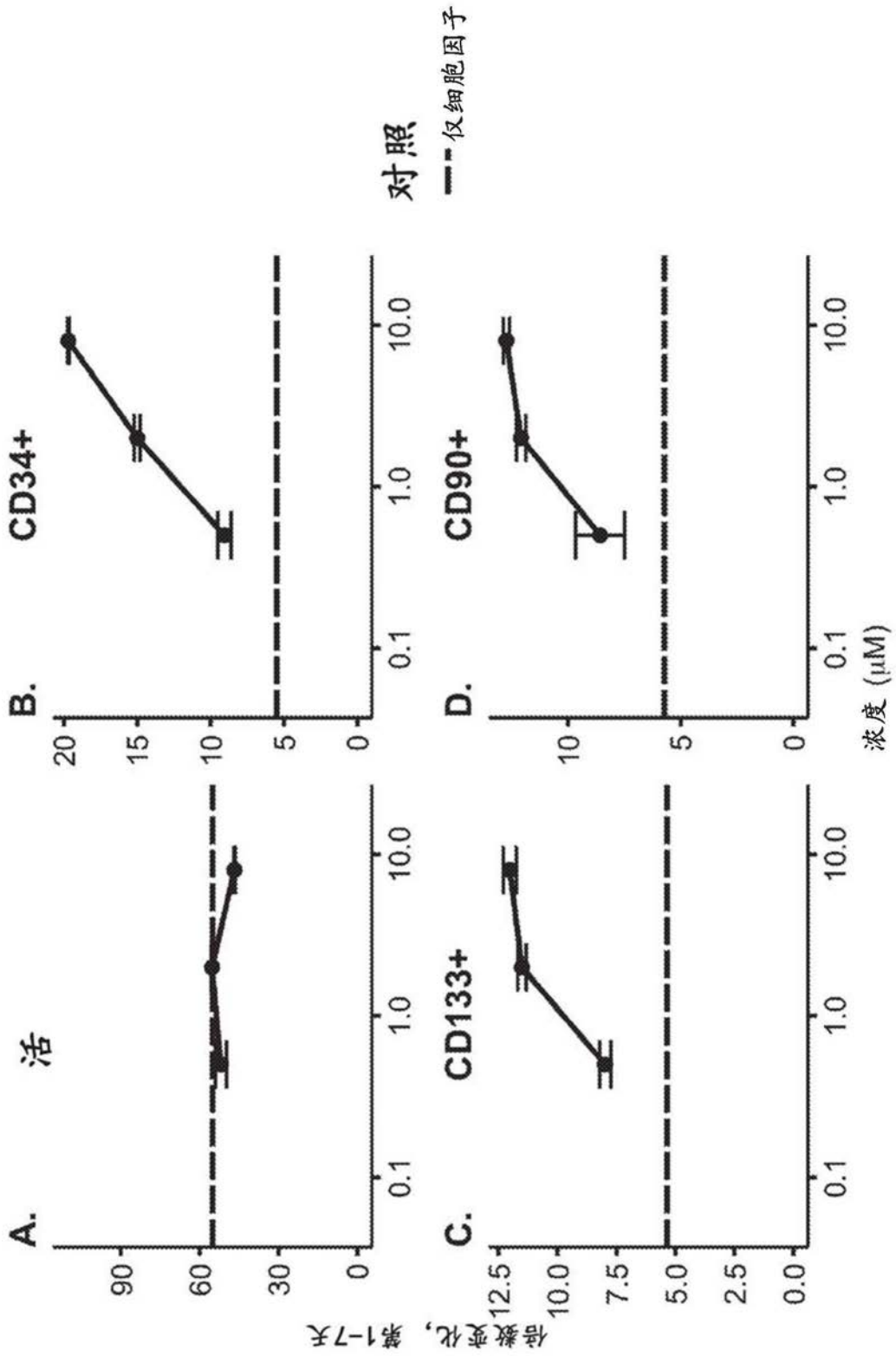


图29A-D

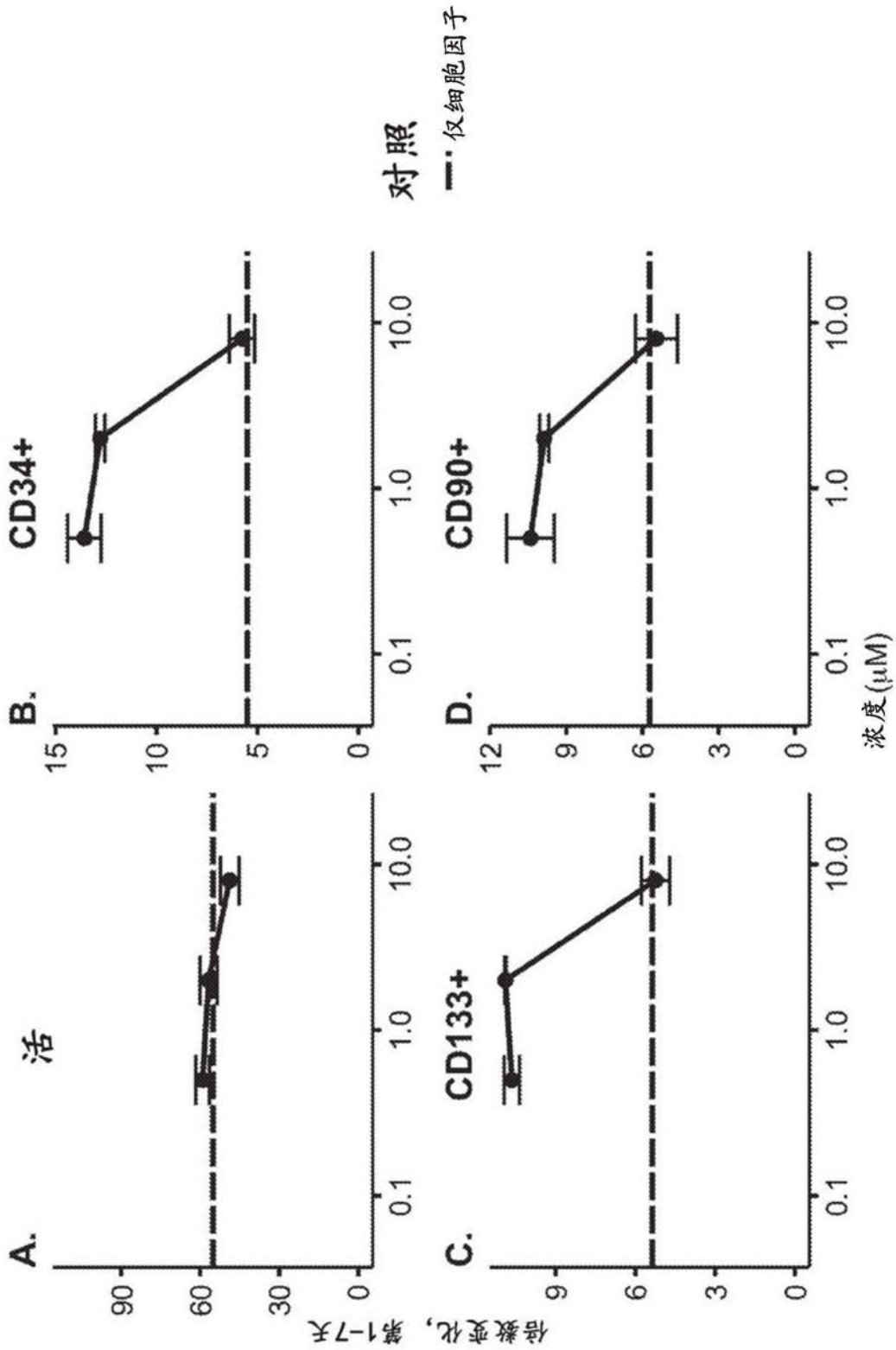


图30A-D

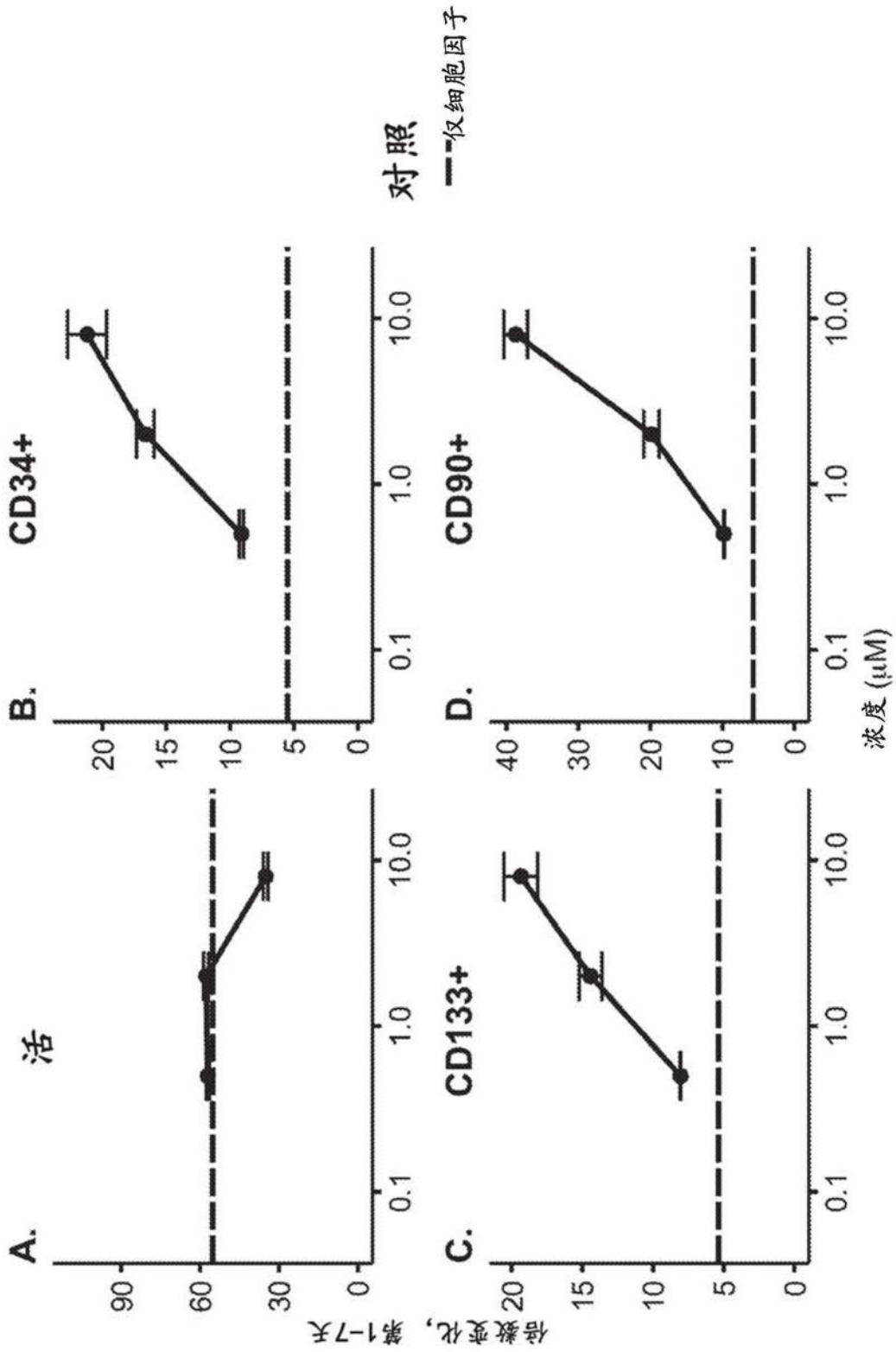


图31A-D

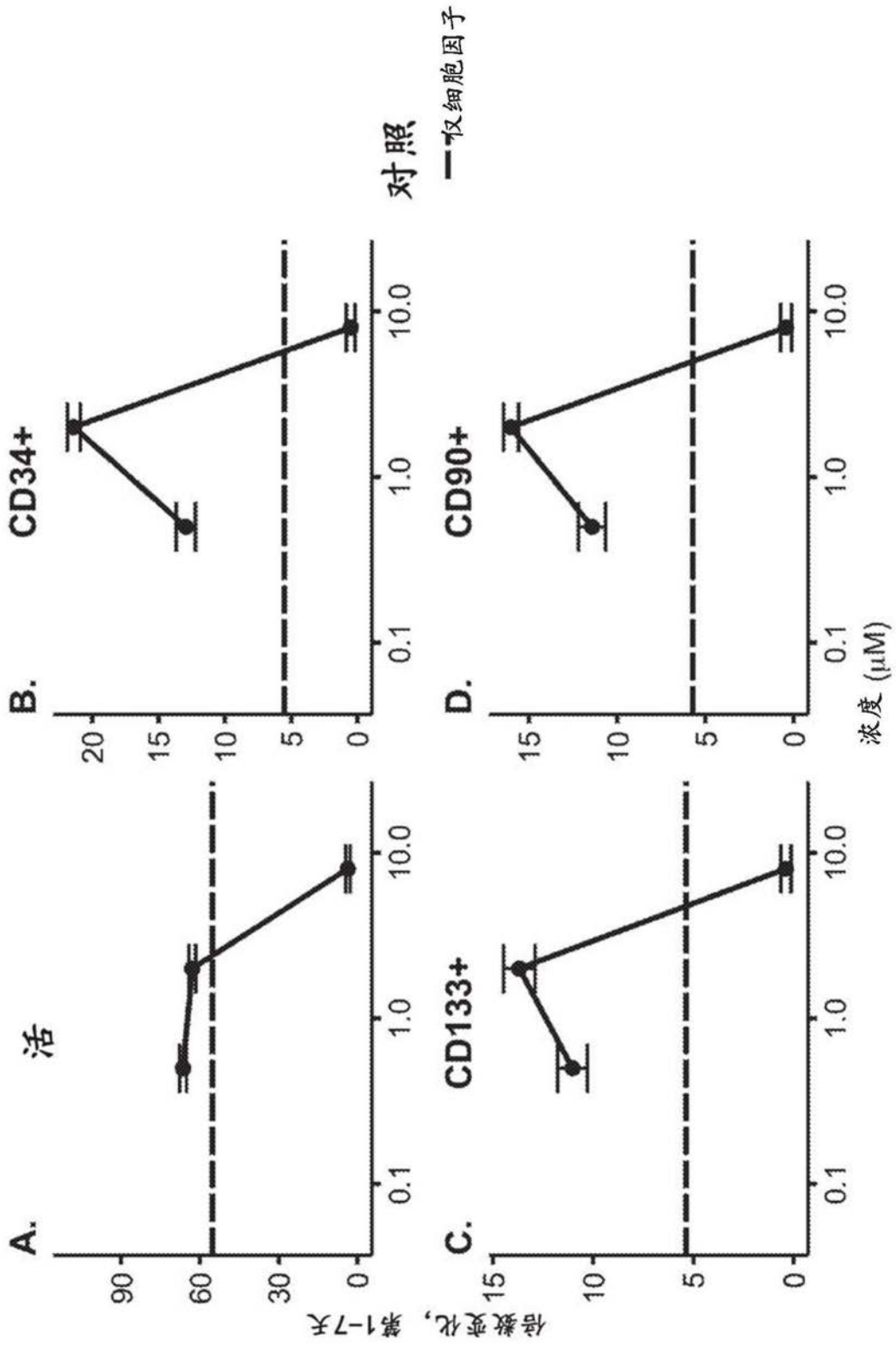


图32A-D

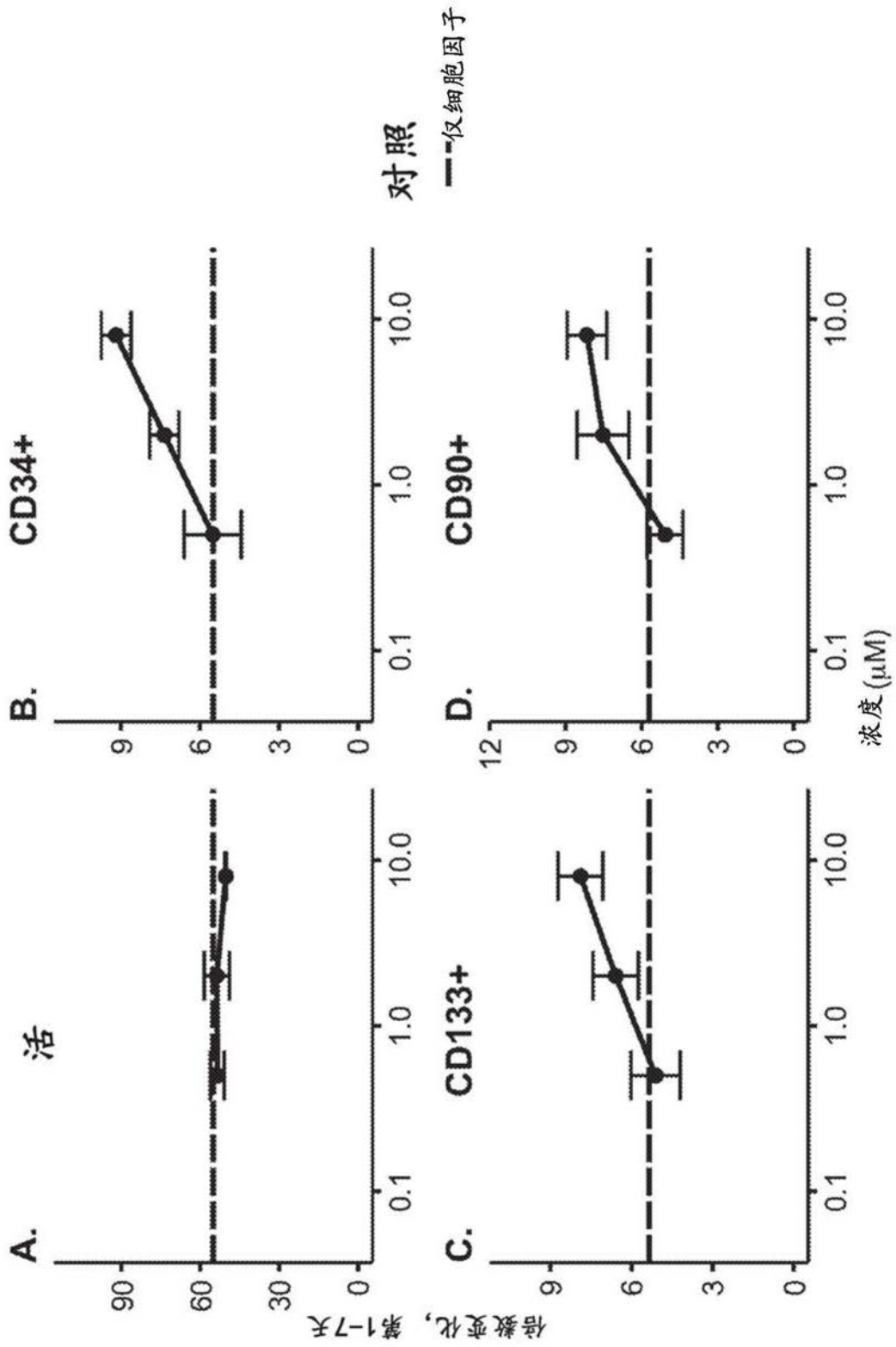


图33A-D

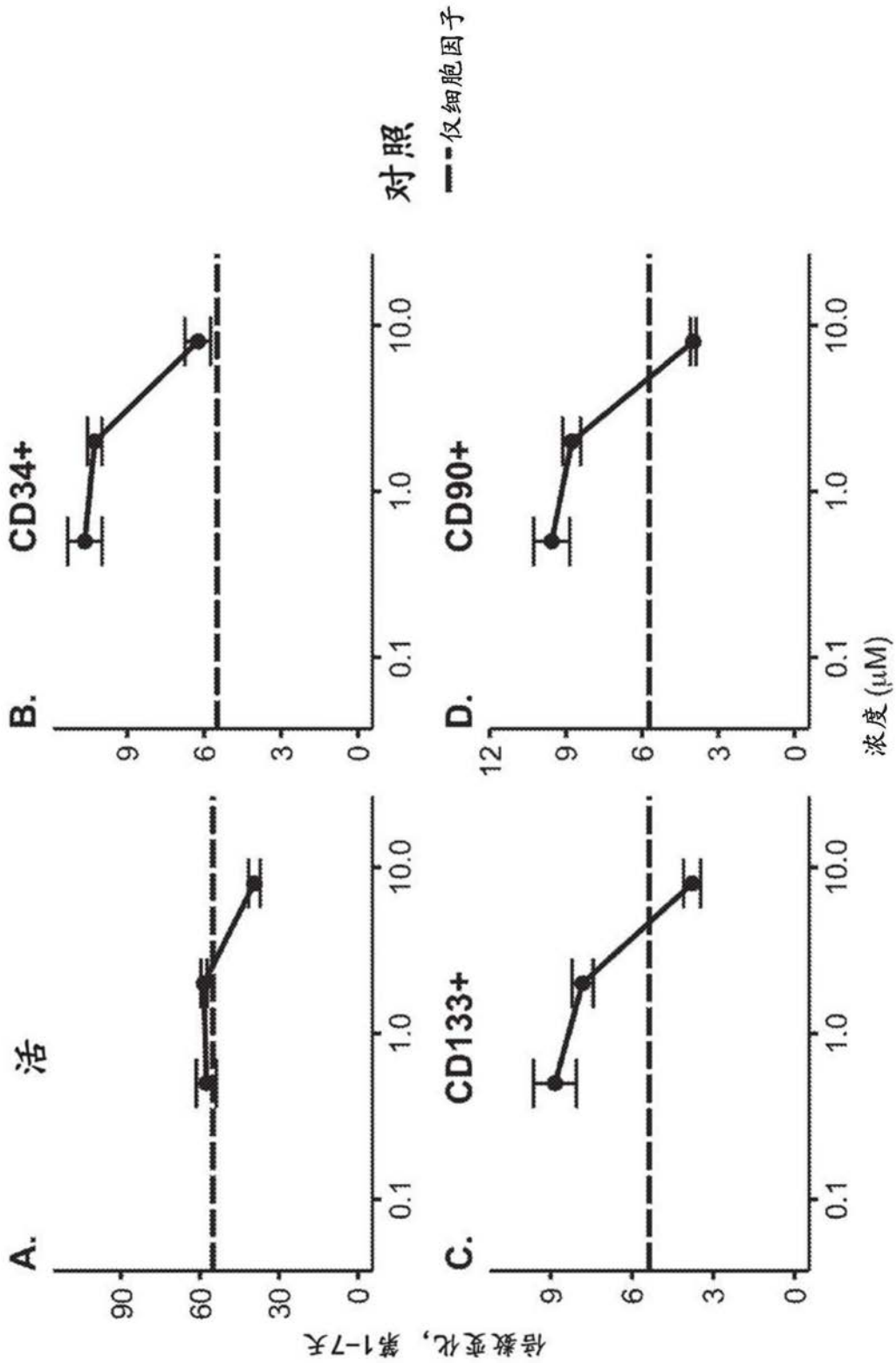


图34A-D

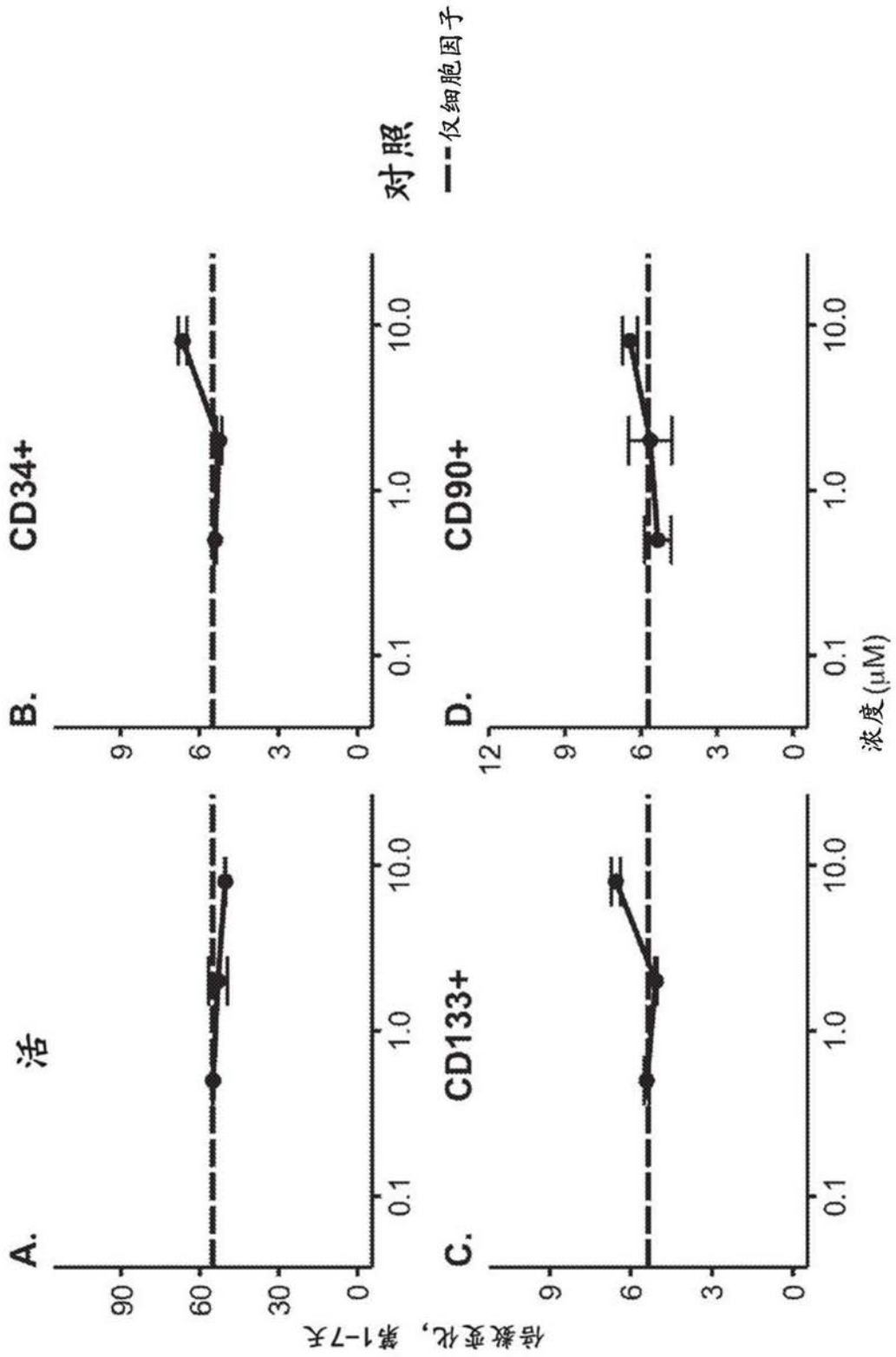


图35A-D

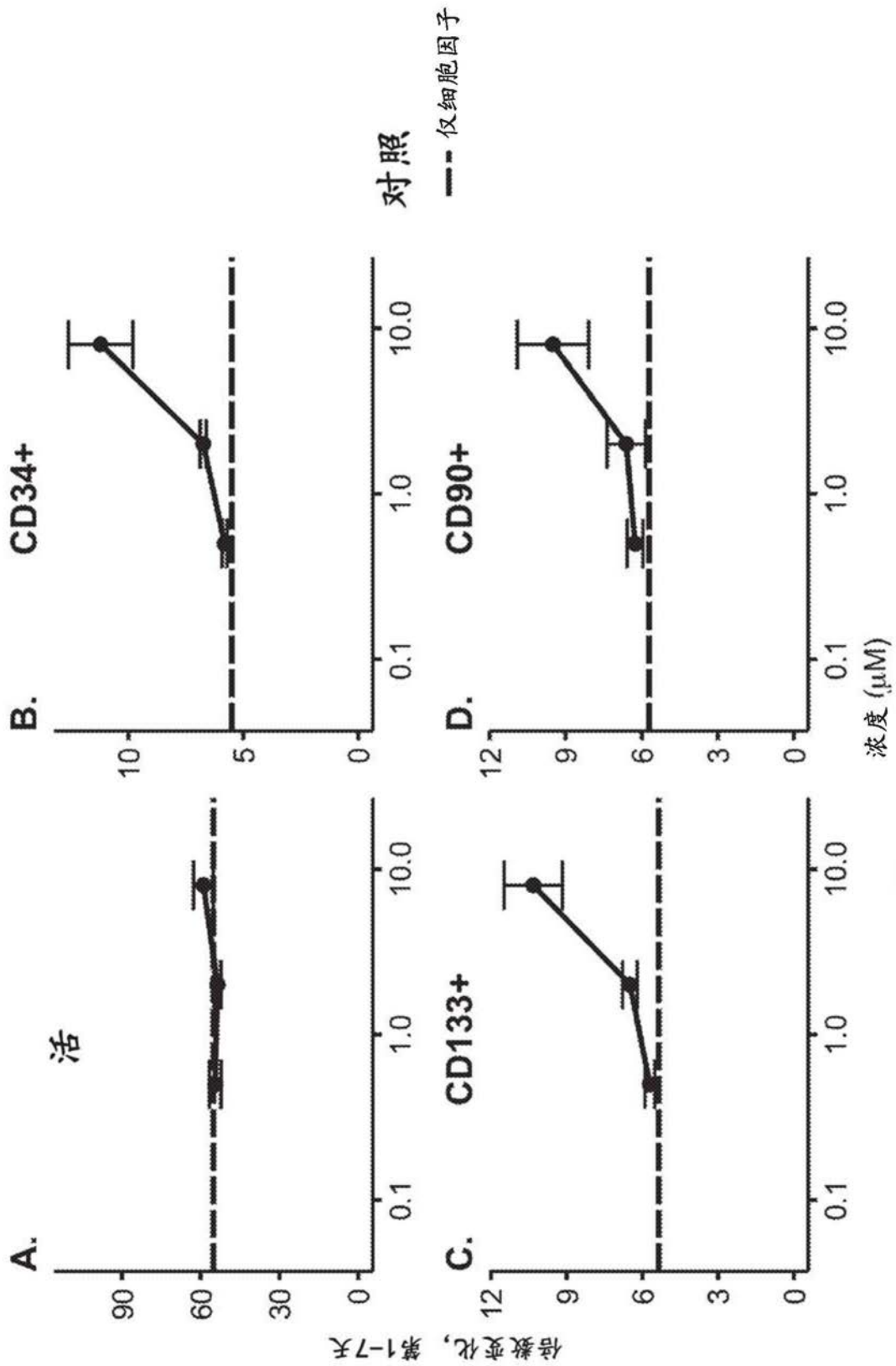


图36A-D

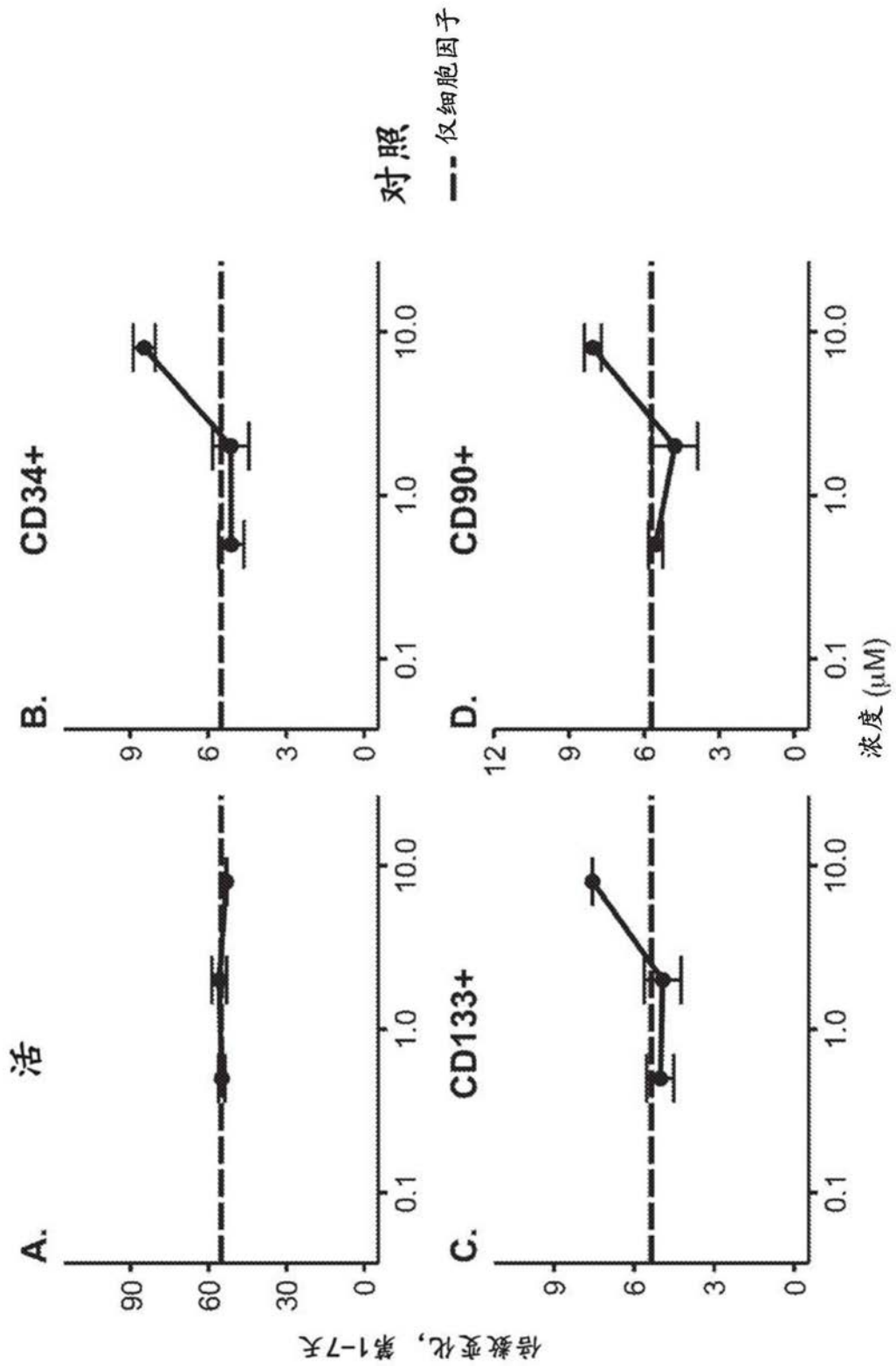


图37A-D

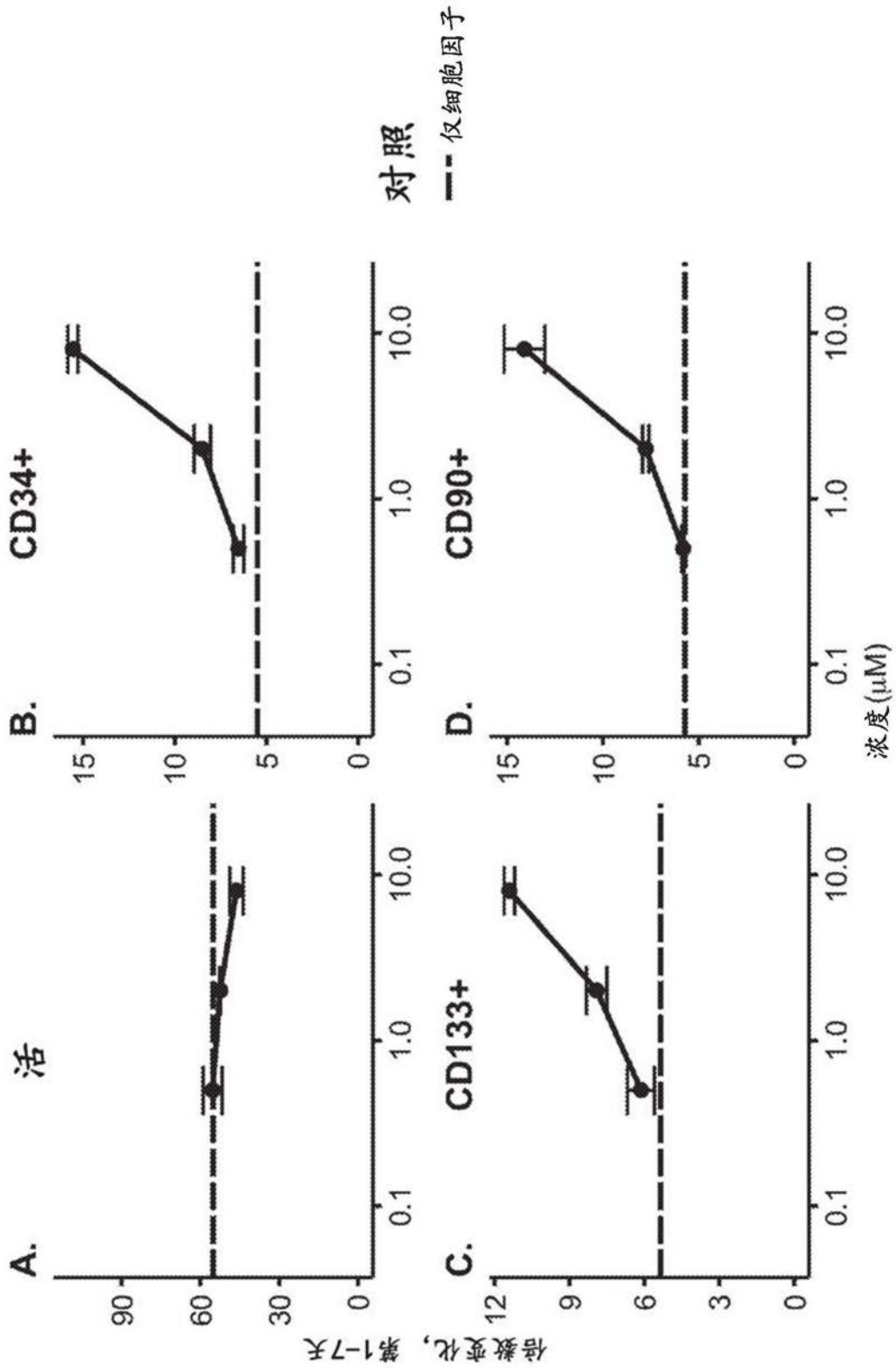


图38A-D

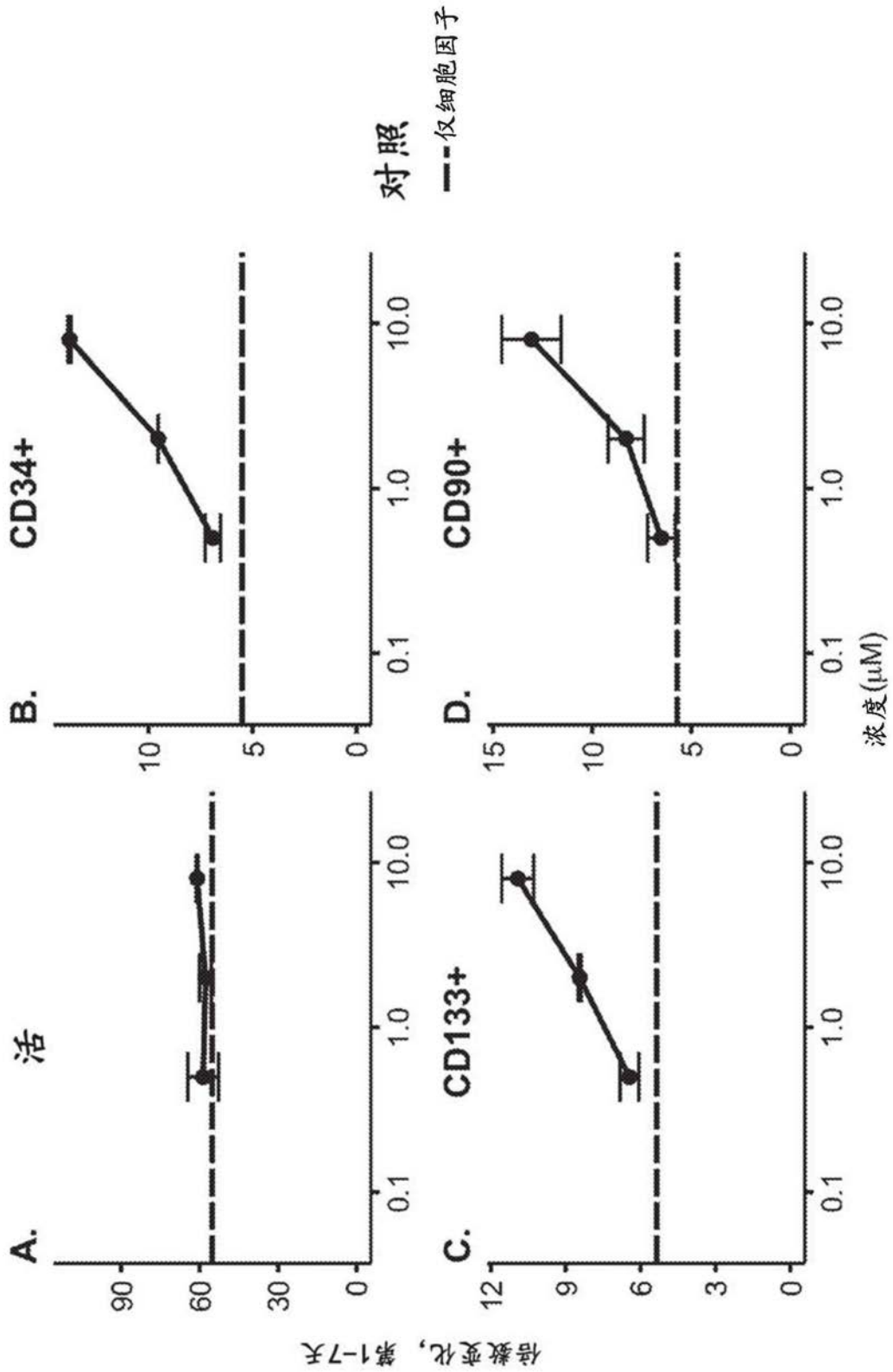


图39A-D

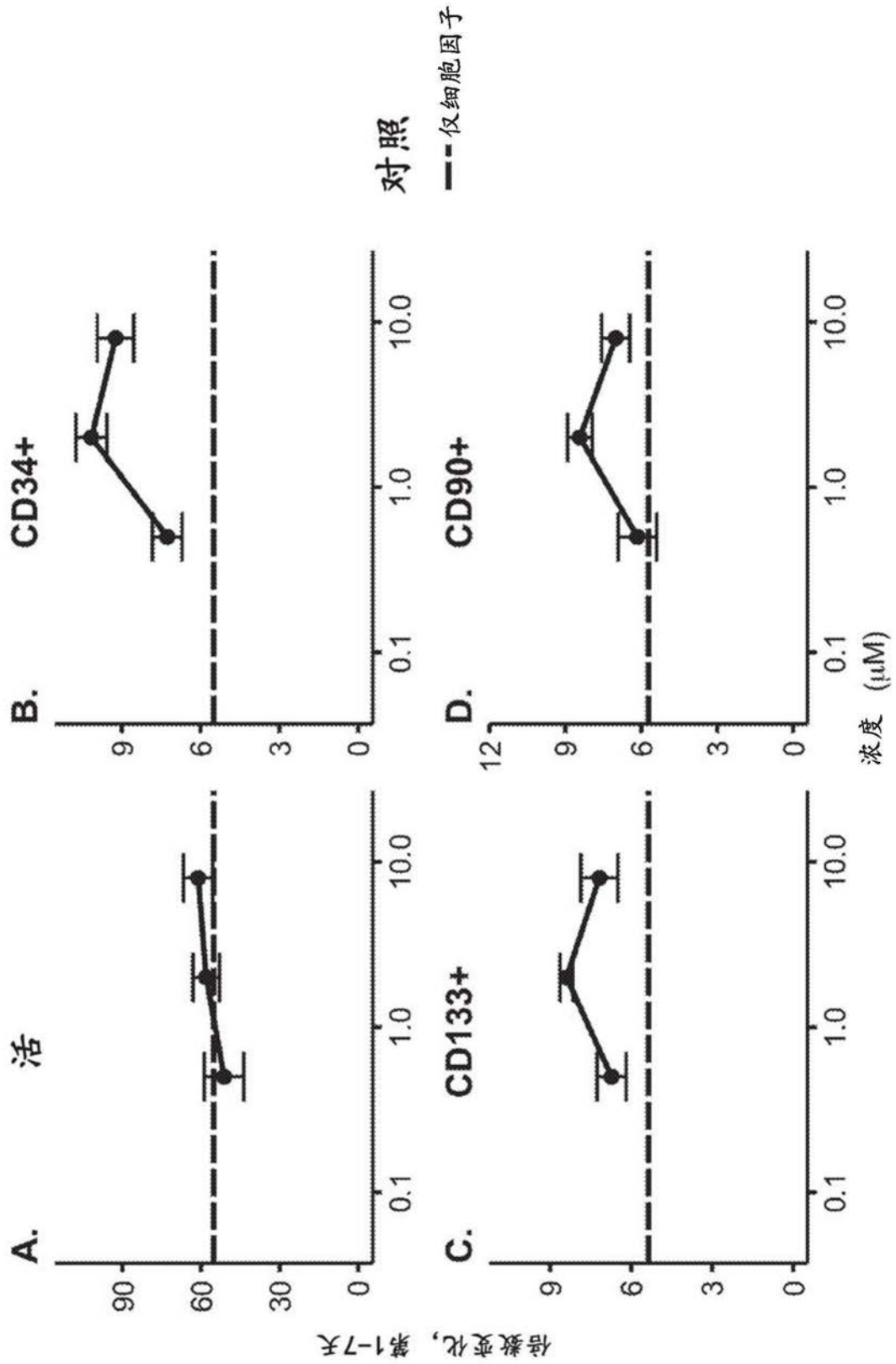


图40A-D

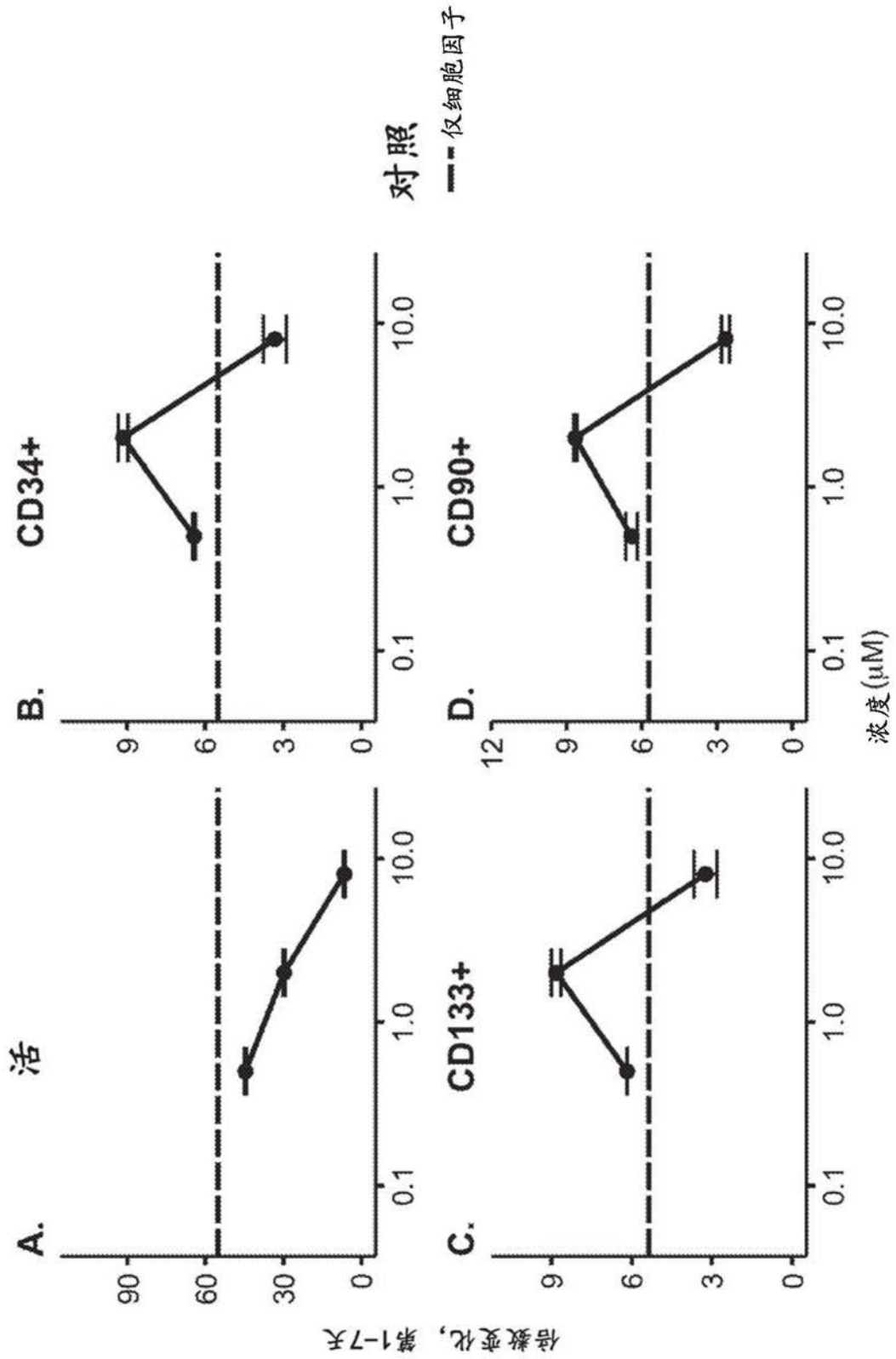


图41A-D

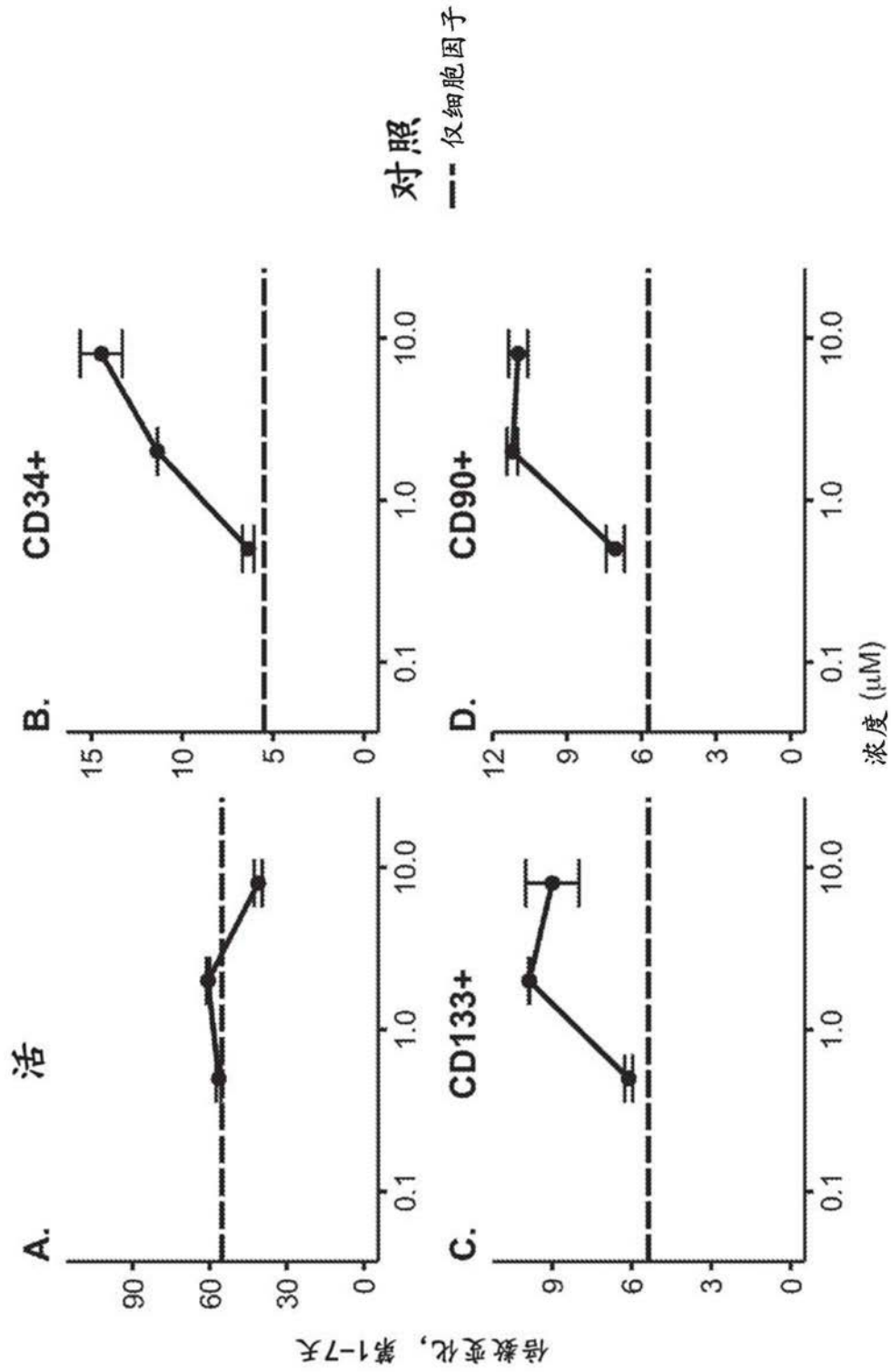


图42A-D

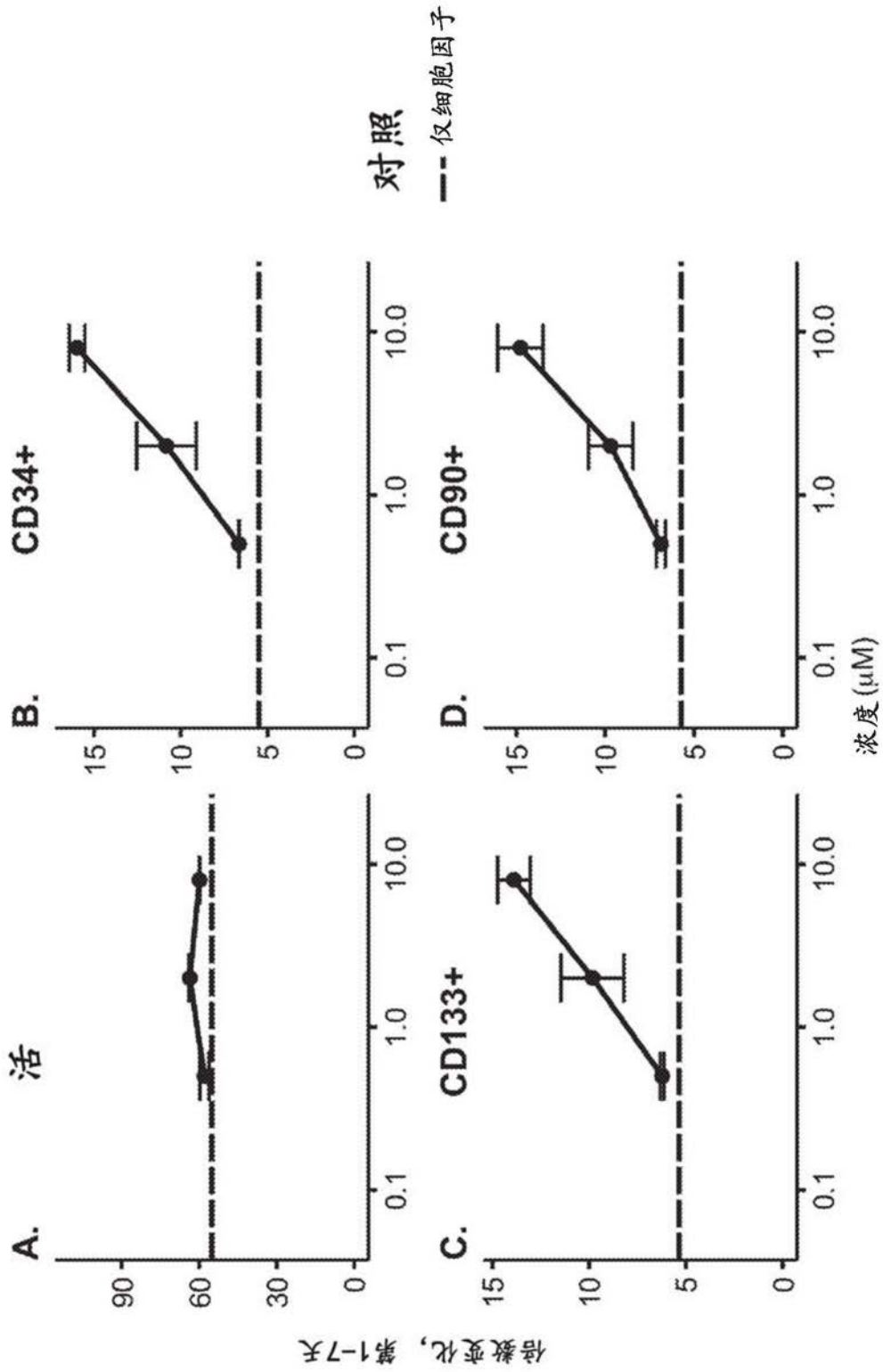


图43A-D

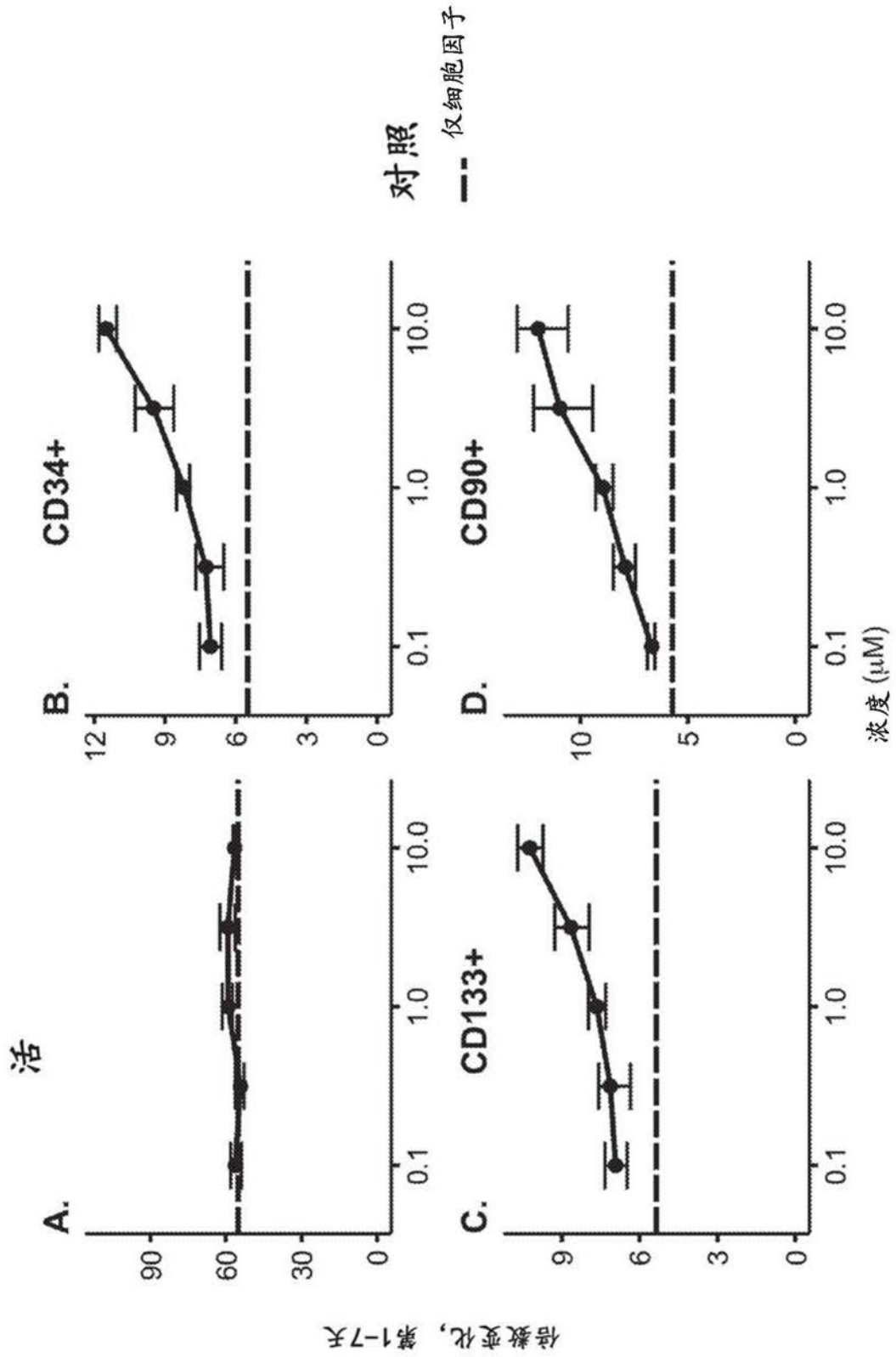


图44A-D

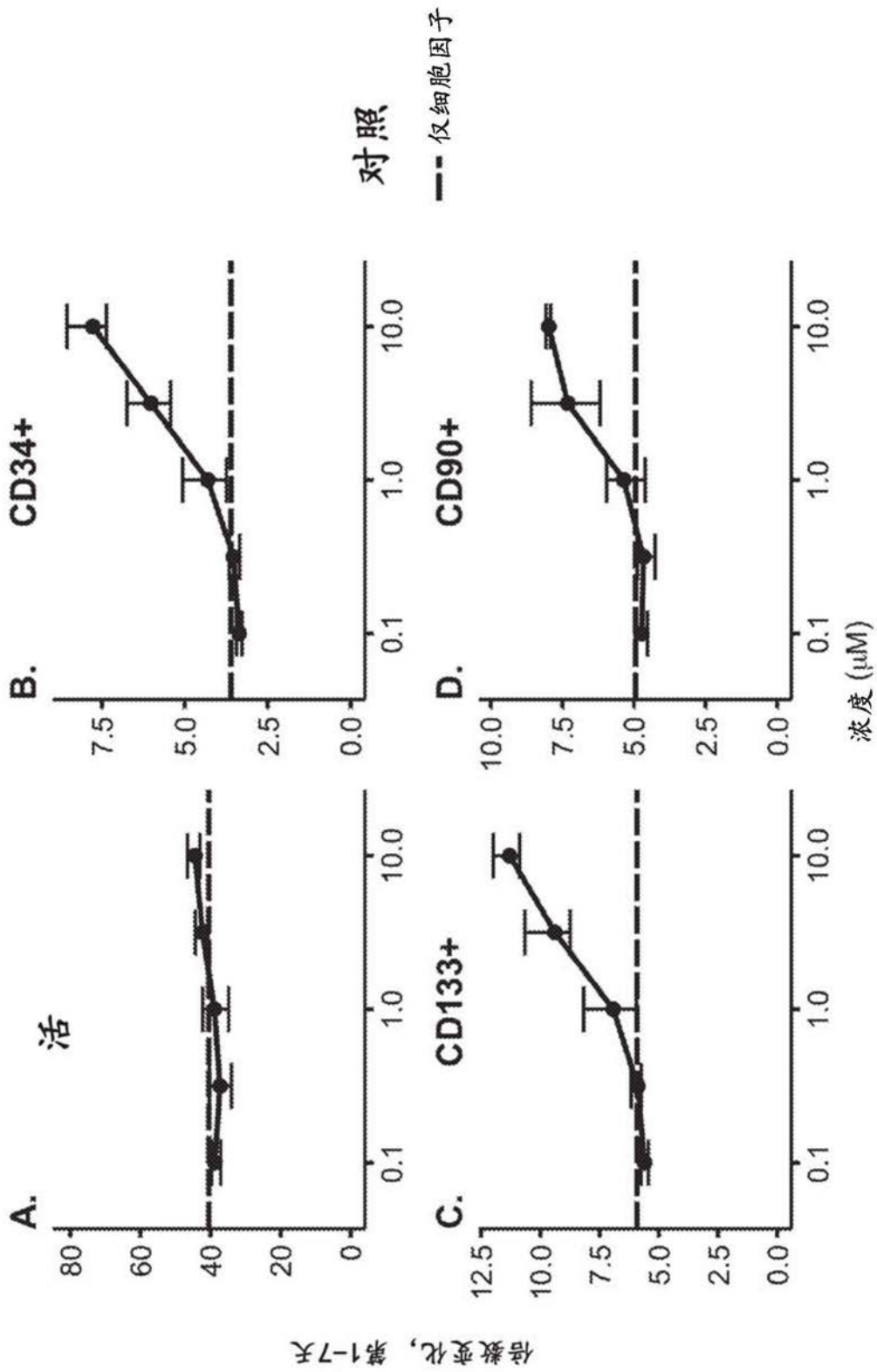


图45A-D

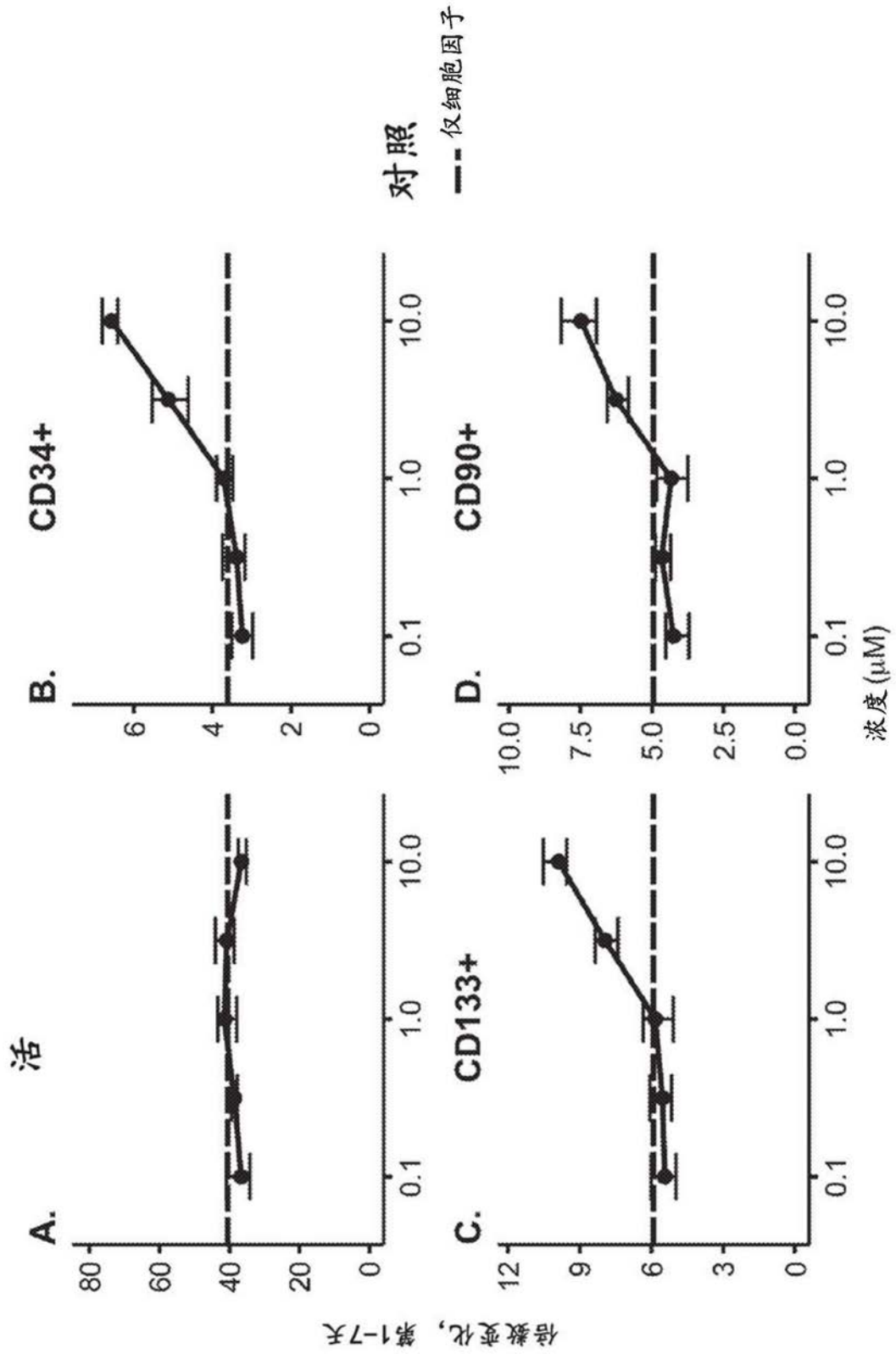


图46A-D

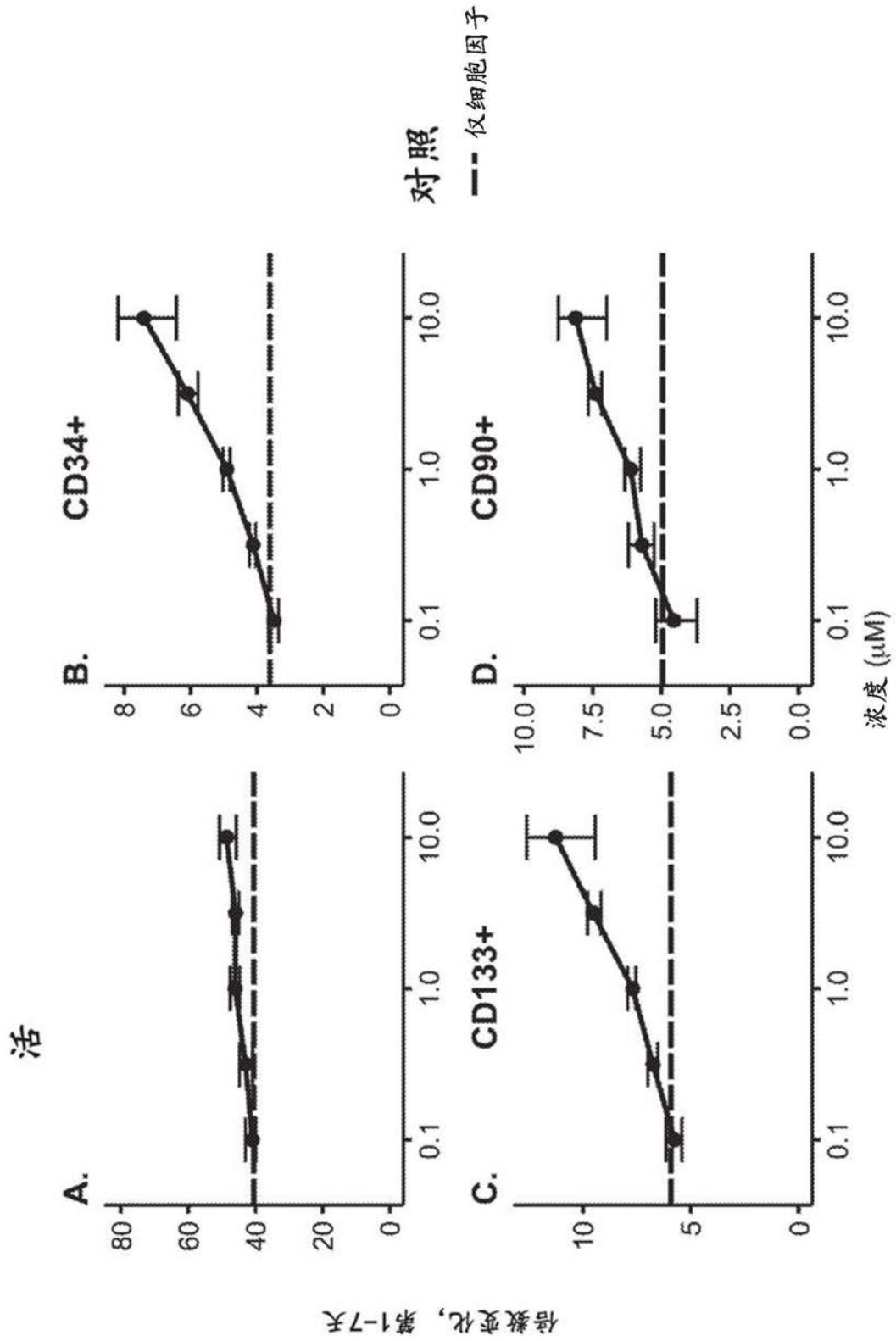


图47A-D

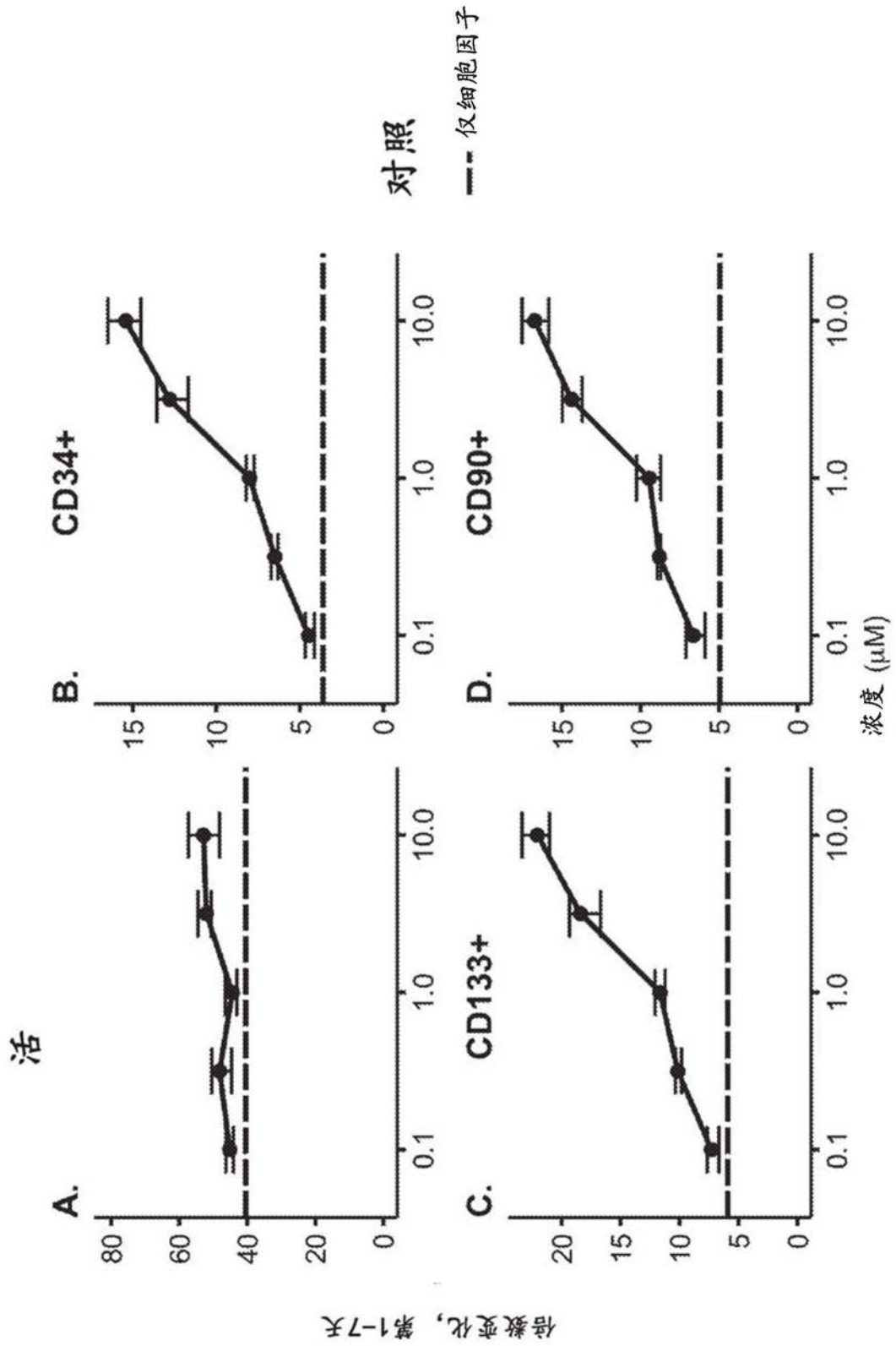


图48A-D

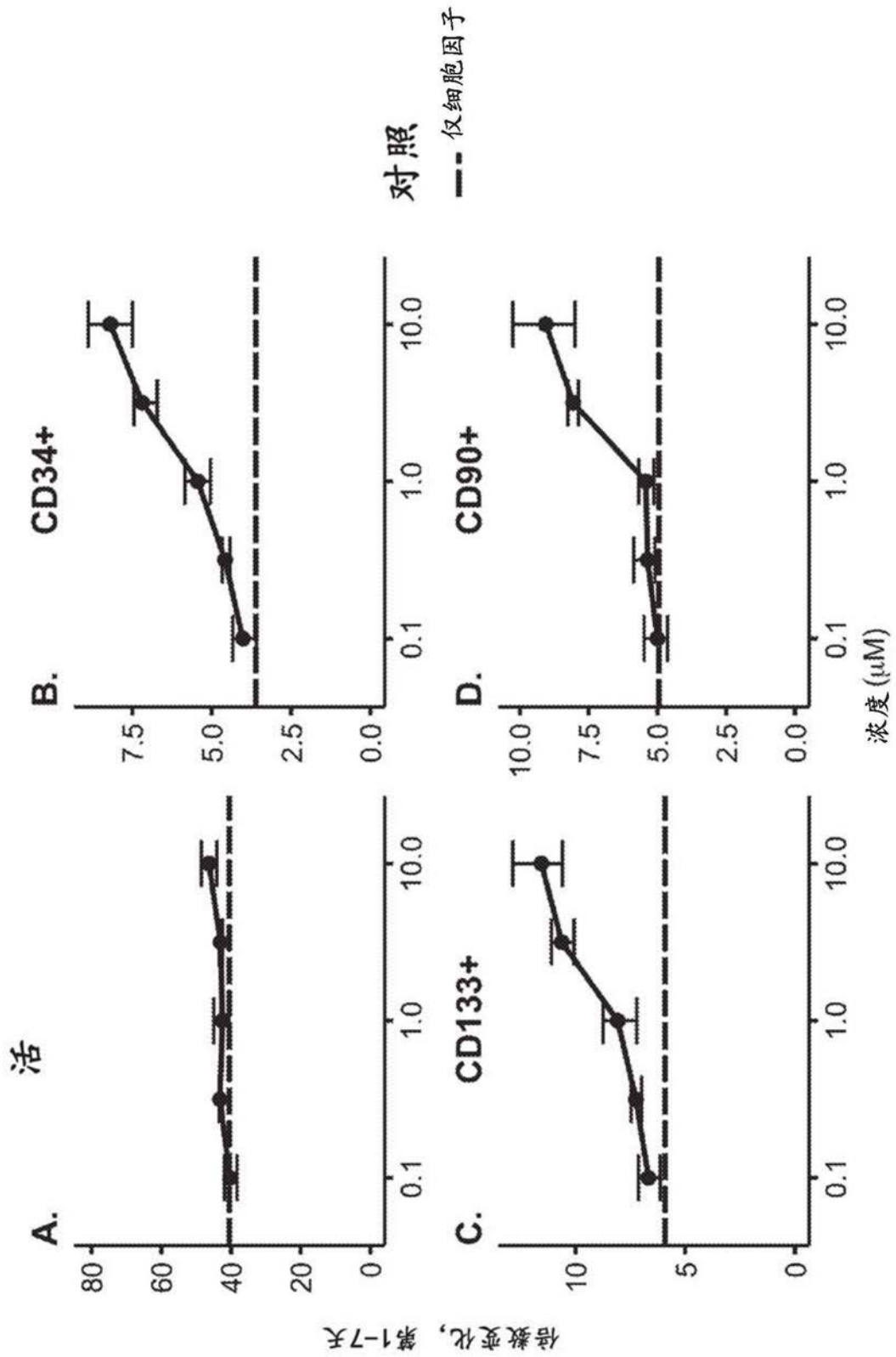


图49A-D

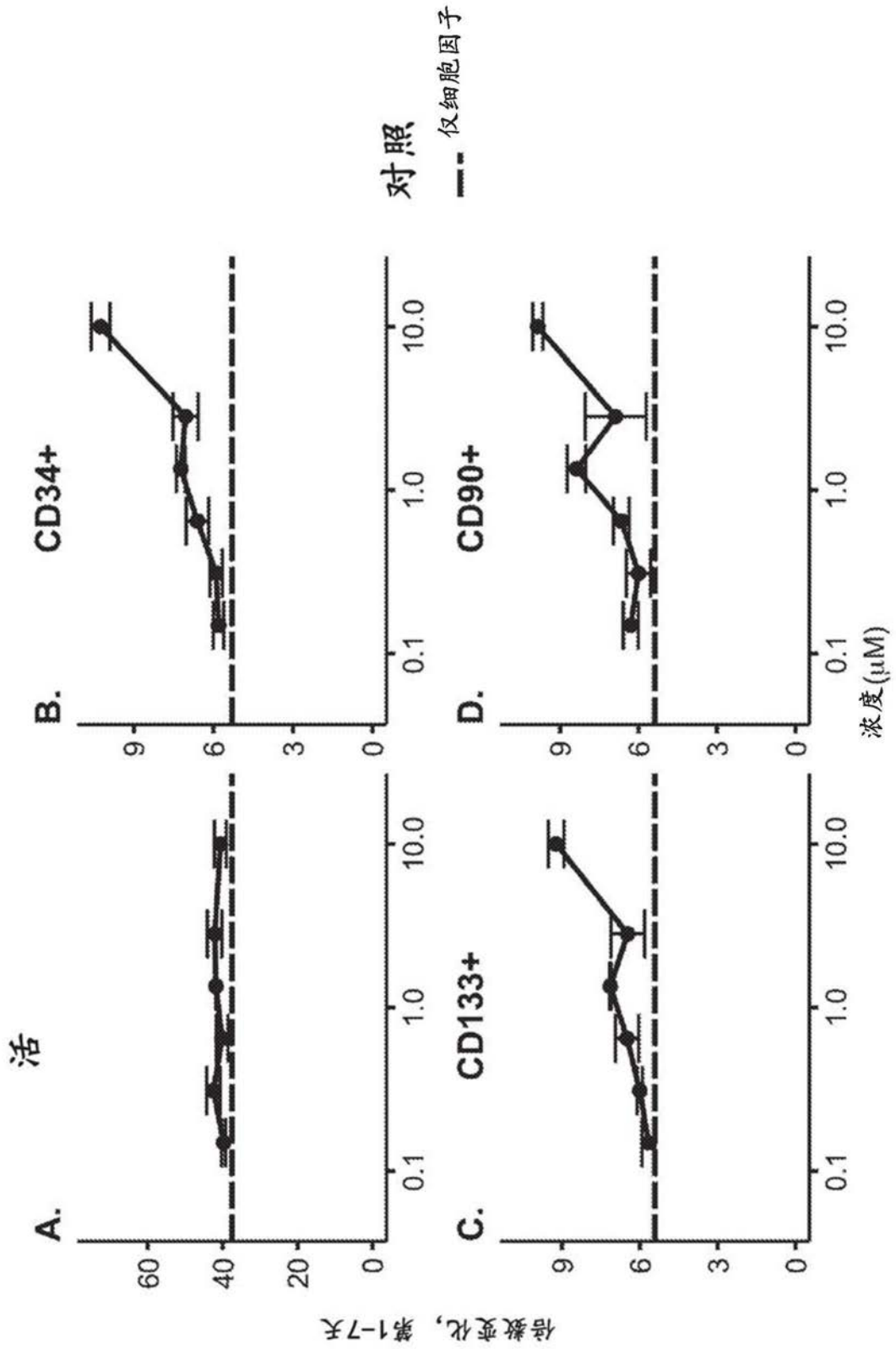


图50A-D

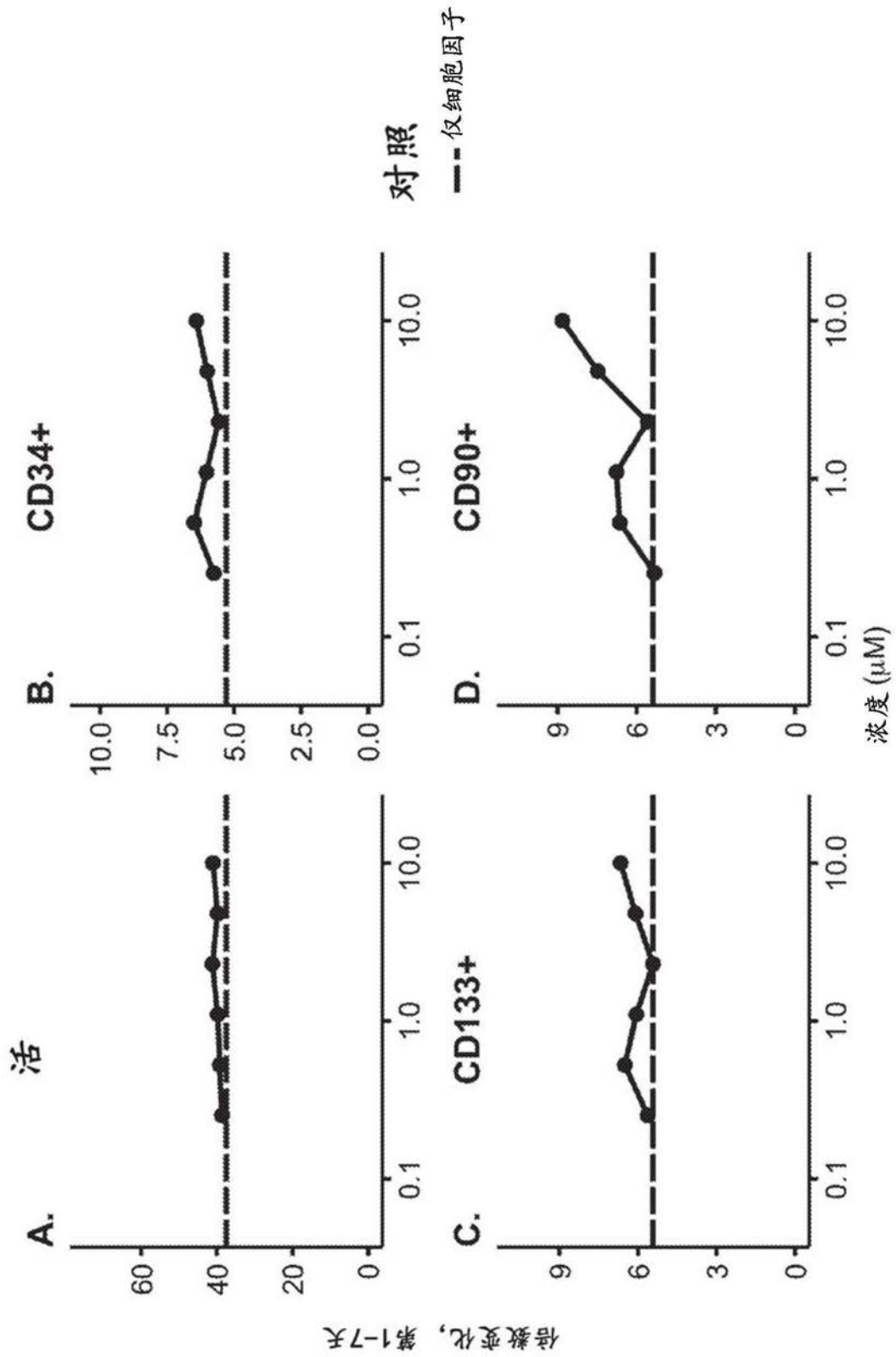


图51A-D

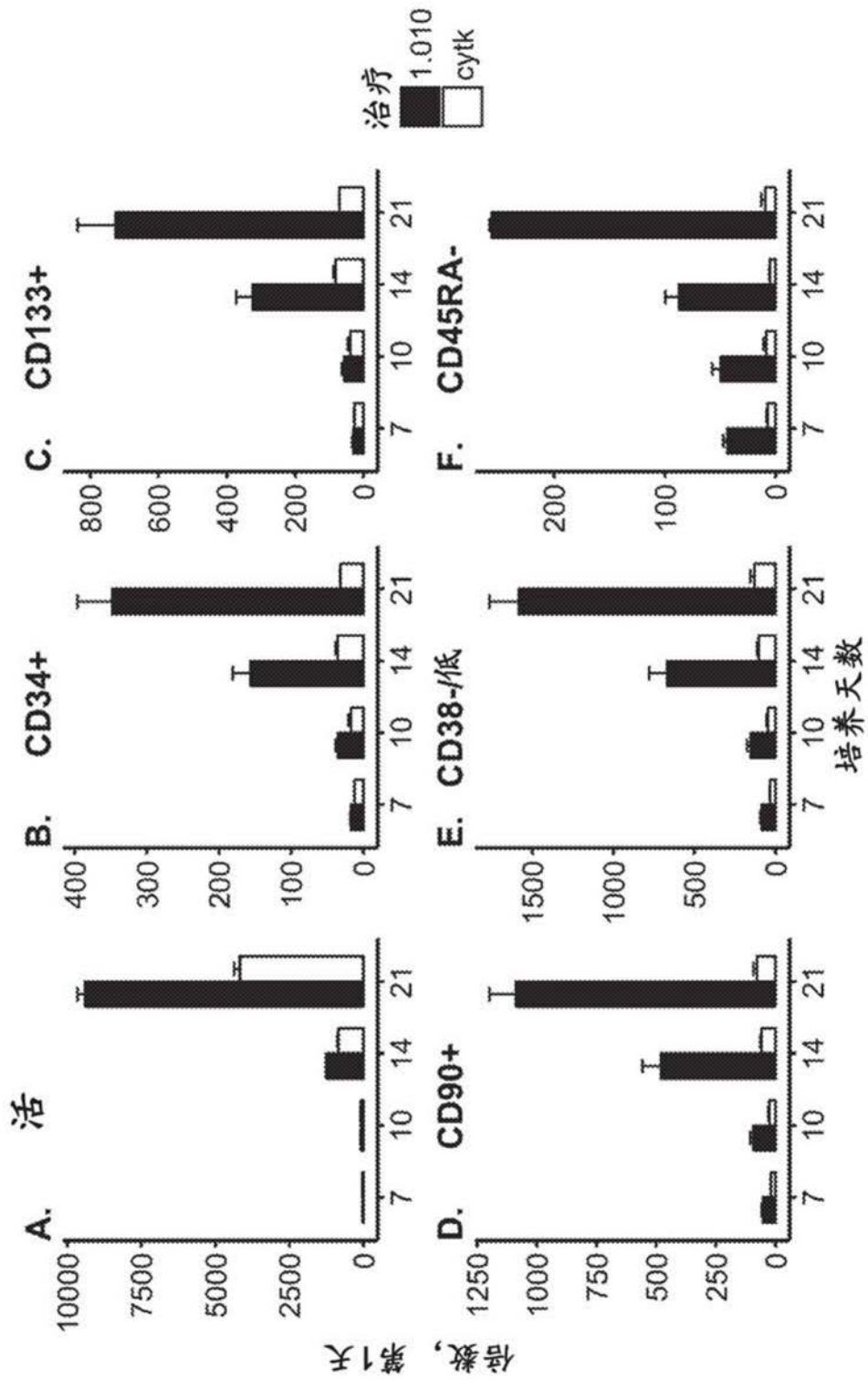


图52A-F

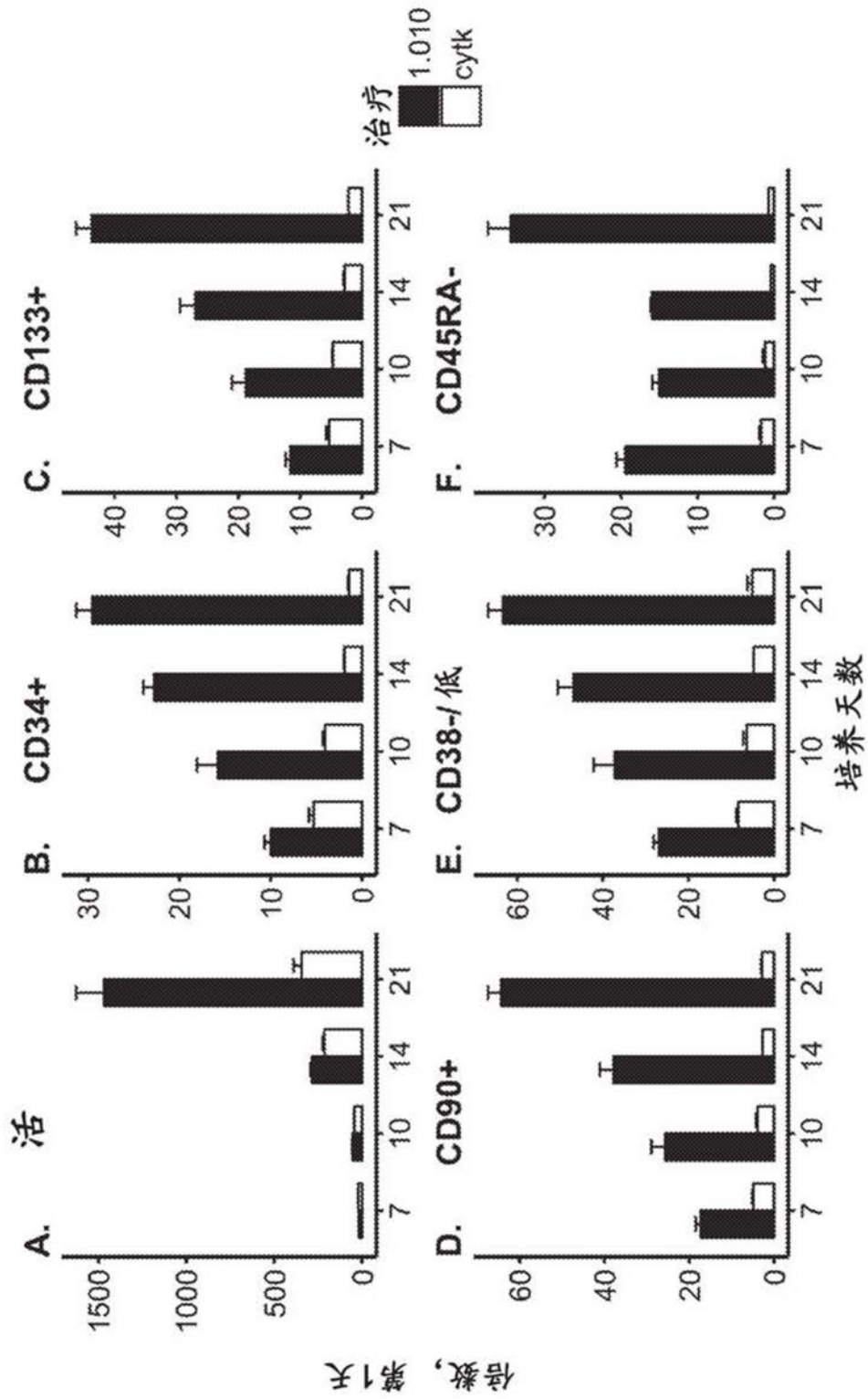


图53A-F

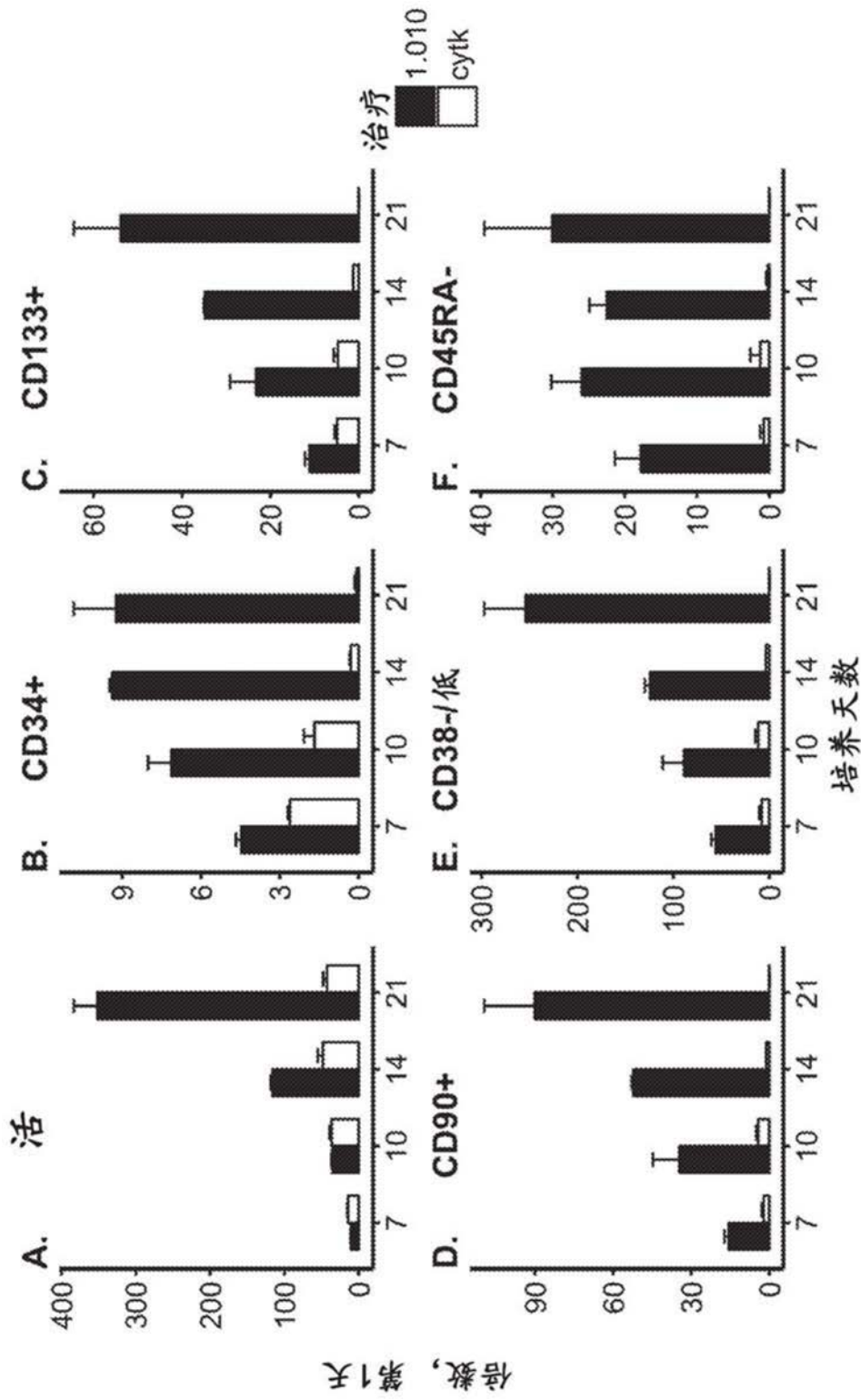


图54A-F

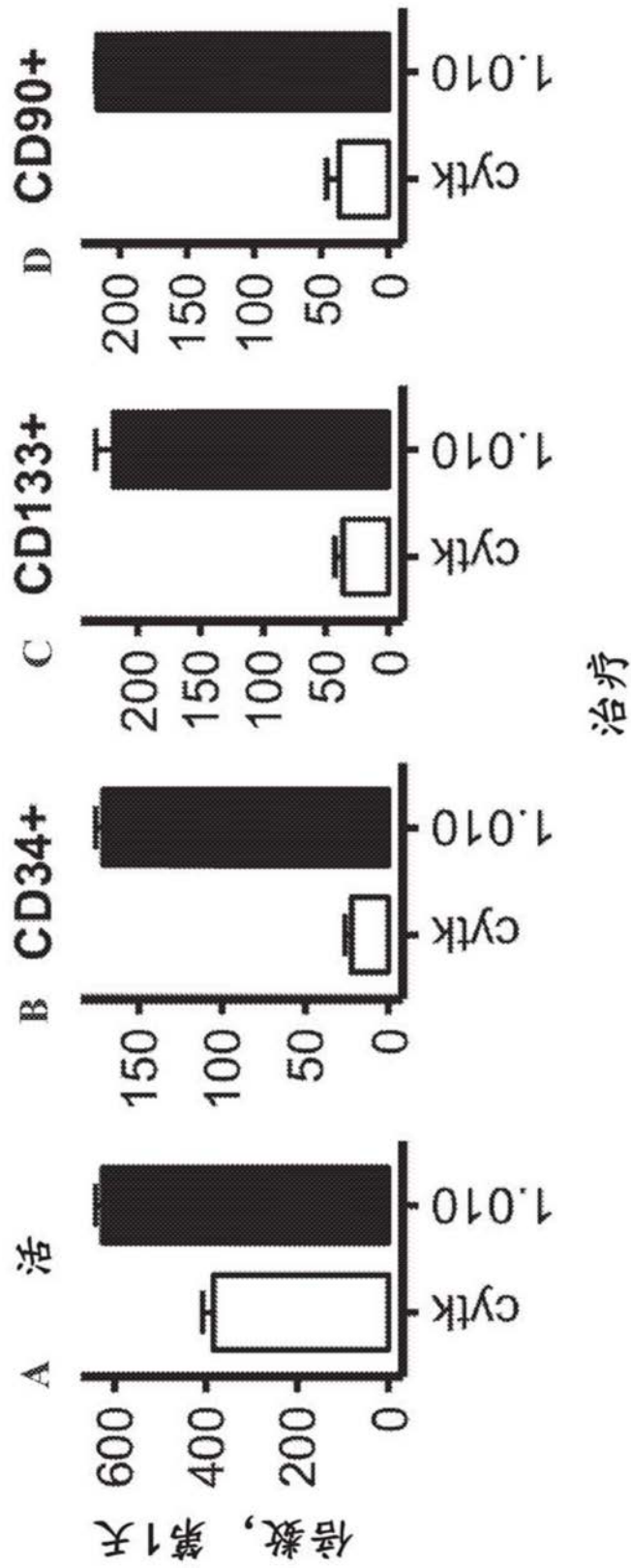


图55A-D