(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992571 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.02

(22) Дата подачи заявки
2018.04.26

(51) Int. Cl. ***C07D 487/04*** (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61K 35/30 (2015.01)
C12N 5/079 (2010.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(54) 6-6-КОНДЕНСИРОВАННЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОАРИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ LATS

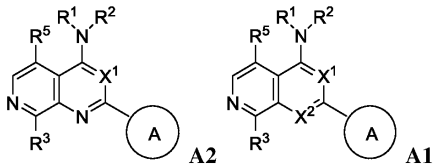
(31) **62/491,475; 62/491,484; 62/491,526; 62/491,573; 62/650,232**
(32) **2017.04.28; 2017.04.28; 2017.04.28; 2017.04.28; 2018.03.29**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2018/052919**
(87) **WO 2018/198077 2018.11.01**
(88) **2019.02.14**

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Бенке Дирк (CH), Беренштейн Фрада, Хао Сюэши, Хоффман Тимоти, Цзинь Цихой, Лакост Арно, Ли Камерон, Лю Цзюнь, Лю Яху (US), Майбаум Юрген Клаус (CH), Мо Тинтин, Пань Цзяньфэн, Цюй Синь (US), Тхож Ян (CH), Се Юнь Фэн, Янь Шаньшань, Цзоу Ефэнь (US)

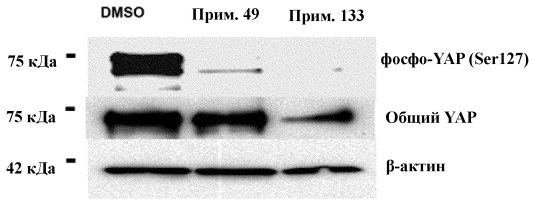
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к 6-6-конденсированным бициклическим гетероарильным соединениям формулы A2 или A1 и к их применению в качестве ингибиторов LATS или к их соли, стереоизомеру или фармацевтической композиции; где переменные определены в данном документе.



A2 A1

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу ингибирования LATS в популяции клеток с использованием соединения формулы A1 или его соли, стереоизомера или фармацевтической композиции. В настоящем изобретении дополнительно представлены способ изготовления соединений по настоящему изобретению и их терапевтические применения, способы их получения, их применение в медицине, их применение в лечении и контроле заболеваний или нарушений.



201992571 A1

201992571 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–558967EA/026

6–6–КОНДЕНСИРОВАННЫЕ БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОАРИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ LATS

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 23 апреля 2018 года, имеет название PAT057699–WO–PCT_SL.txt и ее размер составляет 35778 байт.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к ингибиторам LATS (большая киназа–опухолевый супрессор). Кроме того, настоящее изобретение относится к 6–6–конденсированным бициклическим гетероарильным соединениям и композициям, содержащим такие соединения.

Настоящее изобретение также относится к ex–vivo применению таких соединений для получения клеточного материала, предназначенного для клеточной терапии/трансплантации клеток. Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения увеличенной популяции клеток, как например, увеличенной популяции клеток глаза, например включающей лимбальные стволовые клетки (LSC) или роговичные эндотелиальные клетки (CEC), предусматривающим применение ингибитора LATS, а также популяции таких клеток, как клетки глаза, включающие, например, лимбальные стволовые клетки (LSC) или роговичные эндотелиальные клетки (CEC), и к препаратам, вариантам применения и способам терапии, предусматривающим указанные клетки.

Настоящее изобретение также относится к 6–6–конденсированным бициклическим гетероарильным соединениям, композициям, содержащим такие соединения, и к их применению в стимулировании заживления ран, в частности для лечения ожогов, острых и хронических кожных язв, в том числе трофических, диабетических и пролежневых язв, таких как варикозные язвы нижних конечностей, язвы, обусловленные синдромом диабетической стопы, пролежневые язвы.

Настоящее изобретение дополнительно относится к 6–6–конденсированным бициклическим гетероарильным соединениям, композициям, содержащим такие соединения, и их применению в регенерации печени и компенсаторном росте печени, а также в предупреждении повреждения и в поддержании или улучшении функции органов ex–vivo с перфузионными устройствами или без них.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Восстановление и/или заживление органа представляет собой проблему, являющуюся ключевой при лечении множества серьезных проблем со здоровьем.

Например, в отношении глаза известно, что роговичная слепота представляет собой третью в мире основную причину, вызывающую слепоту. Примерно половину из

всех трансплантаций роговицы в мире проводят для лечения нарушения функции эндотелия роговицы.

Роговица представляет собой прозрачную ткань, содержащую различные слои: эпителий роговицы, боуменову оболочку, строму, десцеметову оболочку и эндотелий. Эндотелий роговицы также содержит монослой роговичных эндотелиальных клеток человека и помогает поддерживать прозрачность роговицы за счет его барьерной функции и функции ионного насоса. Это играет важную роль в поддержании баланса жидкости, питательных веществ и солей между стромой роговицы и внутриглазной жидкостью. Для поддержания прозрачности плотность эндотелиальных клеток должна быть постоянной, однако плотность эндотелиальных клеток может быть значительно снижена в результате травмы, заболевания или эндотелиальных дистрофий. Плотность клеток также снижается с возрастом. Эндотелий роговицы человека имеет ограниченную склонность к пролиферации in vivo. Если плотность клеток станет слишком низкой, барьерная функция может быть нарушена. Потеря барьерной функции эндотелия приводит к отеку роговой оболочки глаза и потере остроты зрения. Клиническое состояние, представляющее собой буллезную кератопатию, может быть одним из возникающих осложнений.

В настоящее время единственным способом лечения слепоты обусловленной, нарушением функции эндотелия роговицы, является трансплантации роговицы. Хотя трансплантация роговицы является одной из наиболее распространенных форм трансплантации органов, доступность требуемой донорской роговицы существенно ограничена. В результате глобального исследования в 2012–2013 годах была определена значительная нехватка роговичного трансплантата, обнаружив, что лишь одна роговица доступна в каждых 70 необходимых случаев (Gain at el., (2016) Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. JAMA Ophthalmol. 134:167–173).

Таким образом, особенно требуются терапевтические подходы для обеспечения роговичными эндотелиальными клетками, предназначенными для лечения нарушения функции эндотелия роговицы.

Также необходима обеспечение функционирования эпителия роговицы в глазу. Эпителий роговицы состоит из слоя базальных клеток и нескольких слоев многослойного плоского неороговевающего эпителия. Он является важным в поддержании состояния прозрачности и нормальной преломляющей поверхности роговицы. Он выполняет функцию прозрачного, возобновляемого защитного слоя над стромой роговицы и обновляется за счет популяции стволовых клеток, расположенных в лимбе роговицы. При дефиците лимбальных стволовых клеток состояние, при котором лимбальные стволовые клетки поражены или отсутствуют, уменьшение количества здоровых лимбальных стволовых клеток приводят к ухудшению способности к регенерации эпителия роговицы.

Дефицит лимбальных стволовых клеток может возникнуть в результате повреждений вследствие химических или термических ожогов, воздействия ультрафиолетового и ионизирующего излучений или даже в результате ношения контактных линз; генетических нарушений, таких как аниридия, и иммунных нарушений,

таких как синдром Стивенса–Джонсона и глазной рубцующийся пемфигоид. Потеря лимбальных стволовых клеток может быть частичной или полной; и может быть односторонней или двухсторонней. Симптомы дефицита лимбальных стволовых клеток включают боль, светобоязнь, незаживающие болезненные дефекты эпителия роговицы, роговичную неоваскуляризацию, замещение эпителия роговицы конъюнктивальным эпителием, потерю прозрачности роговицы и ухудшение зрения, что в конечном итоге может привести к слепоте.

Продукт для применения в лечении дефицита лимбальных стволовых клеток получил условное регистрационное удостоверение в Европейском Союзе в 2015 году (под названием Holoclar®), что делает его первым лекарственным препаратом для передовой терапии (ATMP) в Европе, содержащим стволовые клетки. Holoclar представляет собой препарат на основе аутологичных клеток эпителия роговицы человека, количество которых было увеличено ex vivo, содержащий стволовые клетки. Осуществляют биопсию здоровой лимбальной ткани у пациента, увеличивают количество клеток образца ex vivo и замораживают до проведения хирургического вмешательства. Для введения пациенту размороженные клетки выращивают на мембране, содержащей фибрин, а затем хирургическим путем имплантируют в глаз пациента. Терапия предназначена для применения у взрослых с дефицитом лимбальных стволовых клеток средней и тяжелой степени, возникшим вследствие физических или химических ожогов глаза. (Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. (2010) Limbal stem–cell therapy and long–term corneal regeneration. N Engl J Med. 363:147–155). Однако данный способ ограничен тем, что он предназначен только для аутологичного применения и требуется достаточного количества выживших клеток лимба роговицы в одном глазу, чтобы можно было извлечь у пациента как минимум 1–2 квадратных миллиметра неповрежденной ткани. Также существует риск того, что для каждого конкретного пациента культура его/ее клеток может быть неэффективной и пациент не может получить данный вид лечения. Кроме того, также применяют клетки–фидеры мышиного происхождения для получения клеточного препарата Holoclar, что вызывает потенциальные опасения в отношении безопасности из–за риска передачи заболевания и потенциальной иммуногенности препарата при применении у людей. Более того, клеточный препарат Holoclar содержит только примерно 5% лимбальных стволовых клеток, что определено с помощью окрашивания p63–альфа.

Таким образом, крайне необходимы новые терапевтические подходы для обеспечения лимбальными стволовыми клетками для лечения дефицита лимбальных стволовых клеток.

Функциональное восстановление печени в ходе гомеостаза и при болезненных состояниях является очень важным для поддержания ключевых физиологических процессов. Несмотря на заметный потенциал печени к регенерации, данный процесс может быть нарушен вследствие тяжелого острого или хронического повреждения печени. Повреждение печени и нарушение восстановления печени часто приводят к

высокой заболеваемости и смертности, и, следовательно, требуют жизненно необходимой трансплантации печени. К сожалению, потребность в трансплантатах печени в настоящее время значительно превышает поступление доступных донорских органов. В результате множество пациентов продолжают умирать в ожидании жизненно важного трансплантата. Применение предварительно разделенного трансплантата печени от мертвых доноров или трансплантатов части печени от живых доноров ограничено размерами трансплантата. Трансплантация части печени, которая характеризуется несоответствующим соотношением по весу трансплантата и реципиента (GRWR), увеличивает частоту возникновения нарушения функции и отторжения трансплантата. Виды терапии, которые повышают компенсаторный рост печени, могут обеспечивать возможность трансплантации части печени, которая в ином случае считалась бы неподходящей для трансплантации из–за своего размера. В качестве альтернативы регенерация печени за счет ингибирования гибели клеток печени, улучшение функции печени и восстановление нарушенной структуры печени может нормализовать функцию печени, предупреждая необходимость в трансплантации (Forbes SJ and Newsome PN (2016) Liver regeneration – mechanisms and models to clinical application. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 13(8):473–485; Dutkowski P, Linecker M, DeOliveira ML, Müllhaupt B, Clavien PA (2015) Challenges to Liver Transplantation and Strategies to Improve Outcomes. Gastroenterology, 148(2):307–323).

Следовательно, сохраняется насущная необходимость в более эффективных терапевтических средствах для стимуляции компенсаторного роста печени.

Хронические кожные язвы, в том числе трофические, диабетические и пролежневые язвы, представляют собой важнейшую проблему для общественного здравоохранения. Повышенная потребность в лечении ран отражена в ассоциации ран с сопутствующими заболеваниями, повышенной смертностью и качеством жизни пациента (Demidova–Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. Advances in skin & wound care 25(7):304–314; Demidova–Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. Advances in skin & wound care 25(8):349–370). Затраты на медицинское обслуживание пациентов с хроническими ранами составляют приблизительно 25 миллиардов долларов ежегодно только в США. С момента одобрения Regranex (PDGF) в 1997 году, который имеет ограниченную эффективность, в FDA не одобрили каких–либо новых химических средств (Eaglstein WH, Kirsner RS, & Robson MC (2012) Food and Drug Administration (FDA) drug approval end points for chronic cutaneous ulcer studies. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 20(6):793–796). По сути, факторы роста не являются устойчивыми в протеолитической среде раневой поверхности. Эффективность терапии факторами роста также может ухудшаться

вследствие низкой экспрессии соответствующих рецепторов в ранах, что продемонстрировано в клинических образцах от пациентов (Demidova–Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. Advances in skin & wound care 25(8):349–370).

Следовательно, сохраняется насущная необходимость в более эффективных терапевтических средствах для стимулирования заживления ран у пациентов с хроническими ранами.

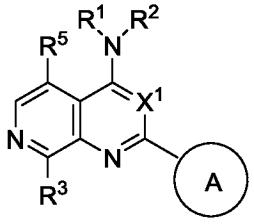
Таким образом, крайне необходимы новые терапевтические подходы для стимулирования пролиферации клеток при состояниях, влияющих на ряд органов во всем организме, на такие как глаза, печень и кожа.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к соединениям, их солям и их композициям, где соединения представляют собой ингибиторы LATS (большая киназа–опухолевый супрессор). Такие соединения применяются в видах терапии состояний и целей, подробно описанных выше.

Различные аспекты настоящего изобретения описаны в данном документе.

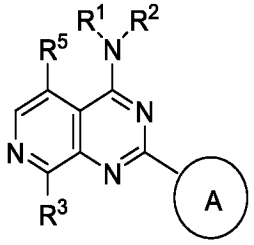
Настоящее изобретение относится к соединению формулы A2 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомеру,

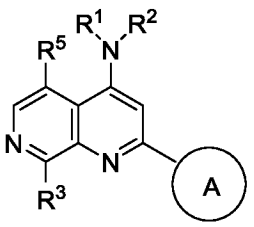


A2,

где X^1, кольцо A, R^1, R^2, R^3 и R^5 определены в подробном описании ниже.

В предпочтительном варианте осуществления соединение представляет собой соединение в соответствии с формулой I или формулой II или их подформулой или его соль:



I или


II,

где кольцо A, R^1, R^2, R^3 и R^5 определены в подробном описании ниже.

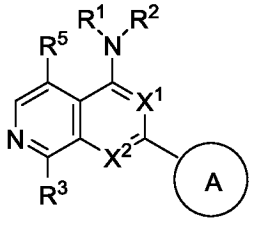
В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения, соответствующего определению формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли или ее подформул и один или несколько

фармацевтически приемлемых носителей.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинации, в частности, фармацевтической комбинации, содержащей терапевтически эффективное количество соединения, соответствующего определению формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли и одно или несколько терапевтически активных средств.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, которые можно применять в терапии.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования LATS в клетке или популяции клеток с использованием соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера:



A1,

где X^1, X^2, кольцо A, R^1, R^2, R^3 и R^5 определены в подробном описании ниже. Предпочтительно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В конкретном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением соединение или его соль выбраны из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина. В другом конкретном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением соединение или его соль выбраны из N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования LATS в популяции клеток глаза с использованием соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера. В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования LATS в популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, с использованием соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибирования LATS в популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, с использованием соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера.

Также предпочтительно способ ингибирования LATS в популяции клеток осуществляют ex vivo. В еще одном предпочтительном варианте осуществления указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от

0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль. В одном предпочтительном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, соединение присутствует в течение 12–16 дней, в частности предпочтительно соединение присутствует в течение 14 дней. В другом варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, данное соединение присутствует в течение одной – двух недель, а затем клетки культивируют в течение некоторого периода время в питательной среде без дополнения указанным соединением, где предпочтительно указанный период времени составляет одну – две недели. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в способе ингибирования LATS в популяции клеток ингибитор LATS ингибирует LATS1 или LATS2 или LATS1 и LATS2. В более предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2. В другом предпочтительном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование указанных лимбальных стволовых клеток. В другом предпочтительном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование указанных роговичных эндотелиальных клеток. Предпочтительно указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способа ингибирования LATS в популяции клеток способ включает после получения увеличенной популяции клеток дополнительную стадию ополаскивания этих клеток, по сути для удаления соединения в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, получаемые с помощью способа ингибирования LATS в популяции клеток, содержащих лимбальные стволовые клетки в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, полученные с помощью способа ингибирования LATS в клеточной популяции, включающей лимбальные стволовые клетки в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемой с помощью способа ингибирования LATS в клеточной популяции, включающей роговичные эндотелиальные клетки в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции роговичных эндотелиальных клеток, полученной с помощью способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз,

содержащему популяцию клеток, получаемую или полученную с помощью способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa (который представляет собой желатин, модифицированный метакриламидом, также известный как метакрилат желатина). В другом конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибрин или фибриновый клей. Предпочтительно препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% лимбальных стволовых клеток. Также предпочтительно, если препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% p63–альфа–положительных клеток. В определенных предпочтительных аспектах популяция клеток, получаемая или полученная с помощью способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно в препарате для доставки роговичных эндотелиальных клеток роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в препарате для доставки клеток при плотности более 500 клеток на $мм^2$ (площадь). В определенных предпочтительных аспектах популяция клеток, получаемая или полученная с помощью способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу культивирования клеток, предусматривающему культивирование популяции клеток в присутствии ингибитора LATS. Клетки могут представлять собой популяцию клеток, описанную и/или представленную в данном документе. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза или клетки печени. В предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой клетки глаза. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу культивирования клеток, предусматривающему культивирование популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии ингибитора LATS. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу культивирования клеток, предусматривающему культивирование популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии ингибитора LATS. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу культивирования клеток, предусматривающему культивирование популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль в соответствии с настоящим изобретением. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу культивирования клеток, предусматривающему

культивирование популяции, содержащей роговичные эндотелиальные клетки, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте осуществления указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль. В одном предпочтительном варианте осуществления способа культивирования клеток, предусматривающего культивирование популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, соединение присутствует в течение 12–16 дней, в частности предпочтительно соединение присутствует в течение 14 дней. В другом предпочтительном варианте осуществления способа культивирования клеток, предусматривающего культивирование популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, соединение присутствует в течение одной – двух недель, а затем клетки культивируют в течение некоторого периода времени в питательной среде без дополнения указанным соединением, где предпочтительно указанный период составляет одну – две недели. В одном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор LATS ингибирует LATS1 или LATS2 или LATS1 и LATS2. В более предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2. В одном варианте осуществления указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование клеток. Предпочтительно указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза. В одном варианте осуществления указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование лимбальных стволовых клеток. В другом предпочтительном варианте осуществления указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование роговичных эндотелиальных клеток. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способ культивирования клеток предусматривает после получения увеличенной популяции клеток дополнительную стадию ополаскивания этих клеток, по сути для удаления соединения в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, получаемой с помощью способа культивирования клеток в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, полученной с помощью способа культивирования клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, получаемые с помощью способа культивирования клеток, предусматривающего лимбальные стволовые клетки в

соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к увеличенной популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, полученные с помощью способа культивирования клеток, предусматривающего лимбальные стволовые клетки в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемой с помощью способа культивирования клеток, предусматривающего роговичные эндотелиальные клетки в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции роговичных эндотелиальных клеток, полученной с помощью способа культивирования клеток, предусматривающего роговичные эндотелиальные клетки в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз, содержащему популяцию клеток, получаемую или полученную с помощью способа культивирования клеток в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa. В другом конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибрин или фибриновый клей. Предпочтительно препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% лимбальных стволовых клеток. Также предпочтительно, если препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% p63–альфа–положительных клеток. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в препарате для доставки клеток, предназначенном для доставки роговичных эндотелиальных клеток, при плотности более 500 клеток на $мм^2$ (площадь). В определенных предпочтительных аспектах популяция клеток, получаемая или полученная с помощью способа культивирования клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения популяции клеток, предусматривающему стадию a) культивирования высеянной популяции клеток в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток. В предпочтительном варианте осуществления способ увеличения популяции клеток осуществляют ex vivo. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза или клетки печени. В предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой клетки глаза. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения популяции клеток, включающему стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль в соответствии с настоящим изобретением. В

дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения популяции клеток, включающему стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии соединения формулы A1 или ее подформул или его соли с увеличением популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное соединение выбрано из соединения формулы A2 или ее подформул или его соли. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения популяции клеток, включающему стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения популяции клеток, включающему стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли с увеличением популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно указанное соединение выбрано из соединения формулы A2 или ее подформул. Также предпочтительно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. Предпочтительно указанное соединение выбрано из группы соединений, состоящей из N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пентан–2–ола; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–изопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

н–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропокси)этан–1–ола; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина и 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Также предпочтительно указанное соединение или его соль выбраны из N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и (S)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–

N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

В предпочтительном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль. В одном предпочтительном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам, на стадии a) соединение присутствует в течение 12–16 дней, в частности предпочтительно соединение присутствует в течение 14 дней. В другом предпочтительном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к роговичным эндотелиальным клеткам, на стадии a) соединение присутствует в течение одной – двух недель, а затем осуществляют стадию b), на которой клетки культивируют в течение некоторого периода времени в питательной среде без дополнения указанным соединением, где предпочтительно указанный период составляет одну – две недели. В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам, с помощью соединений в соответствии с формулой A1 или ее подформулами достигается более чем 30–кратное увеличение количества высеянных клеток. В другом конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам, с помощью соединений в соответствии с формулой A1 и ее подформулами достигается 100–2200–кратное, предпочтительно 600–2200–кратное увеличение количества высеянных клеток. В одном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам, с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением получают популяцию клеток, которая содержит более 20% лимбальных стволовых клеток. В другом варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам, с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением получают популяцию клеток, которая содержит более 50% лимбальных стволовых клеток. В другом аспекте с помощью способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам в соответствии с настоящим изобретением, получают популяцию клеток, которая содержит более 20% клеток, экспрессирующих p63–альфа. В еще одном аспекте с помощью способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам в соответствии с настоящим изобретением, получают популяцию клеток, которая содержит более 50% клеток, экспрессирующих p63–альфа. В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к роговичным эндотелиальным клеткам, с помощью соединений в соответствии с формулой A1 или ее подформулами достигается более чем 10–кратное увеличение количества высеянных клеток. В другом конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток, относящейся к роговичным эндотелиальным клеткам, с помощью соединений в соответствии с формулой A1 или ее подформулами достигается 15–600–кратное, предпочтительно 20–550–кратное увеличение количества высеянных

клеток. В одном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор LATS ингибирует LATS1 или LATS2 или LATS1 и LATS2. В более предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2. В другом предпочтительном варианте осуществления указанный способ увеличения популяции клеток дополнительно предусматривает применение системы редактирования генов. Предпочтительно указанный способ предусматривает применение системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. Также предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза или клетки печени. В предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой клетки глаза. В другом предпочтительном варианте осуществления указанный способ увеличения популяции клеток дополнительно предусматривает генетическое модифицирование лимбальных стволовых клеток, где предпочтительно указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. В другом предпочтительном варианте осуществления указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование роговичных эндотелиальных клеток, где предпочтительно указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способ увеличения популяции клеток дополнительно предусматривает стадию c) ополаскивания увеличенной популяции клеток, по сути с целью удаления соединения в соответствии с настоящим изобретением.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему ингибитор LATS, питательную среду и инструкции для увеличения популяции клеток. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, получаемой с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток глаза, получаемой с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток глаза, полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, получаемые с помощью способа увеличения популяции клеток, относящейся к лимбальным стволовым клеткам в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, полученные с помощью способа увеличения популяции клеток,

относящейся к лимбальным стволовым клеткам в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, получаемые с помощью способа увеличения популяции клеток, относящейся к роговичным эндотелиальным клеткам в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, полученные с помощью способа увеличения популяции клеток, относящейся к роговичным эндотелиальным клеткам в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз, содержащему популяцию клеток, получаемую или полученную с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa. В другом конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибрин или фибриновый клей. Предпочтительно препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% лимбальных стволовых клеток. Также предпочтительно, если препарат для доставки клеток, предназначенный для доставки лимбальных стволовых клеток, содержит более 20% p63–альфа–положительных клеток. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в препарате для доставки клеток, предназначенном для доставки роговичных эндотелиальных клеток, при плотности более 500 клеток на мм^2 (площадь). В определенных предпочтительных аспектах популяция клеток, получаемая или полученная с помощью способа увеличения популяции клеток, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых аспектах способа увеличения популяции клеток данный способ дополнительно предусматривает применение системы редактирования генов. Предпочтительно систему редактирования генов применяют для генетического модифицирования клеток. В ряде вариантов осуществления способов в соответствии с настоящим изобретением генетическое модифицирование предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина. Также предпочтительно система редактирования генов специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением реакции трансплантат против хозяина. Предпочтительно указанная система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы редактирования генов CRISPR, системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеаз с "цинковыми пальцами", системы редактирования генов на основе мегануклеаз, технологий редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации, управляемой вектором на основе AAV, и на основе лентивирусных векторов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной популяции клеток, где более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. Предпочтительно более 20% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. Более предпочтительно более 50% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления более 70% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В частности, предпочтительно более 90% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В одном варианте осуществления в клетках был отредактирован геном.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной популяции клеток, где более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток представляют собой клетки, экспрессирующие p63–альфа. Предпочтительно более 20% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. Более предпочтительно более 50% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления более 70% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. В частности, предпочтительно более 90% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. В одном варианте осуществления в клетках был отредактирован геном.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, или к популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, где одна или несколько указанных клеток содержат не существующую в природе вставку или делецию одного или нескольких остатков нуклеиновой кислоты гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где вставка и/или делеция в результате приводят к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена. В предпочтительном варианте осуществления указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C. В конкретном варианте осуществления клетки имеют генетически модифицированные уровни экспрессии B2M.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей роговичные эндотелиальные клетки, или к популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, где одна или несколько указанных клеток содержат не существующую в природе вставку или делецию одного или нескольких остатков нуклеиновой кислоты гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где вставка и/или делеция в результате приводят к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена. В предпочтительном варианте осуществления указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C. В конкретном варианте осуществления клетки имеют генетически модифицированные уровни экспрессии B2M.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки или роговичные эндотелиальные клетки, в которых был отредактирован геном. В дополнительном аспекте настоящее изобретение

относится к популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, в которых был отредактирован геном. Предпочтительно редактирование генома осуществляли с помощью CRISPR. Предпочтительно ген B2M также был отредактирован.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост клеток, содержащему ингибитор LATS. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост клеток глаза, содержащему ингибитор LATS. В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост лимбальных стволовых клеток, содержащему ингибитор LATS. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль. В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост лимбальных стволовых клеток, содержащему соединение формулы A1 или ее подформул или его соль. В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост роговичных эндотелиальных клеток, содержащему ингибитор LATS. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль. В другом аспекте настоящее изобретение относится к средству, стимулирующему рост роговичных эндотелиальных клеток, содержащему соединение формулы A1 или ее подформул или его соль.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы A2 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер в соответствии с настоящим изобретением и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Предпочтительно композиция дополнительно содержит раствор для консервации или криоконсервации.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к среде для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS и питательную среду. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением. В одном аспекте настоящее изобретение относится к среде для пролиферации клеток, содержащей соединение формулы A1 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением и питательную среду. В одном варианте осуществления среда для пролиферации клеток дополнительно содержит клетки, представленные в данном документе. Предпочтительно среда для пролиферации клеток дополнительно содержит клетки глаза. В другом варианте осуществления среда для пролиферации клеток дополнительно содержит лимбальные стволовые клетки. Предпочтительно лимбальные стволовые клетки находятся в суспензии. В еще одном варианте осуществления среда для пролиферации клеток содержит роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки находятся в суспензии.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату, содержащему ингибитор LATS и клетки из популяции клеток, описанные и/или представленные в данном документе. В другом аспекте настоящее изобретение относится

к препарату на основе клеток, содержащему ингибитор LATS и клетки глаза. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату, содержащему ингибитор LATS и лимбальные стволовые клетки. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к препарату на основе клеток, содержащему ингибитор LATS и роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату, содержащему соединение формулы A1 в соответствии с настоящим изобретением и лимбальные стволовые клетки. В альтернативном аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату на основе клеток, содержащему соединение формулы A1 в соответствии с настоящим изобретением и роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно клеточный препарат дополнительно содержит питательную среду. В частности, предпочтительно клеточный препарат дополнительно содержит раствор для консервации или криоконсервации.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз, содержащему клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa. В другом конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибрин или фибриновый клей. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз, содержащему клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa. В другом конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибрин или фибриновый клей. В определенных предпочтительных аспектах клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном конкретном варианте осуществления более 20% клеток в препарате для доставки клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В другом конкретном варианте осуществления более 20% клеток в препарате для доставки клеток представляют собой клетки, экспрессирующие p63–альфа.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клеточному препарату для доставки в глаз, содержащему клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением, и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой GelMa. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки находятся в суспензии. В

альтернативном варианте осуществления роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в препарате для доставки клеток при плотности более 500 клеток на мм^2 (площадь). В частности, предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют при плотности 1000–3500 клеток/мм^2 (площадь), более предпочтительно от 2000 до приблизительно 3000 клеток/мм^2 (площадь). В определенных предпочтительных аспектах клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением имеет лишь незначительные количества соединения в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно питательная среда в способах или клеточный препарат в соответствии с настоящим изобретением выбраны из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), дополненной фетальной бычьей сывороткой (FBS), бессывороточной (SF) среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и DMEM/F12, которая необязательно дополнена хлоридом кальция; предпочтительной является среда X–VIVO15.

Предпочтительно раствор для консервации или криоконсервации в соответствии с настоящим изобретением содержит раствор, который представляет собой Optisol или PBS (фосфатно–буферный солевой раствор) и раствор для криоконсервации дополнительно содержит глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему композицию, подходящую для доставки в глаз, и ингибитор LATS. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A2 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему композицию, подходящую для доставки в глаз, и соединение формулы A2 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно набор содержит инструкции для применения. В одном варианте осуществления композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет средство, обеспечивающее локальную доставку, или глазные капли для местного применения. Предпочтительно композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку. В конкретном варианте осуществления набор дополнительно содержит лимбальные стволовые клетки. В другом конкретном варианте осуществления набора композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa. В альтернативном конкретном варианте осуществления набора композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой фибрин или фибриновый клей. В еще одном конкретном варианте осуществления более 20% клеток в наборе представляют собой лимбальные стволовые клетки. В другом конкретном варианте осуществления более 20% клеток в наборе представляют собой клетки, экспрессирующие p63–альфа. В альтернативном конкретном варианте осуществления набор содержит роговичные эндотелиальные клетки. В другом конкретном варианте осуществления композиция, подходящая для доставки роговичных эндотелиальных клеток в глаз, представляет собой

средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa. В еще одном конкретном варианте осуществления роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в монослое. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют при плотности более 500 клеток на мм^2 (площадь). В частности, предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют при плотности 1000–3500 клеток/мм^2 (площадь), более предпочтительно от 2000 до приблизительно 3000 клеток/мм^2 (площадь).

В предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу. Предпочтительно композиция, подходящая для доставки в глаз, в соответствии с настоящим изобретением представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, выбранное из группы, состоящей из фибрина, коллагена, желатина, целлюлозы, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA, средств, обеспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, поливинилового спирта, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, поливинилпирролидона, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина, коллагена, фибриногена, целлюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилгуара, геллановой камеди, гуаровой камеди, ксантановой камеди и карбоксиметилцеллюлозы, а также их производных, их сополимеров и их комбинаций. В предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa, фибрин или фибриновый клей. В конкретных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa. В других конкретных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой фибрин или фибриновый клей. Предпочтительно средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой фибриновый клей. Фибриновые клеи известны из уровня техники, включая, например, фибриновый герметик TISSEEL VH (Baxter AG, Вена, Австрия) (Panda et al., 2009, Indian J Ophthalmol. Sep–Oct; 57(5): 371–379). В одном варианте осуществления фибриновый клей применяют для доставки лимбальных стволовых клеток. В другом варианте осуществления GelMa применяют для доставки роговичных эндотелиальных клеток.

В более предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением, где лимбальные стволовые клетки присутствуют в комбинации со

средством, обеспечивающим локальную доставку, более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. Предпочтительно более 20% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. Более предпочтительно более 50% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления более 70% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки. В частности, предпочтительно более 90% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением, где клетки присутствуют в комбинации со средством, обеспечивающим локальную доставку, более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% клеток представляют собой клетки, экспрессирующие p63–альфа. Предпочтительно более 20% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. Более предпочтительно более 50% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления более 70% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки. В частности, предпочтительно более 90% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки.

В более предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в комбинации со средством, обеспечивающим локальную доставку. Предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки находятся в монослое. Более предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют при плотности более 500 клеток на $мм^2$ (площадь). В частности, предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки присутствуют при плотности 1000–3500 клеток/$мм^2$ (площадь), в частности более предпочтительно от 2000 до приблизительно 3000 клеток/$мм^2$ (площадь).

В дополнительных особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор LATS ингибирует LATS1 или LATS2 или LATS1 и LATS2. В более предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

В предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением соединение выбрано из группы, состоящей из 2–метил–1–(2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропокси)пропан–2–ола; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (S)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пентан–2–ола; N–изопропил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–изопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–

(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–1–ола; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропокси)этан–1–ола и (R)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Также предпочтительно указанное соединение или его соль выбраны из N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и (S)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина. Предпочтительно указанное соединение или его соль представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением соединение в соответствии с настоящим изобретением присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток субъекту, при этом указанный способ предусматривает введение популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток, или способа культивирования клеток, или способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу трансплантации популяции клеток глаза на глаз субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток, или способа культивирования клеток, или способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением, где клетки представляют собой клетки глаза. Предпочтительно клетки глаза представляют собой лимбальные стволовые клетки или роговичные эндотелиальные клетки. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток глаза на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток, содержащих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение популяции клеток, включающих

лимбальные стволовые клетки, получаемых или полученных с помощью способа увеличения популяции клеток, или способа культивирования клеток, или способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает увеличение популяции клеток, включающей лимбальные стволовые клетки, путем культивирования указанной популяции в среде для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно ополаскивание увеличенной популяции клеток, по сути для удаления ингибитора LATS, и применение указанных клеток в отношении роговицы указанного субъекта. Предпочтительно указанную популяцию клеток объединяют с биологической матрицей до указанного введения. В конкретном варианте осуществления указанную популяцию клеток объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, до указанного введения. В другом конкретном варианте осуществления указанную популяцию клеток объединяют с фибриновым клеем до указанного введения. В одном варианте осуществления указанную популяцию клеток объединяют с носителем, который представляет собой контактную линзу. В конкретном варианте осуществления популяцию клеток, включающую лимбальные стволовые клетки, объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и при этом GelMA полимеризуют на носителе, который представляет собой контактную линзу. В другом конкретном варианте осуществления популяцию клеток, включающую лимбальные стволовые клетки, объединяют с фибриновым клеем и контактной линзой.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемых или полученных с помощью способа увеличения популяции клеток, или способа культивирования клеток, или способа ингибирования LATS в соответствии с настоящим изобретением. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает увеличение популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, путем культивирования указанной популяции в среде для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS в

соответствии с настоящим изобретением, ополаскивание увеличенной популяции клеток, по сути для удаления ингибитора LATS, и применение указанных клеток в отношении роговицы указанного субъекта. Предпочтительно указанные клетки объединяют с биологической матрицей до указанного введения. В конкретном варианте осуществления указанные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, до указанного введения. В более конкретном варианте осуществления указанные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которую наносят на глазную поверхность посредством биопечати. В частности, предпочтительно указанные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на глазную поверхность посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток в глаз субъекта, предусматривающему объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, инъецирование смеси в глаз субъекта или нанесение смеси на поверхность глаза субъекта и осуществление биопечати клеток в или на глазу путем нацеливания и фиксации клеток, например на роговице, с применением такого источник света, как источник ультрафиолета А или белого света. В определенных вариантах осуществления источник света испускает свет с длиной волны, которая составляет по меньшей мере 350 нм. В определенных вариантах осуществления источник света испускает свет в диапазоне длин волн от 350 нм до 420 нм. Например, источник света, представляющий собой LED, может использоваться для испускания света с длиной волны, составляющей 365 нм или 405 нм, или любой другой длины волны выше 350 нм, или можно использовать ртутную лампу с пропускающим полосовым фильтром для испускания света с длиной волны, составляющей от 350 нм до 700 нм, например, с длиной волны 365 нм или 405 нм. В другом варианте осуществления источник света испускает видимый белый свет с длиной волны в диапазоне, например, от 400 нм до 700 нм. В определенных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки глаза, такие как роговичные клетки, например, роговичные эндотелиальные клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в глаз субъекта, предусматривающему культивирование популяции роговичных эндотелиальных клеток в среде для пролиферации клеток, которая содержит ингибитор LATS, объединение роговичных эндотелиальных клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, введение смеси в глаз субъекта и осуществление биопечати клеток в глазу посредством направления клеток на роговицу и фиксации на ней с использованием такого источника света, как УФ–А или LED или источник видимого света.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием

ингибитора LATS. Предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул в соответствии с настоящим изобретением. В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием соединения в соответствии с формулой A2 или ее подформулами в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительных конкретных вариантах осуществления способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения дополнительно предусматривает способ ингибирования LATS в популяции клеток или способ увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, где указанные клетки представляют собой клетки глаза. Предпочтительно способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, где указанные клетки представляют собой клетки глаза. В другом предпочтительном варианте осуществления способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением, где указанные клетки представляют собой клетки глаза. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения предусматривает стадии способа трансплантации популяции клеток, включающих клетки глаза, в глаз субъекта в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно клетки глаза представляют собой лимбальные стволовые клетки или роговичные эндотелиальные клетки. В еще одном предпочтительном варианте осуществления способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения предусматривает стадии способа трансплантации популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта. В альтернативном предпочтительном варианте осуществления способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения предусматривает стадии способа трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в соответствии с настоящим изобретением на роговицу субъекта. В конкретном варианте осуществления способа профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с настоящим изобретением популяцию клеток, получаемую или полученную с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модулятору YAP (yes–ассоциированному белку), предназначенному для применения в способе трансплантации популяции клеток субъекту, который предусматривает введение нуждающемуся в этом

субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный модулятор YAP представляет собой ингибитор LATS. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модулятору YAP (yes–ассоциированного белка), предназначенному для использования в способе трансплантации популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, который предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемых или полученных с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный модулятор YAP представляет собой ингибитор LATS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модулятору YAP, предназначенному для применения в способе лечения дефицита лимбальных стволовых клеток, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный модулятор YAP представляет собой ингибитор LATS.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к модулятору YAP (yes–ассоциированному белку), предназначенному для применения в способе трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток на роговицу субъекта, который предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный модулятор YAP представляет собой ингибитор LATS.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модулятору YAP, предназначенному для применения в способе лечения нарушения функции эндотелия роговицы, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно указанный модулятор YAP представляет собой ингибитор LATS.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту популяции клеток, где популяция была выращена в присутствии средства, способного к ингибированию активности киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем

самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль. Предпочтительно клетки представляют собой клетки глаза.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению в соответствии с формулой A2 или ее подформулами или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением для применения в терапии или в качестве лекарственного препарата. Предпочтительно соединение представляет собой соединение для применения при глазном заболевании или нарушении.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к ингибитору LATS для применения при глазном заболевании или нарушении, где предпочтительно ингибитор LATS представляет собой соединение. Предпочтительно данное соединение представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с настоящим изобретением.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения формулы A2 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением в изготовлении лекарственного препарата. В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с настоящим изобретением в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения.

В предпочтительных конкретных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением применение дополнительно предусматривает способ ингибирования LATS в популяции клеток или способ увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением.

В дополнительных предпочтительных конкретных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением применение предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток, получаемой или полученной с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим

изобретением применение предусматривает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества препарата для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением. В одном предпочтительном варианте осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением применение предусматривает стадии способа трансплантации популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, включающих клетки глаза, на роговицу субъекта. В еще более предпочтительных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением применение предусматривает стадии способа трансплантации популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта. В еще более предпочтительных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением применение предусматривает стадии способа трансплантации популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, включающих роговичные эндотелиальные клетки, на роговицу субъекта. В конкретных вариантах осуществления соединения для применения в соответствии с настоящим изобретением, или ингибитора LATS для применения в соответствии с настоящим изобретением, или применения соединения в изготовлении лекарственного препарата в соответствии с настоящим изобретением, популяцию клеток, получаемую или полученную с помощью способа увеличения популяции клеток в соответствии с настоящим изобретением, или препарат для доставки клеток в соответствии с настоящим изобретением вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

В предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением глазное заболевание или нарушение ассоциировано с дефицитом лимбальных стволовых клеток. В более предпочтительных вариантах осуществления глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток. Более предпочтительно глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, термических ожогов, лучевого поражения, аниридии, склерокорнеи, множественной эндокринной неоплазии, синдрома Стивенса–Джонсона, глазного рубцующегося пемфигоида, коллагеноза; хронических неаутоиммунных воспалительных нарушений, возникающих вследствие применения контактных линз, синдрома сухого глаза, розацеа,

стафилококкового краевого кератита, кератита (в том числе бактериального кератита, грибкового и вирусного кератита), птеригиума или новообразования, дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, удаления птеригиума или новообразования, или криотерапии; и дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего вследствие токсического воздействия лекарственного препарата, выбранного из группы, состоящей из консервантов (тимеросал, бензалконий), местных анестетиков, пилокарпина, бета–блокаторов, митомицина, 5–фторурацила, нитрата серебра и лекарственных препаратов для перорального введения, вызывающих синдром Стивенса–Джонсона. В частности, предпочтительно глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, аниридии, синдрома Стивенса–Джонсона и применения контактных линз.

В предпочтительных вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением глазное заболевание или нарушение ассоциировано со сниженной плотностью роговичных эндотелиальных клеток. В более предпочтительных вариантах осуществления глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушении функции эндотелия роговицы. Более предпочтительно глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушение функции эндотелия роговицы, которое выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии), недостаточности трансплантата роговицы, задней полиморфной дистрофии роговицы, врожденной наследственной эндотелиальной дистрофии, сцепленной с Х–хромосомой эндотелиальной дистрофии роговицы, аниридии и эндотелита роговицы. В конкретном варианте осуществления глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии) и недостаточности трансплантата роговицы.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам стимулировании заживления ран, в частности лечения или уменьшения интенсивности симптомов ожогов, острых и хронических кожных язв, предусматривающим введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора LATS.

В определенных других аспектах настоящее изобретение относится к способу стимулирования заживления ран, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, которые можно применять в стимулировании заживления ран. В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, которые можно применять с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для

стимулирования заживления ран.

Настоящее изобретение также относится к способу стимулирования заживления ран, в частности лечения или уменьшения интенсивности симптомов ожогов, острых кожных язв и хронических кожных язв, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул и необязательно со вторым терапевтическим средством, которое представляет собой другое соединение по настоящему изобретению или терапевтическое средство другого типа.

Настоящее изобретение также относится к способу стимулирования заживления раны глаза, предусматривающему введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления рана глаза представляет собой рану роговицы. В других вариантах осуществления рана глаза представляет собой повреждение или послеоперационную рану.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, которые можно применять в регенерации печени и обеспечении компенсаторного роста печени. В определенных других аспектах настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера. В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и композициям, которые можно применять с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для регенерации печени и обеспечения компенсаторного роста печени.

Настоящее изобретение также относится к способу регенерации печени и обеспечения компенсаторного роста печени, в частности предназначенного для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению и необязательно с другим терапевтическим средством, которое представляет собой другое соединение по настоящему изобретению или терапевтическое средство другого типа.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

способу получения клеточного материала для клеточной терапии и/или трансплантации, предусматривающему ex–vivo применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера. Клеточный материал может содержать клетки глаза, печени или кожи.

Кроме того, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему ex–vivo применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

Настоящее изобретение также относится к способу ex–vivo увеличения популяции клеток печени, предусматривающему применение соединения по настоящему изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут понятны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: ингибиторы LATS (пример соед. 49 и пр. 133) индуцируют дефосфорилирование YAP в LSC в течение одного часа обработки, что показано с помощью вестерн–блоттинга.

Фигура 2: иммуномечение p63–альфа в культурах лимбальных стволовых клеток указывает на то, что популяция LSC может увеличиваться в том случае, если ее поддерживают в среде, содержащей ингибиторы LATS (пример соед. 49 и пр. 133). **Фигура 2A**: в присутствии питательной среды и DMSO лишь несколько выделенных клеток прикрепляются к культуральной чашке и выживают в течение не более 6 дней. Большинство клеток экспрессировали человеческий ядерный маркер, но лишь некоторые экспрессировали p63–альфа. **Фигуры 2B** и **2C**: в отличие от этого, в присутствии ингибиторов LATS, соединения из примера № 49 и примера № 133, клетки формировали колонии и экспрессировали p63–альфа. Данный результат указывает на то, что ингибиторы LATS способствуют увеличению популяции клеток с p63–альфа–положительным фенотипом. **Фигура 2D:** пассажирование клеток и их культивирование в присутствии ингибитора LATS, соединения из примера № 49, в течение двух недель предоставило возможность увеличения популяции клеток и формирования конфлюэнтных культур, экспрессирующих p63–альфа.

Фигура 3: нокдаун LATS1 и LATS2 с помощью siRNA активирует пролиферацию LSC в культуре, что показано в процентных долях EdU–положительных клеток.

Фигура 4: иммуномечение маркеров LSC дельтаN–p63 альфа/бета/гамма, ABCG2 и C/EBP дельта указывает на то, что LSC, поддерживаемые в культуральной среде, содержащей ингибиторы LATS (пример соед. 49 и пр. 133) экспрессируют типичные для LSC маркеры. Результаты указывают на то, что клетки, культивируемые в DMSO, как правило не экспрессируют такие маркеры, как дельтаN–p63 альфа/бета/гамма, ABCG2 и C/EBP дельта, обычно экспрессируемые LSC. В отличие от этого, клетки, культивируемые в присутствии ингибиторов LATS, экспрессируют такие маркеры, как дельтаN–p63

альфа/бета/гамма, ABCG2 и C/EBP дельта, обычно экспрессируемые LSC.

Фигура 5: иммуномечение недифференцированных маркеров LSC p63–альфа и маркера клеток эпителия роговицы кератина 12 показывает, что популяции LSC, размноженные с использованием культуральной среды, содержащей ингибиторы LATS (**фиг. 5A**: пример соед. 49, **фиг. 5B:** пример соед. 47, **фиг. 5C:** пример соед. 12, **фиг. 5D:** пример соед. 261), могут дифференцироваться в клетки эпителия роговицы при переносе в условия, которые обеспечивают дифференциацию. Показаны изображения перехода от p63–альфа–положительной идентичности клеток к идентичности по кератину–12.

Фигура 6: LSC метили с использованием флуоресцентного белка с целью подтверждения того, что LSC, прикрепленные к контактной линзе с использованием полимеризованного GelMA, могут быть доставлены на поверхность глаза кролика ex vivo. Стрелки показывают участок прикрепления LSC.

Фигура 7: **фиг. 7A**: подвергнутый трансплантации глаз, окрашивание на кератин–12; **фиг. 7B:** подвергнутый трансплантации глаз, окрашенный на кератин–19; **фиг. 7C**: контрольный глаз, не подвергнутый трансплантации, окрашивание на кератин–12; **фиг. 7D:** контрольный глаз, не подвергнутый трансплантации, окрашивание на кератин–19. Данные фигуры показывают, что в кроличьей модели дефицита лимбальных стволовых клеток популяция LSC, размноженная в среде, содержащей соединение из примера № 12, объединенная с GelMA и доставленная с помощью контактных линз in vivo на поверхность роговицы кролика, приводит к восстановлению кератин–12–положительного эпителия роговицы (**фиг. 7A**) и предупреждает конъюнктивализацию с помощью кератин–19–положительных конъюнктивированных клеток в подвергнутом трансплантации глазу. **Фиг. 7B:** стрелками указано отсутствие окрашивания на кератин–19. В отличие от этого глаза кролика, не подвергнутые трансплантации, демонстрировали отсутствие восстановления кератин–12–положительного эпителия роговицы. **Фиг. 7C:** стрелками указано отсутствие окрашивания на кератин–12. Вместо этого наблюдали признаки конъюнктивализации, что показано по наличию окрашивания на кератин–19. **Фиг. 7D**: стрелками указаны участки положительного окрашивания на кератин–19.

Фигура 8: фиг. 8A: глаз кролика, подвергнутый трансплантации LSC; **фиг. 8B:** контрольный глаз кролика, не подвергнутый трансплантации LSC человека. Эти фигуры показывают, что клетки, которые восстановили эпителий роговицы глаз, подвергнутых трансплантации, являлись клетками человека (**фиг. 8A**), что продемонстрировано по присутствию митохондриального белка человека (стрелками показано присутствие митохондриального маркера человека). В отличие от этого, глазная поверхность глаз, не подвергнутых трансплантации, не демонстрировала окрашивания на митохондриальный белок человека (**фиг. 8B:** митохондриальный маркер человека отсутствует).

Фигура 9: полученные с помощью микроскопии изображения LSC, доставленных с помощью TISSEEL в покрытый коллагеном 24–луночный планшет, показывают репопуляцию клеток с покрытием поверхности для культивирования в течение 2 недель.

Фигура 10: LSC, меченные зеленым CellTracker CMFDA, доставляли на роговицу

человека ex vivo и покрывали защитными контактными линзами.

Фигура 11: клетки HEK–293, меченные красным и зеленым красителями, наносили посредством биопечати в виде узора инь–ян на поверхность роговицы кролика ex vivo (показаны в виде темного и светло–серого узоров).

Фигура 12: снижение иммунного отторжения с помощью CRISPR/Cas9–опосредованной делеции гена бета–2–микроглобулина (B2M) в LSC: анализы FACS показывают, что CRISPR–опосредованная делеция B2M и последующее устранение HLA A, B и C происходили у 21 процента LSC.

Фигура 13: популяцию B2M–отрицательных/HLA A, B,C–отрицательных LSC увеличивали с использованием соединения из примера № 48a для получения клеточного препарата, где 97 процентов клеток не экспрессируют HLA A, B, C.

Фигура 14: ингибиторы LATS (соединения из пр. 133 и пр. 49) индуцируют транслокацию YAP в ядре роговичных эндотелиальных клеток (CEC).

Фигура 15: ингибиторы LATS (пример соед. 133 и пр. 49) индуцируют дефосфорилирование YAP в CEC в течение одного часа обработки. Это показано на фиг. 15a с помощью вестерн–блоттинга; фиг. 15b: на графике показаны уровни фосфорилированного YAP, нормализованные по бета–актину; и фиг.15c: на графике показаны уровни фосфорилированного YAP, нормализованные относительно всего YAP.

Фигура 16: CEC, выращенные в присутствии или в отсутствие ингибиторов LATS. Систему Incucyte (Essen Biosciences) использовали для измерения конфлюэнтности CEC с помощью количественного анализа живых клеток в режиме реального времени в динамике. Соединение из прим. 49 (черные квадраты) и прим. 133 (светло–серые квадраты) индуцировали сильную пролиферацию CEC; при этом пролиферация CEC была минимальной в среде–носителе (DMSO, темно–серые квадраты).

Фигура 17: нокдаун LATS1 и LATS2 с помощью siRNA активирует пролиферацию роговичных эндотелиальных клеток в культуре, что показано в процентных долях EdU–положительных клеток.

Фигура 18: иммуномечение Zonula Occludens–1 (ZO–1) указывает на то, что CEC, пролиферация которых происходит в присутствии ингибитора LATS, соединения из пр. 49 (фиг. 18b), образуют плотные контакты, эндотелиальную структуру и сохраняют нормальный размер клетки и морфологические характеристики функциональных CEC. CEC, пролиферация которых происходит в присутствии только носителя (DMSO), показывают признаки полимегатизма, характерные для CEC с нарушенной функцией (фиг. 18a).

Фигура 19: количественный анализ RT–PCR указывает на то, что популяция роговичных эндотелиальных клеток, увеличенная с помощью ингибитора LATS, соединения из пр. 49, экспрессирует гены, которые обычно экспрессируются роговичными эндотелиальными клетками in vivo, в том числе коллаген 8a2, AQP1, SLc4A11. Клетки не экспрессируют маркеры других типов эпителия, присутствующих в глазу, в том числе RPE65 (маркер пигментного эпителия сетчатки) и CD31 (маркер

эпителия сосудов).

Фигура 20: иммуногистохимический анализ указывает на то, что популяция роговичных эндотелиальных клеток, увеличенная с помощью ингибитора LATS, соединения из пр. 49, экспрессирует гены, обычно экспрессируемые роговичными эндотелиальными клетками in vivo, в том числе Na/K АТФазу (фиг. 20a) и коллаген 8a2 (фиг. 20b).

Фигура 21: анализ FACS популяции клеток роговичного эндотелия, увеличенная в присутствии ингибитора LATS, соединения из пр. 47, и культуры CEC в отсутствие ингибитора LATS. Популяция клеток, увеличенная в присутствии ингибитора LATS, экспрессирует низкие уровни CD73 (фиг. 21a, серая линия), CD44 (фиг. 21b, серая линия), CD166 (фиг. 21c, серая линия) и CD105 (фиг. 21d, серая линия); тогда как популяция клеток, культивируемых без ингибитора LATS, экспрессирует высокие уровни CD44, CD73, CD105 и CD166 (черные линии).

Фигура 22: способ с продавливанием пузырьком, изображающий способ 1, описанный далее в разделе "биопечать", в котором биологическую матрицу наносят на глаз для доставки клеточного препарата на глаз в соответствии с настоящим изобретением. **Фиг. 22a**: введение болюса, содержащего биологическую матрицу; **фиг. 22b**: введение пузырька под биологическую матрицу для распространения по роговице; **фиг. 22c**: обработка биологической матрицы с помощью источника УФ или синего света; **фиг. 22d**: удаление пузырька и замена сбалансированным солевым раствором.

Фигура 23: субтрактивный способ с использованием фемтосекундного лазера (FS), изображенный как способ 2, описанный далее в разделе "биопечать", в котором биологическую матрицу наносят на глаз для доставки клеточного препарата в соответствии с настоящим изобретением. **Фиг. 23a**: удаление эндотелия с нарушенной функцией с помощью FS; **фиг. 23b:** введение биологической матрицы в переднюю камеру глаза; **фиг. 23c:** обработка биологической матрицы с помощью источника УФ или синего света**; фиг. 23d:** отделение нежелательной биологической матрицы с помощью FS; **фиг. 23e:** удаление отделенной биологической матрицы с помощью пинцета.

Фигура 24: способ с использованием красителя–шаблона, изображенный как способ 3, описанный далее в разделе "биопечать", в котором биологическую матрицу наносят на глаз с целью доставки клеточного препарата в соответствии с настоящим изобретением. **Фиг. 24a**: окрашивание эндотелия красителем (например, трипановым синим); **фиг. 24b:** удаление эндотелия с нарушенной функцией; **фиг. 24c:** введение окрашенной биологической матрицы; **фиг. 24d:** обработка биологической матрицы с помощью источника УФ или синего света; **фиг. 24e:** промывание необработанной биологической матрицы.

Фигура 25: способ сухого распределения, изображенный как способ 4, описанный далее в разделе "биопечать", в котором биологическую матрицу наносят на глаз с целью доставки клеточного препарата в соответствии с настоящим изобретением. **Фиг. 25a:** осушение передней камеры глаза; **фиг. 25b:** распределение биологической матрицы по

задней части роговицы с помощью мягкого наконечника/щетки для канюли; **фиг. 25c:** обработка биологической матрицы с помощью источника УФ или синего света; **фиг. 25d:** введение в глаз сбалансированного солевого раствора.

Фигура 26: схематическое изображение устройства для биопечати, описанного далее в примере C11.

Фигура 27: результаты показывают, что клетки можно наносить на заднюю часть роговицы с помощью биопечати с использованием портативного устройства, которое пропускает УФ–А свет с длиной волны 365 нм через роговицу. После ополаскивания неполимеризовавшегося и неприсоединившегося материала круговое расположение клеток, меченных флуоресцентным белком, сохранялось на задней части роговицы.

Фигура 28: CEC, нанесенные на заднюю часть роговицы с помощью биопечати, могут заново восстановить эндотелий роговицы в кроличьей модели эндотелиальной дистрофии роговицы. Результаты указывают на то, что у кроликов, использованных в эксперименте, структуру эндотелия роговицы можно выявить с использованием иммуногистохимии ZO–1 (фиг. 28A). В правом глазу кролика, в котором эндотелий роговицы удаляли хирургическим путем и CEC не наносили с помощью биопечати, окрашивание ZO–1 отсутствует, что указывает на отсутствие нормальной структуры эндотелия роговицы (фиг. 28B). В правом глазу кролика, где эндотелий роговицы удаляли хирургическим путем и CEC наносили посредством биопечати, присутствует окрашивание ZO–1, указывая на то, что структура эндотелия роговицы была заново восстановлена (фиг. 28C). На фиг. 28D и фиг. 28E показано, что иммуноокрашивание ядерного антигена человека отсутствует в глазах, в которые не вводили какие–либо CEC человека. В отличие от этого, клетки с присутствием ядерного антигена человека покрывают поле изображения в глазах, на поверхность которых с помощью биопечати наносили CEC (фиг.28F), указывая на то, что меченная ZO–1 структура эндотелия роговицы, показанная на фиг. 28C, состоит из CEC человека, нанесенных с помощью биопечати на заднюю часть роговицы кролика.

Фигура 29: клетки HEK–293, меченные красным флуоресцентным белком, с помощью биопечати наносили ex vivo на конструкции виде различных знаков на задней части роговицы человека.

Фигура 30: карта вектора показывает схему, согласно которой вектор на основе AAV2 использовали для экспрессирования системы CRISPR в LSC и CEC (на фигуре 30 раскрывается SEQ ID NO: 28).

Фигура 31: анализ FACS AAV–опосредованной экспрессии системы CRISPR, обеспечивающей возможность делеции B2M с последующим устранением HLA A, B и C в LSC.

Фигура 32: анализ FACS AAV–опосредованной экспрессии системы CRISPR, обеспечивающей возможность делеции B2M с последующим устранением HLA A, B и C в CEC.

Фигура 33A: на фиг. 33A показан вестерн–блоттинг pYAP в лизате клеток HaCaT

человека, которые не обрабатывали или обрабатывали 40 пМ каждой из siRNA к MST1/2 или LATS1/2; актин использовали в качестве контроля.

Фигура 33B: на фиг. 33B показан вестерн–блоттинг pYAP в лизате клеток HaCaT человека, которые не обрабатывали или обрабатывали 9 мкМ соединения из примера 133; актин использовали в качестве контроля.

Фигура 33C: на фиг. 33C показан график относительной ингибиторной активности в отношении LATS1 по сравнению с концентрацией соединения из примера 133, находящейся в диапазоне от ~10^{-4} до 1 мкМ. Рассчитанное значение IC_{50} для соединения из примера 133 в отношении LATS1 составляло 1,3 нМ.

Фигура 34: показана столбчатая диаграмма относительных уровней экспрессии Cyr61/Gapdh по сравнению с концентрацией соединения из примера 133, составляющей 0, 0,2 и 2 мг/мл.

Фигура 35A: на фиг. 35A показаны микрофотографии кожи мыши, обработанной местно носителем или соединением из примера 133.

Фигура 35B: на фиг. 35B показана диаграмма рассеяния, на которой сравнивают процентную долю клеток Ki67+ в коже мыши, обработанной носителем или соединением из примера 133.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

LATS

LATS представляет собой сокращенное название большой киназы–опухолевого супрессора. LATS, используемое в данном документе, относится к LATS1 и/или LATS2. LATS1, используемое в данном документе, относится к большой киназе–опухолевому супрессору 1, и LATS2 относится к большой киназе–опухолевому супрессору 2. Как LATS1, так и LATS2 характеризуются активностью, присущей протеинкиназе серинового/треонинового типа. LATS1 и LATS2 были присвоены идентификаторы Комитета номенклатуры генов Международной организации по изучению генома человека: HGNC ID 6514 и HGNC ID 6515 соответственно. LATS1 также иногда упоминается в уровне техники как WARTS или wts и LATS2 иногда упоминается в уровне техники как KPM. Иллюстративные последовательности LATS включают без ограничения последовательности белка, доступные из базы данных по структуре белка Национального центра биотехнологической информации с номерами доступа NP_004681.1 (LATS1), и NP_001257448.1 (LATS1), и NP_055387.2 (LATS 2), показанные ниже.

LATS1: NP_004681.1 (серин/треониновая–протеинкиназа LATS1, изоформа 1, homo sapiens)(SEQ ID NO: 1)

1 mkrsekpegy rqmrpktfpa snytvssrqm lqeireslrn lskpsdaaka ehnmskmste

61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnsllpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi

121 qalqktnnrs ieaaiefisk msyqdprreq maaaaarpin asmkpgnvqq svnrkqswkg

181 skeslvpqrh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp

241 qvrsvtpppp prgqtppprg ttppppswep nsqtkrysgn meyvisrisp vppgawqegy

301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgrqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq

361 nvvpagtvnr qppppyplta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vpnrnshnme
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnnplg nrashsansq
481 psattvtait papiqqpvks mrvlkpelqt alapthpswi pqpiqtvqps pfpegtasnv
541 tvmppvaeap nyqgpppppyp khllhqnpsv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv
601 dsgdkekkqi ttspitvrkn kkdeerresr iqsyspqafk ffmeqhvenv lkshqqrlhr
661 kkqlenemmr vglsqdaqdq mrkmlcqkes nyirlkrakm dksmfvkikt lgigafgevc
721 larkvdtkal yatktlrkkd vllrnqvahv kaerdilaea dnewvvrlyy sfqdkdnlyf
781 vmdyipggdm msllirmgif peslarfyia eltcavesvh kmgfihrdik pdnilidrdg
841 hikltdfglc tgfrwthdsk yyqsgdhprq dsmdfsnewg dpsscrcgdr lkplerraar
901 qhqrclahsl vgtpnyiape vllrtgytql cdwwsvgvil femlvgqppf laqtpletqm
961 kvinwqtslh ippqaklspe asdliiklcr gpedrlgkng adeikahpff ktidfssdlr
1021 qqsasyipki thptdtsnfd pvdpdklwsd dneeenvndt lngwykngkh pehafyeftf
1081 rrffddngyp ynypkpieye yinsqgseqq sdeddqntgs eiknrdlvyv

LATS1: серин/треониновая–протеинкиназа LATS1, изоформа 2 [Homo sapiens]
Эталонная последовательность в NCBI: NP_001257448.1 (SEQ ID NO: 2)

1 mkrsekpegy rqmrpktfpa snytvssrqm lqeireslrn lskpsdaaka ehnmskmste
61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnsllpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi
121 qalqktnnrs ieaaiefisk msyqdprreq maaaaarpin asmkpgnvqq svnrkqswkg
181 skeslvpqrh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp
241 qvrsvtpppp prgqtppprg ttpppppswep nsqtkrysgn meyvisrisp vppgawqegy
301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgrqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq
361 nvvpagtvnr qppppyplta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vpnrnshnme
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnnplg nrashsansq
481 psattvtait papiqqpvks mrvlkpelqt alapthpswi pqpiqtvqps pfpegtasnv
541 tvmppvaeap nyqgpppppyp khllhqnpsv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv
601 dsgdkekkqi ttspitvrkn kkdeerresr iqsyspqafk ffmeqhvenv lkshqqrlhr
661 kkqlenemmr vkpfkmsifi lnhlfawclf

LATS 2: NP_055387.2 серин/треониновая–протеинкиназа LATS2 [Homo sapiens]. ((SEQ ID NO: 3)

1 mrpktfpatt ysgnsrqrlq eireglkqps kssvqglpag pnsdtsldak vlgskdatrq
61 qqqmratpkf gpyqkalrei rysllpfane sgtsaaaevn rqmlqelvna gcdqemagra
121 lkqtgsrsie aaleyiskmg yldprneqiv rvikqtspgk glmptpvtrr psfegtgdsf
181 asyhqlsgtp yegpsfgadg ptaleemprp yvdylfpgvg phgpghqhqh ppkgygasve
241 aagahfplqg ahygrphllv pgeplgygvq rspsfqsktp petggyaslp tkgqggppga
301 glafpppaag lyvphphhkq agpaahqlhv lgsrsqvfas dsppqslltp srnslnvdly
361 elgstsvqqw paatlarrds lqkpgleapp rahvafrpdc pvpsrtnsfn shqprpgppg
421 kaepslpapn tvtavtaahi lhpvksvrvl rpepqtavgp shpawvpapa papapapapa
481 aegldakeeh alalggagaf pldveyggpd rrcppppypk hlllrskseq ydldslcagm
541 eqslragpne peggdksrks akgdkggkdk kqiqtspvpv rknsrdeekr esriksyspy
601 afkffmeqhv enviktyqqk vnrrlqleqe makaglceae qeqmrkilyq kesnynrlkr

661 akmdksmfvk iktlgigafg evclackvdt halyamktlr kkdvlnrnqv ahvkaerdil
721 aeadnewvvk lyysfqdkds lyfvmdyipg gdmmsllirm evfpehlarf yiaeltlaie
781 svhkmgfihr dikpdnilid ldghikltdf glctgfrwth nskyyqkgsh vrqdsmepsd
841 lwddvsncrc gdrlktleqr arkqhqrcla hslvgtpnyi apevllrkgy tqlcdwwsvg
901 vilfemlvgq ppflaptpte tqlkvinwen tlhipaqvkl speardlitk lccsadhrlg
961 rngaddlkah pffsaidfss dirkqpapyv ptishpmdts nfdpvdeesp wndasegstk
1021 awdtltspnn khpehafyef tfrrffddng ypfrcpkpsg aeasqaessd lessdlvdqt
1081 egcqpvyv

Полагают, что LATS осуществляет отрицательную регуляцию активности YAP1. "YAP1" относится к yes–ассоциированному белку 1, также известному как YAP или YAP65, который представляет собой белок, выполняющий функцию регулятора транскрипции генов, участвующих в пролиферации клеток. Киназы LATS представляют собой серин/треониновые–протеинкиназы, которые, как было показано, непосредственно фосфорилируют YAP, что в результате приводит к его удерживанию в цитоплазме и инактивации. Без фосфорилирования посредством LATS YAP транслоцируется в ядро, образуя комплекс с ДНК–связывающим белком, TEAD, результатом чего является экспрессия гена, регулирующего последующие звенья сигнальных каскадов. (Barry ER & Camargo FD (2013) The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. Current opinion in cell biology 25(2):247–253.; Mo JS, Park HW, & Guan KL (2014) The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. EMBO reports 15(6):642–656; Pan D (2010) The hippo signaling pathway in development and cancer. Developmental cell 19(4):491–505.)

Путь Hippo/YAP задействован во многих типах клеток и тканях в системах организма млекопитающих, в том числе в различных видах рака. В частности, путь Hippo, очевидно, вовлечен в функционирование кишечника, желудка и пищевода, поджелудочной железы, слюнных желез, кожи, молочной железы, яичников, предстательной железы, головного мозга и нервной системы, костей, хондроцитов, жировых клеток, миоцитов, Т–лимфоцитов, В–лимфоцитов, миелоидных клеток, почек и легких. См. Nishio et al., 2017, Genes to Cells 22:6–31.

Ингибирование LATS1 и LATS2

Соединения формулы A1 или ее подформул в свободной форме или в солевой форме представляют собой высокоактивные ингибиторы LATS1 и/или LATS2.

В предпочтительном варианте осуществления соединения формулы A2 или ее подформул в свободной форме или в солевой форме представляют собой высокоактивные ингибиторы LATS1 и LATS2.

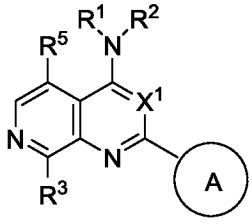
Эффективность ингибирования соединений в отношении LATS1 анализировали с помощью биохимического анализа LATS1 с помощью методики HTRF, что описано в примере A1 ниже. Значения эффективности ингибирования соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении LATS1 (IC_{50} для LATS1 в микромолях) в данном анализе приведены в таблице 1A. Следует отметить, что соединения с IC_{50}, составляющей

более 1 микромоль, рассматриваются как неактивные в данном анализе.

Эффективность ингибирования выбранных соединений в отношении LATS2 анализировали с помощью биохимического анализа LATS2 согласно Caliper, что описано в примере A3 ниже. Значения эффективности ингибирования соединений в соответствии с настоящим изобретением в отношении LATS2 (IC_{50} для LATS2 в микромолях) в данном анализе также приведены в таблице 1A. Следует отметить, что соединения с IC_{50}, составляющей более 1 микромоль, рассматриваются как неактивные в данном анализе.

Ингибиторы LATS

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединению формулы A2:



A2,

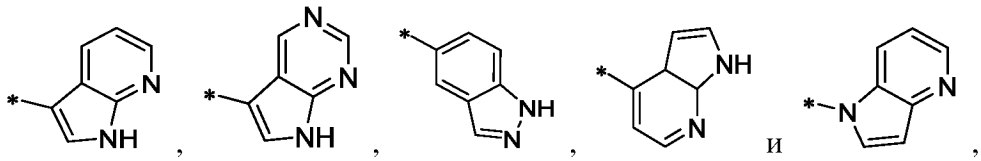
или его соли или стереоизомеру, где

X^1 представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы; и

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(ix) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $-NH-C_{1-6}$алкил$-C(O)R^0$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $-NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

или при условии, что если X^1 представляет собой CH, R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым

они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0;

при условии, что:

(1) если X^1 представляет собой N, кольцо A представляет собой 4–пиримидинил или 3–фтор–4–пиримидинил, R^1 представляет собой H или метил, R^3 представляет собой H или Cl, и R^5 представляет собой H; тогда R^2 не является C_{2-4}алкилом, который замещен заместителем, выбранным из $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино или *трет*–бутил–карбамоил–амино, и который необязательно дополнительно замещен незамещенным фенилом; и

(2) если X^1 представляет собой N, кольцо A представляет собой индазол–5–ил, R^1, R^3 и R^5 представляют собой H; тогда R^2 не является C_4алкилом, который замещен $–NH_2$.

Если не указано иное, термин "соединения по настоящему изобретению" относятся к соединениям формулы A2 или ее подформул или их солям, а также ко всем стереоизомерам (включая диастереоизомеры и энантиомеры), ротамерам, таутомерам и изотопно–меченным соединениям (включая замещенные дейтерием), а также к исходно образованным фрагментам.

Различные (перечисленные) варианты осуществления настоящего изобретения описаны в данном документе. Необходимо признать, что характеристики, описанные в каждом варианте осуществления, можно объединять с другими описанными характеристиками с получением дополнительных вариантов осуществления по настоящему изобретению. Если вариант осуществления описан как "в соответствии с" предыдущим вариантом осуществления, то предыдущий вариант осуществления включает свои подпункты вариантов осуществления, например, если вариант осуществления 20 описан как "в соответствии с" вариантами осуществления 1–19, то варианты осуществления 1–19 включают варианты осуществления 19 и 19A.

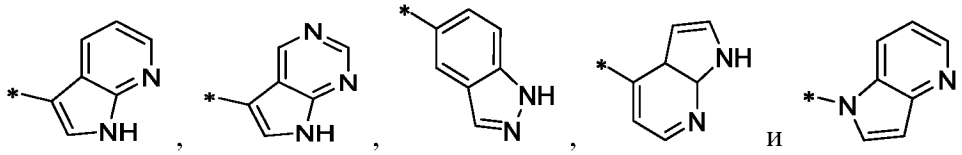
Вариант осуществления 1. Соединение формулы A2 или его соль, описанные выше.

Вариант осуществления 2. Соединение формулы A2 в соответствии с вариантом осуществления 1 или его соль, где

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, которые выбраны из N, при условии, что по меньшей мере один из членов кольца, представляющий собой атом азота, представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

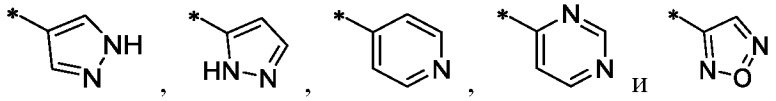
(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из

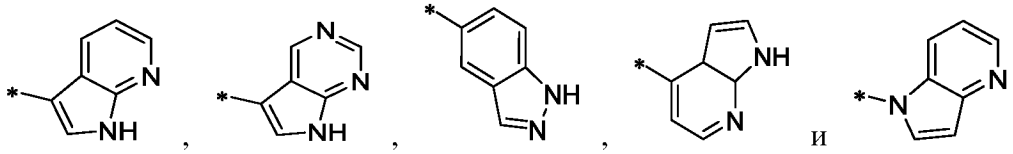


где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы; и

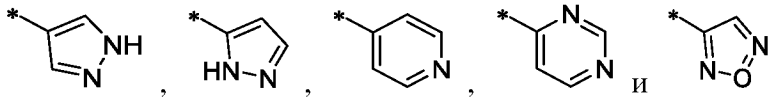
где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$ и C_{3-6}циклоалкила.

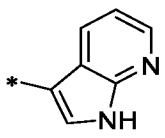
Вариант осуществления 3. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, где кольцо A выбрано

из  , каждое из которых не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

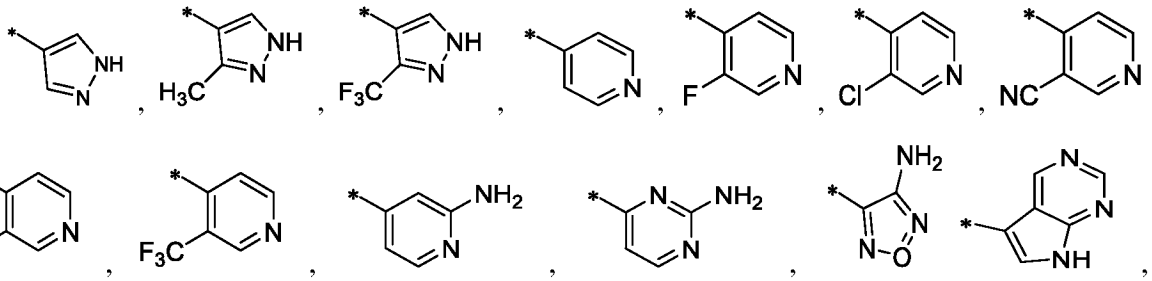
или из  , каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

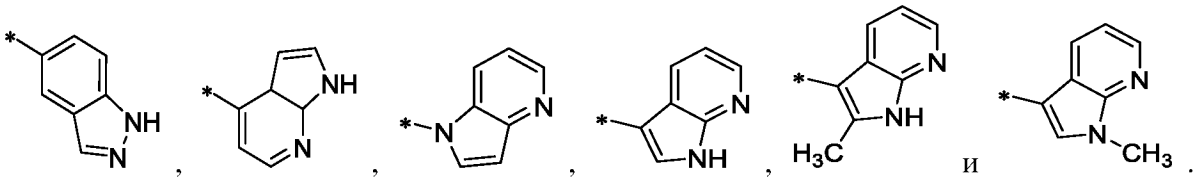
Вариант осуществления 4. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–3, где кольцо A выбрано

из  , каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

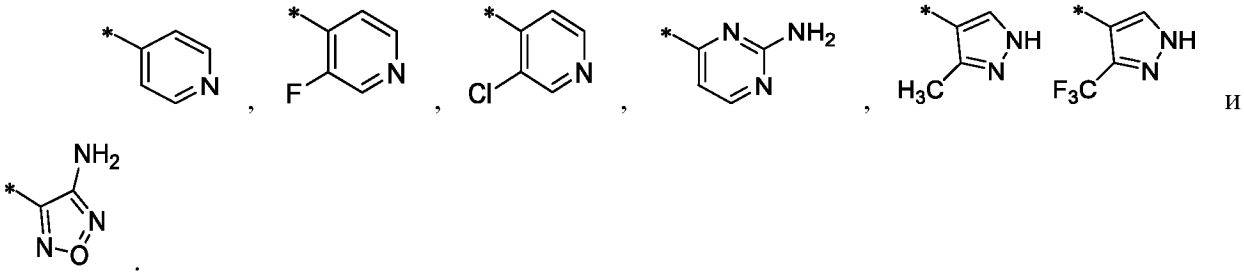
или представляет собой  , которое не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

Вариант осуществления 5. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–3, где кольцо A выбрано из

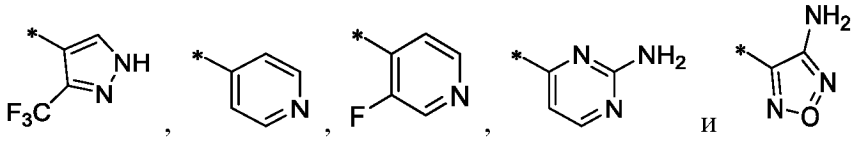


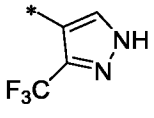


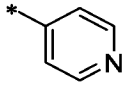
Вариант осуществления 6. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–5, где кольцо A выбрано из

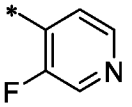


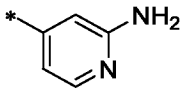
Вариант осуществления 7. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–6, где кольцо A выбрано из

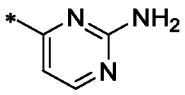


Вариант осуществления 8. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–7, где кольцо A представляет собой  .

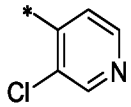
Вариант осуществления 9. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–7, где кольцо A представляет собой  .

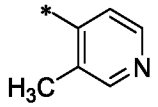
Вариант осуществления 10. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–7, где кольцо A представляет собой  .

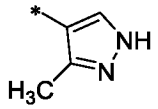
Вариант осуществления 11. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–7, где кольцо A представляет собой  .

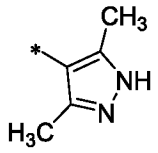
Вариант осуществления 12. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–7, где кольцо A представляет собой  .

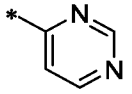
Вариант осуществления 13. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с

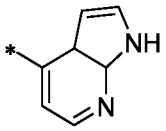
любым из вариантов осуществления 1–5, где кольцо A представляет собой  .

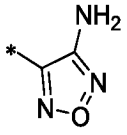
Вариант осуществления 14. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–5, где кольцо A представляет собой  .

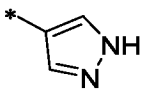
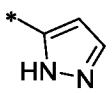
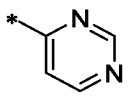
Вариант осуществления 15. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–6, где кольцо A представляет собой  .

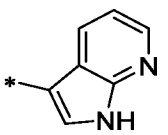
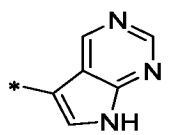
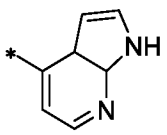
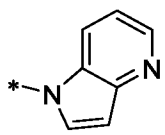
Вариант осуществления 16. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–3, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 17. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–4, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 18. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–5, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 18A. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–5, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 19. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–3, где кольцо A выбрано из  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

или из  ,  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

Вариант осуществления 20. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–19, где R^1 выбран из водорода, метила и этила.

Вариант осуществления 21. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–20, где R^1 представляет собой метил.

Вариант осуществления 22. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–20, где R^1 представляет собой водород.

Вариант осуществления 23. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–22, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(v) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(vi) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$.

Вариант осуществления 24. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–22, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(vi) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

и где атом C в C_{1-8}алкиле, который не замещен или замещен 1–3 заместителями (i)–(x), который представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы, не является $-CH_2-$группой;

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$.

Вариант осуществления 25. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или –C(O)H;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)-C_{1-6}$алкокси и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен –C(O)OH; и

(vi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или $-C(O)-C_{1-6}$алкокси.

Вариант осуществления 26. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–25, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) C_{1-6}галогеналкила;

(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(iii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 27. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, где R^2 представляет собой C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила и $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 28. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, где R^2 представляет собой C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 29. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен C_{1-6}галогеналкилом.

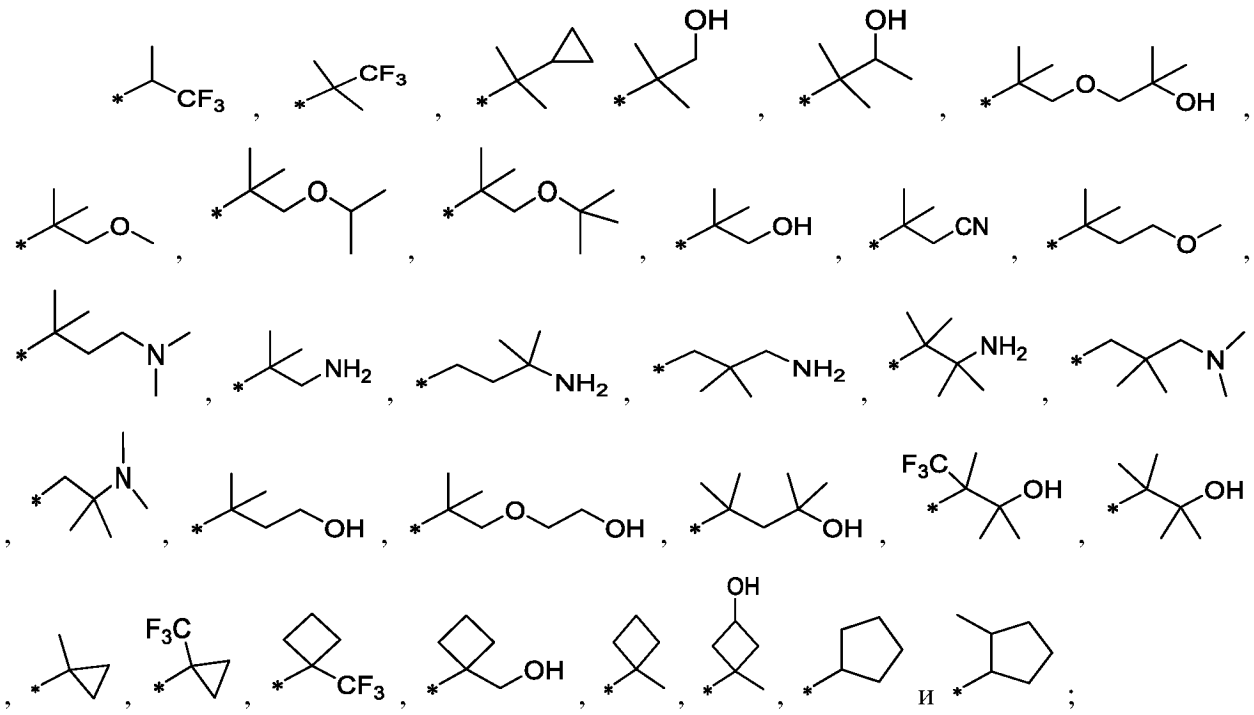
Вариант осуществления 30. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен $–O–C_{1-6}$алкил–OH.

Вариант осуществления 31. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, где R^2 представляет собой C_{3-6}циклоалкил, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}галогеналкила, C_{1-6}алкиламино, R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 32. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26 и 31, где R^2 представляет собой незамещенный C_{3-6}циклоалкил.

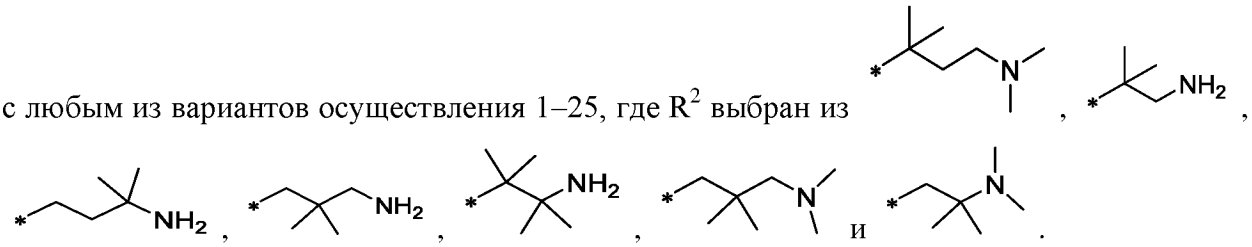
Вариант осуществления 33. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26 и 31, где R^2 представляет собой C_{3-6}циклоалкил, который является замещенным C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом.

Вариант осуществления 34. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–25, где R^2 выбран из изопропила, s–бутила, *трет*–бутила, 2–метил–бут–2–ила, 2,4,4–триметилпентан–2–ила,

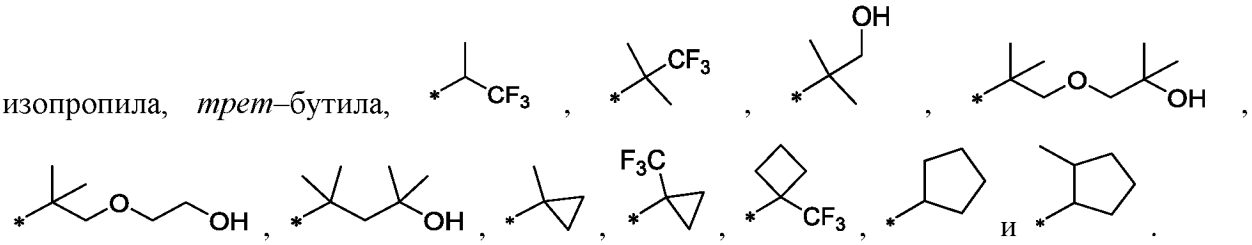


где "*" представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы.

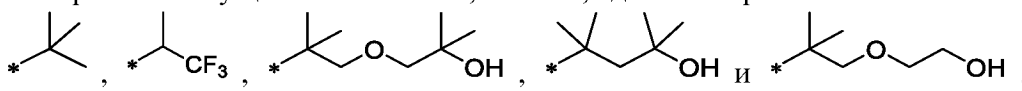
Вариант осуществления 34A. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–25, где R^2 выбран из



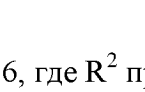
Вариант осуществления 35. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23 и 25–27, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила, *трет*–бутила,



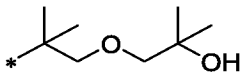
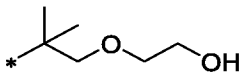
Вариант осуществления 36. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, 34 и 35, где R^2 выбран из

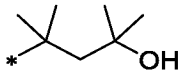


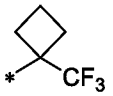
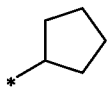
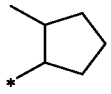
Вариант осуществления 37. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, 29 и 34–36, где R^2 представляет собой

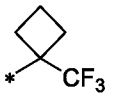


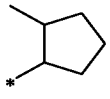
Вариант осуществления 38. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, 30 и 34–36 где R^2 представляет собой

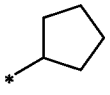
 или  .

Вариант осуществления 39. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–27, 31 и 34–36, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 40. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, 31, 34 и 35, где R^2 выбран из , ,  ,  и  .

Вариант осуществления 41. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, 31, 33–35 и 40, где R^2 выбран из или  .

Вариант осуществления 42. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, 31, 33–35 и 40, где R^2 представляет собой или  .

Вариант осуществления 43. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–26, 31, 32, 34, 35 и 40, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 44. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23, 25–30 и 35, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила и *трет*–бутила.

Вариант осуществления 45. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–23, 25–30, 35 и 44, где R^2 представляет собой н–пропил.

Вариант осуществления 46. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–30, 35 и 44, где R^2 представляет собой изопропил.

Вариант осуществления 47. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–30, 35 и 44, где R^2 представляет собой *трет*–бутил.

Вариант осуществления 48. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–19, где

X^1 представляет собой CH; и

R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный с помощью R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0.

Вариант осуществления 49. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–19 и 48, где

X^1 представляет собой CH; и

R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 5– или 6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, выбранных из N, O и S, где 5– или 6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C_{1-4}алкила и C_{1-4}галогеналкила.

Вариант осуществления 50. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–19, 48 и 49, где

X^1 представляет собой CH; и

R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве члена кольца дополнительный гетероатом, выбранный из N и O, где 6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C_{1-6}алкила и C_{1-6}галогеналкила.

Вариант осуществления 51. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–19 и 48–50, где

X^1 представляет собой CH; и

R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, выбранного из пиперидинила, пиперазинила и морфолинила, где пиперидинил, пиперазинил или морфолинил являются незамещенными или замещенными 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила и C_{1-6}алкила.

Вариант осуществления 52. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–51, где R^3 выбран из водорода, хлора и метила.

Вариант осуществления 53. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–52, где R^3 представляет собой водород.

Вариант осуществления 53A. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–52, где R^3 представляет собой хлор.

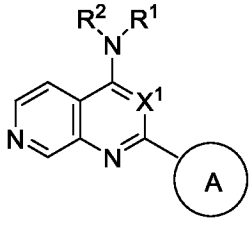
Вариант осуществления 53B. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии

с любым из вариантов осуществления 1–52, где R^3 представляет собой метил.

Вариант осуществления 54. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–53, где R^5 выбран из водорода и хлора.

Вариант осуществления 55. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–54, где R^5 представляет собой водород.

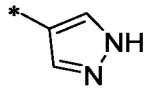
Вариант осуществления 56. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, где соединение представляет собой соединение формулы A3:

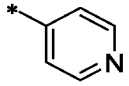


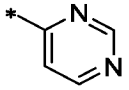
A3,

где

X^1 представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой 

, 

или 

, каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

R^1 представляет собой водород или незамещенный C_{1-6}алкил; и

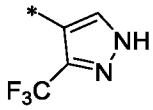
R^2 представляет собой

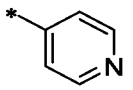
(a) C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен 1 заместителем, выбранным из

(i) C_{1-4}галогеналкила и

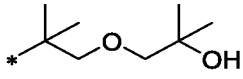
(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; или

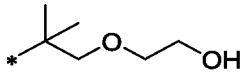
(b) моноциклический C_{3-6}циклоалкил, который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом.

Вариант осуществления 57. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 56, где кольцо A представляет собой 

или 

.

Вариант осуществления 58. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 56 или вариантом осуществления 57, где R^2 представляет собой 

или 

.

Вариант осуществления 59. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 56 или вариантом осуществления 57, где R^2 представляет собой н–пропил или трет–бутил, который не замещен или замещен трифторметилом.

Вариант осуществления 60. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, выбранное из: N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–бутил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; N–этил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–циклогексилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилоксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; N–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метил–4–фенилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)уксусной кислоты; (1R,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–(1–метансульфонил–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (2S)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–[(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)амино]уксусной кислоты; (2R)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; метил 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаноата; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–(2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этокси)этан–1–ола; 2–(гидроксиметил)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–метил–3–(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутанамидо)бутановой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–

трифтор–3–фенилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–{[4–(диметиламино)оксан–4–ил]метил}–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(2–метансульфонилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(адамантан–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропанамида; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропан–2–сульфонамида; 2–(пиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4,4,4–трифтор–2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентил)метанола; N–(3–метоксициклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1R,2R)–1–N,2–N–диметил–1–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]циклогексан–1,2–диамина; метил–(1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; этил–1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; 1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; (1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; N–(бутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбут–3–ин–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1r,3s)–3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–ола; 2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–(2,4,4–триметилпентан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пентан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–метил–1–(морфолин–4–

ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(трет–бутокси)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4,4,4–трифтор–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–пентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–[1–(1H–индол–3–ил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(4–фторфенил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–фенилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(4–фторфенил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–({[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}метил)циклопентан–1–ола; N,N–диметил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метоксифенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–фенил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 6–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}гексановой кислоты; N–(3–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(1–фенилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; трет–бутил–N–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)карбамата; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; метил–2–(1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)ацетата; N–(2–метилпропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутаннитрила; N–(6–аминогексил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–аминобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаннитрила; N–[2–метил–1–(2–метилпиперидин–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–[4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил]пиридин–2–амина; 2–[1–(бензолсульфонил)–2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил]–N–трет–бутилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–

бутил–2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метилпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пентан–2–ола; N–этил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–[2–метил–2–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пропокси]пропан–2–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–циклопентилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–(2–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ола; N–метил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[2–хлор–5–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–индазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(4–гидрокси–2,4–диметилпентан–2–ил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–(3,5–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2,3–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–

метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–тиазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–[2–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–карбонитрила; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,2–оксазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(диметил–1,2–оксазол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; н–пропил–2–{7H–пирроло[2,3–d]пиримидин–5–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–циклопропил–1H–пиразол–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{1–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–[(1R)–1–фенилэтил]–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(5–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридазин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–оксазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–1,2,3–триазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1,2–оксазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(2H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1–метил–1H–

пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)метанола; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–4–ил)–N–(2–метилпропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–{[4–(трет–бутиламино)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–5–ил]амино}этокси)этан–1–ола; N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[2–метил–1–(пропан–2–илокси)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[(2S)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[(2R)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2,2–диметил–1–[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]пиперидин–4–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутил)амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридазин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиридин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N, N–диэтил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; (3–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–3–метилбутил)диметиламина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(пиперидин–1–ил)–1,7–нафтиридина;

2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(морфолин–4–ил)–1,7–нафтиридина; N–трет–бутил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–2–метилпропан–1–ола; 1–[2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]–2,2–диметилпиперидин–4–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–1,7–нафтиридин–4–амина; 4–(4–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 4–(пиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 4–(2–метилпиперидин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклобутил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–метил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамина; N–(оксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 4–(3,3–диметилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2,2–диметил–4–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)морфолина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2,2–диметил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамина; N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамина; 4–(2–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамина; (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)–1,7–нафтиридина; N–(трет–бутил)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2–метил–1–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–2–ил)карбамата; *трет*–бутил–(2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)этил)карбамата; 2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина; N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)этан–1,2–диамина; N, N,2–триметил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; N^1,3–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2,2–диметил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)карбамата; 2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутанамида; (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; 2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина; (S)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; этил–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноата; N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина; N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–

диамина; 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; (S)–1,1,1–трифтор–2–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)амино)пропан–2–ола; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N, N–диэтил–1,7–нафтиридин–4–амина; N–((1R,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (S)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (R)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1R,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; н–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *трет*–бутил (3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамата; N^1,N^1,N^3,2,2–пентаметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; N^1,N^1–диэтил–3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–фторпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^3–(2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–аминопиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; и 3–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина.

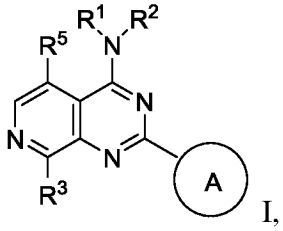
Вариант осуществления 60A. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, выбранные из: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *н–пропил*–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; N–(1–

метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 60B. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, выбранные из: N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 60C. Соединение формулы A2 или его соль в соответствии с вариантом осуществления 1, где соединение представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

Вариант осуществления 61. Соединение формулы I или его соль



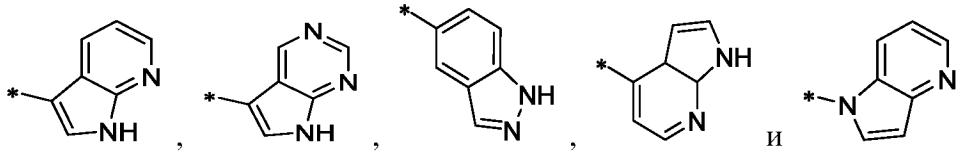
I,

где

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила, $–NH_2$, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $C_{3–6}$циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –

$C(O)R^0$;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0;

при условии, что:

(1) если кольцо A представляет собой 4–пиримидинил или 3–фтор–4–пиримидинил, R^1 представляет собой H или метил, R^3 представляет собой H или Cl, и R^5 представляет собой H; тогда R^2 не является C_{2-4}алкилом, который замещен заместителем, выбранным из $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино или *трет*–бутил–карбамоил–амино, и который необязательно дополнительно замещен незамещенным фенилом; и

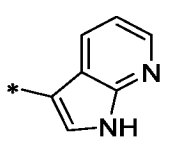
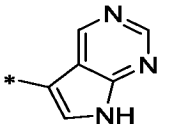
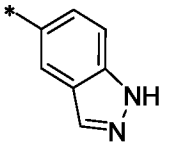
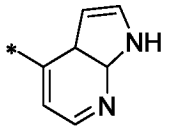
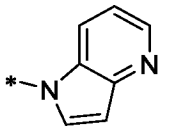
(2) если кольцо A представляет собой индазол–5–ил, R^1, R^3 и R^5 представляют собой H; тогда R^2 не является C_4алкилом, который замещен $–NH_2$.

Вариант осуществления 62. Соединение формулы I в соответствии с вариантом осуществления 61 или его соль, где

кольцо A представляет собой

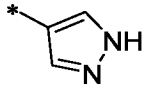
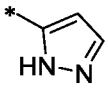
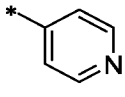
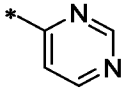
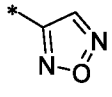
(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, которые выбраны из N, при условии, что по меньшей мере один из членов кольца, представляющий собой атом азота, представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 5–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

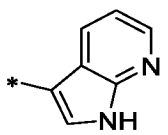
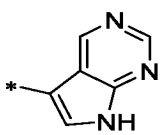
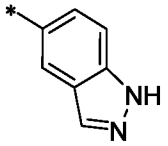
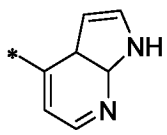
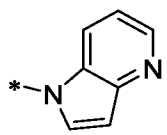
(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из


, 
, 
, 
и 
,

где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы и кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$ и C_{3-6}циклоалкила.

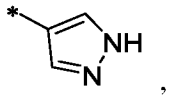
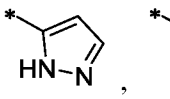
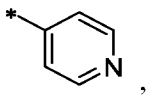
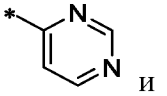
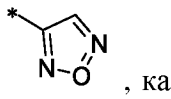
Вариант осуществления 63. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 61 или вариантом осуществления 62, где кольцо A выбрано

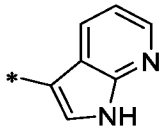
из 
, 
, 
, 
и 
, каждое из которых не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

или из  ,  ,  ,  и  ,

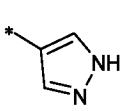
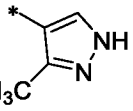
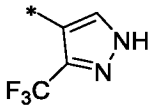
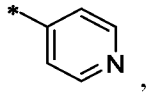
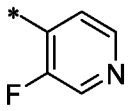
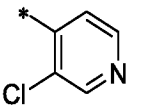
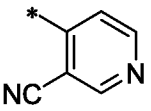
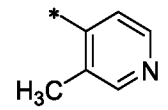
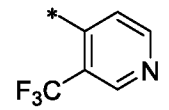
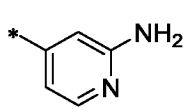
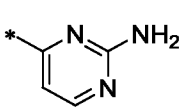
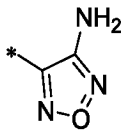
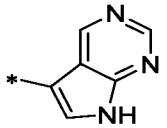
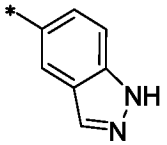
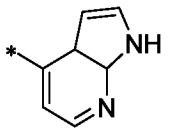
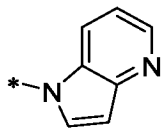
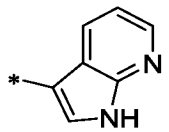
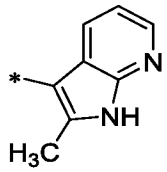
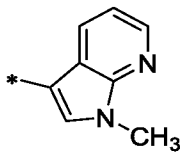
каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

Вариант осуществления 64. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–63, где кольцо A выбрано

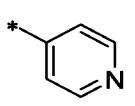
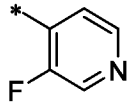
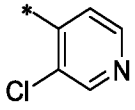
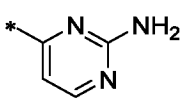
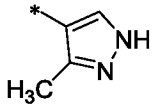
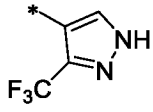
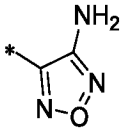
из  ,  ,  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

или представляет собой  , которое не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

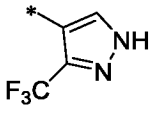
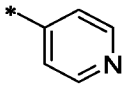
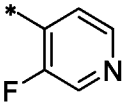
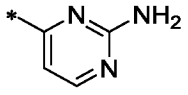
Вариант осуществления 65. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–63, где кольцо A выбрано из

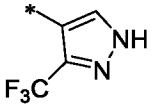
 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  и  .

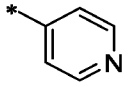
Вариант осуществления 66. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–65, где кольцо A выбрано из

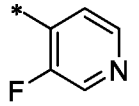
 ,  ,  ,  ,  ,  и  .

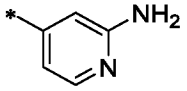
Вариант осуществления 67. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–66, где кольцо A выбрано из

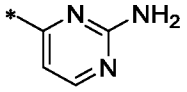
 ,  ,  и  .

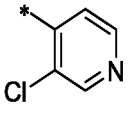
Вариант осуществления 68. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–67, где кольцо A представляет собой  .

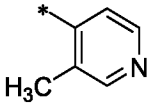
Вариант осуществления 69. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–67, где кольцо A представляет собой  .

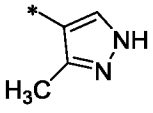
Вариант осуществления 70. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–67, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 71. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–67, где кольцо A представляет собой  .

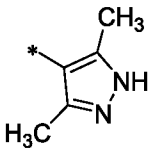
Вариант осуществления 72. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–67, где кольцо A представляет собой  .

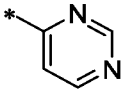
Вариант осуществления 73. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–65, где кольцо A представляет собой  .

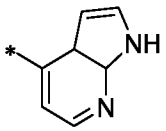
Вариант осуществления 74. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–65, где кольцо A представляет собой  .

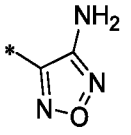
Вариант осуществления 75. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–66, где кольцо A представляет собой  .

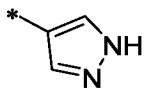
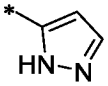
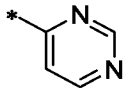
Вариант осуществления 76. Соединение формулы I или его соль в соответствии с

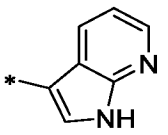
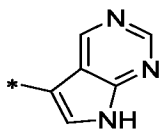
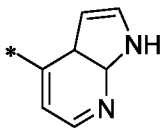
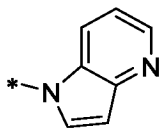
любым из вариантов осуществления 61–63, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 77. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–64, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 78. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–65, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 78A. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–65, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 79. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–63, где кольцо A выбрано из  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

или из  ,  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

Вариант осуществления 80. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–79, где R^1 выбран из водорода, метила и этила.

Вариант осуществления 81. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–80, где R^1 представляет собой метил.

Вариант осуществления 82. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–80, где R^1 представляет собой водород.

Вариант осуществления 83. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–82, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(vi) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$.

Вариант осуществления 84. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–82, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(vi) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-}

$_{6}$алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

и где атом C в C_{1-8}алкиле, который не замещен или замещен 1–3 заместителями (i) – (x), который представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы, не является $–CH_2–$группой.

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$.

Вариант осуществления 85. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–83, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или –C(O)H;

(v) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)–C_{1-6}$алкокси и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен –C(O)OH; и

(vi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен одним гидроксилом; и

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или $–C(O)–C_{1-6}$алкокси.

Вариант осуществления 86. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–85, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) C_{1-6}галогеналкила;

(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(iii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями,

независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 87. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила и $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 88. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 89. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен C_{1-6}галогеналкилом.

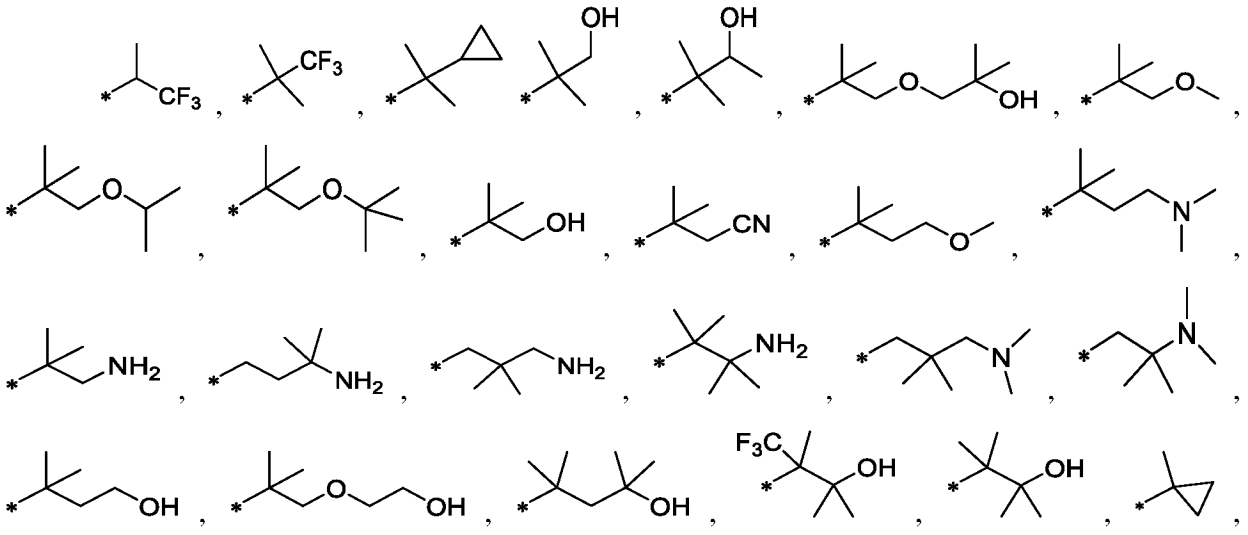
Вариант осуществления 90. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, где R^2 представляет собой C_{1-6}алкил, который не замещен или замещен $–O–C_{1-6}$алкил–OH.

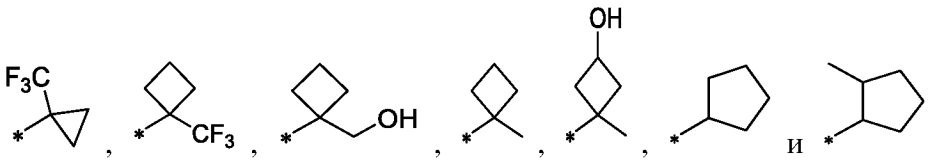
Вариант осуществления 91. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, где R^2 представляет собой C_{3-6}циклоалкил, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}галогеналкила, C_{1-6}алкиламино, R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 92. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86 и 91, где R^2 представляет собой незамещенный C_{3-6}циклоалкил.

Вариант осуществления 93. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86 и 91, где R^2 представляет собой C_{3-6}циклоалкил, который является замещенным C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом.

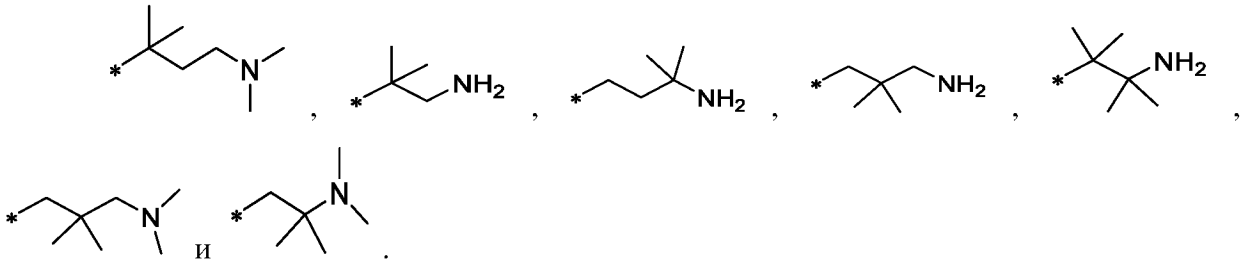
Вариант осуществления 94. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–85, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила, *втор*–бутила, *трет*–бутил, 2–метил–бут–2–ил, 2,4,4–триметилпентан–2–ила,





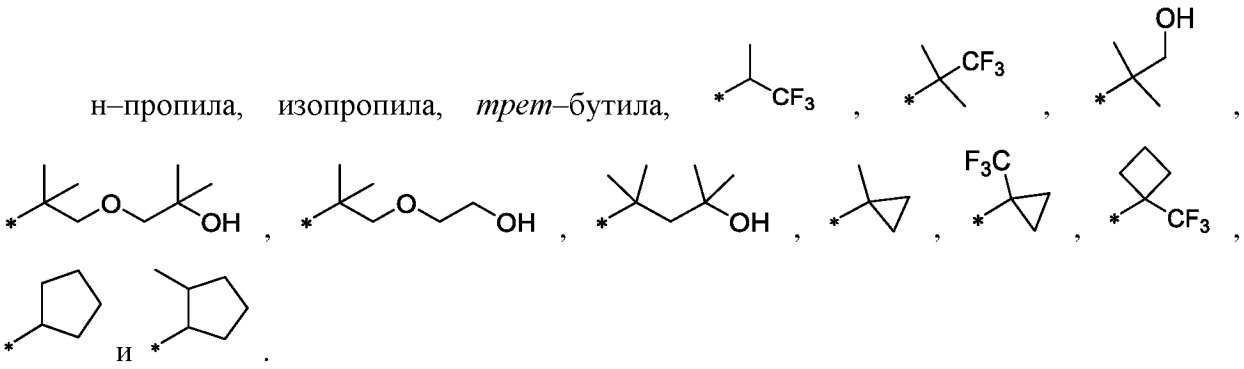
; где "*" представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы.

Вариант осуществления 94A. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–85, где R^2 выбран из



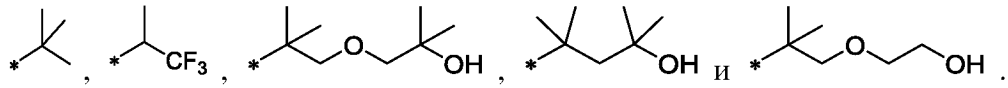
и .

Вариант осуществления 95. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–83 и 85–87, где R^2 выбран из

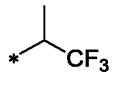
н–пропила, изопропила, *трет*–бутила, 

и .

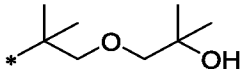
Вариант осуществления 96. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, 94 и 95, где R^2 выбран из



.

Вариант осуществления 97. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, 89 и 94–96, где R^2 представляет собой 

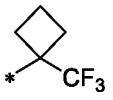
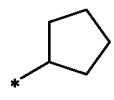
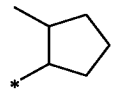
.

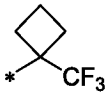
Вариант осуществления 98. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, 90 и 94–96, где R^2 представляет собой 

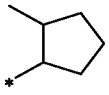
.

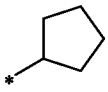
Вариант осуществления 99. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–87, 91 и 94–96, где R^2 представляет собой

.

Вариант осуществления 100. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, 91, 94 и 95, где R^2 выбран из , ,  ,  и  .

Вариант осуществления 101. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, 91, 93–95 и 100, где R^2 представляет собой или  .

Вариант осуществления 102. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, 91, 93–95 и 100, где R^2 представляет собой или  .

Вариант осуществления 103. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–86, 91–95, 100 и 102, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 104. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–83, 85–90 и 95, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила и *трет*–бутила.

Вариант осуществления 105. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–83, 85–90, 95 и 104, где R^2 представляет собой н–пропил.

Вариант осуществления 106. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–90, 95 и 104, где R^2 представляет собой изопропил.

Вариант осуществления 107. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–90, 95 и 104, где R^2 представляет собой *тет*–бутил.

Вариант осуществления 108. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–107, где R^3 выбран из водорода, хлора и метила.

Вариант осуществления 109. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–108, где R^3 представляет собой водород.

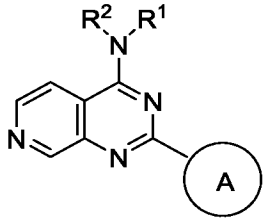
Вариант осуществления 109A. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–108, где R^3 представляет собой хлор.

Вариант осуществления 109B. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–108, где R^3 представляет собой метил.

Вариант осуществления 110. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–109, где R^5 выбран из водорода и хлора.

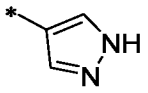
Вариант осуществления 111. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 61–110, где R^5 представляет собой водород.

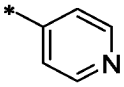
Вариант осуществления 112. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 61, где соединение представляет собой соединение формулы V:

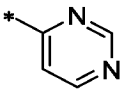


V,

где

кольцо A представляет собой 

, 

или 

, каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

R^1 представляет собой водород или незамещенный C_{1-6}алкил; и

R^2 представляет собой

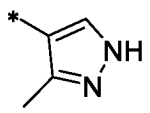
(a) C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен 1 заместителем, выбранным из

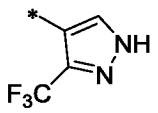
(i) C_{1-4}галогеналкила или

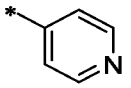
(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; или

(b) моноциклический C_{3-6}циклоалкил, который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом.

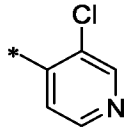
Вариант осуществления 113. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 112, где кольцо A выбрано из

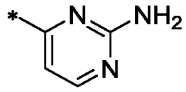


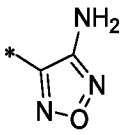
, 

, 

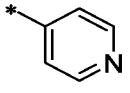
,

, 

, 

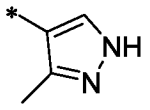
и 

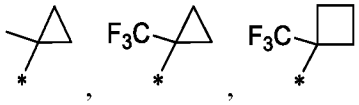
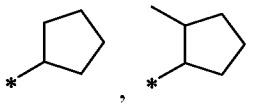
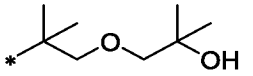
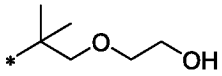
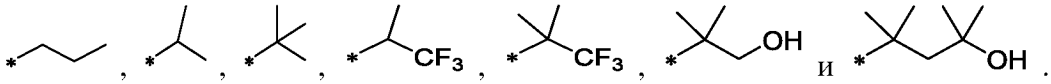
.

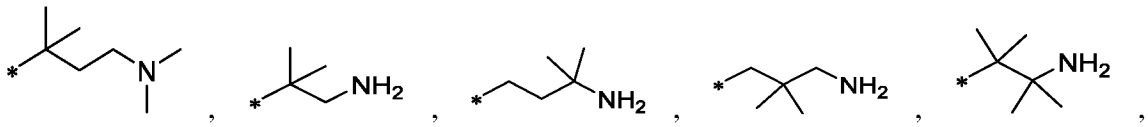
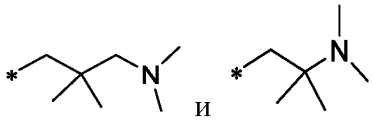
Вариант осуществления 114. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 112 или вариантом осуществления 113, где кольцо A представляет собой 

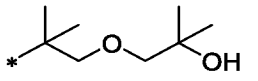
.

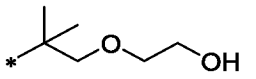
Вариант осуществления 115. Соединение формулы I или его соль в соответствии с

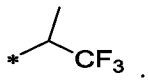
вариантом осуществления 112 или вариантом осуществления 113, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 116. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 112–115, где R^2 выбран из  ,  , ,  ,  ,  .

Вариант осуществления 116A. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 112–115, где R^2 выбран из  ,  .

Вариант осуществления 117. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 112–116, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 118. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 112–116, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 119. Соединение формулы I или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 112–116, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 120. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 61, выбранное из: N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–

ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–бутил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; N–этил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–циклогексилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилоксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; N–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метил–4–фенилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)уксусной кислоты; (1R,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–(1–метансульфонил–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (2S)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–[(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)амино]уксусной кислоты; (2R)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; метил–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаноата; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–(2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этокси)этан–1–ола; 2–(гидроксиметил)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–метил–3–(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутанамидо)бутановой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–3–фенилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–{[4–(диметиламино)оксан–4–ил]метил}–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(2–метансульфонилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(адамантан–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропанамида; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–

ил]амино}бутановой кислоты; N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропан–2–сульфонамида; 2–(пиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4,4,4–трифтор–2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентил)метанола; N–(3–метоксициклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1R,2R)–1–N,2–N–диметил–1–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]циклогексан–1,2–диамина; метил–(1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; этил–1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; 1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; (1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; N–(бутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбут–3–ин–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1r,3s)–3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–ола; 2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–(2,4,4–триметилпентан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пентан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(трет–бутокси)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4,4,4–трифтор–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–пентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–[1–(1H–индол–3–ил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(4–фторфенил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(2–фенилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(4–фторфенил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–({[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}метил)циклопентан–1–ола; N,N–диметил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метоксифенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–фенил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 6–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}гексановой кислоты; N–(3–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(1–фенилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; трет–бутил–N–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)карбамата; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; метил–2–(1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)ацетата; N–(2–метилпропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутаннитрила; N–(6–аминогексил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–аминобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаннитрила; N–[2–метил–1–(2–метилпиперидин–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–[4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил]пиридин–2–амина; 2–[1–(бензолсульфонил)–2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил]–N–трет–бутилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метилпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пентан–2–ола; N–этил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–

d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–[2–метил–2–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пропокси]пропан–2–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–циклопентилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–(2–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ола; N–метил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[2–хлор–5–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–индазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(4–гидрокси–2,4–диметилпентан–2–ил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–(3,5–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2,3–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–тиазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–[2–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–карбонитрила; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,2–оксазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(диметил–1,2–оксазол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}пиридо[3,4–

d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; н–пропил–2–{7H–пирроло[2,3–d]пиримидин–5–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–циклопропил–1H–пиразол–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{1–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–[(1R)–1–фенилэтил]–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(5–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридазин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–оксазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–1,2,3–триазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1,2–оксазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(2H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–

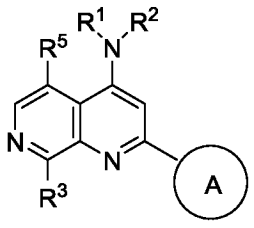
d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)метанола; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–4–ил)–N–(2–метилпропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2–метил–1–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–2–ил)карбамата; *трет*–бутил–(2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)этил)карбамата; 2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина; N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)этан–1,2–диамина; N, N,2–триметил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; N^1,3–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2,2–диметил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)карбамата; 2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутанамида; (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; 2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина; (S)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; этил–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноата; N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина; N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина; 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; (S)–1,1,1–трифтор–2–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)амино)пропан–2–ола; 5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–{[4–(трет–бутиламино)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–5–ил]амино}этокси)этан–1–ола; N–((1R,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (S)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (R)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1R,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *трет*–бутил–

(3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамата; N^1,N^1,N^3,2,2–пентаметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; N^1,N^1–диэтил–3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–фторпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^3–(2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–аминопиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и 3–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина.

Вариант осуществления 120A. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 61, выбранное из: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *н–пропил*–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 120B. Соединение формулы I или его соль в соответствии с вариантом осуществления 61, где соединение представляет собой N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин.

Вариант осуществления 121. Соединение формулы II или его соль



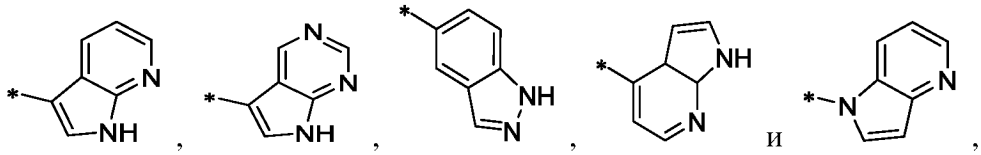
II,

где

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, –NH_2, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –$C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –$C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –$C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –$C(O)R^0$; или

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

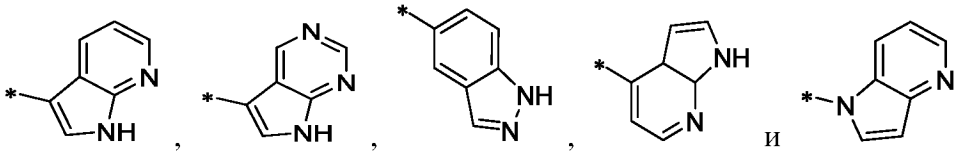
Вариант осуществления 122. Соединение формулы II в соответствии с вариантом осуществления 121 или его соль, где

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–2

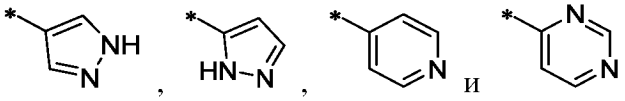
гетероатома, которые выбраны из N, при условии, что по меньшей мере один из членов кольца, представляющий собой атом азота, представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

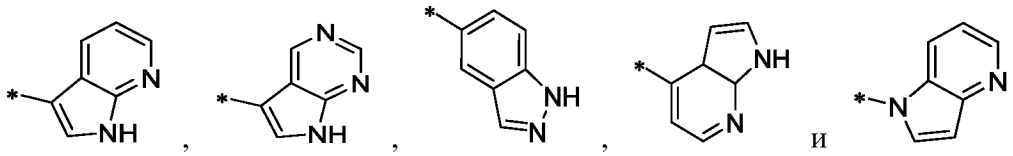
(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



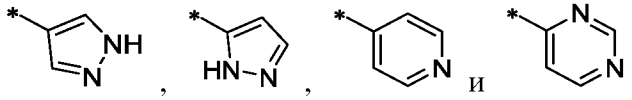
где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы и кольцо не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$ и C_{3-6}циклоалкила.

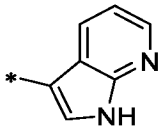
Вариант осуществления 123. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 121 или вариантом осуществления 122, где кольцо A выбрано

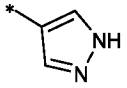
Из  , каждое из которых не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

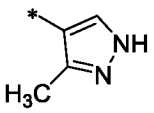
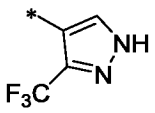
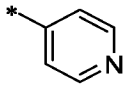
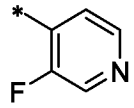
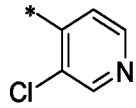
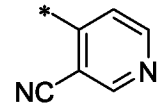
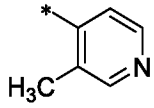
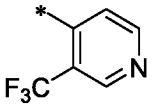
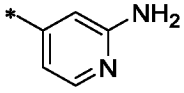
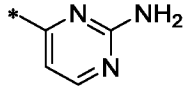
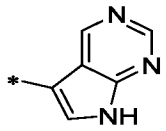
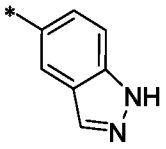
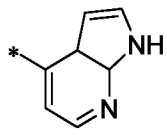
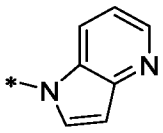
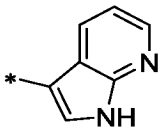
или из  , каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

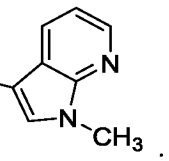
Вариант осуществления 124. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–123, где кольцо A выбрано

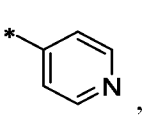
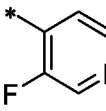
из  , каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

или представляет собой  , которое не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

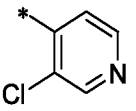
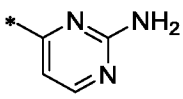
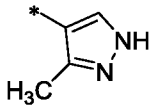
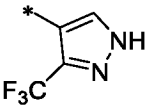
Вариант осуществления 125. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–123, где кольцо A выбрано из  ,

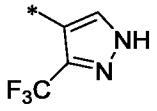


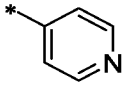
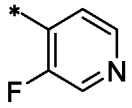
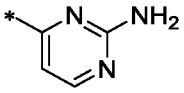



Вариант осуществления 126. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–125, где кольцо A выбрано из

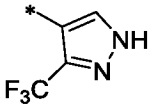





Вариант осуществления 127. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–126, где кольцо A выбрано из



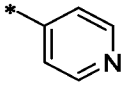




Вариант осуществления 128. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–127, где кольцо A представляет собой



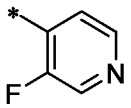
.

Вариант осуществления 129. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–127, где кольцо A представляет собой



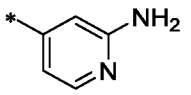
.

Вариант осуществления 130. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–127, где кольцо A представляет собой



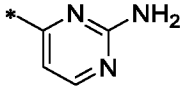
.

Вариант осуществления 131. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–127, где кольцо A представляет собой

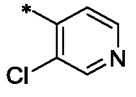


.

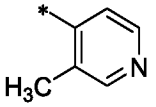
Вариант осуществления 132. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–127, где кольцо A представляет собой



.

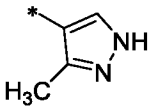
Вариант осуществления 133. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–125, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 134. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–125, где кольцо A представляет собой



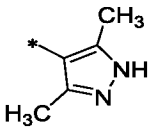
.

Вариант осуществления 135. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–126, где кольцо A представляет собой

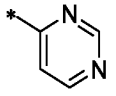


.

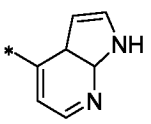
Вариант осуществления 136. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–123, где кольцо A представляет собой



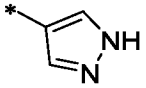
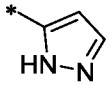
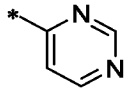
.

Вариант осуществления 137. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–124, где кольцо A представляет собой  .

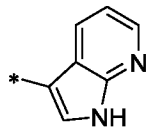
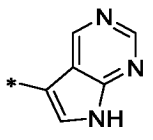
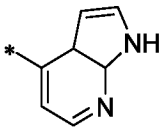
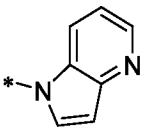
Вариант осуществления 138. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–125, где кольцо A представляет собой



.

Вариант осуществления 139. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–123, где кольцо A выбрано из  ,  и  , каждое из которых не замещено или

замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из циано, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, NH_2 и C_{3-6}циклоалкила;

или из  ,  ,  и  , каждое из которых не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

Вариант осуществления 140. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–139, где R^1 выбран из водорода, метила и этила.

Вариант осуществления 141. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–140, где R^1 представляет собой метил.

Вариант осуществления 142. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–140, где R^1 представляет собой водород.

Вариант осуществления 143. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–142, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(v) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(vi) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$.

Вариант осуществления 144. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–142, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(v) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(vi) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом; и

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

где атом C в C_{1-8}алкиле, который не замещен или замещен 1–3 заместителями (i) – (x), который представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы, не является $–CH_2–$группой;

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(c) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве члена кольца гетероатом, выбранный из N и O, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$.

Вариант осуществления 145. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–143, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или $–C(O)H$;

(v) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или $C_{1–6}$алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)–C_{1–6}$алкокси и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен –C(O)OH; и

(vi) моноциклического $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(b) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен гидроксилом или $–C(O)–C_{1–6}$алкокси.

Вариант осуществления 146. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–145, где

R^2 выбран из

(a) $C_{1–8}$алкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из

(i) $C_{1–6}$галогеналкила;

(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(iii) моноциклического $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен гидроксилом; и

(b) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 147. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146, где R^2 представляет собой $C_{1–6}$алкил, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила и $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 148. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, где R^2 представляет собой $C_{1–6}$алкил, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 149. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, где R^2 представляет собой $C_{1–6}$алкил, который не замещен или замещен $C_{1–6}$галогеналкилом.

Вариант осуществления 150. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, где R^2 представляет собой $C_{1–6}$алкил, который не замещен или замещен $–O–C_{1–6}$алкил–OH.

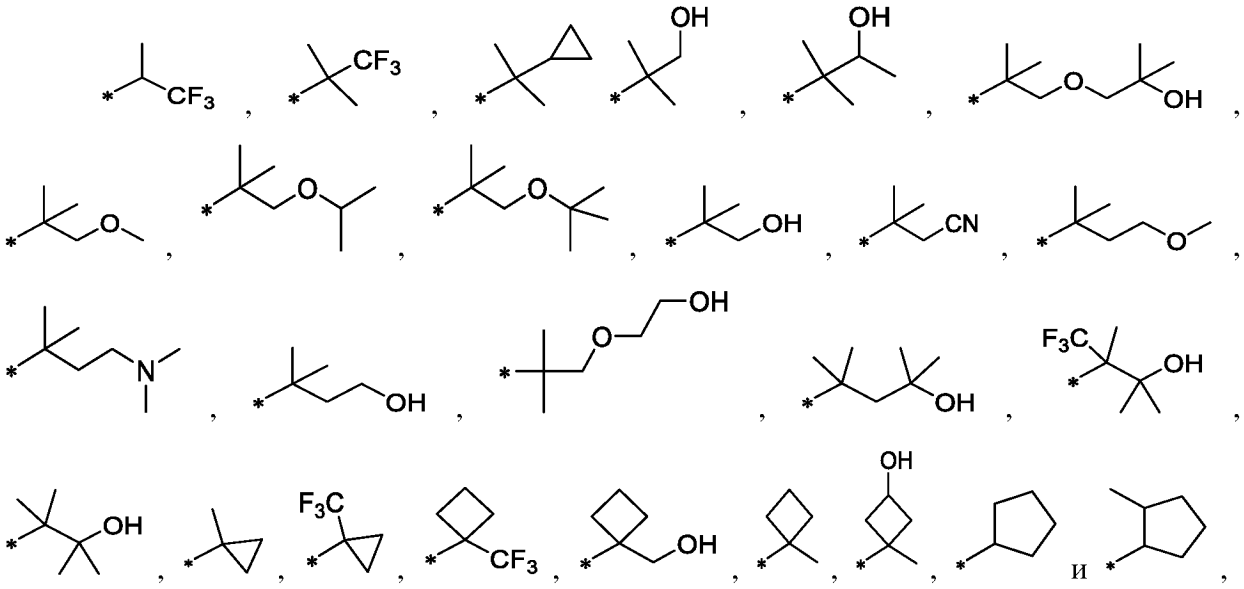
Вариант осуществления 151. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146, где R^2 представляет собой $C_{3–6}$циклоалкил, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из $C_{1–6}$галогеналкила, $C_{1–6}$алкиламино, R^0 и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен гидроксилом.

Вариант осуществления 152. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146 и 151, где R^2 представляет собой

незамещенный C_{3-6}циклоалкил.

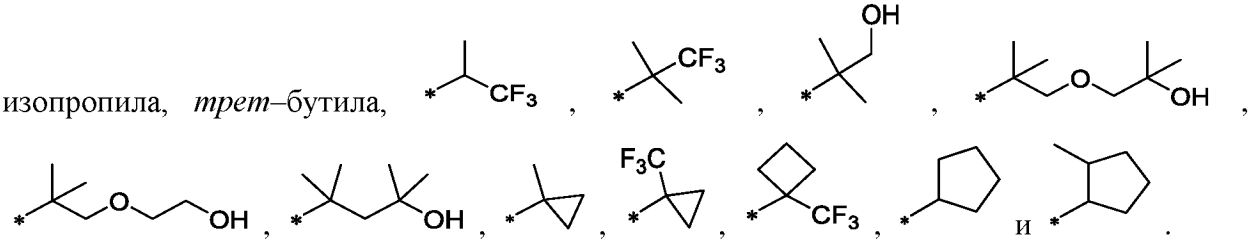
Вариант осуществления 153. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146 и 151, где R^2 представляет собой C_{3-6}циклоалкил, который является замещенным C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом.

Вариант осуществления 154. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–145, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила, *втор*–бутила, *трет*–бутила, 2–метил–бут–2–ила, 2,4,4–триметилпентан–2–ила,

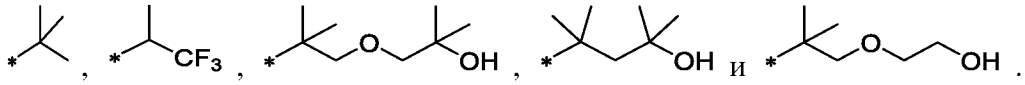


где "*" представляет собой точку присоединения R^2 к остальной части молекулы.

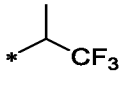
Вариант осуществления 155. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–143 и 145–147, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила, *трет*–бутила,



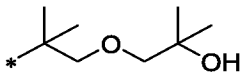
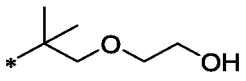
Вариант осуществления 156. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, 154 и 155, где R^2 выбран из

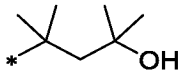


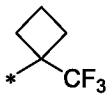
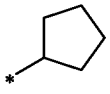
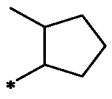
Вариант осуществления 157. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, 149 и 154–156, где R^2 представляет собой

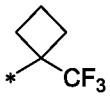


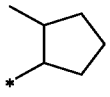
Вариант осуществления 158. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, 150 и 154–156, где R^2 представляет собой

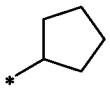
 или  .

Вариант осуществления 159. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–147, 151 и 154–156, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 160. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146, 151, 154 и 155, где R^2 выбран из , ,  ,  и  .

Вариант осуществления 161. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–146, 151, 153–155 и 160, где R^2 представляет собой или  .

Вариант осуществления 162. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–136, 151, 153–155 и 160, где R^2 представляет собой или  .

Вариант осуществления 163. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–136, 151, 152, 154, 155 и 160, где R^2 представляет собой  .

Вариант осуществления 164. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–133, 135–150 и 155, где R^2 выбран из н–пропила, изопропила и *трет*–бутила.

Вариант осуществления 165. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–143, 145–150, 155 и 164, где R^2 представляет собой н–пропил.

Вариант осуществления 166. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–150, 155 и 164, где R^2 представляет собой изопропил.

Вариант осуществления 167. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–150, 155 и 164, где R^2 представляет собой *трет*–бутил.

Вариант осуществления 168. Соединение формулы II или его соль в соответствии с

любым из вариантов осуществления 121–139, где R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0.

Вариант осуществления 169. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–139 и 168, где R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 5– или 6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, выбранных из N, O и S, где 5– или 6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C_{1-4}алкила и C_{1-4}галогеналкила.

Вариант осуществления 170. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–139, 168 и 169, где R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца дополнительный гетероатом, выбранный из N и O, где 6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C_{1-6}алкила и C_{1-6}галогеналкила.

Вариант осуществления 171. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–139 и 168–170, где R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, выбранного из пиперидинила, пиперазинила и морфолинила, где пиперидинил, пиперазинил или морфолинил являются незамещенными или замещенными 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила и C_{1-6}алкила.

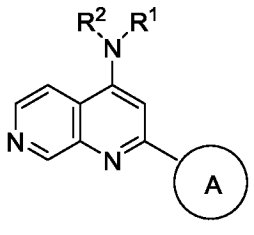
Вариант осуществления 172. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–171, где R^3 выбран из водорода, хлора и метила.

Вариант осуществления 173. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–172, где R^3 представляет собой водород.

Вариант осуществления 174. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–173, где R^5 выбран из водорода и хлора.

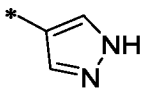
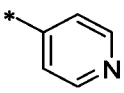
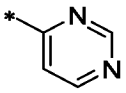
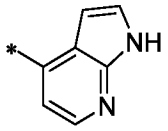
Вариант осуществления 175. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 121–174, где R^5 представляет собой водород.

Вариант осуществления 176. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 121, где соединение представляет собой соединение формулы VI:



VI,

где

кольцо A представляет собой  ,  ,  и  ,

каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

R^1 представляет собой водород или незамещенный C_{1-6}алкил; и

R^2 представляет собой

(a) C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из

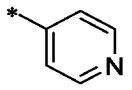
(i) ди–C_{1-6}алкиламино;

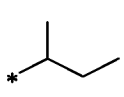
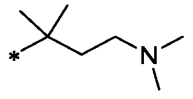
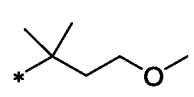
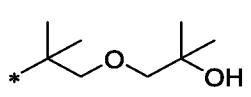
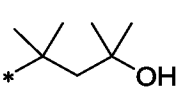
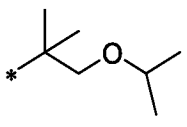
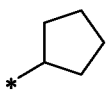
(ii) C_{1-6}галогеналкила;

(iii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0; или

(b) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом;

или R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, выбранными из C_{1-6}алкила и гидроксила.

Вариант осуществления 177. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 176, где кольцо A представляет собой  .

Вариант осуществления 178. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 176 или вариантом осуществления 177, где R^2 выбран из этила,  , ,  ,  ,  ,  ,  и  .

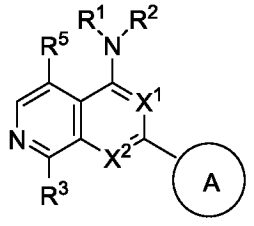
Вариант осуществления 179. Соединение формулы II или его соль в соответствии с любым из вариантов осуществления 176–178, где R^2 представляет собой трет–бутил.

Вариант осуществления 180. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 121, выбранное из: N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[2–метил–1–(пропан–2–илокси)пропан–2–

ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[(2S)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[(2R)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2,2–диметил–1–[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]пиперидин–4–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутил)амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридазин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиридин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N, N–диэтил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; (3–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–3–метилбутил)диметиламина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(пиперидин–1–ил)–1,7–нафтиридина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(морфолин–4–ил)–1,7–нафтиридина; N–трет–бутил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–2–метилпропан–1–ола; 1–[2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]–2,2–диметилпиперидин–4–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N, N–диэтил–1,7–нафтиридин–4–амина.

Вариант осуществления 180a. Соединение формулы II или его соль в соответствии с вариантом осуществления 121, где соединение представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

Вариант осуществления 181. Соединение формулы A1 или его соль



A1

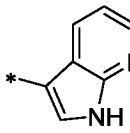
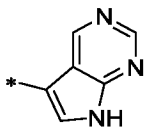
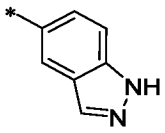
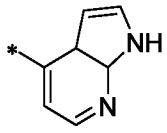
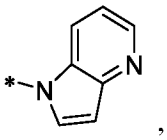
для применения при глазных заболеваниях или нарушениях, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из


,

,

,

и

,

где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2

гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

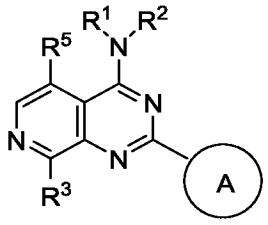
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

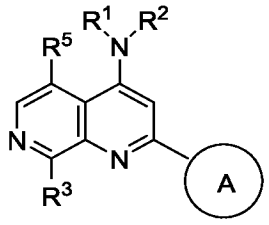
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещенным R^0.

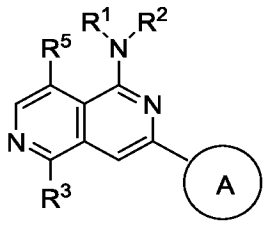
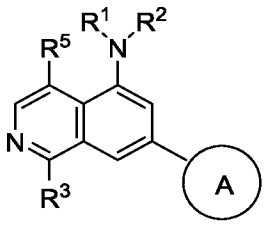
Вариант осуществления 182. Соединение формулы A1 или его соль для применения при глазных заболеваниях или нарушениях в соответствии с вариантом осуществления 181, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



I,



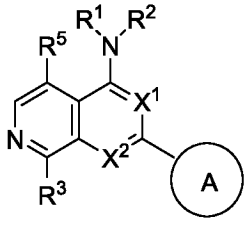
II,


III и

IV.

Вариант осуществления 183. Соединение формулы A1 или его соль для применения при глазных заболеваниях или нарушениях в соответствии с вариантом осуществления 181, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 184. Соединение формулы A1 или его соль для применения при глазных заболеваниях или нарушениях в соответствии с вариантом осуществления 181, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 185. Применение соединения формулы A1 или его соли,


A1,

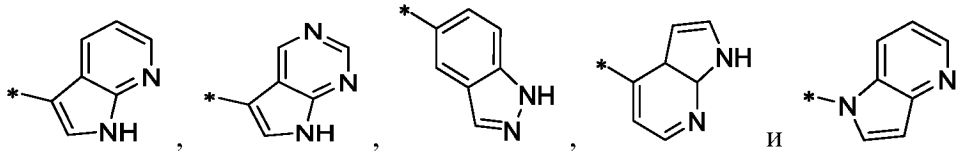
в способе получения увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток, предпочтительно ex vivo, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части

молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

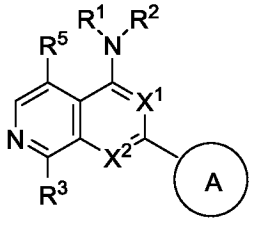
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 186. Применение соединения формулы A1 или его соли,



A1,

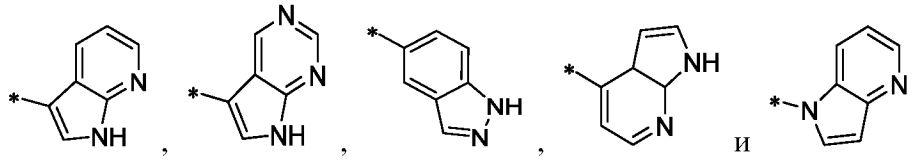
в способе получения увеличенной популяции роговичных эндотелиальных клеток, предпочтительно ex vivo, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо

выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2

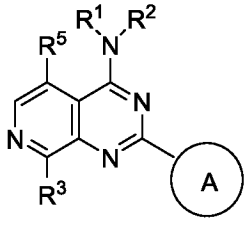
заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

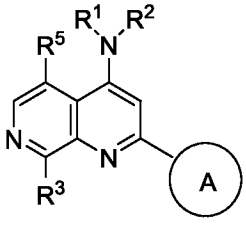
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

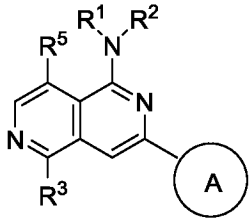
Вариант осуществления 187. Применение соединения формулы A1 или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



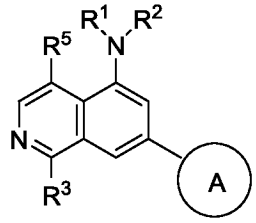
I,



II,



III и



IV.

Вариант осуществления 188. Применение соединения формулы A1 или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина и 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина.

Вариант осуществления 188A. Применение соединения формулы AI или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение выбрано из: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

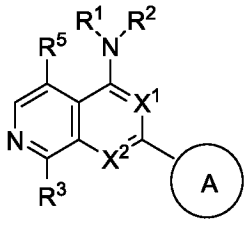
N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *н–пропил*–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 188B. Применение соединения формулы AI или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение выбрано из: N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 188C. Применение соединения формулы AI или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

Вариант осуществления 189. Применение соединения формулы A1 или его соли в соответствии с вариантом осуществления 185 или 186, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 190. Способ лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту популяции клеток, где популяция клеток была выращена в присутствии соединения формулы A1 или его соли,



A1,

где

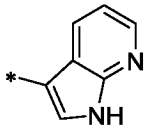
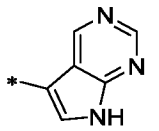
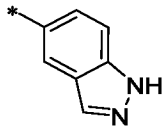
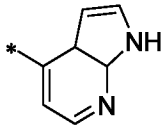
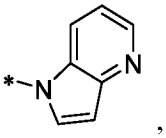
каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4

гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из





и


где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил–$C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила и R^0;

(d) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

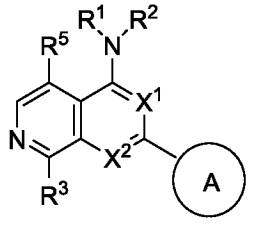
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и $C_{1–6}$алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетеро$C_{3–8}$алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 190A. Способ лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту популяции лимбальных стволовых клеток, где указанная популяция была выращена в присутствии соединения формулы A1 или его соли,



A1,

где

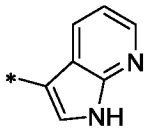
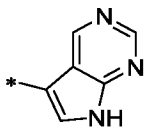
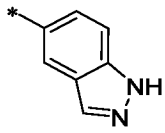
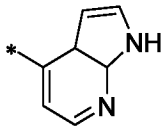
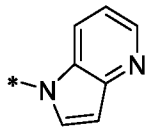
каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере

один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из





и


где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве

членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила и R^0;

(d) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

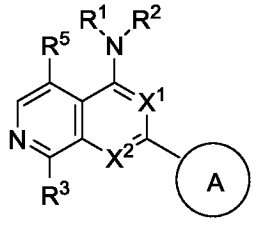
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и $C_{1–6}$алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетеро$C_{3–8}$алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 191. Способ лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту популяции роговичных эндотелиальных клеток, где популяция была выращена в присутствии соединения формулы A1 или его соли,



A1,

где

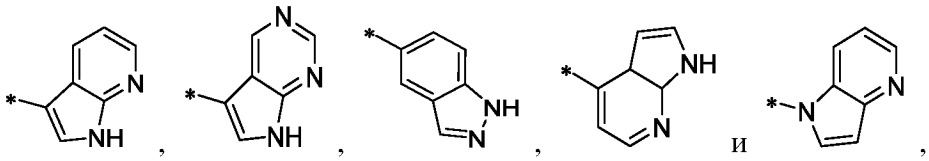
каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=),

расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве

членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила и R^0;

(d) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

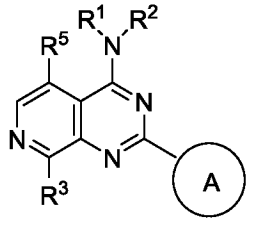
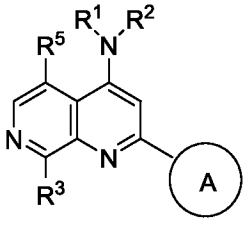
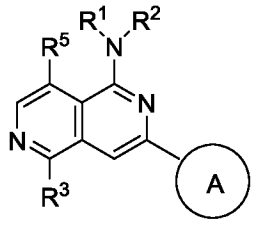
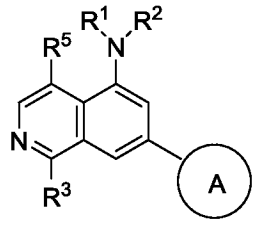
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и $C_{1–6}$алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетеро$C_{3–8}$алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 192. Способ лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 193. Способ лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение выбрано из 3–

(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 193A. Способ лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение выбрано из: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *н–пропил*–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

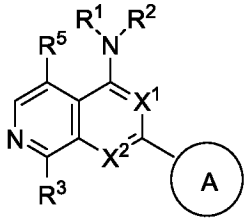
Вариант осуществления 193B. Способ лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение выбрано из: N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 193C. Способ лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

Вариант осуществления 194. Способ стимулирования пролиферации клеток в соответствии с вариантом осуществления 190 или 191, где соединение представляет собой

соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 195. Применение соединения формулы A1 или его соли,



A1,

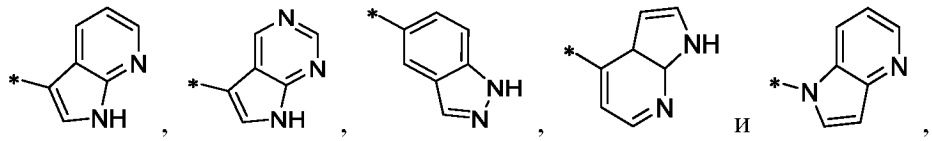
в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или

замещен R^0 или –C(O)R^0;

(viii) –$NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, –C(O)R^0, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен –C(O)R^0;

(ix) –C(O)R^8, где R^8 представляет собой R^0 или –NH–C_{1-6}алкил–C(O)R^0;

(x) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, –NH_2, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

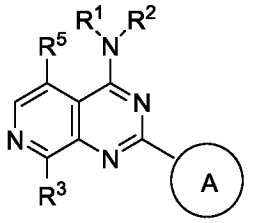
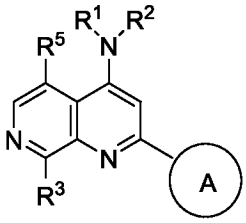
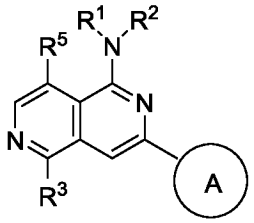
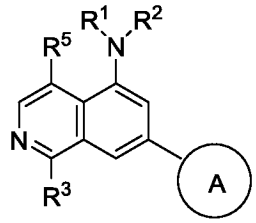
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 196. Применение соединения формулы A1 или его соли в

изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 197. Применение соединения формулы A1 или его соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина и 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина.

Вариант осуществления 197A. Применение соединения формулы AI или его соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение выбрано из: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *н–пропил*–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–

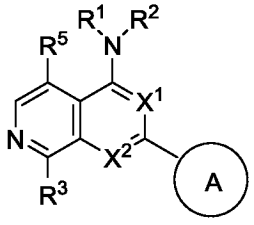
ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 197B. Применение соединения формулы AI или его соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение выбрано из: N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 197C. Применение соединения формулы AI или его соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение представляет собой N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин.

Вариант осуществления 198. Применение соединения формулы A1 или его соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения глазного заболевания или нарушения в соответствии с вариантом осуществления 195, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 199. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль,



A1,

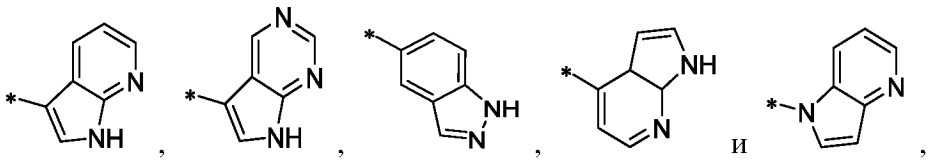
для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0; и

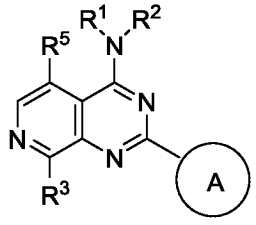
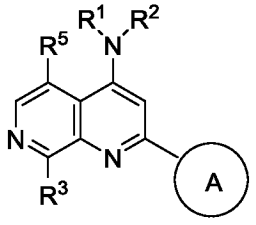
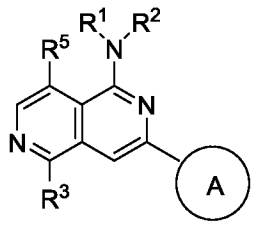
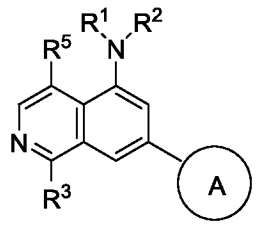
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 200. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 199, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 201. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 199, где соединение выбрано из:

2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–

ил]амино}пропокси)пропан–2–ола;

диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина;

N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина;

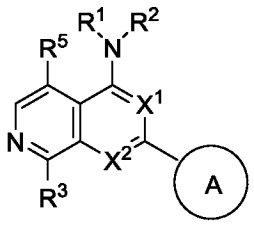
N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–аминad]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина и

N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина.

Вариант осуществления 202. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 199, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 203. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли,



A1,

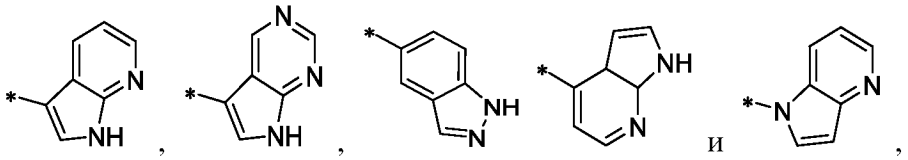
для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

–C(O)R^8, где R^8 представляет собой R^0 или –NH–C_{1-6}алкил–C(O)R^0;

–$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, –NH_2, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0; и

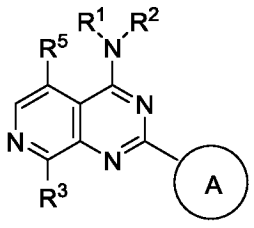
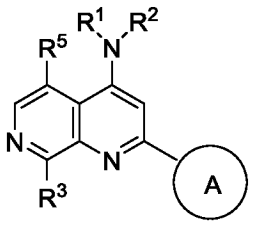
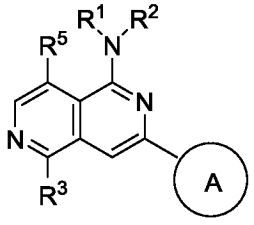
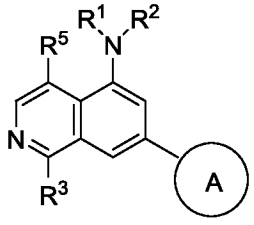
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 204. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 203, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 205. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 203, где соединение выбрано из:

2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола;

диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина;

N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина;

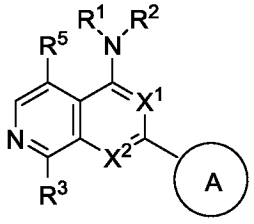
N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–аминad]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина и

N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина.

Вариант осуществления 206. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 203, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 207. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли,


A1,

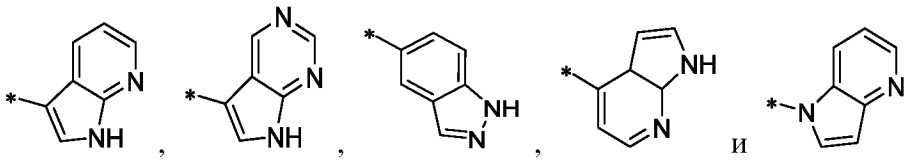
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –

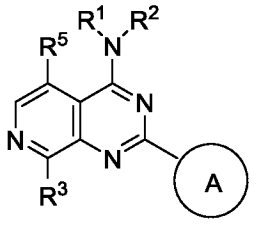
$C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

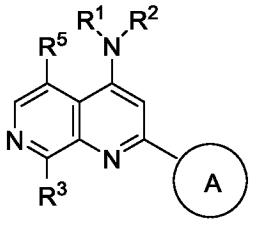
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

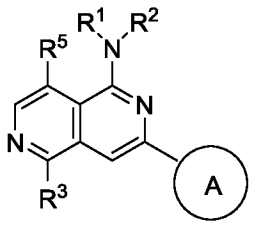
Вариант осуществления 208. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 207, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



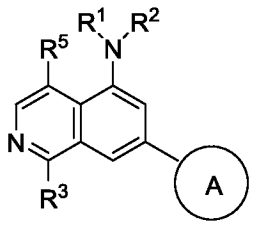
I,



II,



III и



IV.

Вариант осуществления 209. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 207, где соединение выбрано из:

2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола;

диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина;

N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–

амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина;

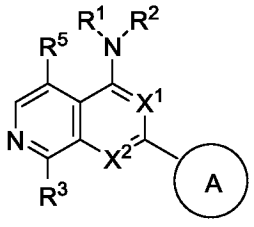
N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–аминad]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина и

N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина.

Вариант осуществления 210. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 207, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 211. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли,



A1,

в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, где

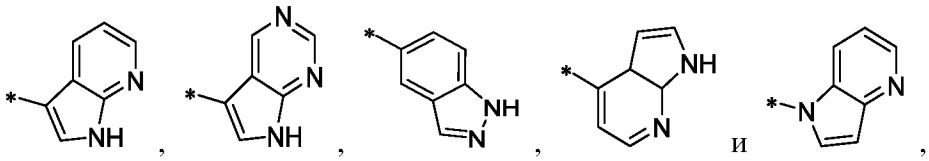
каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила;

или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



,

,

,

и

,

где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего

в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила и R^0;

(d) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

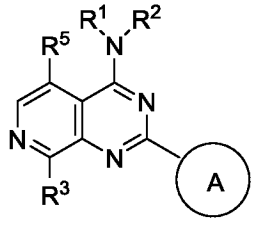
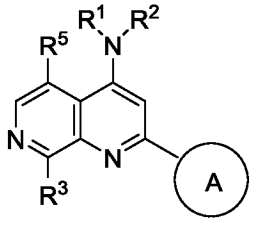
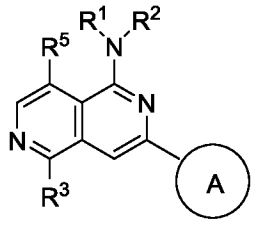
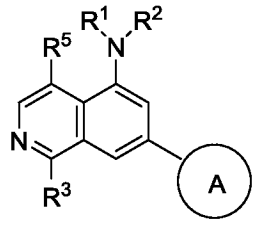
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и $C_{1–6}$алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетеро$C_{3–8}$алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 212. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 211, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 213. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для

стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 211, где соединение выбрано из:

2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола;

диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина;

N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина;

N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–аминad]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина и

N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина.

Вариант осуществления 214. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени в соответствии с вариантом осуществления 211, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из соединений по

настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из соединений по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению в соответствии с настоящим изобретением или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, предназначенных для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени, содержащей соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени отдельно или необязательно в комбинации с другим соединением формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой солью и/или по меньшей мере одним терапевтическим средством другого типа.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности предназначенного для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В предпочтительном варианте осуществления средство представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ex vivo увеличения популяции клеток печени, который предусматривает приведение в контакт клеток печени с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180. В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно предусматривает редактирование гена в указанных клетках печени. Предпочтительно указанное редактирование гена нацелено на ген, вовлеченный в иммунную реакцию трансплантат против хозяина.

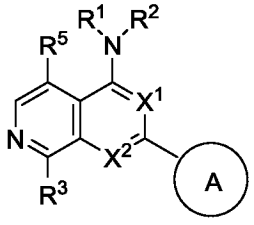
В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу ex vivo увеличения популяции печеночных клеток–предшественников, который предусматривает приведение в контакт печеночных клеток–предшественников с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180. В предпочтительном варианте осуществления способ дополнительно предусматривает редактирование гена в указанных печеночных клетках–предшественниках. Предпочтительно указанное редактирование гена нацелено на ген, вовлеченный в иммунную реакцию трансплантат против хозяина.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к популяция клеток печени, полученных путем приведения клеток печени в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180. В предпочтительном варианте осуществления клетки печени, полученные путем приведения клеток печени в контакт с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180, имеют отредактированный ген. Предпочтительно указанное редактирование гена нацелено на ген, вовлеченный в иммунную реакцию трансплантат против хозяина.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к популяции

печеночных клеток–предшественников, полученных путем приведения в контакт печеночных клеток–предшественников с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180. В предпочтительном варианте осуществления печеночные клетки–предшественники, полученные путем приведения в контакт печеночных клеток–предшественников с соединением в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180, имеют отредактированный ген. Предпочтительно указанное редактирование гена нацелено на ген, вовлеченный в иммунную реакцию трансплантат против хозяина.

Вариант осуществления 215. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль,



A1,

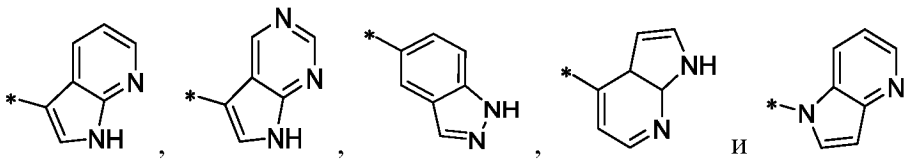
для применения в стимулировании заживления ран, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

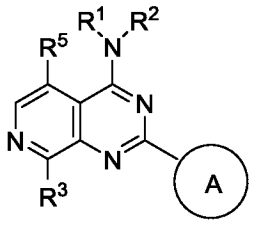
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом

азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

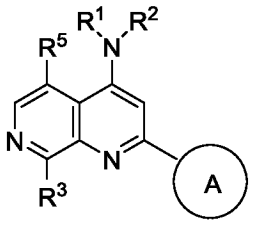
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

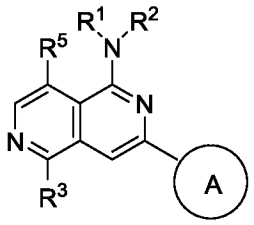
Вариант осуществления 216. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 215, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



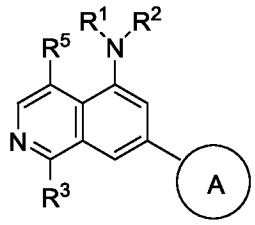
I,



II,



III и

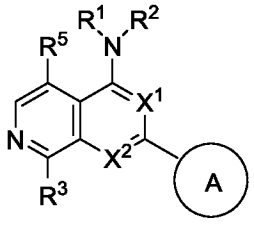


IV.

Вариант осуществления 217. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 215, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 218. Соединение формулы A1 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 215, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 219. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли,



A1,

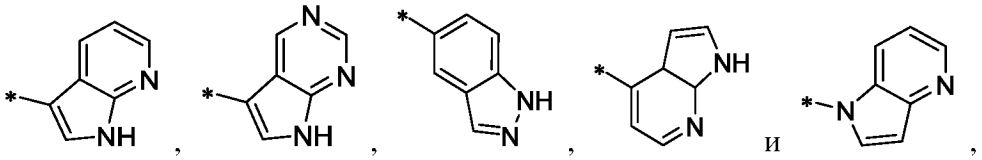
для стимулирования заживления ран, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино

и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

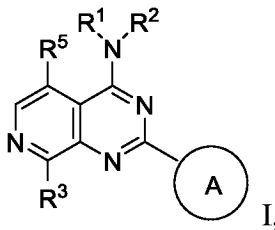
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

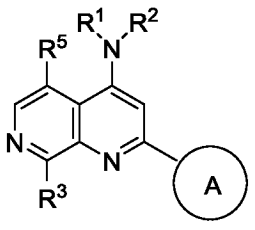
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

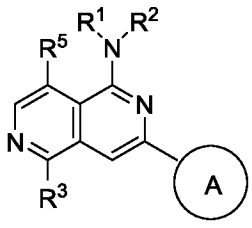
Вариант осуществления 220. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулирования заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 219, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:

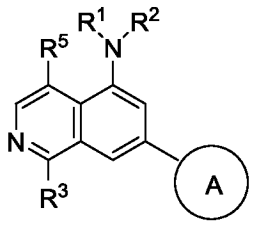


I,



II,



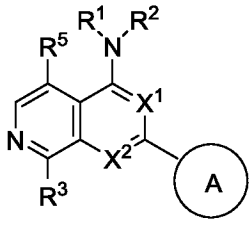
III и


IV.

Вариант осуществления 221. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 219, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина и 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина.

Вариант осуществления 222. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли для стимулирования заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 219, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 223. Способ стимулировании заживления ран, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли,



A1,

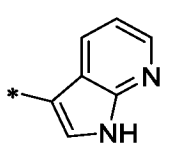
где

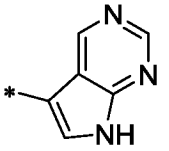
каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

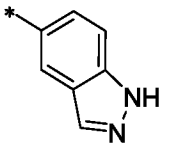
кольцо A представляет собой

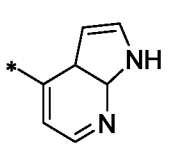
(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

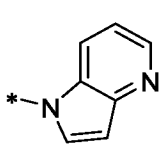
(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



,


,


,


и


,

где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части

молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

$–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

$–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

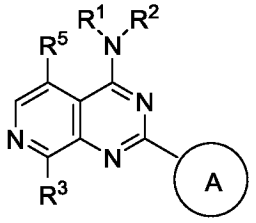
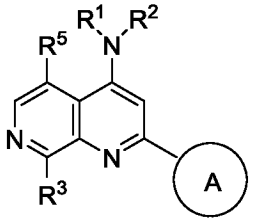
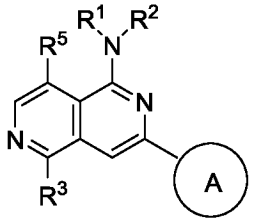
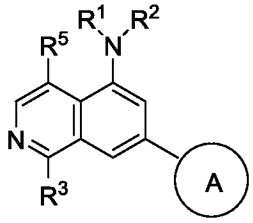
(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 224. Способ стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 223, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной формул I–IV:

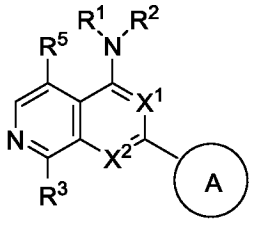

I,

II,

III и

IV.

Вариант осуществления 225. Способ стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 223, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

Вариант осуществления 226. Способ стимулировании заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 223, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

Вариант осуществления 227. Применение соединения формулы A1 или его

фармацевтически приемлемой соли,



A1,

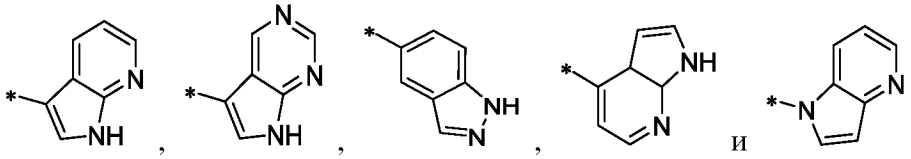
в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования заживления ран, где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

галогена;

циано;

оксо;

C_2алкенила;

C_2алкинила;

C_{1-6}галогеналкила;

$–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

$–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из

водорода, –C(O)R^0, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен –C(O)R^0;

–C(O)R^8, где R^8 представляет собой R^0 или –NH–C_{1-6}алкил–C(O)R^0;

–$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, –NH_2, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

фенила, который не замещен или замещен галогеном;

5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) –$S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

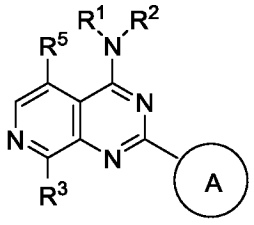
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

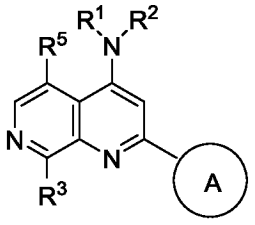
R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

Вариант осуществления 228. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 227, где

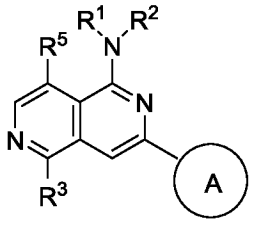
соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



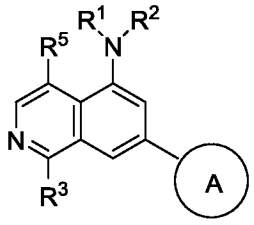
I,



II,



III и



IV.

Вариант осуществления 229. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 227, где соединение выбрано из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина и 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина.

Вариант осуществления 230. Применение соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования заживления ран в соответствии с вариантом осуществления 227, где соединение представляет собой соединение в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–180.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере одно из соединений формулы A2 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из соединений формулы A2 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению формулы A2 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, предназначенных для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в стимулировании регенерации печени и компенсаторного роста печени, содержащей соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к

применению соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени отдельно или необязательно в комбинации с другим соединением формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой солью и/или по меньшей мере одним терапевтическим средством другого типа.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности предназначенного для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в стимулировании заживления ран, содержащей соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически

приемлемой соли в изготовлении лекарственного препарата для стимулирования заживления ран отдельно или необязательно в комбинации с другим соединением формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой солью и/или по меньшей мере одним терапевтическим средством другого типа.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования заживления ран, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования заживления ран, предусматривающему лечение или уменьшение интенсивности симптомокомплекса при ожогах, острых и хронических кожных язвах, где кожные язвы включают без ограничения трофические язвы, диабетические язвы и пролежневые язвы.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования заживления ран, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту популяции клеток, где популяция была выращена в присутствии средства, способного ингибировать активность киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту популяции лимбальных стволовых клеток, где популяция была выращена в присутствии средства, способного ингибировать активность киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающему введение нуждающемуся в этом субъекту популяции роговичных эндотелиальных клеток, где

популяция была выращена в присутствии средства, способного ингибировать активность киназ LATS1 и LATS2; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток. В дополнительном варианте осуществления средство представляет собой соединение формулы A1 или ее подформул или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимулирования заживления раны глаза, предусматривающему введение в глаз субъекта терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с настоящим изобретением. В одном варианте осуществления рана глаза представляет собой рану роговицы. В других вариантах осуществления рана глаза представляет собой повреждение или послеоперационную рану.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Общие термины, используемые выше и далее в данном документе, предпочтительно имеют следующие значения в контексте данного изобретения, если не указано иное, где более общие термины, используемые где–либо еще, независимо друг от друга могут быть заменены на более конкретные определения или оставаться без изменения, определяя таким образом более подробные варианты осуществления настоящего изобретения.

Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или нет иного явного противоречия по контексту. Представленное в данном документе применение всех возможных примеров или вводных слов перед примером (например, "такой как") предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не предполагает ограничения объема настоящего изобретения, заявленного в той или иной форме.

Форма единственного числа и аналогичные формы, используемые в контексте настоящего изобретения (в частности, в контексте формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающие как форму единственного числа, так и форму множественного числа, если в данном документе не указано иное или нет явного противоречия с контекстом.

Используемый в данном документе термин "$C_{1–8}$алкил" относится к радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода, не содержащему ненасыщенных связей, содержащему от одного до восьми атомов углерода и который присоединен к остальной части молекулы посредством одинарной связи. Термин "$C_{1–4}$алкил" следует истолковывать соответствующим образом. Используемый в данном документе термин "*н*–алкил" относится к алкильному радикалу с прямой цепью (неразветвленному), что определено в данном документе. Примеры $C_{1–8}$алкила включают без ограничения, метил, этил, *н*–пропил, 1–метилэтил (*изо*–пропил), *н*–бутил, *н*–пентил, 1,1–диметилэтил (*трет*–бутил), $–C(CH_3)_2CH_2CH(CH_3)_2$ и $–C(CH_3)_2CH_3$.

Используемый в данном документе термин "C_{2-6}алкенил" относится к группе, представляющей собой радикал, с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей по меньшей мере одну двойную связь, имеющей от двух до шести атомов углерода и которая присоединена к остальной части молекулы посредством одинарной связи. Термин "C_{2-4}алкенил" следует истолковывать соответствующим образом. Примеры C_{2-6}алкенила включают без ограничения, этенил, проп–1–енил, бут–1–енил, пент–1–енил, пент–4–енил и пента–1,4–диенил.

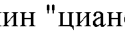
Термин "алкилен" относится к двухвалентной алкильной группе. Например, термин "C_{1-6}алкилен" или "C_1–C_6 алкилен" относится к двухвалентной, прямой или разветвленной алифатической группе, содержащей 1–6 атомов углерода. Примеры алкилена включают без ограничения метилен (–CH_2–), этилен (–CH_2CH_2–), н–пропилен (–$CH_2CH_2CH_2$–), изо–пропилен (–$CH(CH_3)CH_2$–), н–бутилен, втор–бутилен, изо–бутилен, трет–бутилен, н–пентилен, изопентилен, неопентилен и н–гексилен.

Используемый в данном документе термин "C_{2-6}алкинил" относится к группе, представляющей собой радикал, с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей по меньшей мере одну тройную связь, имеющей от двух до шести атомов углерода и которая присоединена к остальной части молекулы посредством одинарной связи. Термин "C_{2-4}алкинил" следует истолковывать соответствующим образом. Примеры C_{2-6}алкинила включают без ограничения, этинил, проп–1–инил, бут–1–инил, пент–1–инил, пент–4–инил и пента–1,4–диинил.

Используемый в данном документе термин "C_{1-6}алкокси" относится к радикалу формулы –OR_a, где R_a представляет собой C_{1-6}алкильный радикал, определенный в общем выше. "C_1–$_6$ алкокси" или "C_1–C_6 алкокси" предполагает включение C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 и C_6 алкоксигрупп (которые содержат 1–6 атомов углерода в алкильной цепи). Примеры C_{1-6}алкокси включают без ограничения метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, изобутокси, пентокси и гексокси.

Используемый в данном документе термин "C_{1-6}алкиламино" относится к радикалу формулы –NH–R_a, где R_a представляет собой C_{1-4}алкильный радикал, определенный выше.

Используемый в данном документе термин "ди–(C_{1-6}алкил)амино" относится к радикалу формулы –N(R_a)–R_a, где каждый R_a представляет собой C_{1-4}алкильный радикал, который может быть аналогичным или отличающимся, что определено выше.

Используемый в данном документе термин "циано" означает радикал  .

Термин "циклоалкил" относится к неароматическому карбоциклическому кольцу, которое представляет собой полностью гидрогенизированное кольцо, включая моно–, би– или полициклические кольцевые системы. "C_{3-10}циклоалкил" или "C_3–C_{10}циклоалкил" предполагает включение C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9 и C_{10}циклоалкильных групп (которые содержат 3–10 членов углеродного кольца). Примеры циклоалкильных групп включают

без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и норборнил.

Термин "конденсированное кольцо", используемый в данном документе, относится к многокольцевой конструкции, где кольца, составляющие кольцевую конструкцию, связаны так, что атомы кольца, которые являются общими для двух колец, непосредственно связаны друг с другом. Конструкции из конденсированных колец могут быть насыщенными, частично насыщенными, ароматическими, карбоциклическими, гетероциклическими и т. п. Неисключающие примеры общих конденсированных колец включают декалин, нафталин, антрацен, фенантрен, индол, бензофуран, пурин, хинолин и т. п.

"Галоген" относится к брому, хлору, фтору или йоду; предпочтительно к фтору, хлору или брому.

Используемый в данном документе термин "галогеналкил" предполагает включение насыщенных алкильных групп как с разветвленной, так и с прямой цепью, что определено выше, содержащих указанное количество атомов углерода, замещенных одним или несколькими галогенами. Например, "C_1–$_6$галогеналкил" или "C_1–C_6 галогеналкил" предполагают включение C_1, C_2, C_3, C_4, C_5 и C_6алкильной цепи. Примеры галогеналкилов включают без ограничения фторметил, дифторметил, трифторметил, трихлорметил, пентафторэтил, пентахлорэтил, 2,2,2–трифторэтил, 1,3–дибромпропан–2–ил, 3–бром–2–фторпропил и 1,4,4–трифторбутан–2–ил, гептафторпропил и гептахлоропропил.

"Гетероалкил", используемый в данном документе, относится к алкилу, что определено в данном документе, где один или несколько атомов углерода в алкильной цепи заменены гетероатомами, независимо выбранными из N, O и S. В C_{X-Y}гетероалкиле или x–y–членном гетероалкиле, используемом в данном документе, x–y описывает количество атомов цепи (углерода и гетероатомов) в гетероалкиле. Например, C_{3-8}гетероалкил относится к алкильной цепи с 3–8 атомами цепи. Кроме того, в отношении гетероалкила, что определено в данном документе, атом, связывающий радикал с остальной частью молекулы, должен представлять собой атом углерода. Иллюстративные примеры 3–8–членного гетероалкила включают без ограничения $–(CH_2)OCH_3$, $–(CH_2)_2OCH(CH_3)_2$, $–(CH_2)_2–O–(CH_2)_2–OH$ и $–(CH_2)_2–(O–(CH_2)_2)_2–OH$.

Термин "гетероарил" относится к ароматическим фрагментам, содержащим по меньшей мере один гетероатом (например, атом кислорода, серы, азота или их комбинации) в 5–10–членной ароматической кольцевой системе. Примеры гетероарила включают без ограничения пирролил, пиридил, пиразолил, индолил, индазолил, тиенил, фуранил, бензофуранил, оксазолил, изоксазолил, имидазолил, триазолил, тетразолил, триазинил, пиримидинил, пиразинил, тиазолил, пуринил, бензимидазолил, хинолинил, изохинолинил, хиноксалинил, бензопиранил, бензотиофенил, бензоимидазолил, бензоксазолил и 1H–бензо[d][1,2,3]триазолил. Гетероароматический фрагмент может состоять из одного кольца или конденсированной кольцевой системы. Типичное отдельное гетероарильное кольцо представляет собой 5–6–членное кольцо, содержащее от

одного до четырех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, и типичная конденсированная гетероарильная кольцевая система представляет собой 9–10–членную кольцевую систему, содержащую от одного до четырех гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S. Конденсированная гетероарильная кольцевая система может состоять из двух гетероарильных колец, конденсированных вместе, или гетероарила, конденсированного с арилом (например, с фенилом).

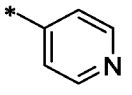
Используемый в данном документе термин "гетероатомы" относится к атомам азота (N), кислорода (O) или серы (S). Если не указано иное, предполагается, что любой гетероатом с незаполненными валентностями имеет атомы водорода в достаточном количестве для заполнения валентностей, и если гетероатом представляет собой атом серы, он может быть неокисленным (S) или окисленным до S(O) или $S(O)_2$.

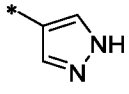
Термин "гидроксил" или "гидрокси", используемый в данном документе, относится к радикалу –OH.

Термин "гетероциклоалкил" означает циклоалкил, определенный в данной заявке, при условии, что один или несколько указанных атомов углерода кольца заменены фрагментом, выбранным из –O–, –N=, –NH–, –S–, –S(O)– и $–S(O)_2–$. Примеры 3–8–членных гетероциклоалкилов включают без ограничения оксиранил, азиридинил, азетидинил, имидазолидинил, пиразолидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидротиенил–1,1–диоксид, оксазолидинил, тиазолидинил, пирролидинил, пирролидинил–2–он, морфолинил, пиперазинил, пиперидинил, пиразолидинил, гексагидропиримидинил, 1,4–диокса–8–аза–спиро[4.5]дек–8–ил, тиоморфолинил, сульфанморфолинил, сульфонморфолинил и октагидропирроло[3,2–b]пирролил.

Термин "оксо", используемый в данном документе, относится к двухвалентному радикалу =O.

Упоминаемое в данном документе выражение "замещенный" означает, что по меньшей мере один атом водорода заменен неводородной группой, при условии, что поддерживаются нормальные валентности и что замещение приводит к образованию стабильного соединения. Если заместитель представляет собой оксо (т. е. =O), то 2 атома водорода при атоме заменены. В случаях, где в соединениях по настоящему изобретению присутствуют атомы азота (например, в составе аминов), они могут быть превращены в N–оксиды посредством обработки окисляющим средством (например, mCPBA и/или пероксидами водорода) с получением других соединений по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин "незамещенный азот" относится к члену кольца, представляющему собой атом азота, который не обладает способностью к замещению из–за его связи со смежными атомами кольца за счет двойной связи и одинарной связи (–N=). Например, атом азота в пара–положении 4–пиридила  представляет собой "незамещенный" азот, и атом азота в 4–положении в отношении

связывающего С–кольцевого атома в 1Н–пиразол–4–иле  представляет собой "незамещенный" азот.

Специалисту в данной области техники будет понятно, например, кетонная группа (–CH–C(=O)–) в молекуле может таутомеризироваться в ее енольную форму (–C=C(OH)–). Таким образом, данное изобретение предназначено для охвата всех возможных таутомеров, даже если структура изображает лишь один из них.

Используемые в данном документе обозначения " " и " " представляют собой символы, обозначающие точку присоединения X к другой части молекулы.

Если какая–либо переменная встречается более одного раза в любой составляющей или формуле соединения, ее определение в каждом случае является независимым от ее определения в каждом другом случае. Таким образом, например, если показано, что группа замещена 0–3 R–группами, тогда указанная группа может быть незамещенной или замещенной не более чем тремя R–группами, и в каждом случае R выбран независимо от определения R.

Если не указано иное, выражение "соединение по настоящему изобретению" или "соединения по настоящему изобретению" относится к соединениям формулы A2 и ее подформул, а также к изомерам, таким как стереоизомеры (включая диастереоизомеры, энантиомеры и рацематы), геометрические изомеры, конформационные изомеры (включая ротамеры и атропоизомеры), таутомеры, изотопно–меченные соединения (включая замещенные дейтерием) и исходно образованные фрагменты (например, полиморфы, сольваты и/или гидраты). Если присутствует фрагмент, способный к образованию соли, то также включены соли, в частности, фармацевтически приемлемые соли.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что соединения по настоящему изобретению могут содержать хиральные центры и по этой причине могут существовать в различных изомерных формах. Используемый в данном документе термин "изомеры" относится к разным соединениям, которые имеют такую же молекулярную формулу, но различаются расположением и конфигурацией атомов.

"Энантиомеры" представляют собой пару стереоизомеров, которые являются несовпадающими зеркальными отображениями друг друга. Смесь 1:1 пары энантиомеров представляет собой "рацемическую" смесь. Термин используют для обозначения рацемической смеси, если это необходимо. При обозначении стереохимии для соединений по настоящему изобретению один стереоизомер с известной относительной и абсолютной конфигурацией двух хиральных центров обозначают с применением общепринятой системы RS (например, (1S,2S)); один стереоизомер с известной относительной конфигурацией, но неизвестной абсолютной конфигурацией обозначен звездочками (например, (1R*,2R*)); и рацемат с двумя буквами (например, (1RS,2RS) означает рацемическую смесь (1R,2R) и (1S,2S); (1RS,2SR) означает рацемическую смесь (1R,2S) и (1S,2R)). "Диастереоизомеры" представляют собой стереоизомеры, которые имеют по

меньшей мере два асимметрических атома, но которые не являются зеркальными отображениями друг друга. Абсолютная стереохимия указана в соответствии с системой R–S Кана–Ингольда–Прелога. Если соединение представляет собой чистый энантиомер, стереохимия при каждом хиральном углероде может быть указана либо как R, либо как S. Разделенные соединения, абсолютная конфигурация которых является неизвестной, могут быть обозначены как (+) или как (−) в зависимости от направления (право– или левовращающее), в котором они вращают плоскополяризованный свет при длине волны D линии натрия. В качестве альтернативы разделенные соединения можно определить с помощью соответствующих значений времени удерживания для соответствующих энантиомеров/диастереоизомеров с помощью хиральной HPLC.

Некоторые из соединений, описанных в данном документе, содержат один или несколько асимметрических центров или осей и таким образом могут образовывать энантиомеры, диастереоизомеры и другие стереоизомерные формы, которые можно определить, с точки зрения абсолютной стереохимии, как (R)– или (S)–.

Геометрические изомеры могут образовываться в том случае, когда соединение содержит двойную связь или имеет какую–то другую особенность, придающую молекуле определенную степень структурной жесткости. В том случае, если соединение содержит двойную связь, заместитель может иметь E– или Z–конфигурацию. Если соединение содержит двузамещенный циклоалкил, циклоалкильный заместитель может иметь цис– или транс–конфигурацию.

Конформационные изомеры (или конформеры) представляют собой изомеры, которые могут различаться вращением вокруг одной или нескольких связей. Ротамеры представляют собой конформеры, которые различаются вращением вокруг только одной связи.

Термин "атропоизомер" относится к структурному изомеру на основе аксиальной или плоскостной хиральности, возникающей в результате ограниченного вращения в молекуле.

Если не указано иное, соединения по настоящему изобретению подразумевают включение всех таких возможных изомеров, в том числе рацемических смесей, оптически чистых форм и смесей промежуточных соединений. Оптически активные (R)– и (S)–изомеры можно получать с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или выделять с использованием общепринятых методик (например, разделять в хроматографических колонках хиральной SFC или HPLC, таких как CHIRALPAK® и CHIRALCEL®, доступных от DAICEL Corp., с применением подходящего растворителя или смеси растворителей для достижения надлежащего разделения).

Соединения по настоящему изобретению могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. Оптически активные формы можно получить путем разделения рацемических форм или путем синтеза из оптически активных исходных материалов. Все способы, используемые для получения соединений по настоящему изобретению, и промежуточные соединения, полученные в пределах этих способов,

считаются частью настоящего изобретения. При получении энантиомерных или диастереоизомерных продуктов, они могут быть разделены с помощью общепринятых способов, например с помощью хроматографии или фракционной кристаллизации.

Используемый в данном документе термин "LATS" представляет собой сокращенное название большой протеинкиназы–опухолевого супрессора. LATS, используемое в данном документе, относится к LATS1 и/или LATS2. LATS1, используемое в данном документе, относится к большой киназе–опухолевому супрессору 1, и LATS2 относится к большой киназе–опухолевому супрессору 2. Как LATS1, так и LATS2 характеризуются активностью, присущей протеинкиназе серинового/треонинового типа.

Используемый в данном документе термин "YAP1" относится к yes–ассоциированному белку 1, также известному как YAP или YAP65, который представляет собой белок, выполняющий функцию регулятора транскрипции генов, участвующих в пролиферации клеток.

Используемый в данном документе термин "MST1/2" относится к стерильной 20–подобной киназе–1 и –2 млекопитающих.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к соединению по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представлена в форме, подходящей для местного, парентерального или инъекционного введения.

Выражение "терапевтически эффективное количество" соединения по настоящему изобретению относится к количеству соединения по настоящему изобретению, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта, например, снижение или подавление активности фермента или белка, или уменьшать интенсивность симптомов, облегчать состояние, замедлять или сдерживать прогрессирование заболевания или предупреждать заболевание и т. д. В одном неограничивающем варианте осуществления выражение "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения по настоящему изобретению, которое при введении субъекту является эффективный в отношении (1) по меньшей мере частичного облегчения, подавления, предупреждения и/или снижения тяжести состояния, или нарушения, или заболевания, (i) опосредованного активностью LATS, или (ii) характеризующегося (нормальной или аномальной) активностью LATS; или (2) уменьшения, или подавления активности LATS; или (3) снижения, или ингибирования экспрессии LATS. В другом неограничивающем варианте осуществления выражение "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения по настоящему изобретению, которое при введении в клетку, или ткань, или неклеточный биологический материал, или среду является эффективным в отношении по меньшей мере частичного снижения или подавления активности LATS или по меньшей мере частичного снижения или подавления экспрессии LATS.

Термин "субъект" охватывает человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают позвоночных, например, млекопитающих и животных, отличных от млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овца, кошки, лошади, коровы, куры, собака, мышь, крыса, коза, кролик и свинья. Предпочтительно субъект представляет собой человека. За исключением случаев, когда это отмечено, термины "пациент" или "субъект" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин "IC_{50}", используемый в данном документе, относится к молярной концентрации ингибитора, которая обеспечивает 50% ингибирующего эффекта.

Применяемый в данном документе термин "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" любого заболевания или нарушения относится к облегчению или снижению тяжести заболевания или нарушения (т. е. замедлению или остановке развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов); или к снижению или уменьшению по меньшей мере одного физического параметра или биомаркера, ассоциированного с заболеванием или нарушением, включая такие, которые могут не ощущаться пациентом.

Используемый в данном документе термин "предупреждать", "осуществление предупреждения" или "предупреждение" любого заболевания или нарушения относится к профилактическому лечению заболевания или нарушения или к задержке возникновения или прогрессирования заболевания или нарушения.

Используемый в данном документе, субъект является "нуждающимся в" лечении, если в результате такого лечения такой субъект получит пользу с биологической, медицинской точки зрения или улучшится качество его жизни.

В зависимости от условий способа соединения по настоящему изобретению получают либо в свободной (нейтральной) форме, либо в солевой форме. И свободная форма, и солевая форма, и в частности "фармацевтически приемлемые соли" таких соединений находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Используемые в данном документе термины "соль" или "соли" относятся к соли присоединения кислоты или присоединения основания соединения по настоящему изобретению. "Соли" включают, в частности, "фармацевтически приемлемые соли". Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений по настоящему изобретению и которые, как правило, не являются биологически или иным образом нежелательными. Во многих случаях соединения по настоящему изобретению способны к образованию кислых и/или основных солей за счет присутствия амино– и/или карбоксильных групп или им подобных групп.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть образованы с помощью неорганических кислот и органических кислот.

Неорганические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту,

азотную кислоту, фосфорную кислоту и т. п.

Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т. п.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы с помощью неорганических и органических оснований.

Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, соли аммония и металлов из групп I–XII периодической таблицы элементов. В определенных вариантах осуществления соли получены из натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; в частности, подходящие соли включают аммониевые, калиевые, натриевые, кальциевые и магниевые соли.

Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая существующие в природе замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т. п. Определенные органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтаноламин, диэтиламин, лизин, меглюмин, пиперазин и трометамин.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены соединения формулы A2 в форме соли, представляющей собой ацетат, аскорбат, адипат, аспартат, бензоат, безилат, бромид/гидробромид, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, камфорсульфонат, капринат, хлорид/гидрохлорид, хлортеофиллонат, цитрат, этандисульфонат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, глутамат, глутарат, гликолят, гиппурат, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, лактобионат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, соль миндальной кислоты, мезилат, метилсульфат, соль муциновой кислоты, соль нафтойной кислоты, напсилат, никотинат, нитрат, октадеканоат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, полигалактуронат, пропионат, себацинат, стеарат, сукцинат, сульфосалицилат, сульфат, тартрат, тозилат трифенатат, трифторацетат или ксинафоат.

Любая формула, приведенная в данном документе, также подразумевает присутствие немеченных форм, а также меченных изотопом форм соединений. Меченные изотопом соединения имеют структуры, изображенные формулами, приведенными в данном документе, за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом, характеризующимся выбранными атомной массой или массовым числом. Изотопы, которые можно включать в соединения по настоящему изобретению, включают, например, изотопы водорода.

Кроме того, включение определенных изотопов, в частности дейтерия (т. е., ^{2}H или D), может давать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более

высокой метаболической устойчивостью, например, увеличенным периодом полувыведения in vivo, или снижением требующейся дозировки, или улучшением терапевтического индекса или переносимости. Следует понимать, что дейтерий в данном контексте рассматривается в качестве заместителя соединения формулы A1 или ее подформул. Концентрацию дейтерия можно определить по коэффициенту изотопного обогащения. Используемый в данном документе термин "коэффициент изотопного обогащения" означает соотношение распространенности изотопа и природной распространенности указанного изотопа. Если заместитель в соединении по настоящему изобретению указан как дейтерий, такое соединение характеризуется коэффициентом изотопного обогащения для каждого обозначенного атома дейтерия, составляющим по меньшей мере 3500 (введение 52,5% дейтерия при каждом обозначенном атоме дейтерия), по меньшей мере 4000 (введение 60% дейтерия), по меньшей мере 4500 (введение 67,5% дейтерия), по меньшей мере 5000 (введение 75% дейтерия), по меньшей мере 5500 (введение 82,5% дейтерия), по меньшей мере 6000 (введение 90% дейтерия), по меньшей мере 6333,3 (введение 95% дейтерия), по меньшей мере 6466,7 (введение 97% дейтерия), по меньшей мере 6600 (введение 99% дейтерия) или по меньшей мере 6633,3 (введение 99,5% дейтерия). Следует понимать, что термин "коэффициент изотопного обогащения" может использоваться в отношении любого изотопа таким же образом, как это описано для дейтерия.

Другие примеры изотопов, которые можно включать в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{18}F ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl,^{123}I, ^{124}I, ^{125}I соответственно. Однако следует понимать, что настоящее изобретение включает соединения, в которые включены один или несколько любых из вышеуказанных изотопов, включая, например, радиоактивные изотопы, такие как ^{3}H и ^{14}C, или соединения, в которых присутствуют нерадиоактивные изотопы, такие как ^{2}H и ^{13}C. Такие изотопно–меченные соединения применимы в метаболических исследованиях (с использованием ^{14}C), исследованиях кинетических параметров реакций (например, с использованием ^{2}H или ^{3}H), методиках обнаружения или визуализации, таких как позитронно–эмиссионная томография (PET) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в тканях, или в лучевой терапии пациентов. В частности, ^{18}F или меченое соединение может быть особенно востребованными для исследований с помощью PET или SPECT. Изотопно–меченые соединения формулы A2, как правило, можно получать с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных описанным в сопутствующих примерах и способах получения, с использованием подходящего изотопно–меченого реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Любой асимметрический атом (например, углерод или подобный) соединения(соединений) по настоящему изобретению может находиться в рацемической

или энантиомерно обогащенной форме, например, в (R)–, (S)– или (R, S)–конфигурации. В определенных вариантах осуществления каждый асимметрический атом предусматривает энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 50%, энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 60%, энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 70%, энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 80%, энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 90%, энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 95%, или энантиомерный избыток, составляющий по меньшей мере 99%, в (R)– или (S)–конфигурации. Заместители при атомах с ненасыщенными двойными связями могут, если это возможно, находиться в *цис*– (Z)– или *транс*– (E)–форме.

Соответственно, используемое в данном документе соединение по настоящему изобретению может находиться в форме одного из возможных стереоизомеров, ротамеров, атропоизомеров, таутомеров или их смесей, например, в виде по сути чистых геометрических (*цис*– или *транс*–) стереоизомеров, диастереоизомеров, оптических изомеров (антиподов), рацематов или их смесей.

Любые полученные в результате смеси стереоизомеров могут быть разделены на основе физико–химических отличий составляющих компонентов на чистые или практически чистые геометрические или оптические изомеры, диастереоизомеры, рацематы, например, посредством хроматографии и/или фракционной кристаллизации.

Любые полученные в результате рацематы конечных продуктов или промежуточных соединений могут быть разделены на оптические антиподы с помощью известных способов, например путем разделения их диастереоизомерных солей, полученных с помощью оптически активных кислоты или основания, и выделения оптически активных кислого или основного соединений. В частности, основный фрагмент таким образом может быть использован для разделения соединений по настоящему изобретению на их оптические антиподы, например путем фракционной кристаллизации соли, образованной с помощью оптически активной кислоты, например, винной кислоты, дибензоилвинной кислоты, диацетилвинной кислоты, ди–O, O'–*п*–толуолвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты или камфор–10–сульфоновой кислоты. Рацемические продукты также могут быть разделены с помощью хиральной хроматографии, например жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) с использованием хирального адсорбента.

Процент "идентичности последовательности" определяют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, при этом для оптимального выравнивания этих двух последовательностей фрагмент полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е., гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (например, полипептид по настоящему изобретению), которая не содержит добавлений или делеций. Процент рассчитывают путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях встречается идентичное основание нуклеиновой кислоты или

остаток аминокислоты, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

Термины "идентичный" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми последовательностями. Две последовательности являются "по сути идентичными", если две последовательности имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е., по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности на протяжении указанного участка или, если не указано, на протяжении всей последовательности эталонной последовательности), при сравнении и выравнивании для обеспечения максимального соответствия на протяжении окна сравнения или обозначенного участка, что измерено с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательности или посредством ручного выравнивания и визуального просмотра. В настоящем изобретении представлены полипептиды или полинуклеотиды, которые являются по сути идентичными полипептидам или полинуклеотидам, соответственно, приведенным в качестве примера в данном документе.

Термин "выделенный" означает измененный относительно природного состояния или извлеченный из него. Например, нуклеиновая кислота, или пептид, или клетка, присутствующие в природных условиях в живом животном, не являются "выделенными", однако те же нуклеиновая кислота, или пептид, или клетка, частично или полностью отделенные от сопутствующих материалов в своем природном состоянии, являются "выделенными".

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в однонитевой или двухнитевой форме. Если специально не ограничено, то данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые обладают свойствами связывания, сходными со свойствами эталонной нуклеиновой кислоты, и метаболизируются с помощью механизма, сходного с механизмом для существующих в природе нуклеотидов. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также косвенно охватывает ее варианты с консервативными модификациями (например, с заменами вырожденными кодонами), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замены вырожденными кодонами можно осуществлять за счет получения последовательностей, в которых в третьем положении одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов произведена замена любым из канонических оснований и/или дезоксиинозиновыми остатками (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605–2608 (1985); и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91–98 (1994)).

"Клеточная популяция" или "популяция клеток", используемые в данном документе, включают клетки, которые пролиферируют в присутствии ингибитора LATS1 и/или LATS2 in vivo или ex vivo. В таких клетках передача сигнала по пути Hippo, как правило, подавляет рост клеток, но клетки будут пролиферировать, если путь нарушен в результате ингибирования LATS. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, применимая в способе, препарате, среде, средстве или наборе по настоящему изобретению, содержит клетки тканей, описанных выше, или клетки, описанные или представленные в данном документе. Такие клетки включают без ограничения клетки глаза (например, лимбальные стволовые клетки, роговичные эндотелиальные клетки), эпителиальные клетки (например, клетки кожи), нервные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, базальные стволовые клетки легких, эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки взрослых, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и печеночные клетки–предшественники.

Фармакология и применимость

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к низкомолекулярным ингибиторам киназы LATS, предназначенным для применения по всем показаниям, при которых пролиферация клеток будет благоприятной in vivo и/или ex vivo.

Виды клеточной терапии ex vivo обычно включают увеличение популяции клеток, выделенной у пациента или здорового донора, для трансплантации пациенту с целью приживления временного или устойчивого трансплантата увеличившихся клеток. Виды клеточной терапии ex vivo можно использовать для доставки гена или биотерапевтической молекулы пациенту, где перенос гена или экспрессия биотерапевтической молекулы достигаются в выделенных клетках. Неограничивающие примеры видов клеточной терапии ex vivo включают без ограничения трансплантацию стволовых клеток (например, трансплантацию гематопоэтических стволовых клеток, трансплантацию аутологичных стволовых клеток или трансплантацию стволовых клеток пуповинной крови), регенерацию ткани, клеточную иммунотерапию и генную терапию. См. например, Naldini, 2011, Nature Reviews Genetics volume 12, pages 301–315.

В конкретном аспекте настоящее изобретение относится к низкомолекулярным ингибиторам LATS, которые способны к активации пути YAP для стимулирования пролиферации клеток кожи, и, таким образом, являются применимыми в стимулировании заживления ран.

Дополнительные примеры применений соединений по настоящему изобретению представляют собой среди прочих

1) применение в лечении недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов (органы, которые считаются неподходящими и, таким образом, часто исключаются по причинам, которые включают без ограничения избыточное содержание жира, малые размеры относительно размера тела и пожилой возраст донора);

2) поддержание усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии, например, в условиях первичных и метастатических опухолей печени, травматического повреждения печени и резекции других участков с метастатическими поражениями печени, такими как сосудистые патологии и абсцессы в печени;

3) стимулирование роста гепатоцитов (например, печеночных клеток–предшественников (HPC)) в культуре (увеличение ex vivo) и способствование возможной последующей трансплантации;

4) регенерацию печени у пациентов с острой печеночной недостаточностью, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждением печени, индуцированным лекарственным средством, аутоиммунным гепатитом, ишемической болезнью печени и застойной болезнью печени;

5) поддержание лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза; или

6) предупреждение повреждения и поддержание или улучшение функции органов ex vivo с перфузионными устройствами или без них.

Путь Hippo/YAP регулирует рост и регенерацию ткани кожи и других тканей. Киназный каскад Hippo (MST), где киназы LATS являются концевыми, осуществляет отрицательную регуляцию активности YAP. Киназы LATS представляют собой серин/треониновые–протеинкиназы, которые, как было показано, непосредственно фосфорилируют YAP, что в результате приводит к его удерживанию в цитоплазме и инактивации. Без фосфорилирования посредством LATS YAP транслоцируется в ядро, образуя комплекс с TEAD, и осуществляет управление экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток и выживание.

Активность соединения по настоящему изобретению можно оценить с помощью следующих способов in vitro и in vivo.

Ингибирование LATS1 и LATS2

Соединения формулы A1 или ее подформул в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли представляют собой высокоактивные ингибиторы LATS1 и LATS2.

Ингибирующая эффективность соединений в отношении LATS1 анализировали с помощью биохимического анализа LATS1 с помощью методики HTRF, что описано в разделе A примеров. Показатели ингибирующей эффективности соединений по настоящему изобретению в отношении LATS1 (IC_{50} LATS1 в мкМ) приведены в таблице 1A.

Показатели IC_{50} для соединений, ингибирующих LATS1, находились в диапазоне

от >10 мкМ до менее 1 нМ, при этом большинство соединений имели IC_{50} ниже 1 мкМ. Следует отметить, что соединения с показателем IC_{50} более 1 мкМ, рассматриваются как неактивные в данном анализе.

Ингибирующая эффективность соединений в отношении LATS2 анализировали с помощью биохимического анализа LATS2 согласно Caliper, что описано в разделе А примеров. Показатели ингибирующей эффективности соединений по настоящему изобретению в отношении LATS2 (IC_{50} LATS2 в мкМ) также приведены в таблице 1А.

Подавление pYAP (клетки HaCaT)

За счет ингибирования киназ LATS1 и LATS2 соединения формулы A1 ингибируют фосфорилирование YAP. Способность данных соединений снижать фосфорилирование YAP в клетках HaCaT человека (клеточная линия кератиноцитов) измеряли с помощью анализа pYAP по методике HTRF, как это описано в примерах. Результаты анализа приведены в таблице 1С. Данные демонстрируют, что обработка соединениями формулы A1 снижала фосфорилирование YAP.

Способность соединений формулы A1 к снижению фосфорилирования YAP может быть аналогично продемонстрирована в клетках JHH–5 (Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457–60).

Ядерная транслокация YAP (клетки HaCaT)

Без фосфорилирования за счет LATS YAP транслоцируется в ядро. Влияние соединений формулы A1 или ее подформул на транслокацию YAP в клетках HaCaT человека оценивали с помощью анализа ядерной транслокации YAP, как это описано в разделе А примеров. Полученные в результате показатели EC_{50} приведены в таблице 1С. Показатели EC_{50} при ядерной транслокации варьировали в диапазоне от >20 мкМ до 0,3 мкМ, и при этом выбранные соединения имеют значения EC_{50}, составляющие приблизительно 1 мкМ или ниже. Данные подтверждают, что обработка с помощью выбранных соединений формулы A1 активирует транслокацию YAP из цитоплазмы в ядро.

Влияние соединений формулы A1 или ее подформул на транслокацию YAP может быть аналогично продемонстрировано в клетках JHH–5 (Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457–60).

Идентификация мишеней

Соединения формулы A1 или ее подформул селективно целенаправленно воздействуют на LATS1/2 по сравнению с киназами MST1/2. Для идентификации мишени в хитах, полученных в результате скринингового анализа транслокации YAP, проводили анализ идентификации мишени, как это описано в разделе А примеров. Результаты анализа описаны на фигурах 33А – 33С.

На фигуре 33А показан вестерн–блоттинг для pYAP (Ser127) в лизате клеток HaCaT человека, обработанных средой–носителем, или трансфицированных 40 пМ siRNA против MST1/2 или LATS1/2. siRNA против LATS1/2 устраняла сигнал pYAP, при этом siRNA против MST1/2 имела минимальное влияние. Это согласуется с мнением в данной

области, что LATS отвечает за фосфорилирование YAP.

На фигуре 33B показан вестерн–блоттинг клеточных лизатов клеток HaCaT человека, которые не обрабатывали или обрабатывали 9 мкМ соединения из примера 133 в течение 1 часа в присутствии 0,5 мкМ окадаиковой кислоты. Степень ингибирования pYAP была существенной. Результат аналогичен исследованию с siRNA против LATS и MSTS (фигура 33A), и дает основания полагать, что пример соединения 133 целенаправленно воздействует на киназы LATS.

На фигуре 33C показано ингибирование активности LATS1 (по сравнению с контролем DMSO) в ответ на концентрацию соединения из примера 133, находящуюся в диапазоне от приблизительно 10^{-4} до 1 мкМ. Данные показывают, что соединения из примера 133 в значительной степени ингибировали LATS1 в данном анализе с показателем IC_{50}, составляющим 1,3 нм. Результат дополнительно подтвердил, что соединения по настоящему изобретению представляют собой высокоактивные ингибиторы киназ LATS.

Фармакодинамические характеристики (PD) на мышиной модели in vivo: применение в заживлении ран

Соединения по настоящему изобретению также активируют путь YAP in vivo. Исследование пути YAP экспрессии целевого гена проводили в мышиной модели in vivo, как это описано в in vivo PD–анализе в разделе A примеров. Две иссеченные раны на всю толщу кожи на спине анестезированной мыши местно обрабатывали носителем или 0,2 и 2 мг/мл соединения из примера 133. После введения двух суточных доз отбирали образцы кожи вокруг краев раны и проводили анализ Taqman с применением зондов Cyr61 и Gapdh. Уровни экспрессии mRNA для целевых генов нормализовали относительно уровней mRNA Gapdh и на фигуре 34 наносили на график в зависимости от концентрации соединений из примера 133. Данные показывают, что пример соединения 133 в значительной степени дозозависимым образом активирует целевой ген YAP Cyr61 по сравнению с носителем. Результат согласовывается с известными биологическими свойствами LATS в отношении активации пути YAP.

Пролиферация клеток кожи in vivo

Кроме того, соединения по настоящему изобретению усиливают in vivo пролиферацию клеток кожи при местном нанесении. Исследование проводили так, как это описано в "Гистологический анализ in vivo и окрашивание Ki67" в разделе A примеров. Пример соединения 133 или носитель наносили на неповрежденную кожу спины мыши. После трех дней введения доз дважды в сутки образцы кожи отбирали и подвергали иммуногистологическому окрашиванию на Ki67. Срезы оценивали визуально в отношении пролиферации клеток и относительного количества Ki67–положительных клеток. Результаты исследования зафиксированы на фигурах 35A и 35B.

На фигуре 35A показаны иллюстративные микрофотографии окрашенной на Ki67 кожи мыши, обработанной либо носителем, либо соединением из примера 133. Кожа мыши, обработанная с помощью соединения из примера 133, показывает значительное

усиление пролиферации базальных клеток и увеличение толщины эпидермиса по сравнению с носителем. На фигуре 35B показано сравнение относительного количества Ki67–положительных клеток в необработанной и обработанной коже мыши. Данные показывают относительное количество Ki67–положительных клеток, которое на 10% выше, в коже, обработанной соединением из примера 133, что указывает на статистически значимую индукцию образования Ki67–положительных клеток.

Соответственно, пример соединения из примера 133 в значительной степени повышает пролиферацию клеток кожи мыши in vivo.

Подводя итог, на основе многопараметрического визуализационного фенотипического HTS для соединений по настоящему изобретению было показано, что они являются высокоактивными ингибиторами LATS, что было подтверждено как клеточным, так и биохимическим анализами LATS. Также за счет использования siRNA для нокдауна как LATS1, так и LATS2, LATS также был подтвержден в качестве отрицательного регулятора пути YAP.

Кроме того, in vitro было показано, что соединение из примера 133 активировало путь YAP, стимулировало пролиферацию кератиноцитов человека (HaCaT). Ингибиторы LATS индуцировали экспрессию целевого гена YAP в PD мышиных моделях с ранами. Местная обработка с помощью соединения из примера 133 мыши индуцировала экспрессию целевого гена YAP и повышала рост клеток базального слоя кожи, о чем свидетельствует окрашивание на Ki67. Соответственно, пример соединения 133 является применимым в стимулировании регенерации кожи.

Таким образом, соединения формулы A1 или ее подформул в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли можно применять в качестве средства для терапии заболевания или состояния, при которых будет наблюдаться благоприятный эффект в результате пролиферации клеток, как это описано в данном документе. Например, в тех случаях, когда регенерация поврежденных или пораженных заболеванием тканей и органов будет приносить пользу субъекту, включая без ограничения пользу для кожи, печени и роговицы. Кроме того, соединения формулы A2 или ее подформул также можно использовать в качестве химических веществ для исследований, например, в качестве фармакологически активных соединений.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера в терапии.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера для лечения и уменьшения интенсивности симптомокомплекса при ожогах, острых и хронических кожных язвах. В одном варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из трофических язв, диабетических язв и пролежневых язв. В дополнительном варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из варикозных язв нижних конечностей, язв, обусловленных синдромом

диабетической стопы, и пролежней.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания или нарушения, лечение которого осуществляют путем ингибирования киназ LATS, предусматривающий введение терапевтически приемлемого количества соединения формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

В одном варианте осуществления заболевание или состояние выбрано из ожогов, острой кожной язвы или хронической кожной язвы. В дополнительном варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из трофических язв, диабетических язв и пролежневых язв. В дополнительном варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из варикозных язв нижних конечностей, язв, обусловленных синдромом диабетической стопы, и пролежней.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера для изготовления лекарственного препарата.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера для изготовления лекарственного препарата для стимулирования заживления ран или для лечения заболевания, лечение которого осуществляют путем ингибирования киназ LATS. В другом варианте осуществления заболевание представляет собой ожоги, острую или хроническую кожную язву. В другом варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из диабетических язв, пролежневых язв и трофических язв. В другом варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из варикозных язв нижних конечностей, язв, обусловленных синдромом диабетической стопы, и пролежней.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено соединение формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомер, предназначенные для применения в качестве лекарственного препарата.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено соединение формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомер для применения в качестве лекарственного препарата для стимулирования заживления ран или для лечения заболевания, лечение которого осуществляют путем ингибирования киназ LATS. В другом варианте осуществления заболевание представляет собой ожоги, острую кожную язву или хроническую кожную язву. В другом варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из диабетических язв, пролежневых язв и трофических язв. В другом варианте осуществления хроническая кожная язва выбрана из варикозных язв нижних конечностей, язв, обусловленных синдромом диабетической стопы, и пролежней.

In vivo обработка мышей: применение в отношении печени

Способность соединений формулы A1 индуцировать регенерацию печени и компенсаторный рост печени измеряли посредством обработки мышей соединениями, как это описано в in vivo анализе, описанном в разделе "Биологический анализ" ниже. Результаты анализа приведены в таблице 1C.

Результаты показывают, что тестируемые соединения снижают уровни pYAP в печени мышей по сравнению с контрольными мышами, обработанными средой–носителем, свидетельствуя об in vivo ингибировании киназ LATS в печени через 2 часа после введения дозы. Повышенная экспрессия mRNA целевых генов YAP Cyr61 и Ctgf свидетельствует об активации передачи сигналов, опосредованной YAP, через 2 часа после введения дозы. Иммуногистохимическое окрашивание в отношении маркера пролиферации Ki67 дополнительно свидетельствует об усилении пролиферации клеток печени через 24 после введения дозы.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера в терапии.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ лечения заболевания, лечение которого осуществляют путем ингибирования киназ LATS, предусматривающий введение терапевтически приемлемого количества соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста

остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза, предусматривающий введение терапевтически приемлемого количества соединения формулы A1 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера для изготовления лекарственного препарата.

В дополнительном варианте осуществления лекарственный препарат предназначен для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении представлено соединение формулы A2 или ее подформул, или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомер, предназначенные для применения в качестве лекарственного препарата. В дополнительном варианте осуществления лекарственный препарат предназначен для стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, в частности для лечения недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; для поддержания усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; для регенерации печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным

средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и для лечения пациентов с хроническим повреждением печени и сопутствующим фиброзом печени, возникающими вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством, как для усиления регенеративной способности, так и для ускорения разрешения фиброза.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлено применение соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера для стимулирования роста гепатоцитов в культуре вне донора (увеличение ex–vivo) или для индуцирования регенерации печени ex–vivo.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ стимулирования роста гепатоцитов в культуре вне донора (увеличение ex–vivo) или индуцирования регенерации печени ex–vivo с использованием соединения формулы A1 или ее подформул, или его соли, или его стереоизомера.

Фармацевтическая композиция и введение

В другом аспекте в вариантах осуществления по настоящему изобретению, относящихся к применению in vivo, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере два таких фармацевтически приемлемых носителя, которые описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, относящихся к местному применению соединений по настоящему изобретению, фармацевтическая композиция составлена таким способом, что она является подходящей для местного введения, например, в виде водных растворов, суспензий, мазей, кремов, гелей или распыляемых составов, например, для доставки посредством аэрозоля или ему подобных, и содержит активный ингредиент вместе с одним или несколькими солюбилизаторами, стабилизаторами, средствами для повышения тоничности, буферами и консервантами, которые известны специалистам в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, относящихся к применению in vivo, соединение по настоящему изобретению, как правило, составляют в фармацевтических лекарственных формах для обеспечения легко контролируемого дозирования лекарственного средства и обеспечения пациента простым и легким в применении продуктом. Схема дозирования для соединений по настоящему изобретению конечно будет варьироваться в зависимости от известных факторов, как например, фармакодинамические характеристики конкретного средства и способ, и путь его введения; вид, возраст, пол, состояние здоровья, медицинское показание и вес реципиента; природа и степень симптомов; вид сопутствующего лечения; частота лечения; путь введения, функция почек и печени пациента и требующийся эффект. В

определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, относящихся к применению in vivo, соединения по настоящему изобретению можно вводить в виде однократной суточной дозы, или общую суточную дозу можно вводить дробными дозами два, три или четыре раза в сутки.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению, относящихся к применению in vivo, фармацевтическая композиция или комбинация по настоящему изобретению может быть в однократной дозе, составляющей приблизительно 1–1000 мг активного(активных) ингредиента(ингредиентов) для субъекта весом приблизительно 50–70 кг. Терапевтически эффективная доза соединения, фармацевтической композиции или их комбинаций зависит от вида субъекта, веса тела, возраста и индивидуального состояния, нарушения или заболевания, лечение которых осуществляют, или их тяжести. Квалифицированный лечащий врач, клиницист или ветеринар может легко определить эффективное количество каждого из активных ингредиентов, необходимое для предупреждения, лечения или ингибирования прогрессирования нарушения или заболевания.

Соединения по настоящему изобретению можно применять местно в форме водных растворов, суспензий, мазей, кремов, лосьона, гелей или распыляемых составов, например, для доставки посредством аэрозоля или ему подобных. Дозировка может находиться в диапазоне от приблизительно 10^{-3} молярной до 10^{-9} молярной концентрации. Терапевтически эффективное количество in vivo в зависимости от пути введения может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до 100 мг/кг.

В некоторых случаях может быть преимущественным введение соединения по настоящему изобретению в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтическим (или терапевтическим) средством, таким как болеутоляющее средство, и их комбинациями. В частности, композиции будут либо составлены вместе в виде комбинированного терапевтического средства, либо вводиться по отдельности.

В некоторых случаях может быть преимущественным введение соединения по настоящему изобретению в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтическим (или терапевтическим) средством, таким как иммунодепрессант, например, кортикостероиды, циклоспорин, такролимус, и с комбинациями иммунодепрессантов. В частности, композиции будут либо составлены вместе в виде комбинированного терапевтического средства, либо вводиться по отдельности.

Соединение по настоящему изобретению можно вводить либо одновременно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, либо до, либо после их введения. Соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно от других средств, посредством такого же или иного пути введения, или же вместе с ними в одной и той же фармацевтической композиции. Терапевтическое средство представляет собой, например, химическое соединение, пептид, антитело, фрагмент антитела или нуклеиновую кислоту, которые являются терапевтически активными или повышают терапевтическую активность при введении пациенту в комбинации с соединением по

настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен продукт, содержащий соединение формулы A1 или ее подформул и по меньшей мере одно другое терапевтическое средство в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии. В одном варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания или состояния, опосредованного LATS1/2. Продукты, представленные в виде комбинированного препарата, включают композицию, содержащую соединение формулы A1 и другое терапевтическое средство(средства) вместе в той же фармацевтической композиции, или соединение формулы A1 и другое терапевтическое средство(терапевтические средства) в отдельной форме, например, в форме набора.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы A2 или ее подформул и другое терапевтическое средство(терапевтические средства). Необязательно фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый носитель, описанный выше.

В одном варианте осуществления, относящемся к применению in vivo, в настоящем изобретении представлен набор, содержащий две или более отдельных фармацевтических композиций, по меньшей мере одна из которых содержит соединение формулы A2 или ее подформул. В одном варианте осуществления набор содержит средства для раздельного хранения указанных композиций, такие как контейнер, разделенная бутылка, разделенная пробирка или разделенный пакет из фольги. Примером такого набора является пакет из фольги, как правило, используемый для доставки геля или мази и им подобных.

Набор согласно варианту осуществления по настоящему изобретению, относящемуся к применению in vivo, можно использовать для введения различных лекарственных форм, например для перорального и местного применения, для введения отдельных композиций с различными интервалами между введениями доз или для титрования отдельных композиций одна относительно другой. В целях содействия комплаентности набор по настоящему изобретению, как правило, содержит инструкции по введению.

В видах комбинированной терапии по настоящему изобретению соединение по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство могут быть изготовлены и/или составлены одним и тем же или разными производителями. Более того, для вариантов осуществления по настоящему изобретению, относящихся к применению in vivo, соединение по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство могут быть объединены в комбинированную терапию: (i) до того, как комбинированный продукт попадает к лечащим врачам (например, в случае набора, содержащего соединение по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство); (ii) самими лечащими врачами (или под наблюдением лечащего врача) незадолго до введения; (iii) в самом пациенте, например, в ходе последовательного введения соединения по настоящему

изобретению и другого терапевтического средства.

Соответственно, настоящее изобретение относится к применению соединения формулы A1 или ее подформул для лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где лекарственный препарат получен для введения с другим терапевтическим средством. Настоящее изобретение также относится к применению другого терапевтического средства для лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где лекарственный препарат вводят с соединением формулы A1 или ее подформул.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы A1 или ее подформул для применения в способе лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где соединение формулы A1 или ее подформул получено для введения с другим терапевтическим средством. Настоящее изобретение также относится к другому терапевтическому средству для применения в способе лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где другое терапевтическое средство получено для введения с соединением формулы A1 или ее подформул.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы A1 или ее подформул для применения в способе лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где соединение вводят с другим терапевтическим средством. В настоящем изобретении также представлено другое терапевтическое средство для применения в способе лечения заболевания или состояния посредством ингибирования LATS, где другое терапевтическое средство вводят с соединением формулы A1 или ее подформулы.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы A1 или ее подформул для лечения заболевания или состояния, опосредованного LATS1/2, где пациента ранее (например, в течение 24 часов) лечили с помощью другого терапевтического средства. В настоящем изобретении также представлено применение другого терапевтического средства для лечения заболевания или состояния опосредованного LATS, где пациента ранее (например, в течение 24 часов) лечили с помощью соединения формулы A1 или ее подформул.

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ

Соединения по настоящему изобретению можно получить с помощью ряда способов, известных специалисту в области органического синтеза, с учетом способов, схем реакций и примеров, представленных в данном документе. Соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением способов, описанных ниже, вместе со способами синтеза, известными в области химии органического синтеза, или с помощью их вариаций, как понятно специалистам в данной области техники. Предпочтительные способы включают без ограничения те, что описаны ниже. Реакции проводят в растворителе или смеси растворителей, подходящих для используемых реагентов и материалов и пригодных для осуществляемых преобразований. Специалистам в области органического синтеза будет понятно, что функциональная группа,

присутствующая в молекуле, должна соответствовать предполагаемым преобразованиям. Это иногда требует решения, заключающегося в изменении порядка стадий синтеза или выборе одной конкретной схемы процесса вместо другой с целью получить необходимое соединение по настоящему изобретению.

Исходные материалы обычно доступны из коммерческих источников, таких как Aldrich Chemicals (Милуоки, Висконсин) или являются легко получаемыми с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области техники (например, получаемыми с помощью способов, общем и целом описанных в Louis F. Fieser and Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v. 1–19, Wiley, New York (1967–1999 ed.), Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations, 2nd–ed., Wiley–VCH Weinheim, Germany (1999) или Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer–Verlag, Berlin, включая дополнения (также доступные с помощью онлайн–базы данных Beilstein).

Для иллюстративных целей схемы реакций, изображенные ниже, обеспечивают возможные пути синтеза соединений по настоящему изобретению, а также ключевых промежуточных соединений. Для более подробного описания отдельных стадий реакции см. раздел «Примеры» ниже. Специалистам в данной области техники будет понятно, что могут применяться другие пути синтеза, чтобы синтезировать соединения в соответствии с настоящим изобретением. Хотя конкретные исходные материалы и реагенты изображены на схемах и рассмотрены ниже, они могут быть легко заменены другими исходными материалами и реагентами для обеспечения разнообразия производных и/или условий реакции. Кроме того, множество соединений, полученных посредством описанных ниже способов, можно дополнительно модифицировать с учетом настоящего изобретения с применением традиционных химических методик, широко известных специалистам в данной области техники.

При получении соединений по настоящему изобретению может потребоваться введение защитных групп для отдаленных функциональных групп промежуточных соединений. Необходимость такого введения защитных групп будет варьироваться в зависимости от природы отдаленной функциональной группы и условий способов получения. Необходимость такого введения защитных групп легко определяется специалистом в данной области техники. Для общего описания защитных групп и их применения см. Greene, T.W. et al., Protecting Groups in Organic Synthesis, 4th Ed., Wiley (2007). Защитные группы, используемые в ходе получения соединений по настоящему изобретению, такие как тритильная защитная группа, могут быть показаны в виде одного региоизомера, но также могут существовать в виде смеси региоизомеров.

Сокращения

Сокращения, используемые в данном документе, определены следующим образом: "1x" означает один раз, "2x" означает дважды, "3x" означает трижды, "°C" означает градусы по Цельсию, "водн." означает водный, "Col" означает колонку, "экв." означает эквивалент или эквиваленты, "г" означает грамм или граммы, "мг" означает миллиграмм

или миллиграммы, "нм" означает нанометр или нанометры, "л" означает литр или литры, "мл" означает миллилитр или миллилитры, "мкл" означает микролитр или микролитры, "нл" означает нанолитр или нанолитры, "н." означает нормальный, "мкМ" микромолярный, "нМ" означает наномолярный, "моль" означает моль или моли, "ммоль" означает миллимоль или миллимоли, "мин." означает минуту или минуты, "ч." означает час или часы, "к. т." означает комнатную температуру, "ON" означает в течение ночи, "атм." означает атмосферу, "фунт/кв. дюйм" означает фунты на квадратный дюйм, "конц." означает концентрированный, "водн." означает водный, "нас." или "насыщ." означает насыщенный, "MW" означает молекулярную массу, "mw" означает микроволновое излучение, "т. пл." означает точку плавления, "Wt" означает вес, "MS" или "Mass Spec" означает масс–спектрометрию, "ESI" означает масс–спектрометрию с ионизацией электрораспылением, "HR" означает высокое разрешение, "HRMS" означает масс–спектрометрию высокого разрешения, "LCMS" означает жидкостную хроматографию и масс–спектрометрию, "HPLC" означает жидкостную хроматографию высокого давления, "RP HPLC" означает HPLC с обращенной фазой, "TLC" или "tlc" означает тонкослойную хроматографию, "ЯМР" означает ядерную магнитно–резонансную спектроскопию, "nOe" означает спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера, "1H" означает протон, "δ" означает дельта, "s" означает синглет, "d" означает дублет, "t" означает триплет, "q" означает квартет, "m" означает мультиплет, "br" означает широкий, "Гц" означает герц, "э. и." означает "энантиомерный избыток", и "α", "β", "R","r", "S", "s", "E" и "Z" являются стереохимическими обозначениями, известными специалисту в данной области техники.

Следующие сокращения, применяемые в данном документе ниже, имеют соответствующие значения:

AC активный контроль

AIBN азобисизобутиронитрил

ATP аденозинтрифосфат

Bn бензил

Boc *трет*–бутоксикарбонил

Boc_2O ди–*трет*–бутилдикарбонат

BSA бычий сывороточный альбумин

Bu бутил

Cs_2CO_3 безводный карбонат цезия

$CHCl_3$ хлороформ

DAST диэтиламиносератрифторид

DBU 2,3,4,6,7,8,9,10–октагидропиримидо[1,2–a]азепин

DCM дихлорметан

DMAP 4–диметиламинопиридин

DMEM среда Игла, модифицированная по Дульбекко

DMF диметилформамид

DMSO диметилсульфоксид

DPPA дифенилфосфорилазид

DTT дитиотреитол

EA этилацетат

EDTA этилендиаминтетрауксусная кислота

Equiv. эквивалентность

Et этил

Et_2O диэтиловый эфир

EtOH этанол

EtOAc этилацетат

FBS фетальная бычья сыворотка

HATU 2–(7–аза–1H–бензотриазол–1–ил)–1,1,3,3–тетраметилурония гексафторфосфат

HCl хлористоводородная кислота

HEPES (4–(2–гидроксиэтил)–1–пиперазинэтансульфоновая кислота

HPMC (гидроксипропил)метилцеллюлоза

HTRF гомогенная флуоресценция с временным разрешением

i–Bu изобутил

i–Pr изопропил

KOAc ацетат калия

$LiAlH_4$ алюмогидрид лития

Me метил

mCPBA 3–хлорпероксибензойная кислота

MeCN ацетонитрил

MnO_2 диоксид марганца

N_2 азот

$NaBH_4$ борогидрид натрия

$NaHCO_3$ бикарбонат натрия

Na_2SO_4 сульфат натрия

NBS N–бромсукцинимид

NC нейтральный контроль

PBS фосфатно–солевой буферный раствор

PFA параформальдегид

Ph фенил

PPh_3 трифенилфосфин

$Ph_3P=O$ трифенилфосфиноксид

pYAP фосфо–YAP

R_f фактор удерживания

к.т. комнатная температура (°C)

Ser серин

t–Bu или Bu^t *трет*–бутил

T3P® ангидрид пропанфосфоновой кислоты

TEA триэтиламин

TFA трифторуксусная кислота

THF тетрагидрофуран

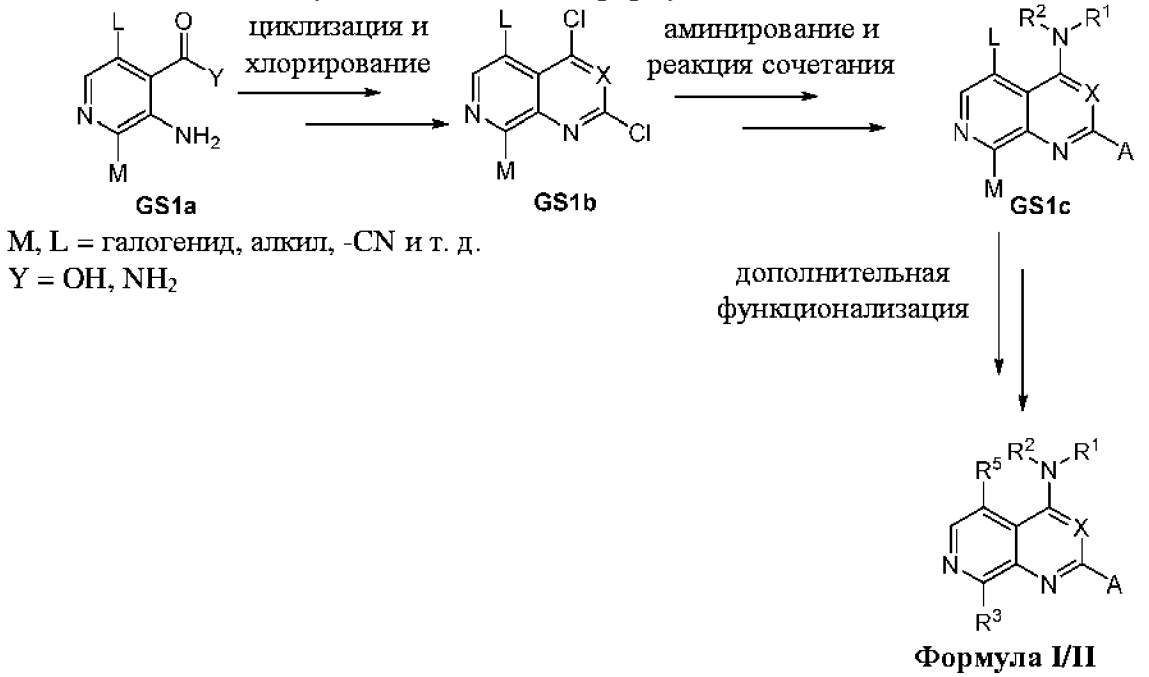
UVA ультрафиолет A

YAP Yes–ассоциированный белок (ID гена в NCBI: 10413; официальный символ: (YAP1)

I. Общие пути синтеза

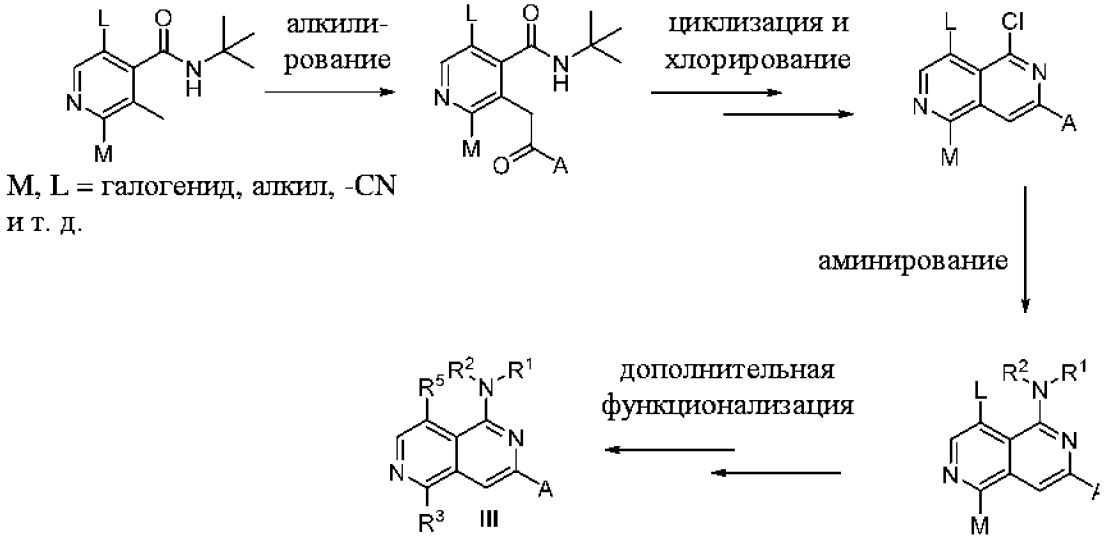
Соединения формул I–VI можно получать, как показано на общих схемах I–III и более подробно на схемах 1–6 ниже. Подробное описание синтеза промежуточных соединений и соединений, приведенных в качестве примера, также раскрыто ниже.

Общая схема I для получения соединений формулы I или II



Бициклический дихлорид **GS1b** может быть коммерчески доступным, если X=C, или может быть получен из аминоизоникотиновой кислоты/амида **GS1a** посредством циклизации и хлорирования. Дихлорид в **GS1b** можно аминировать и подвергать реакции сочетания с подходящими средствами с образованием соединения **GS1c**, которое дополнительно функционализируют с получением соединения формулы I или формулы II посредством любой необходимой функционализации, такой как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование, аминирование, реакция сочетания и т. д.

Общая схема II для получения соединений формулы III



Общая схема III для получения соединений формулы IV

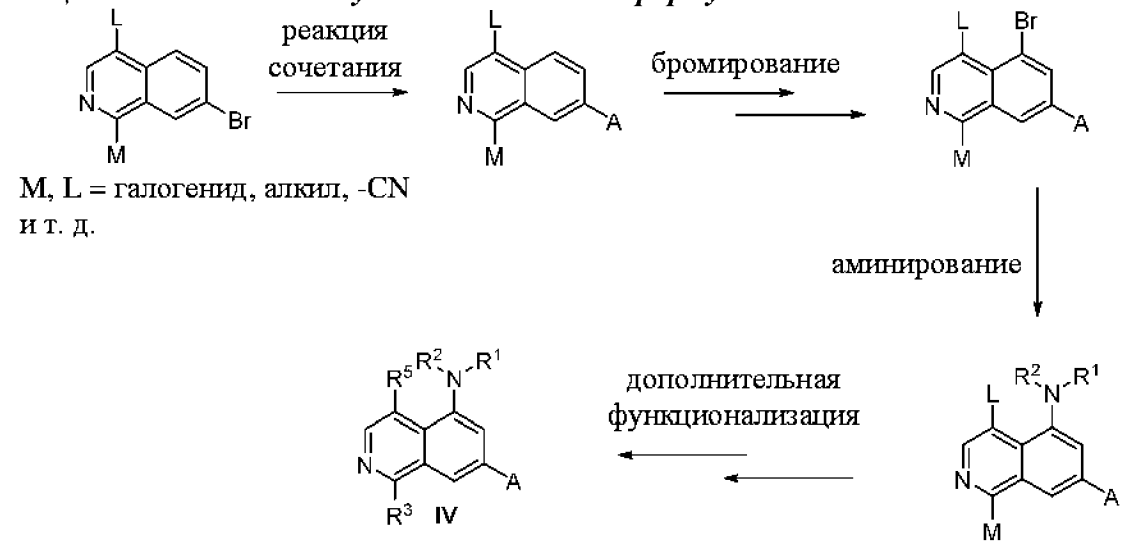


Схема 1.

Соединения формулы V можно получать, как показано на схеме 1 ниже. Стадия C может включать аминирование и любую необходимую функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д.

Схема 1

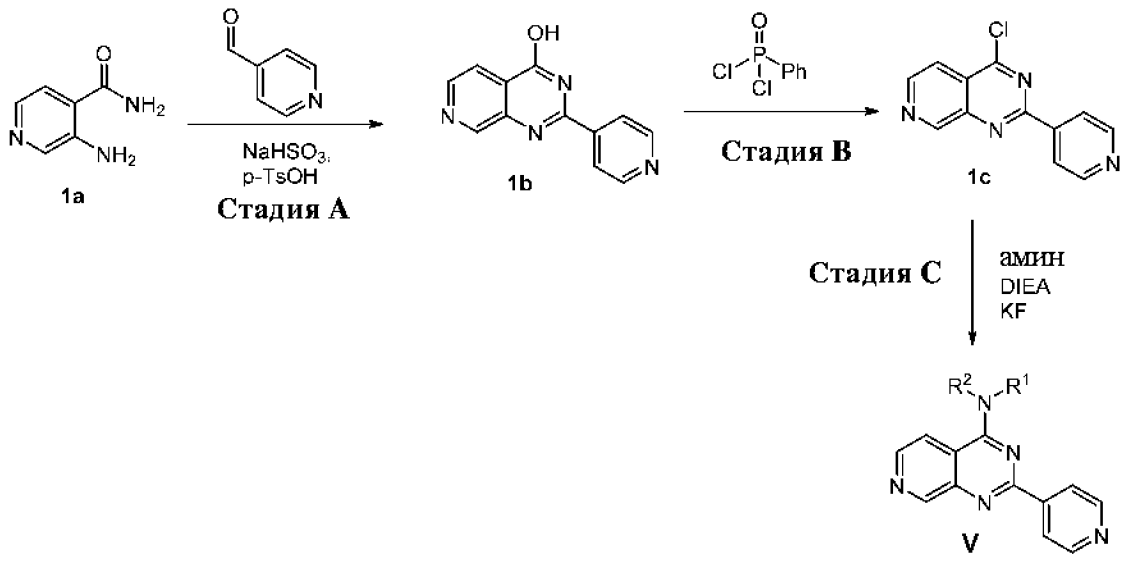


Схема 2.

В качестве альтернативы соединения формулы V можно получать, как показано на схеме 2. Стадия C может включать аминирование и любую необходимую функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д. Дополнительная функционализация монохлоридного промежуточного соединения **2d** посредством без ограничения металл–опосредованного сочетания, аминирования, алкилирования и т. д. и необходимых стадий введения защитных групп и удаления защитных групп приводит к получению соединений формулы V.

Схема 2

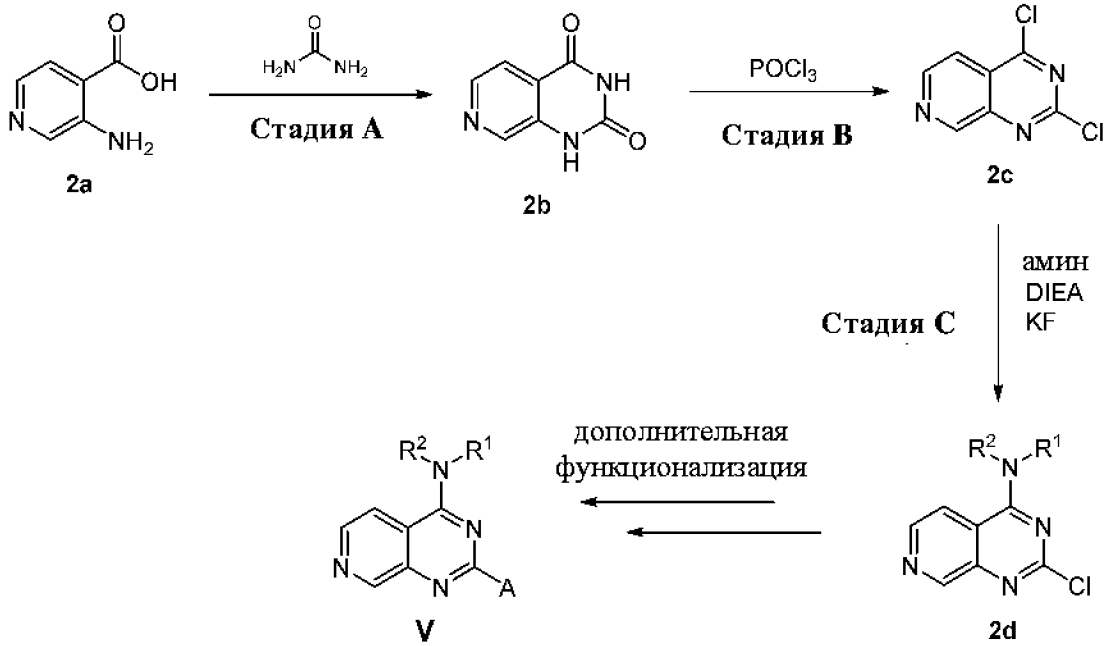
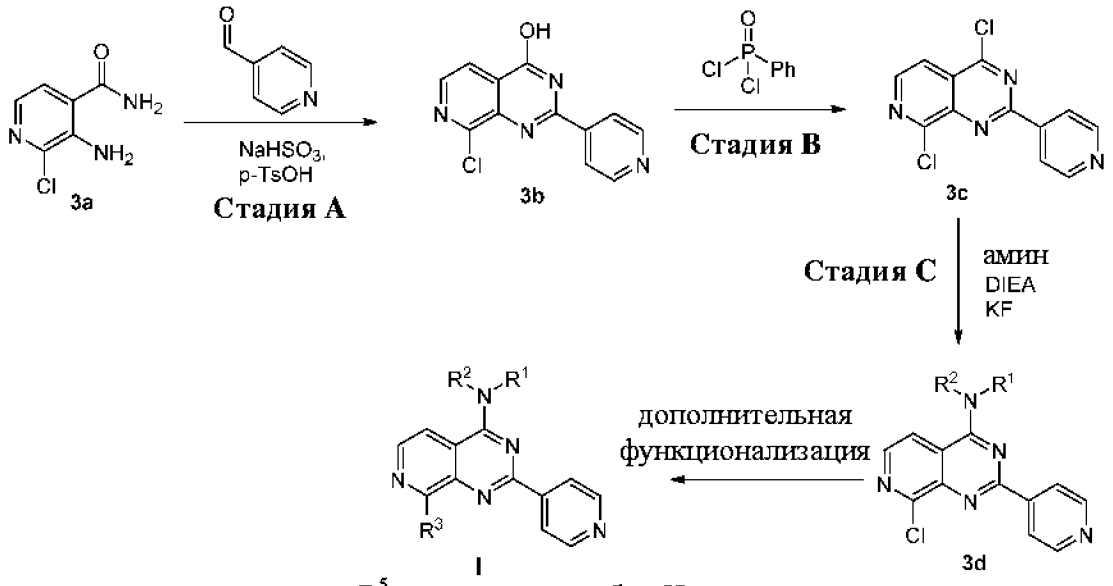


Схема 3.

Соединения формулы I, где R^5 представляет собой водород, можно получать, как показано на схеме 3. Стадия C может включать аминирование и любую необходимую

функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д. Дополнительная функционализация монохлоридного промежуточного соединения **3d** с помощью без ограничения металл–опосредованного сочетания, аминирования, алкилирования и т. д. и необходимых стадий введения защитных групп и удаления защитных групп приводит к получению соединений формулы (I), где R^5 представляет собой водород.

Схема 3



где R^5 представляет собой H

Схема 4.

Соединения формулы I, где как R^3, так и R^5 представляют собой водород, можно получать, как показано на схеме 4. Стадия C может включать аминирование и любую необходимую функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д., что приводит к получению соединений формулы I, где как R^3, так и R^5 представляют собой водород.

Схема 4

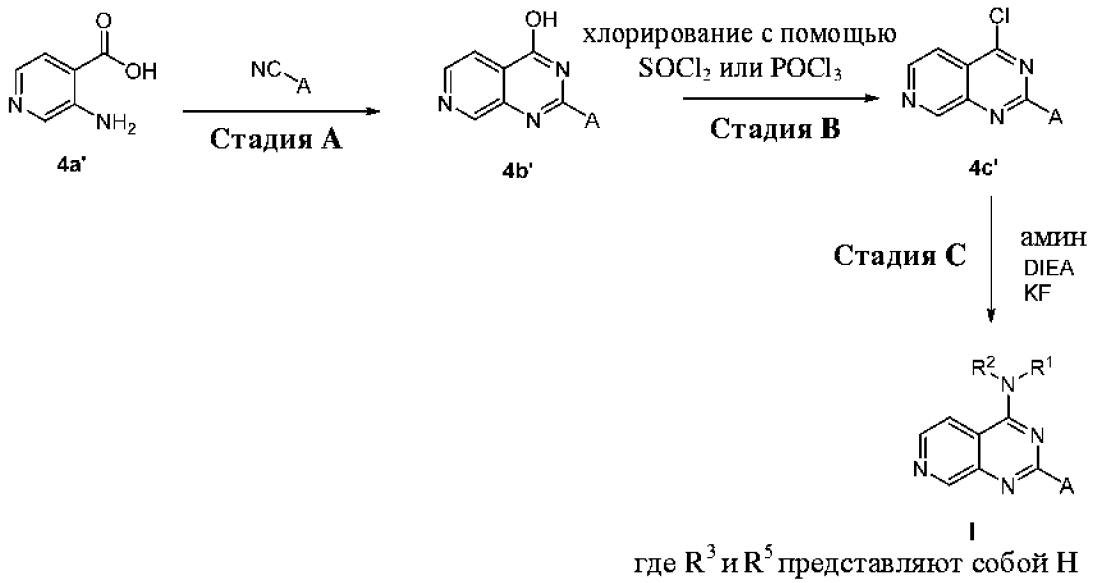


Схема 5.

Соединения формулы I, где R^3 представляет собой водород, можно получать, как показано на схеме 5. Стадия D может включать аминирование и любую необходимую функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д. Дополнительная функционализация монохлоридного промежуточного соединения **5d** с помощью без ограничения металл–опосредованного сочетания, аминирования, алкилирования и т. д. и необходимых стадий введения защитных групп и удаления защитных групп приводит к получению соединений формулы I, где R^3 представляет собой водород.

Схема 5

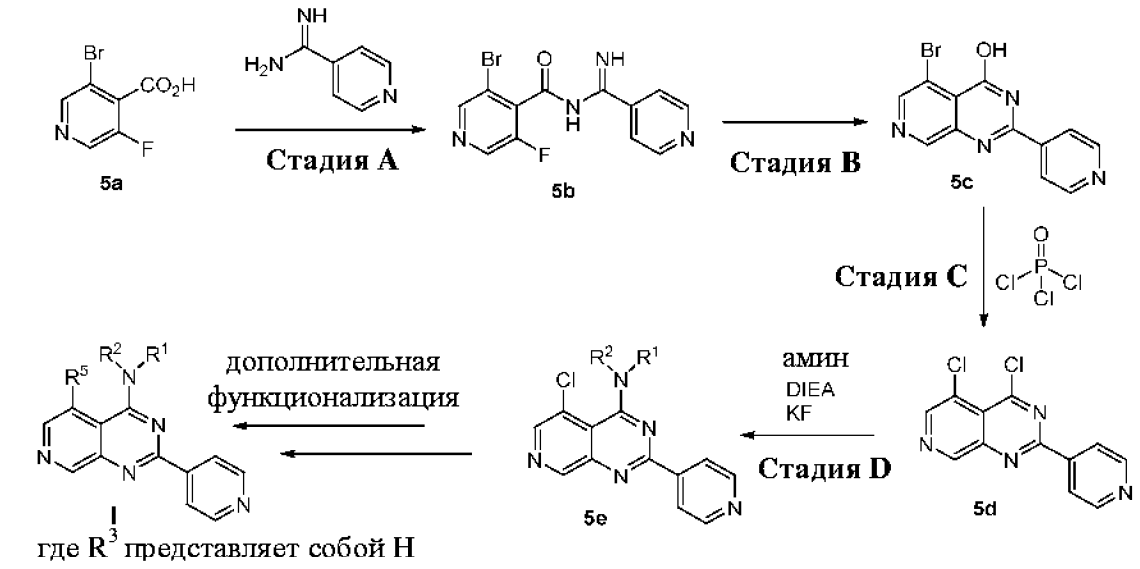
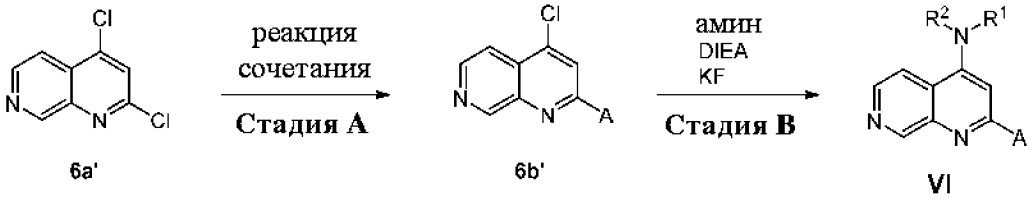


Схема 6.

Соединения формулы VI можно получать из коммерчески доступного дихлорида **6a'** (2,4–дихлор–1,7–нафтиридин, Aquila Pharmatech), как показано на схеме 6. Стадия A может включать металл–опосредованное сочетание и любую необходимую

функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д. Стадия B может включать аминирование и любую необходимую функционализацию, такую как без ограничения стадии введения защитных групп и удаления защитных групп, восстановление, гидролиз, алкилирование и т. д.

Схема 6



Получение иллюстративных примеров

Следующие примеры были получены, выделены и охарактеризованы с применением способов, раскрытых в данном документе. Следующие примеры демонстрируют частичный объем настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Если не указано иное, то исходные материалы обычно доступны из коммерческих источников, которые не являются исключительными, таких как TCI Fine Chemicals (Япония), Shanghai Chemhere Co., Ltd. (Шанхай, Китай), Aurora Fine Chemicals LLC (Сан–Диего, Калифорния), FCH Group (Украина), Aldrich Chemicals Co. (Милуоки, Висконсин), Lancaster Synthesis, Inc. (Виндхем, Нью–Гемпшир), Acros Organics (Фейр–Лоун, Нью–Джерси), Maybridge Chemical Company, Ltd. (Корнуолл, Англия), Tyger Scientific (Принстон, Нью–Джерси), AstraZeneca Pharmaceuticals (Лондон, Англия), Chembridge Corporation (США), Matrix Scientific (США), Conier Chem & Pharm Co., Ltd (Китай), Enamine Ltd (Украина), Combi–Blocks, Inc. (Сан–Диего, США), Oakwood Products, Inc. (США), Apollo Scientific Ltd. (Великобритания), Allichem LLC. (США) и Ukrorgsyntez Ltd (Латвия).

Способы LCMS, используемые для характеристики примеров 1–290

Аналитическую LC/MS проводили на системах Agilent с применением программного обеспечения ChemStation. Системы состоят из:

- насоса для двухкомпонентных смесей Agilent G1312
- автоматического дозатора для луночного планшета Agilent G1367
- термостатированного колоночного отделения Agilent G1316
- детектора на диодной матрице Agilent G1315
- масс–спектрометра Agilent 6140/6150
- испарительного детектора светорассеяния SOFTA.

Типичные условия способа являются следующими:

- расход: 0,9 мл/мин.
- колонка: колонка Waters Acquity HSS T3 C18, 1,8 микрометра, 2,1×50 мм

 подвижная фаза A: вода+0,05% TFA

 подвижная фаза B: ацетонитрил+0,035% TFA

 время анализа: 2,25 минуты.

 На системе проводили анализ с применением градиента от 10% B до 90% B за 1,35 минуты. Обеспечивали промывку в течение 0,6 минуты при 100% B после использования градиента. Оставшаяся продолжительность способа обеспечивает возврат системы к исходным условиям.

 Типичный диапазон сканирования масс–спектрометра составлял 100–1000 а.е.м.

Способы LCMS, используемые для характеристики примеров 291–335

LC–MS (способ 1):

Система: Waters Acquity UPLC с детектором Waters SQ.

Колонка: Acquity HSS T3 1,8 мкм, 2,1×50 мм.

Расход: 1,0 мл/мин. Температура колонки: 60°C.

Градиент: от 5 до 98% B за 1,4 мин., A=вода+0,05% муравьиной кислоты+3,75 мМ ацетата аммония, B=ацетонитрил+0,04% муравьиной кислоты.

LC–MS (способ 2):

Система: Waters Acquity H–Class UPLC с детектором Waters SQ.

Колонка: BEH C18 1,7 мкм, 2,1×50 мм.

Расход: 3,0 мл/мин. Температура колонки: 30°C.

Градиент: от 2 до 100% B за 2,7 мин., A=2 мМ ацетат аммония/вода+0,1% муравьиной кислоты, B=ацетонитрил+0,1% муравьиной кислоты.

ЯМР, используемая для характеристики примеров 1–290

Протонные спектры регистрировали на Bruker AVANCE II 400 МГц с 5 мм криозондом QNP или Bruker AVANCE III 500 МГц с 5 мм зондом QNP, если не указано иное. Химические сдвиги приведены в ppm относительно диметилсульфоксида (δ 2,50), хлороформа (δ 7,26), метанола (δ 3,34) или дихлорметана (δ 5,32). Небольшое количество сухого образца (2–5 мг) растворяли в подходящем дейтерированном растворителе (1 мл).

ЯМР, используемая для характеристики примеров 291–335

Протонные спектры регистрировали на ЯМР–спектрометре Bruker Avance 400 (400 МГц), оснащенном криозондом, или на ЯМР–спектрометре Bruker Avance 600 (600 МГц), оснащенном криозондом. Химические сдвиги (δ–значения) приведены в ppm, отсчитывая от тетраметилсилана, при этом спектры на схеме расщепления обозначены как синглет (s), дуплет (d), триплет (t), квартет (q), пентет (p), мультиплет, неразделенные или в большей степени перекрывающиеся сигналы (m), широкий сигнал (br). Растворители приведены в скобках.

Реагенты и материалы

Растворители и реагенты приобретали у поставщиков и применяли без какой–либо дополнительной очистки. Картриджи с основной ионообменной смолой PoraPakTM Rxn CX 20cc (2 г) приобретали у Waters. Картриджи для разделения фаз (Isolute Phase Separator) приобретали у Biotage. Абсорбент Isolute (Isolute HM–N) приобретали у Biotage.

Способы ISCO, используемые для очистки примеров

Флэш–хроматографию ISCO проводили на системе Teledyne COMBIFLASH® с колонкой RediSep®, предварительно заполненной диоксидом кремния.

Способы препаративной HPLC, используемые для очистки примеров

Препаративную HPLC проводили на системах Waters Autoprep с применением программного обеспечения MassLynx и FractionLynx. Системы состоят из:

- автоматического дозатора/коллектора фракций Waters 2767
- насоса для двухкомпонентных смесей Waters 2525
- подпиточный насос Waters 515
- УФ–детектора Waters 2487, работающего при двух значениях длины волны
- масс–спектрометра Waters ZQ.

Типичные условия способа являются следующими:

- расход: 100 мл/мин.
- колонка: колонка Waters Atlantis T3 C18, 10 микрометров, 19×50 мм
- объем вводимой пробы: 0–1000 микролитров
- подвижная фаза A: вода+0,05% TFA
- подвижная фаза B: ацетонитрил+0,035% TFA
- время анализа: 4,25 минуты.

На системе проводили анализ с применением градиента от x% B до y% B, подходящего для примеров, за 3 минуты после 0,25–минутной выдержки при исходных условиях. Обеспечивали промывку в течение 0,5 минуты при 100% B после использования градиента. Оставшаяся продолжительность способа обеспечивает возврат системы к исходным условиям.

Сбор фракций запускался с помощью масс–детектирования с использованием программного обеспечения FractionLynx.

Способы хиральной препаративной HPLC, используемые для очистки примеров

Хиральный скрининг на основе SFC проводили на системе Thar Instruments Prep Investigator, сопряженной с масс–спектрометром Waters ZQ. Система Thar Prep Investigator состоит из:

- автоматического дозатора Leap HTC PAL
- модуля подачи жидкости Thar (0–10 мл/мин.)
- колоночного термостата Thar SFC на 10 положений
- Waters 2996 PDA
- хирального детектора Jasco CD–2095
- автоматического регулятора обратного давления Thar.

Все компоненты Thar являются частью серии SuperPure Discovery Series.

В системе обеспечивали поток при 2 мл/мин. (4 мл/мин. для колонки WhelkO–1) и поддерживали при 30 градусах C. Обратное давление системы устанавливали на значении 125 бар. Каждый образец подвергали скринингу через набор из шести 3–микрометровых

колонок:

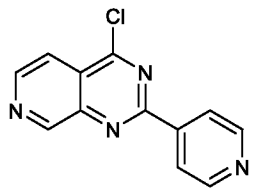
- 3 микрометра, 4,6×50 мм, ChiralPak AD
- 3 микрометра, 4,6×50 мм, ChiralCel OD
- 3 микрометра, 4,6×50 мм, ChiralCel OJ
- 3 микрометра, 4,6×250 мм, Whelk O–1
- 3 микрометра, 4,6×50 мм, ChiralPak AS
- 3 микрометра, 4,6×50 мм, Lux–Cellulose–2.

На системе проводили анализ с применением градиента от 5% сорастворителя до 50% сорастворителя за 5 минут с последующим выдерживанием в течение 0,5 минуты при 50% сорастворителя, изменяли обратно до 5% сорастворителя и выдерживали в течение 0,25 минуты при исходных условиях. Между применением каждого градиента использовали методику 4–минутного уравновешивания, при этом подавали поток при 5% сорастворителя через следующую колонку для скрининга. Типичные растворители, используемые для скрининга, представляют собой MeOH, MeOH+20 мМ NH_3, MeOH+0,5%DEA, IPA и IPA+20 мМ NH_3.

После обнаружения разделения с помощью одного из градиентных методов, будет разработан изократический способ и, при необходимости, проведено его масштабирование для очистки с помощью системы Thar Prep80.

Синтез промежуточных соединений

Промежуточное соединение 1c (схема 1): 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин

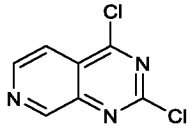


Стадия А. В 20–мл флакон для микроволновой обработки добавляли 3–аминоизоникотинамид (**1a**, 2 г, 14,58 ммоль), изоникотинальдегид (1,521 мл, 16,04 ммоль), бисульфит натрия (1,821 г, 17,50 ммоль) и гидрат 4–метилбензолсульфоновой кислоты (0,277 г, 1,458 ммоль) в DMA (объем: 5 мл) с получением оранжевой суспензии. Реакционную смесь тщательно перемешивали и нагревали в микроволновой печи при 160°C в течение 12 мин. Реакционную смесь разбавляли водой и фильтровали. Твердое вещество промывали с помощью воды, MeOH и простого эфира с получением 2,03 г твердого вещества грязно–белого цвета в качестве продукта **1b** (59%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,88–8,78 (m, 2H), 8,73 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,16–8,08 (m, 2H), 8,03 (dd, J=5,2, 0,9 Гц, 1H).

Стадия В. В 5–мл микроволновой реактор добавляли 2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол (**1b,** 500 мг, 2,230 ммоль) и фенилфосфоновый дихлорид (1564 микролитра, 11,15 ммоль) с получением коричневой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 170°C в течение 30 мин. до момента определения с помощью LCMS полного превращения. Реакционную смесь гасили с помощью льда/воды

и нейтрализовали с помощью насыщенного Na_2CO_3, затем экстрагировали с помощью DCM x3 с получением продукта **1c** (74%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,65 (d, J=1,0 Гц, 1H), 8,96 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,87 (s, 2H), 8,47–8,30 (m, 2H), 8,18 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 243,1.

Промежуточное соединение 2c (схема 2): 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидин

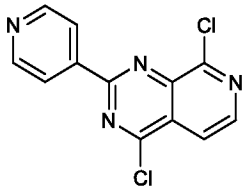


Стадия A. Смесь мочевины (40,00 г, 666,00 ммоль) и 3–аминоизоникотиновой кислоты (**2a,** 18,40 г, 133,20 ммоль) нагревали при 210°C в течение 1 ч. (ПРИМЕЧАНИЕ: не применяли растворитель). Добавляли NaOH (2 н., 320 мл) и смесь перемешивали при 90°C в течение 1 ч. Твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали с помощью воды. Полученный таким образом неочищенный продукт суспендировали в HOAc (400 мл) и перемешивали при 100°C в течение 1 ч. Смесь охлаждали до к. т., фильтровали и твердое вещество промывали с помощью большого количества воды и затем высушивали под вакуумом с получением пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b,** 17,00 г, выход 78%) без дополнительной очистки. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 164,0.

Стадия B. К смеси пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b**, 20,00 г, 122,60 ммоль) и $POCl_3$ (328,03 г, 2,14 моль) в толуоле (200 мл) добавляли по каплям DIEA (31,69 г, 245,20 ммоль) и данную реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение ночи (18 ч.) с получением суспензии.

Растворитель и $POCl_3$ удаляли под вакуумом, разбавляли с помощью DCM (50 мл), нейтрализовали с помощью DIEA до pH=7 при –20°C и концентрировали снова, остаток очищали с помощью колонки (20–50% EA/PE) с получением продукта (**2c**, 20,00 г, 99,99 ммоль, выход 82%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ–d) δ 9,52 (s, 1 H), 8,92 (d, J=5,6 Гц, 1 H), 8,04 (d, J=5,6 Гц, 1 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 200,0.

Промежуточное соединение 3c (схема 3): 4,8–дихлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин

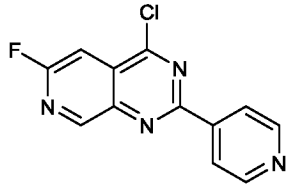


Стадия A. В 20–мл микроволновой реактор добавляли 3–аминоизоникотинамид (**3a**, 650 мг, 3,79 ммоль) и изоникотинальдегид (487 мг, 4,55 ммоль), бисульфит натрия (788 мг, 7,58 ммоль) в DMA (объем: 10 мл) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали в условиях обработки микроволновым излучением при 160°C в течение 10 мин. Реакционную смесь разбавляли водой, фильтровали и промывали с

помощью MeOH и простого эфира. Твердое вещество собирали с получением продукта **3b** (8–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол, 300 мг, 29%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 8,86–8,80 (m, 2H), 8,45 (d, J=5,1 Гц, 1H), 8,18–8,12 (m, 2H), 8,00 (d, J=5,1 Гц, 1H).

Стадия B. В 20–мл микроволновом реакторе смешивали (8–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол (**3b**, 300 мг, 1,160 ммоль) и фенилфосфоновый дихлорид (1 мл, 7,13 ммоль) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали в условиях обработки микроволновым излучением при 170°C в течение 60 мин. Реакционную смесь разбавляли водой и фильтровали. Твердое вещество промывали с помощью воды, MeOH и простого эфира с получением указанного в заголовке продукта **3c** (78%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,05–8,96 (m, 2H), 8,52 (d, J=5,1 Гц, 1H), 8,46–8,38 (m, 2H), 8,05 (d, J=5,1 Гц, 1H). (К образцу для ЯМР добавляли 1 каплю TFA, в ином случае наблюдали 2 серии пиков). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 277,0.

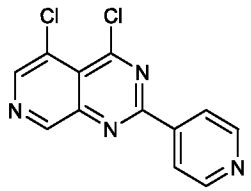
<u>Промежуточное соединение 4c (схема 4, промежуточное соединение 4c, где X представляет собой F, и A представляет собой 4–пиридинил):</u> 4–хлор–6–фтор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин



Стадия A. Раствор изоникотинонитрила (800 мг, 7,69 ммоль) в MeOH (30 мл) обрабатывали с помощью метоксида натрия (0,474 мл, 5,4 M, 2,56 ммоль) при к. т. в течение 1 ч. Затем добавляли 5–амино–2–фторизоникотиновую кислоту (1,0 г, 6,41 ммоль) и полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 24 часов. После охлаждения до к. т. твердый продукт собирали посредством фильтрации. Его промывали с помощью EtOAc, затем высушивали под вакуумом с получением 6–фтор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ола (**4b**, 756 мг, 48,7%). 1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d6) δ 8,89 (s, 1H), 8,81 (d, J=5,6 Гц, 2H), 8,14–8,06 (m, 2H), 7,74 (d, J=2,3 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 243,10.

Стадия B. К смеси 6–фтор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ола (**4b**, 750 мг, 3,1 ммоль) в DCE (40 мл) добавляли тионилхлорид (1,81 мл, 24,8 ммоль) и DMF (0,1 мл). Затем смесь перемешивали в течение 3 часов при 85°C. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и высушивали под вакуумом в течение ночи. Неочищенный продукт (950 мг) использовали для реакции на следующей стадии без дополнительной обработки или очистки. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 261,10.

<u>Промежуточное соединение 5d (схема 5):</u> 4,5–дихлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин

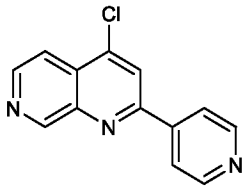


Стадия A. К смеси 3–бром–5–фторизоникотиновой кислоты (**5a**, 1,87 г, 8,5 ммоль) и HATU (4,85 г, 12,75 ммоль) в DMF (30 мл) добавляли DIEA (4,5 мл), смесь перемешивали при к. т. в течение 20 минут, затем добавляли изоникотинимидамид (1,236 г, 10,2 ммоль). Перемешивание продолжали в течение еще 15 часов при к. т. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Затем неочищенную смесь в виде светло–коричневого сиропа растворяли в DCM и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (элюировали с помощью 0–10% MeOH/растворитель A, при этом растворитель A представляет собой смесь 4 литров DCM и 8 мл 7 н. раствора аммиака в MeOH), фракции 66–80 объединяли и концентрировали с получением необходимого продукта, представляющего собой 3–бром–5–фтор–N–(имино(пиридин–4–ил)метил)изоникотинамид **5b** (566 мг, 20,6%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,27 (s, 1H), 10,09 (s, 1H), 8,79–8,73 (m, 2H), 8,71 (s, 2H), 7,95–7,89 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 323,0.

Стадия B. Смесь 3–бром–5–фтор–N–(имино(пиридин–4–ил)метил)изоникотинамида (**5b**, 600 мг, 1,857 ммоль), DIEA (0,33 мл, 1,857 ммоль), карбоната калия (257 мг, 1,857 ммоль) и DBU (0,28 мл, 1,857 ммоль) в DMA (8 мл) нагревали в 20–мл микроволновом реакционном сосуде при 150°C в течение 45 минут (обработка микроволновым излучением). Реакционную смесь разбавляли водой (20 мл), экстрагировали с помощью EtOAc (3×60 мл), при этом необходимый продукт оставался в водной фазе. Затем водную фазу очищали посредством ISCO с обращенной фазой (10–50% CH3CN/вода) с получением необходимого продукта, представляющего собой 5–бром–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол **5c** (520 мг, чистота 80%, 74%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 303,0.

Стадия C. 5–Бром–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол (**5c**, 150 мг, 0,495 ммоль) растворяли в безводном CH_3CN (2 мл) и затем добавляли $POCl_3$ (759 мг, 4,95 ммоль). Затем реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 16 ч. С помощью LCMS определяли, что реакция завершена. Реакционную смесь охлаждали до к. т. и растворитель выпаривали. Остаток разбавляли ледяной водой (40 мл) и затем экстрагировали с помощью EtOAc (3×40 мл). Объединенные органические слои высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и выпаривали до сухого состояния с получением необходимого продукта, представляющего собой 4,5–дихлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин **5d** (86%). Продукт применяли непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,05 (s, 1H), 8,87 (s, 2H), 8,68 (s, 1H), 8,16 (d, J=4,9 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 277,0.

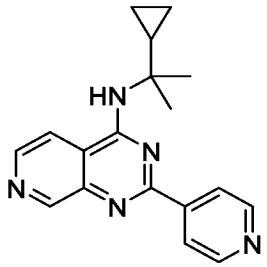
Промежуточное соединение 6b (схема 6, промежуточное соединение 6b', где A представляет собой 4–пиридинил): 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин



Стадия A. В 20–мл микроволновой реактор добавляли тетракиспалладий (58,1 мг, 0,050 ммоль), карбонат калия (1,256 мл, 2,51 ммоль), и 2,4–дихлор–1,7–нафтиридин (**6a,** 200 мг, 1,005 ммоль), и пиридин–4–илбороновую кислоту (130 мг, 1,055 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) с получением оранжевой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 60 мин. в условиях обработки микроволновым излучением. Неочищенную смесь разбавляли с помощью DCM, H_2O, разделяли и экстрагировали с помощью DCM x3. Объединяли органические слои и высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта (62%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,58 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,85–8,78 (m, 4H), 8,32–8,29 (m, 2H), 8,11 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 242,1.

Синтез соединений формулы A1

<u>Пример 1:</u> N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (соединение 1)



Указанное в заголовке соединение получали из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение **1c**) с применением **стадии C**, как на **схеме 1**.

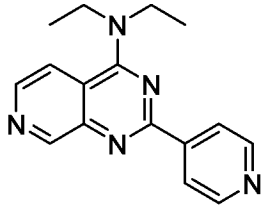
Стадия C. В 20–мл флаконе 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин (30 мг, 0,12 ммоль) перемешивали в DMF (0,7 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли TEA (19 мкл, 0,14 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (7 мг, 0,12 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли 2–циклопропилпропан–2–амин (0,013 мл, 0,12 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 80°C в течение двух ч. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта, представляющего собой N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (50%).1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80(d, J=6,1 Гц, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,29(m, 2H), 7,74(s, 1H), 1,94(m, 1H), 1,52(s, 6H), 0,49(m, 4H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$):

306,2.

Примеры 2–110

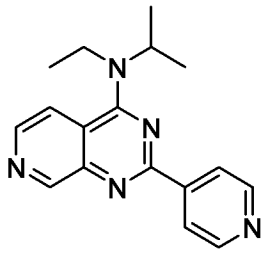
Примеры 2–110, описанные *ниже*, синтезировали в соответствии с протоколом, описанным для **примера 1**, с применением 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение **1c**) и различных аминов соответственно, за исключением конкретно указанных.

Пример 2: N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



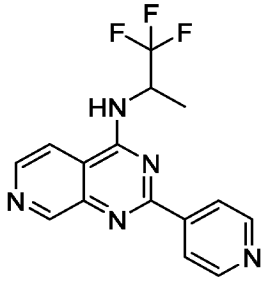
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,58(d, J=5,9 Гц, 1H), 8,31(m, 2H), 7,89(dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 3,90(q, J=7,0 Гц, 4H), 1,40(t, J=7,0 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,1.

Пример 3: N–этил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



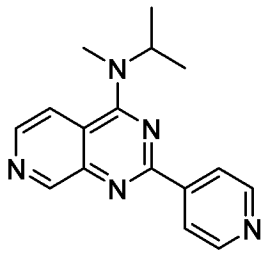
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,58(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 7,88(dd, J=5,8, 0,8 Гц, 1H), 4,95–4,90(m, 1H), 3,81(q, J=6,9 Гц, 2H), 1,40(s, 3H), 1,38(s, 3H), 1,35(m, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 294,2.

Пример 4: 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



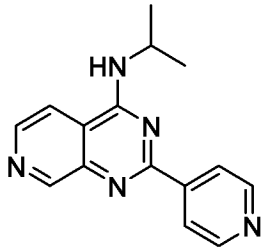
1H ЯМР (400МГц, CDCl3) δ 9,45(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,83(m, 2H), 8,78(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,70–8,60(m, 2H), 7,63(s, 1H), 5,98–5,92(m, 1H), 5,80–5,75(m, 1H), 1,81(d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 320,1.

Пример 5: N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



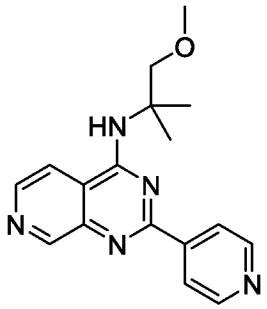
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,55(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,31(m, 2H), 8,03(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 5,15–5,10(m, 1H), 3,34(s, 3H), 1,35(d, J=6,6 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

Пример 6: N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



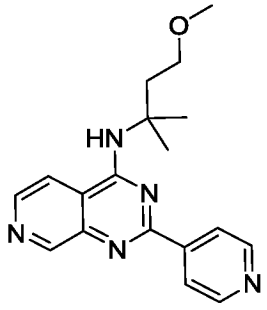
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,76(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,50(d, J=7,5 Гц, 1H), 8,32(m, 2H), 8,28(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 4,74–4,67(d, J=6,7 Гц, 1H), 1,36(d, J=6,6 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 266,1.

Пример 7: N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



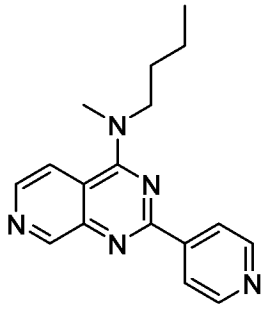
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,64(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,40(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,29(m, 2H), 7,74(s, 1H), 3,85(s, 2H), 3,28(s, 3H), 1,60(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 310,2.

Пример 8: N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



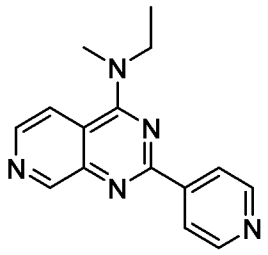
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 8,28(m, 1H), 7,85(s, 1H), 3,48(t, J=6,7 Гц, 2H), 3,20(s, 3H), 2,35(t, J=6,8 Гц, 2H), 1,64(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 324,2.

Пример 9: **N–бутил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



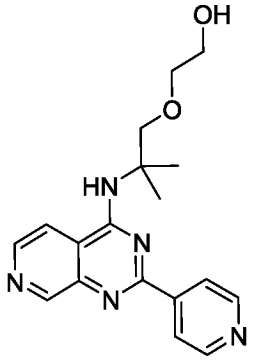
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77(m, 2H), 8,55(d, J=5,9 Гц, 1H), 8,31(m, 2H), 8,08(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 3,92(m, 2H), 3,54(s, 3H), 1,82–1,75(m, 2H), 1,48–1,36(m, 2H), 0,98(t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,2.

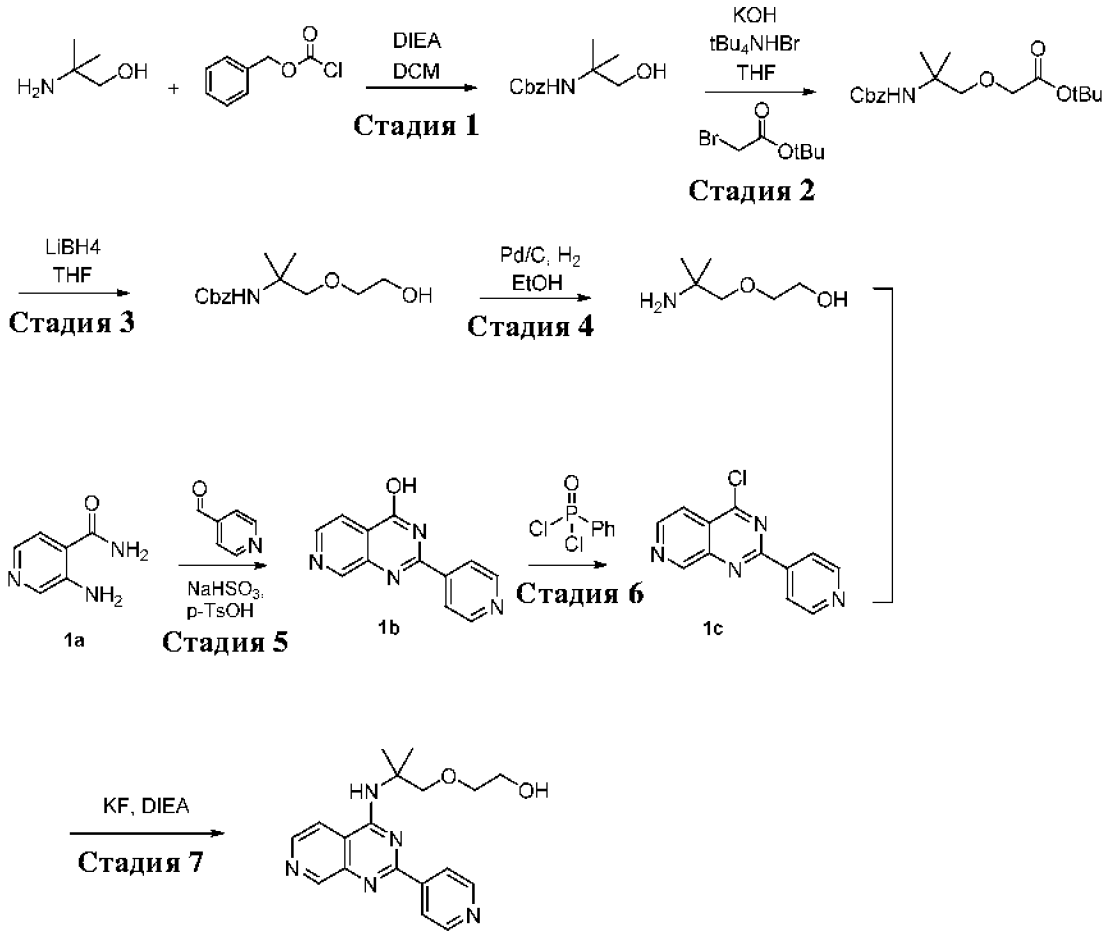
Пример 10: **N–этил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,55(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,31(m, 2H), 8,05(dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 3,94(q, J=7,1 Гц, 2H), 3,50(s, 3H), 1,39(t, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 266,1.

Пример 11: **2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ол**





Стадия 1. В 40–мл флакон при 0°C добавляли 2–амино–2–метилпропан–1–ол (1,5 г, 16,8 ммоль) в 8 мл сухого DCM. Добавляли порциями DIEA (3,2 мл, 18,5 ммоль), затем бензилкарбонохлоридат (2,37 мл, 16,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение двух ч., медленно нагревая до комнатной температуры. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–50% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой бензил–(1–гидрокси–2–метилпропан–2–ил)карбамат (90%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 224,3.

Стадия 2. В 20–мл флакон добавляли бензил–(1–гидрокси–2–метилпропан–2–ил)карбамат (0,63 г, 2,8 ммоль) в 5 мл сухого THF. Гидроксид калия (0,16 г, 2,8 ммоль) добавляли в 0,5 мл H_2O, затем трет–бутил–2–бромацетат (0,62 мл, 4,2 ммоль) и бромид тетрабутиламмония (90 мг, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 30°C. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–40% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой трет–бутил–2–(2–(((бензилокси)карбонил)амино)–2–метилпропокси)ацетат (35%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,4.

Стадия 3. В 20–мл флакон при 0°C добавляли трет–бутил–2–(2–(((бензилокси)карбонил)амино)–2–метилпропокси)–ацетат (0,14 г, 0,17 ммоль) в 1 мл сухого DMF. Добавляли порциями борогидрид лития (0,45 мл, 0,91 ммоль) и

перемешивали в течение 4 ч. при комнатной температуре, затем гасили с помощью воды. Использовали DCM для экстракции и растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–70% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой бензил–(1–(2–гидроксиэтокси)–2–метилпропан–2–ил)карбамат (35%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 268,3.

Стадия 4. В 20–мл герметичный флакон с мембраной добавляли бензил–(1–(2–гидроксиэтокси)–2–метилпропан–2–ил)карбамат (0,03 г, 0,11 ммоль) в 1,2 мл EtOH. Флакон интенсивно продували с помощью N_2 при комнатной температуре. Небольшой мерной ложкой осторожно добавляли Pd/C (30%, кат. количество) и реакционную смесь выдерживали в атмосфере N_2. Затем использовали баллон с H_2, чтобы тщательно продуть реакционный сосуд, и затем обеспечивали перемешивание в атмосфере H_2 под давлением в течение четырех ч. Удаляли H_2 из реакционной смеси, затем сосуд продували с помощью N_2. Затем материал фильтровали через Na_2SO_4 и целит, растворитель выпаривали в потоке воздуха. Не было необходимости в дополнительной очистке остатка. 2–(2–Амино–2–метилпропокси)этанол (95%). 1H ЯМР (500 МГц, Хлороформ–d) δ 3,76–3,73 (m, 2H), 3,62–3,59 (m, 2H), 3,26 (s, 2H), 1,27 (s, 2H), 1,20 (d, J=4,6 Гц, 1H), 1,11 (s, 6H).LCMS (масса/заряд [M+H]+): 134,2.

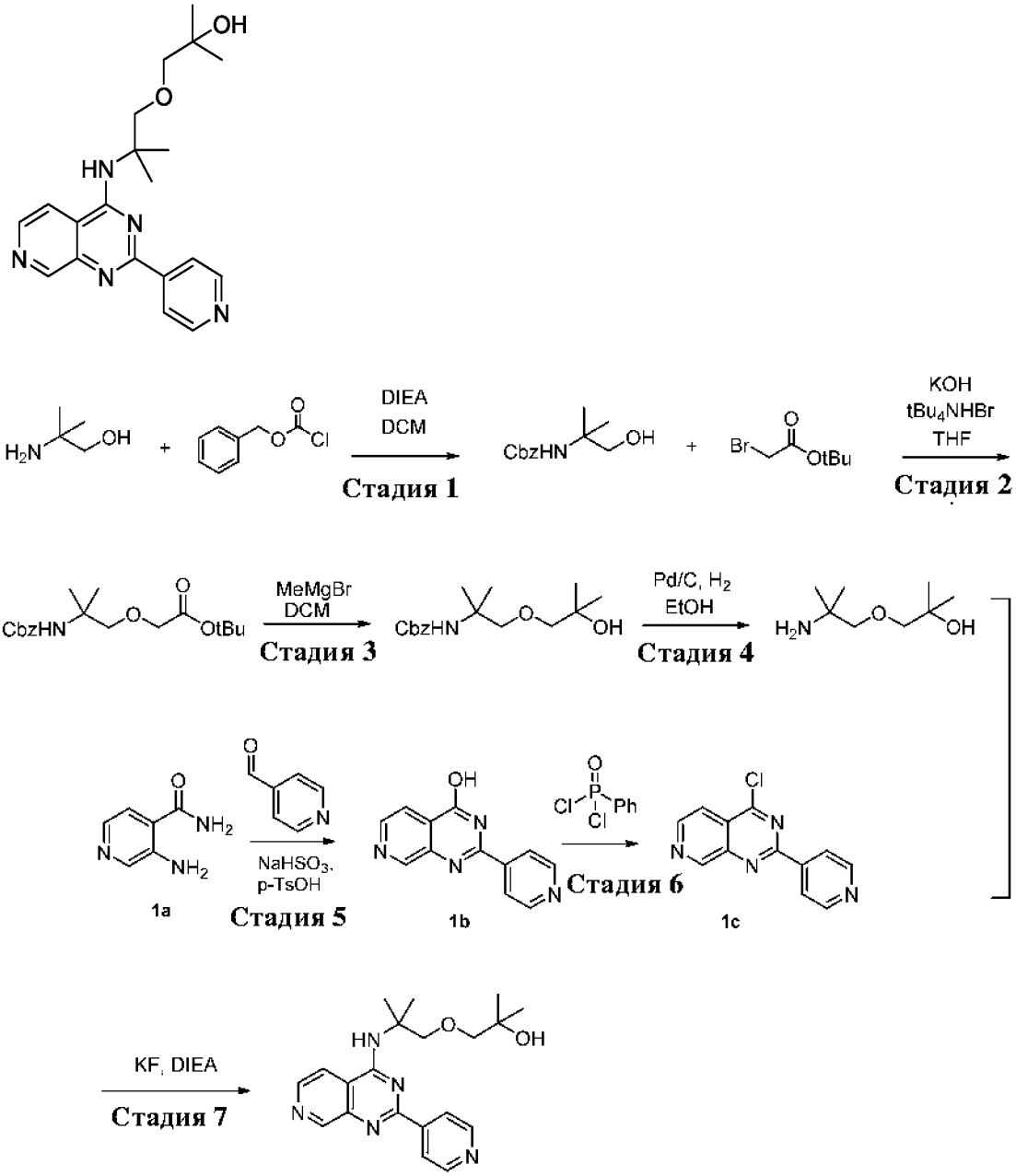
Стадия 5. В 20–мл флакон для микроволновой обработки добавляли 3–аминоизоникотинамид (**1a**, 2 г, 14,58 ммоль), изоникотинальдегид (1,521 мл, 16,04 ммоль), бисульфит натрия (1,821 г, 17,50 ммоль) и гидрат 4–метилбензолсульфоновой кислоты (0,277 г, 1,458 ммоль) в DMA (объем: 5 мл) с получением оранжевой суспензии. Реакционную смесь тщательно перемешивали и нагревали в микроволновой печи при 160°C в течение 12 мин. Реакционную смесь разбавляли водой и фильтровали. Твердое вещество промывали с помощью воды, MeOH и простого эфира с получением 2,03 г твердого вещества грязно–белого цвета в качестве продукта **1b** (59%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,88–8,78 (m, 2H), 8,73 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,16–8,08 (m, 2H), 8,03 (dd, J=5,2, 0,9 Гц, 1H).

Стадия 6. В 5–мл микроволновой реактор добавляли 2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол (**1b,** 500 мг, 2,230 ммоль) и фенилфосфоновый дихлорид (1564 микролитра, 11,15 ммоль) с получением коричневой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 170°C в течение 30 мин. до момента определения с помощью LCMS полного превращения. Реакционную смесь гасили с помощью льда/воды и нейтрализовали с помощью насыщенного Na_2CO_3, затем экстрагировали с помощью DCM x3 с получением продукта **1c** (74%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,65 (d, J=1,0 Гц, 1H), 8,96 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,87 (s, 2H), 8,47–8,30 (m, 2H), 8,18 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 243,1.

Стадия 7. В 20–мл флаконе 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин (**промежуточное соединение 1c**) (150 мг, 0,618 ммоль) перемешивали в DMSO (1,5 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли DIEA (324

микролитра, 1,85 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (36 мг, 0,618 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли 2–(2–амино–2–метилпропокси)этанол (99 мг, 0,74 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 60°C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (25%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,35(m, 1H), 8,29(m, 2H), 7,76(s, 1H), 4,64–4,59(m, 1H), 3,90(s, 2H), 3,50–3,44(m, 4H), 1,61(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 340,2

Пример 12: 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ол



Стадия 1. В 40–мл флакон при 0°C добавляли 2–амино–2–метилпропан–1–ол (1,5 г, 16,8 ммоль) в 8 мл сухого DCM. Добавляли порциями DIEA (3,2 мл, 18,5 ммоль), затем

бензилкарбонохлоридат (2,37 мл, 16,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение двух ч., медленно нагревая до комнатной температуры. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–50% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой бензил–(1–гидрокси–2–метилпропан–2–ил)карбамат (90%). 1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 7,41–7,29 (m, 5H), 5,06 (s, 2H), 4,97–4,83 (m, 1H), 4,70 (s, 1H), 3,62 (s, 2H), 1,34–1,19 (m, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 224,3.

Стадия 2. В 20–мл флакон добавляли бензил–(1–гидрокси–2–метилпропан–2–ил)карбамат (0,63 г, 2,8 ммоль) в 5 мл сухого THF. Гидроксид калия (0,16 г, 2,8 ммоль) добавляли в 0,5 мл H_2O, затем добавляли трет–бутил–2–бромацетат (0,62 мл, 4,2 ммоль) и бромид тетрабутиламмония (90 мг, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 30°C. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–40% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой трет–бутил–2–(2–(((бензилокси)карбонил)амино)–2–метилпропокси)ацетат (35%). 1H ЯМР (500 МГц, Хлороформ–d) δ 7,39–7,28 (m, 5H), 5,52 (s, 1H), 5,06 (s, 2H), 3,96 (s, 2H), 3,45 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,36 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,4.

Стадия 3. трет–Бутил–2–(2–(((бензилокси)карбонил)амино)–2–метилпропокси)ацетат (700 мг, 4,15 ммоль) перемешивали в DCM (5 мл) на ледяной бане в течение 10 минут. Бромид метилмагния (30 мл, 42 ммоль) медленно добавляли порциями, затем перемешивали при нагревании до комнатной температуры в течение двух ч. Реакцию затем гасили с помощью воды и три раза экстрагировали с помощью DCM. Органические слои объединяли, концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–50% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой бензил–(1–(2–гидрокси–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ил)карбамат (55%). LCMS [M+H] = 296,4.

Стадия 4. В 20–мл герметичный флакон с мембраной добавляли бензил–(1–(2–гидрокси–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ил)карбамат (0,03 г, 0,11 ммоль) в 1,2 мл EtOH. Флакон интенсивно продували с помощью N_2 при комнатной температуре. Небольшой мерной ложкой осторожно добавляли Pd/C (30%, кат. количество) и реакционную смесь выдерживали в атмосфере N_2. Затем использовали баллон с H_2, чтобы тщательно продуть реакционный сосуд, и затем обеспечивали перемешивание в атмосфере H_2 под давлением в течение четырех ч. Удаляли H_2 из реакционной смеси, затем сосуд продували с помощью N_2. Затем материал фильтровали через Na_2SO_4 и целит, растворитель выпаривали в потоке воздуха. Не было необходимости в дополнительной очистке остатка для получения (1–(2–амино–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ола) (95%). 1H ЯМР (500 МГц, Хлороформ–d) δ 3,32 (s, 2H), 3,26 (s, 2H), 1,22 (s, 6H), 1,12 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 162,2.

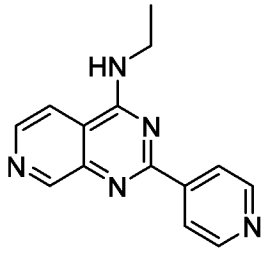
Стадия 5. В 20–мл флакон для микроволновой обработки добавляли 3–аминоизоникотинамид (**1a**, 2 г, 14,58 ммоль), изоникотинальдегид (1,521 мл, 16,04 ммоль),

бисульфит натрия (1,821 г, 17,50 ммоль) и гидрат 4–метилбензолсульфоновой кислоты (0,277 г, 1,458 ммоль) в DMA (объем: 5 мл) с получением оранжевой суспензии. Реакционную смесь тщательно перемешивали и нагревали в микроволновой печи при 160°C в течение 12 мин. Реакционную смесь разбавляли водой и фильтровали. Твердое вещество промывали с помощью воды, MeOH и простого эфира с получением 2,03 г твердого вещества грязно–белого цвета в качестве продукта **1b** (59%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,88–8,78 (m, 2H), 8,73 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,16–8,08 (m, 2H), 8,03 (dd, J=5,2, 0,9 Гц, 1H).

Стадия 6. В 5–мл микроволновой реактор добавляли 2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ол (**1b,** 500 мг, 2,230 ммоль) и фенилфосфоновый дихлорид (1564 микролитра, 11,15 ммоль) с получением коричневой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 170°C в течение 30 мин. до момента определения с помощью LCMS полного превращения. Реакционную смесь гасили с помощью льда/воды и нейтрализовали с помощью насыщенного Na_2CO_3, затем экстрагировали с помощью DCM x3 с получением продукта **1c** (74%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,65 (d, J=1,0 Гц, 1H), 8,96 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,87 (s, 2H), 8,47–8,30 (m, 2H), 8,18 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 243,1.

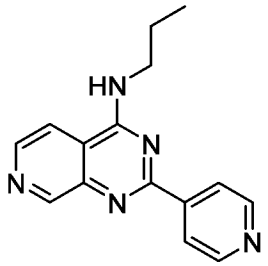
Стадия 7. В 20–мл флаконе 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин (промежуточное соединение **1c**) (25 мг, 0,10 ммоль) перемешивали в DMSO (0,7 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли DIEA (43 мкл, 0,25 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (6 мг, 0,10 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли 2(1–(2–амино–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ол) (0,013 мл, 0,12 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 60°C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением соединения, указанного в заголовке (50%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,37 (dd, 5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30 (m, 2H), 7,80 (s, 1H), 4,40 (s, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,17 (s, 2H), 1,61 (s, 6H), 0,99 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 368,2.

<u>Пример 13:</u> N–этил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



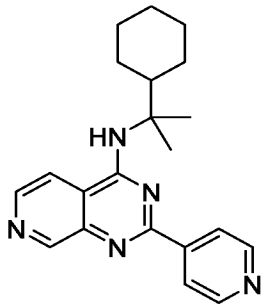
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,84(m, 1H), 8,76(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,34(m, 2H), 8,18(dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 3,77–3,69(qd, J=7,2, 5,4 Гц, 2H), 1,31(t, J=7,2 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 252,1.

<u>Пример 14:</u> N–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



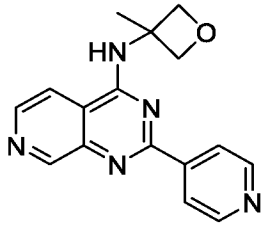
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82(t, J=5,5 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,64(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,33(m, 2H), 8,19(dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 3,70–3,62(td, J=7,0, 5,7 Гц, 2H), 1,80–1,70(m, 2H), 1,00(t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 266,1.

Пример 15: N–(2–циклогексилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



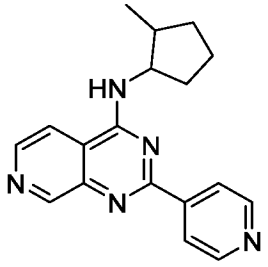
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,16(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,62(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,28(m, 2H), 7,62(s, 1H), 1,76–1,70(m, 4H), 1,62–1,59(m, 1H), 1,52(s, 6H), 1,18–1,04(q, J=11,8, 10,9 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 348,2.

Пример 16: N–(3–метилоксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,9 Гц, 1H), 9,14(s, 1H), 8,76(m, 2H), 8,68(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,25(m, 2H), 8,16(dd, J=5,6 Гц, 1H), 4,90(d, J=6,3 Гц, 2H), 4,64(d, J=6,5 Гц, 2H), 1,82(s, 3H)). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,1.

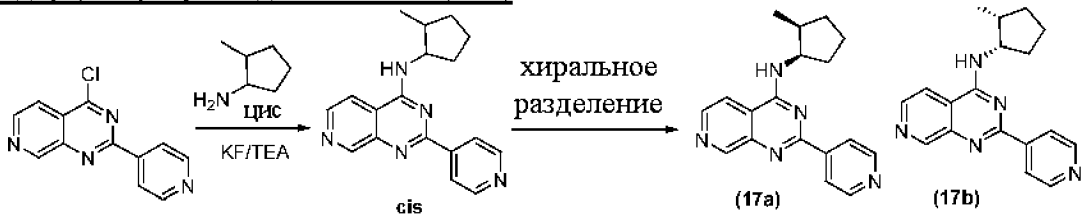
Пример 17: N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=1,0 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,66(m, 1H),

8,33(m, 2H), 8,32(m, 1H), 7,91(m, 1H), 4,45–4,42(m, 1H), 2,20–2,14(m, 1H), 1,98–1,82(m, 2H), 1,80–1,72(m, 2H), 1,70–1,62(m, 1H), 1,50–1,42(m, 1H), 0,91(d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 306,2.

Пример 17b: N–((1R,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пирido[3,4–d]пиримидин–4–амин (17a) и N–((1S,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пирido[3,4–d]пиримидин–4–амин (17b)

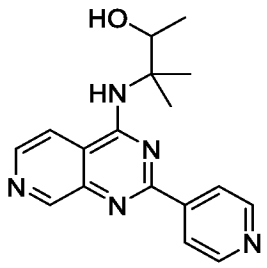


К раствору 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пирido[3,4–d]пиримидина (130 мг, 0,536 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли TEA (0,23 мл, 1,61 ммоль) и KF (32,7 мл, 0,56 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 минут перед добавлением *цис*–2–метилциклопентанамина гидрохлорида (72,7 мг, 0,536 ммоль). Полученную смесь затем перемешивали в течение 2 часов при 50°C. Неочищенную смесь затем очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением 109 мг продукта. 100 мг данного материала подвергали хиральному разделению с получением двух цис–изомеров, 35 мг изомера, соответствующего пику 1 (T_R=1,46 мин.), 46 мг изомера, соответствующего пику 2 (T_R=1,95 мин.). Определение хирального центра является экспериментальным, условия хирального разделения: растворитель A CO_2 (80%), растворитель B MeOH+0,1% NH_4Cl (20%), расход 2 мл/мин., колонка 21×250 мм AD–H, время анализа: последовательные введения с интервалом 6 минут, время элюирования 10 минут.

Изомер, соответствующий пику 1 (T_R=1,46 мин.): 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (s, 1H), 8,77 (d, J=5,8 Гц, 2H), 8,66 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 8,36–8,29 (m, 3H), 4,86 (p, J=7,5 Гц, 1H), 2,09 (dtd, J=11,7, 8,1, 3,4 Гц, 1H), 1,89 (dddq, J=29,7, 12,7, 8,4, 3,8 Гц, 3H), 1,66–1,53 (m, 1H), 1,51–1,41 (m, 1H), 0,83 (d, J=7,1 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 306,2.

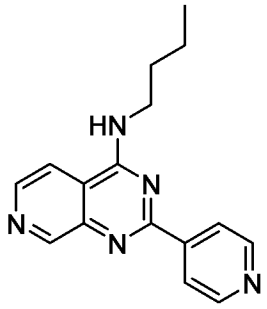
Изомер, соответствующий пику 2 (T_R=1,95 мин.): 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,7 Гц, 1H), 8,80–8,74 (m, 2H), 8,66 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 8,36–8,29 (m, 3H), 4,86 (p, J=7,6 Гц, 1H), 2,09 (dp, J=12,4, 4,6, 4,2 Гц, 1H), 1,98–1,79 (m, 3H), 1,66–1,54 (m, 1H), 1,50–1,41 (m, 1H), 0,83 (d, J=7,1 Гц, 3H).). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 306,2.

Пример 18: 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пирido[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ол



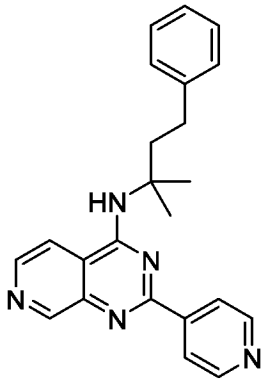
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,17(d, J=5,4 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,63(m, 1H), 8,33(m, 1H), 8,28(dd, J=5,4, 0,8 Гц, 2H), 7,58(s, 1H), 5,00(d, J=5,6 Гц, 1H), 4,30–4,26(m, 1H), 1,29(s, 3H), 1,27(s, 3H), 1,05(d, J=6,7 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 310,2.

Пример 19: **N–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



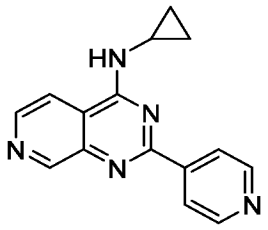
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,82(m, 1H), 8,78(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,34(m, 2H), 8,20(dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 3,75–3,68(td, 7,2, 5,6 Гц, 2H), 1,78–1,69(m, 2H), 1,50–1,40(m, 2H), 0,98(t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

Пример 20: **N–(2–метил–4–фенилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



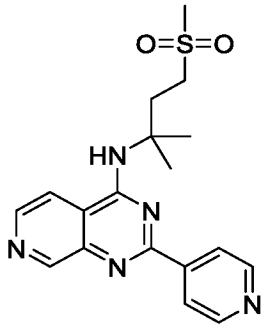
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,63(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 7,79(s, 1H), 7,13–7,04(m, 5H), 2,61–2,56(dd, J=10,7, 6,0 Гц, 2H), 2,48–2,43(m, 2H), 1,65(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 370,2.

Пример 21: **N–циклопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



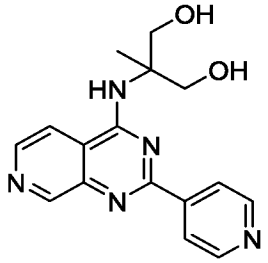
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,83(m, 1H), 8,78(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40(m, 2H), 8,18(dd, J=5,6 1,0 Гц, 1H), 3,30–3,22(m, 1H), 0,98–0,94(m, 2H), 0,80–0,76(m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 264,1.

Пример 22: N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



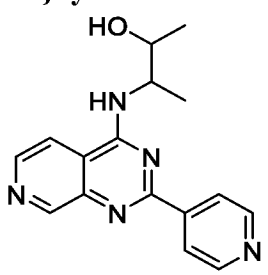
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 7,76(s, 1H), 3,15–3,10(m, 2H), 2,90(s, 3H), 2,65–2,60(m, 2H), 1,61(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 372,1.

Пример 23: 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диол



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,63(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,32(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,29(m, 2H), 7,38(s, 1H), 4,81(t, J=6,0 Гц, 2H), 3,97–3,94(dd, J=10,8, 6,0 Гц, 2H), 3,90–3,82(dd, J=10,9, 6,2 Гц, 2H), 1,52(s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 312,1.

Пример 24: 3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ол



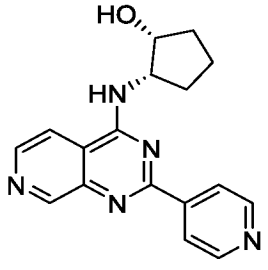
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38(m, 1H), 8,32(m, 2H), 8,30(s, 1H), 4,80(d, J=5,5 Гц, 1H), 4,76–4,72(m, 1H), 3,93–3,88(m, 1H), 1,31(d, J=6,7 Гц, 3H), 1,19(d, J=6,3 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 296,2.

Пример 25: 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)уксусная кислота

Указанное в заголовке соединение получали из трет–бутил–2–(2–амино–2–метилпропокси)ацетата и 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина, как описано на **стадии C примера 1**, с последующим удалением защитных групп с трет–бутилового эфира.

Удаление защитных групп: трет–бутил–2–(2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропокси)ил)амино)пропокси)ацетат (25 мг, 0,061 ммоль) перемешивали в 40% смеси TFA в DCM при комнатной температуре в течение двух часов. С помощью TLC или LCMS исходный материал не наблюдали. Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM и концентрировали с применением N_2 и умеренного воздействия тепла, затем повторяли это три раза и оставляли в высоком вакууме в течение ночи. Промежуточные соединения при данных условиях обычно применяли без дополнительной очистки. Указанные в заголовке соединения при данных условиях затем также очищали посредством флэш–хроматографии. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, 0,8 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,63(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,33(ddd, J=10,8, 5,1, 1,2 Гц, 2H), 8,30(m, 1H), 8,19(s, 1H), 4,14(s, 2H), 3,80(s, 2H), 3,16(s, 1H), 1,62(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 354,2.

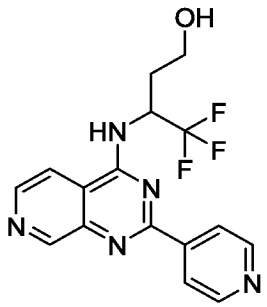
Пример 26: (1R,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ол



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 1H), 8,65(m, 1H), 8,40(m, 1H), 8,37(m, 1H), 8,32(m, 2H), 4,72(d, J=3,7 Гц, 1H), 4,60–4,52(ddd, J=15,9, 9,2, 4,4 Гц, 1H), 4,44–4,40(m, 1H), 2,04–1,98(m, 3H), 1,90–1,82(m, 1H), 1,74–1,56(m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 308,1.

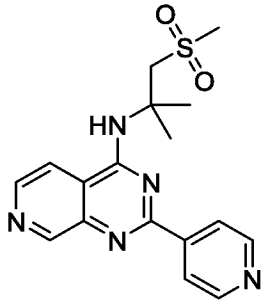
Пример 27: 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–

ил]амино}бутан–1–ол



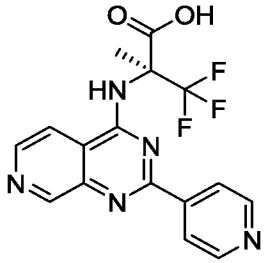
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,30(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,85(m, 1H), 8,80(m, 2H), 8,74(m, 1H), 8,39(d, J=4,3 Гц, 1H), 8,33(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 2H), 5,76–5,70(m, 1H), 4,77–4,70(m, 1H), 3,61–3,55(m, 2H), 2,11–2,08(m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 350,1.

Пример 28: **N–(1–метансульфонил–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



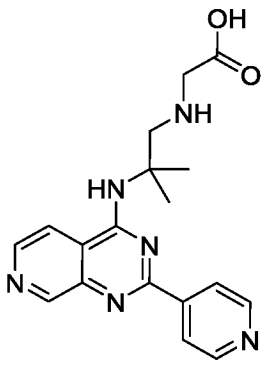
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,67(dd, J=5,9, 4,7 Гц, 1H), 8,40(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 8,08(s, 1H), 4,13(s, 2H), 2,90(s, 3H), 1,80(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 358,1.

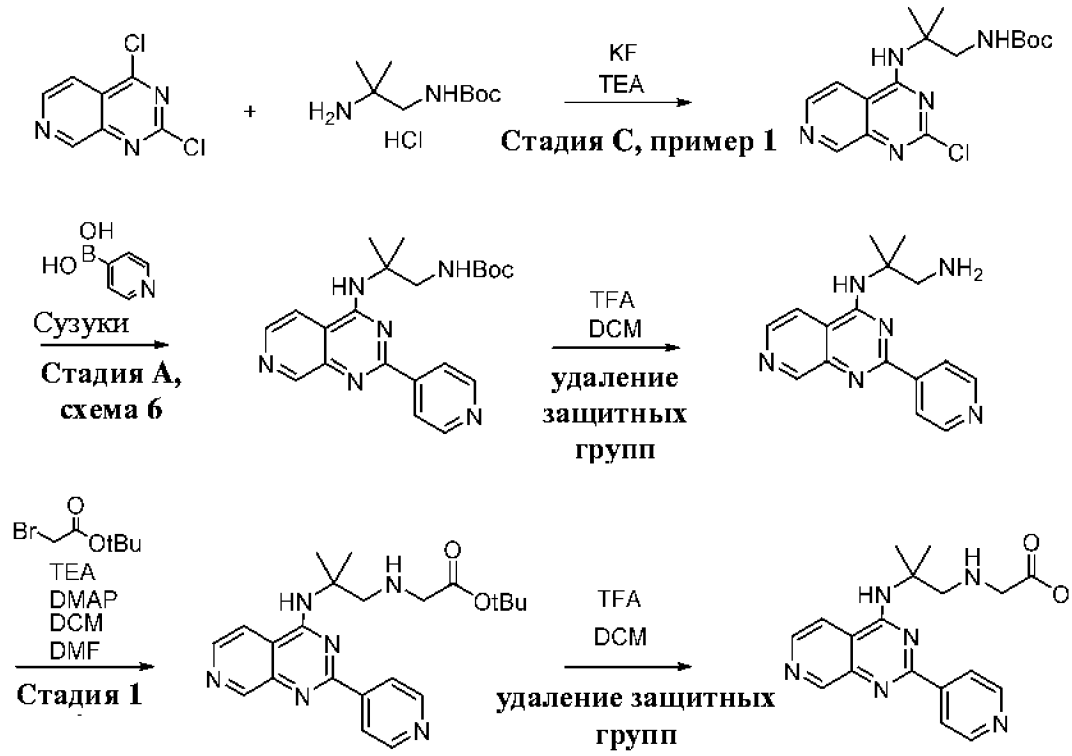
Пример 29: **(2S)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановая кислота**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,23(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,76(m, 1H), 8,70(m, 1H), 8,30(dd, J=5,6, 0,8 Гц, 2H), 7,81(s, 1H), 2,02(s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 364,1.

Пример 30: **2–[(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)амино]уксусная кислота**



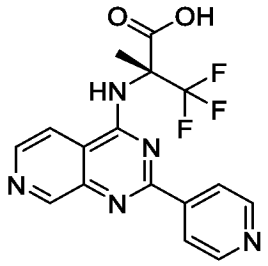


Указанное в заголовке соединение получали с применением трет–бутил–2–((2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо–[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)амино)ацетата, как описано на схеме выше**.** 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,25(m, 1H), 8,82(m, 2H), 8,70(m, 1H), 8,40(m, 1H), 8,35(m, 2H), 7,84(d, J=9,4 Гц, 1H), 3,89–3,80(d, J=6,2 Гц, 1H), 3,60–3,56(d, J=11,0 Гц, 4H), 1,70(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 353,2.

Стадия 1. 2–Метил–N2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамин (20 мг, 0,068 ммоль) перемешивали в DCM/DMF при комнатной температуре. 21 микролитр TEA (21 микролитр, 0,149 ммоль) добавляли и перемешивали в течение трех минут. трет–Бутил–2–бромацетат (11 микролитров, 0,071 ммоль) и каталитическое количество DMAP затем добавляли и перемешивали при комнатной температуре в течение четырех ч. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта, представляющего собой трет–бутил–2–((2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)амино)ацетат

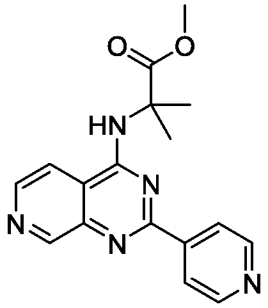
(35%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 409,5.

Пример 31: **(2R)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановая кислота**



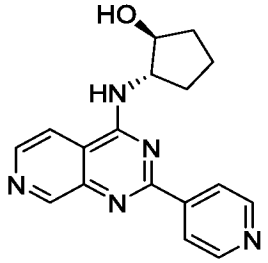
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,23(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,77(m, 1H), 8,70(m, 1H), 8,30(m, 2H), 7,83(s, 1H), 2,02(s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 364,1.

Пример 32: **метил–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаноат**



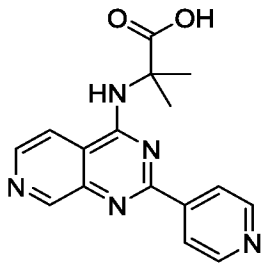
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,24(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,85(s, 1H), 8,79(m, 2H), 8,70(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,39(dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 8,25(m, 2H), 3,51(s, 3H), 1,69(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 324,1.

Пример 33: **(1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ол**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,51(d, J=7,0 Гц, 1H), 8,38(m, 1H), 8,36(m, 1H), 8,31(dd, J=5,6, 0,9, Гц, 1H), 4,92(d, J=4,6 Гц, 1H), 4,60–4,54(d, J=7,0 Гц, 1H), 4,26–4,20(m, 1H), 2,32–2,22(ddt, J=13,2, 8,2, 4,3 Гц, 1H), 2,00–1,92(m, 1H), 1,85–1,72(m, 2H), 1,70–1,56(m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 308,1.

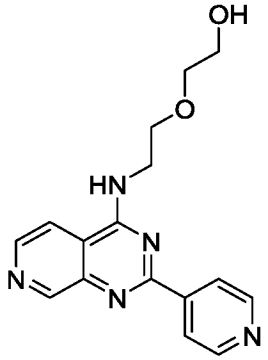
Пример 34: **2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановая кислота**



Указанное в заголовке соединение получали посредством удаления защитных групп с метил–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноата, как описано на **стадии А примера 25.**

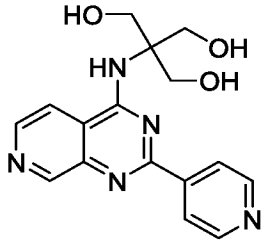
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,61(s, 1H), 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,86–8,80(s, 1H), 8,75(m, 2H), 8,67(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 8,28(m, 1H), 1,66(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 310,1.

Пример 35: 2–(2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этокси)этан–1–ол



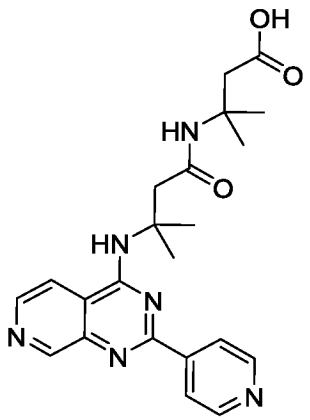
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,89(t, J=5,5 Гц, 1H), 8,76(m, 2H), 8,65(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,32(m, 2H), 8,20(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 4,60–4,57(m, 1H), 3,89(q, J=5,7 Гц, 2H), 3,78(t, J=5,8 Гц, 2H), 3,51–3,48(d, J=2,9 Гц, 4H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 312,1.

Пример 36: 2–(гидроксиметил)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диол



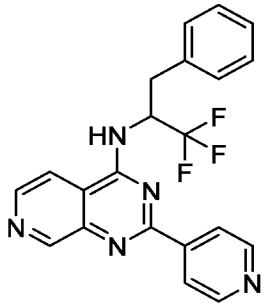
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,65(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,30(ddd, J=19,4, 5,1, 1,3 Гц, 1H), 8,26(m, 2H), 7,19(s, 1H), 4,72(t, J=6,0 Гц, 3H), 4,00(d, J=6,0 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 328,1.

Пример 37: 3–метил–3–(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутанамидо)бутановая кислота



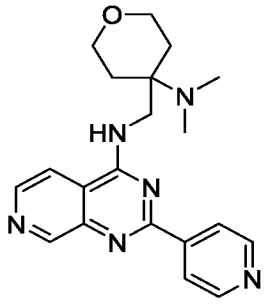
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80(dt, J=4,5, 1,1 Гц, 2H), 8,64(m, 1H), 8,33(m, 2H), 8,30(m, 1H), 7,90(s, 1H), 1,72(s, 6H), 1,70(s, 2H), 1,30(s, 2H), 1,00(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 423,2.

Пример 38: 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–3–фенилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



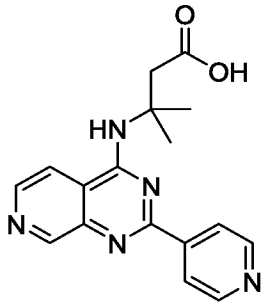
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,99(d, J=9,0 Гц, 1H), 8,75(m, 2H), 8,71(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,33(m, 1H), 8,30(m, 2H), 7,41(m, 2H), 7,11(m, 2H), 7,02(m, 1H), 5,95–5,86(t, J=8,2 Гц, 1H), 3,38–3,34(m, 1H), 3,24–3,17(ddt, J=13,8, 11,7, 0,7 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 396,1.

Пример 39: N–{[4–(диметиламино)оксан–4–ил]метил}–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



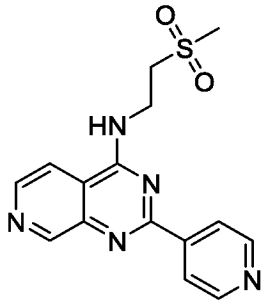
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(s, 1H), 8,78(m, 2H), 8,67(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,52(s, 1H), 8,33(m, 2H), 8,28(m, 1H), 3,62(t, J=10,6 Гц, 2H), 3,53(d, J=10,7 Гц, 2H), 3,27(d, J=5,3 Гц, 2H), 2,41(s, 6H), 1,80(d, J=14,1 Гц, 2H), 1,63(t, J=11,5 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 365,2.

Пример 40: 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановая кислота



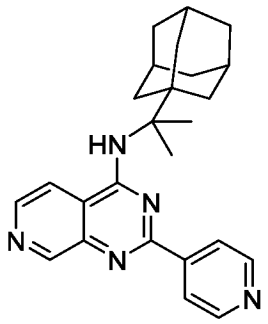
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,02(s, 1H), 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,66(m, 1H), 8,40(m, 1H), 8,30(m, 2H), 7,99(m, 1H), 3,12–3,08(q, J=7,3 Гц, 2H), 1,70(s, 6H. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 324,1.

Пример 41: N–(2–метансульфонилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



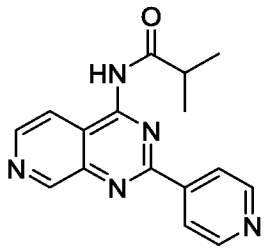
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,23(s, 1H), 9,10(t, J – 5,6 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,69(d, J=5,7 Гц, 1H), 8,39(m, 2H), 8,14(d, J=5,7 Гц, 1H), 4,13–4,09(q, J=6,4 Гц, 2H), 3,62(t, J=6,7 Гц, 2H), 3,09(s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 330,1.

Пример 42: N–[2–(адамантан–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



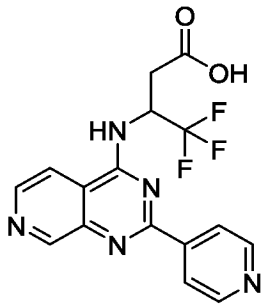
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,16(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(m, 2H), 8,63(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,45(m, 1H), 8,25(m, 2H), 7,06(s, 1H), 1,99–1,96(d, J=7,5 Гц, 3H), 1,80–1,76(m, 6H), 1,67–1,64(m, 6H), 1,64–1,60(m, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 400,2.

Пример 43: 2–метил–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропанамид



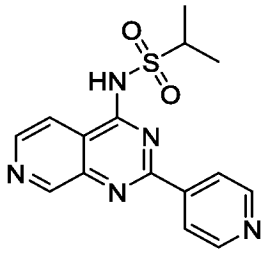
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 11,08(s, 1H), 9,49(m, 1H), 8,84(m, 2H), 8,80(m, 1H), 8,40(m, 2H), 8,25(dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 3,29–3,18(m, 1H), 1,26(d, J=6,8 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,1.

<u>Пример 44:</u> 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановая кислота



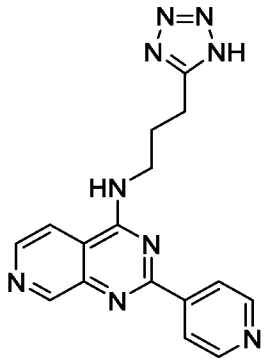
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,29(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,71(t, J=4,9 Гц, 1H), 8,34(m, 2H), 8,23(d, J=5,7 Гц, 1H), 5,84–5,79(m, 1H), 3,65–3,55(d, J=4,8 Гц, 1H), 2,45–2,41(d, J=4,7 Гц, 1H), 2,32–2,26(m, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 364,1.

<u>Пример 45:</u> N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропан–2–сульфонамид



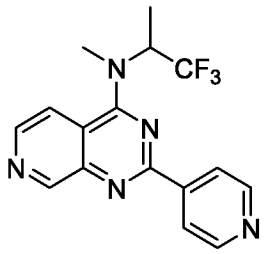
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,38(s, 1H), 8,88(m, 2H), 8,76(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40–8,30(m, 3H), 4,20–4,10(q, J=7,1 Гц, 1H), 1,40(d, J=6,9 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 330,1.

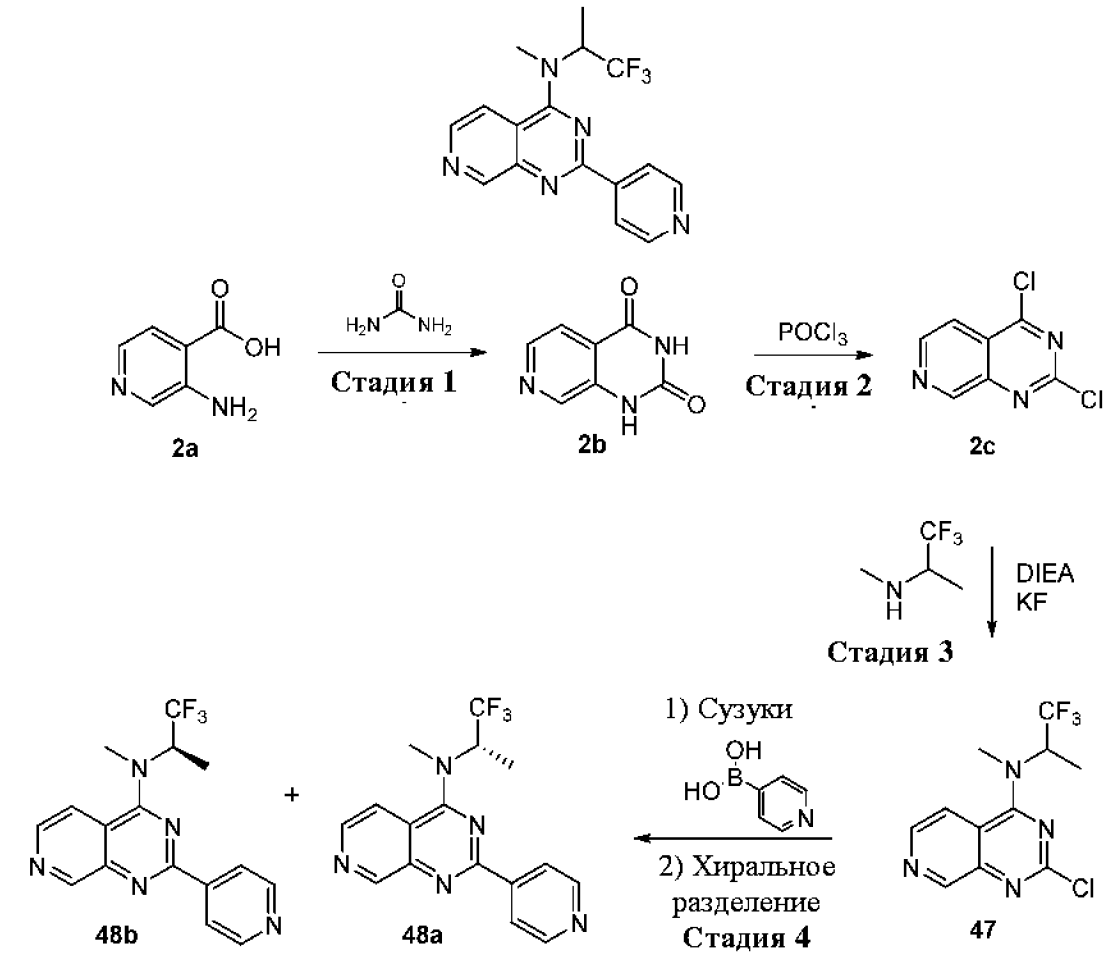
<u>Пример 46:</u> 2–(пиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(m, 1H), 9,18(s, 1H), 8,75(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,30(m, 2H), 8,21(dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,81–3,75(td, J=6,9, 5,3 Гц, 2H), 2,95(t, J=7,2 Гц, 2H), 2,18–2,10(m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 334,2.

Пример 47: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин





Стадия 1. Смесь мочевины (40,00 г, 666,00 ммоль) и 3–аминоизоникотиновой

кислоты (**2a,** 18,40 г, 133,20 ммоль) нагревали при 210°C в течение 1 ч. (ПРИМЕЧАНИЕ: не применяли растворитель). Добавляли NaOH (2 н., 320 мл) и смесь перемешивали при 90°C в течение 1 ч. Твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали с помощью воды. Полученный таким образом неочищенный продукт суспендировали в HOAc (400 мл) и перемешивали при 100°C в течение 1 ч. Смесь охлаждали до к. т., фильтровали и твердое вещество промывали с помощью большого количества воды и затем высушивали под вакуумом с получением пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b,** 17,00 г, выход 78%) без дополнительной очистки. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 164,0.

Стадия 2. К смеси пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b**, 20,00 г, 122,60 ммоль) и $POCl_3$ (328,03 г, 2,14 моль) в толуоле (200 мл) добавляли по каплям DIEA (31,69 г, 245,20 ммоль) и данную реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение ночи (18 ч.) с получением суспензии.

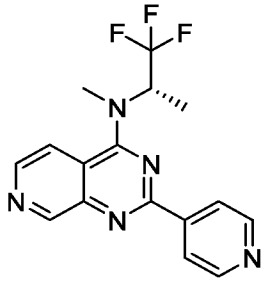
Растворитель и $POCl_3$ удаляли под вакуумом, разбавляли с помощью DCM (50 мл), нейтрализовали с помощью DIEA до pH=7 при –20°C и концентрировали снова, остаток очищали с помощью колонки (20–50% EA/PE) с получением 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**2c**, 20,00 г, 99,99 ммоль, выход 82%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ–d) δ 9,52 (s, 1 H), 8,92 (d, J=5,6 Гц, 1 H), 8,04 (d, J=5,6 Гц, 1 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 200,0.

Стадия 3. В 20–мл флаконе 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидин (600 мг, 3,0 ммоль) перемешивали в DMSO (0,7 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли DIEA (1 мл, 6 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (174 мг, 3 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли рацемический 1,1,1–трифтор–N–метилпропан–2–амин (419 мг, 3,3 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 60°C в течение 4 часов. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением 2–хлор–N–метил–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина (680 мг, 74%). 1H ЯМР (500 МГц, Ацетон–d6) δ 9,09 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,59 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,22 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 5,93 (dddd, J=15,3, 8,3, 7,0, 1,2 Гц, 1H), 3,61 (q, J=1,0 Гц, 3H), 1,63 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 291,7.

Стадия 4. В 20–мл микроволновой реактор добавляли тетракиспалладий (99 мг, 0,086 ммоль), карбонат калия (2,15 мл, 4,3 ммоль), и 2–хлор–N–метил–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (500 мг, 1,72 ммоль), и пиридин–4–илбороновую кислоту (233 мг, 1,89 ммоль) в ацетонитриле (8 мл) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 130°C в течение 30 мин. в условиях обработки микроволновым излучением. Неочищенную смесь разбавляли с помощью DCM, H_2O, разделяли и экстрагировали с помощью DCM x3. Объединяли органические слои и высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–

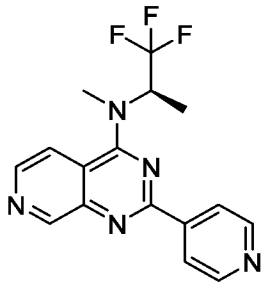
10% MeOH/DCM с получением **примера 47** в виде рацемического продукта, затем следовала хиральная HPLC (колонка 21×250 мм OJ–H с 85% CO_2 в качестве фазы A и 15% MeOH в качестве фазы B, расход 2 мл/мин., 30°C, время элюирования 3,5 мин.) с разделением энантиомеров с получением **примеров 4ba и 48b**.

Пример 48a: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



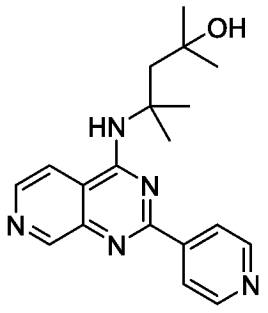
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,33 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,86–8,75 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,38–8,30 (m, 2H), 8,20 (dd, J=6,0, 0,9 Гц, 1H), 6,11 (qt, J=8,5, 7,4 Гц, 1H), 3,50 (d, J=1,1 Гц, 3H), 1,61 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 334,1. Хиральная HPLC T_R=1,73 мин. Абсолютную стереохимию подтверждали посредством рентгеноструктурного анализа.

Пример 48b: N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



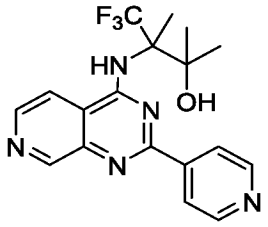
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,33 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,86–8,75 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,38–8,30 (m, 2H), 8,20 (dd, J=6,0, 0,9 Гц, 1H), 6,11 (qt, J=8,5, 7,4 Гц, 1H), 3,50 (d, J=1,1 Гц, 3H), 1,61 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 334,1. Хиральная HPLC T_R=1,25 мин. Абсолютную стереохимию подтверждали посредством рентгеноструктурного анализа.

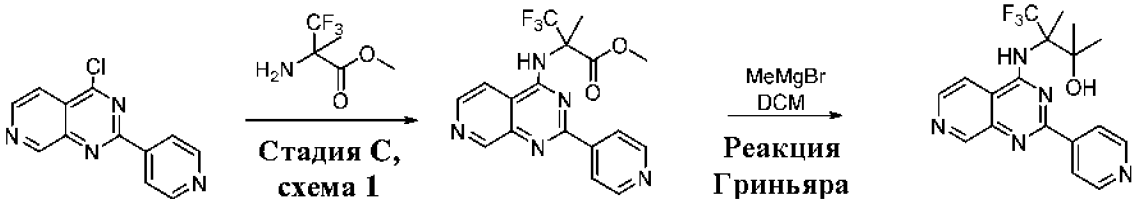
Пример 49: 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ол



1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,57 (s, 1H), 9,15 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,82–8,72 (m, 2H), 8,56 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,44–8,37 (m, 2H), 7,69 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 2,08 (s, 2H), 1,87 (s, 6H), 1,48 (d, J=0,8 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,2.

Пример 50: 4,4,4–трифтор–2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ол

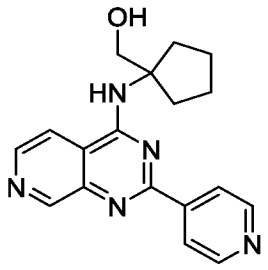




Указанное в заголовке соединение получали из метил–2–амино–3,3,3–трифтор–2–метилпропаноата гидрохлорида и 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина, как описано на **стадии C примера 1**, с последующим проведением реакции Гриньяра с метилмагнийбромидом.

Реакция Гриньяра: метил–3,3,3–трифтор–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноат (7 мг, 0,019 ммоль) перемешивали с метилмагнийбромидом (1,4 М в гексанах, 0,133 мл) в DCM при 0°C в течение 1 часа. С помощью TLC или LCMS исходный материал не наблюдали. Реакцию гасили посредством MeOH и концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (66%). 1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,28 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,77–8,71 (m, 2H), 8,67 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,44–8,38 (m, 2H), 7,85 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 2,09 (d, J=1,4 Гц, 3H), 1,55 (t, J=2,2 Гц, 3H), 1,37 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 378,2.

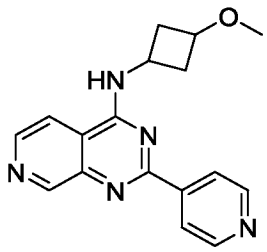
Пример 51: (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентил)метанол



1H ЯМР (500 МГц, Хлороформ–d) δ 9,35 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,82–8,75 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,30–8,24 (m, 2H), 7,49 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 3,99 (d, J=4,0 Гц, 2H), 2,19 (td, J=7,3, 6,7, 2,5 Гц, 4H), 1,94–1,78 (m, 4H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 322,2.

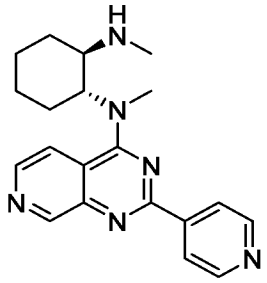
Пример 52: N–(3–метоксициклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–

d]пиримидин–4–амин



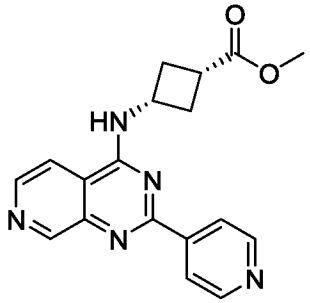
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,87 (d, J=6,4 Гц, 1H), 8,80–8,72 (m, 2H), 8,66 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,37–8,32 (m, 2H), 8,25 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 4,53–4,42 (m, 1H), 3,84–3,74 (m, 1H), 3,20 (s, 3H), 2,89–2,79 (m, 2H), 2,11 (tdd, J=9,0, 7,5, 2,8 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 308,1.

<u>Пример 53:</u> (1R,2R)–1–N,2–N–диметил–1–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]циклогексан–1,2–диамин



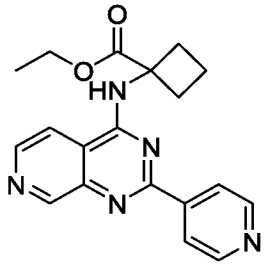
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,23 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,73–8,68 (m, 2H), 8,53 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,46–8,41 (m, 2H), 8,22 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 3,47 (s, 3H), 2,91 (dd, J=13,0, 9,0 Гц, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,30 (dtt, J=12,6, 5,1, 2,5 Гц, 1H), 2,04 (dp, J=12,4, 3,1 Гц, 1H), 1,90 (dddd, J=23,1, 13,0, 5,6, 3,0 Гц, 2H), 1,84–1,74 (m, 1H), 1,58 (qt, J=12,7, 3,5 Гц, 1H), 1,42 (qt, J=13,2, 3,3 Гц, 1H), 1,33–1,23 (m, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 349,2.

<u>Пример 54:</u> метил–(1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилат



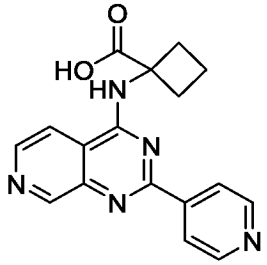
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,20 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,95 (d, J=6,0 Гц, 1H), 8,82–8,72 (m, 2H), 8,67 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,34–8,28 (m, 2H), 8,25 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 4,95 (h, J=7,3 Гц, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,27–3,21 (m, 1H), 2,72 (dddd, J=10,7, 8,2, 4,3, 2,5 Гц, 2H), 2,62–2,51 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 336,1.

<u>Пример 55:</u> этил–1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилат



1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,27 (dd, J=12,0, 4,4 Гц, 1H), 8,83–8,74 (m, 2H), 8,54–8,40 (m, 1H), 8,40–8,31 (m, 2H), 7,56–7,49 (m, 1H), 4,32–4,16 (m, 2H), 3,03–2,85 (m, 2H), 2,49 (dddd, J=11,8, 9,4, 7,1, 2,3 Гц, 2H), 2,31–2,11 (m, 2H), 1,22 (dtd, J=9,6, 7,5, 7,0, 1,8 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 350,2.

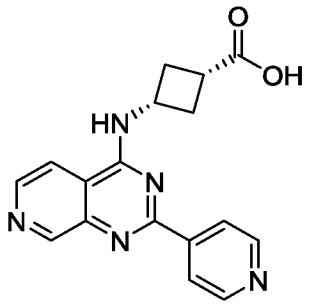
Пример 56: 1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновая кислота



Указанное в заголовке соединение получали посредством гидролиза сложного этилового эфира из **примера 55**.

Гидролиз: суспензию примера 55 (27 мг, 0,077 ммоль) и гидроксида лития (0,077 мл, 0,077 ммоль) в MeOH (2 мл) перемешивали при 90°C в течение 3 ч. до определения с помощью LCMS того, что не осталось исходного материала. Реакционную смесь нейтрализовали с помощью 2 мл 1 M HCl. Водный слой подвергали обратной экстракции с помощью DCM x5. Объединенные органические слои промывали с помощью солевого раствора, высушивали и концентрировали. Остаток промывали с помощью DCM/простой эфир с получением указанного в заголовке соединения (92%). 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 12,49 (s, 1H), 9,35 (s, 1H), 9,23 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80–8,72 (m, 2H), 8,70 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,34 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 8,32–8,21 (m, 2H), 2,82 (ddd, J=13,3, 8,8, 4,9 Гц, 2H), 2,49–2,43 (m, 2H), 2,12–1,96 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 322,1.

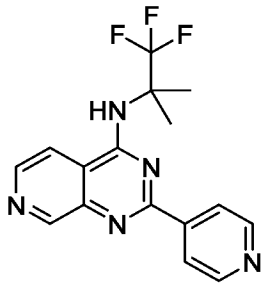
Пример 57: (1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновая кислота



Указанное в заголовке соединение получали посредством гидролиза сложного

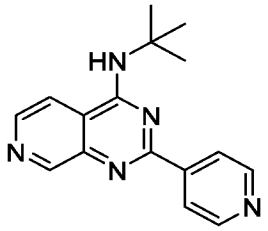
этилового эфира из **примера 54** с применением процедуры, описанной в **примере 56.** 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,26 (d, J=0,9 Гц, 1H), 9,21 (d, J=6,0 Гц, 1H), 9,02–8,93 (m, 2H), 8,73 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,66 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,38 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 4,92 (q, J=7,4 Гц, 1H), 3,19–3,11 (m, 1H), 2,76–2,68 (m, 2H), 2,56 (ddd, J=12,9, 6,5, 2,7 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 322,1.

Пример 58: 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



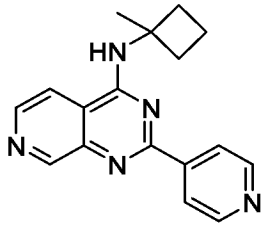
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,27 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,84–8,77 (m, 2H), 8,72 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,51 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30–8,24 (m, 2H), 7,98 (s, 1H), 1,91 (s, 6H).LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 334,1.

Пример 59: N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



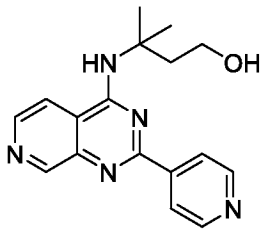
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,77 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,34–8,29 (m, 2H), 7,88 (s, 1H), 1,66 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

Пример 60: N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



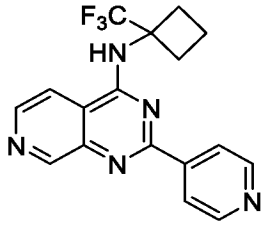
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,17 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77 (dd, J=6,3, 1,9 Гц, 2H), 8,63 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,33–8,29 (m, 2H), 8,27 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 2,70–2,64 (m, 1H), 2,58–2,53 (m, 1H), 2,35–2,26 (m, 2H), 2,04–1,81 (m, 2H), 1,71 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 292,2.

Пример 61: 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ол



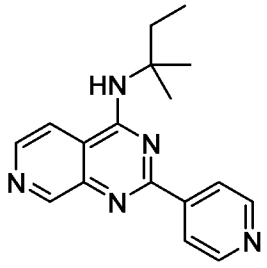
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,83–8,77 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,34–8,29 (m, 2H), 8,17 (s, 1H), 8,12 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 4,86 (s, 1H), 3,68–3,61 (m, 2H), 2,19 (t, J=6,6 Гц, 2H), 1,66 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 310,2.

<u>Пример 62:</u> 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



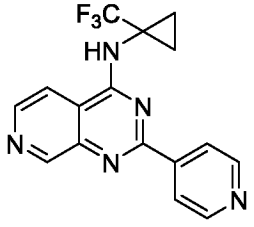
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,26 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,81–8,76 (m, 2H), 8,71 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,30–8,25 (m, 2H), 2,91–2,76 (m, 4H), 2,11–1,96 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 346,1.

<u>Пример 63:</u> N–(2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



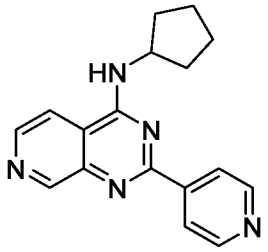
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,19–9,12 (m, 1H), 8,72 (ddt, J=6,3, 4,7, 1,6 Гц, 2H), 8,57 (dd, J=5,8, 2,6 Гц, 1H), 8,43 (tt, J=7,3, 3,4 Гц, 2H), 8,24–8,17 (m, 1H), 2,23 (qd, J=6,7, 6,0, 2,6 Гц, 2H), 1,66 (s, 6H), 0,94 (td, J=7,4, 1,6 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,2.

<u>Пример 64:</u> 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



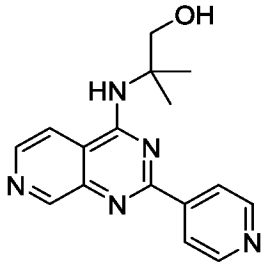
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,40 (s, 1H), 9,29 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,83–8,78 (m, 2H), 8,71 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40–8,35 (m, 2H), 8,27 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 1,65–1,55 (m, 2H), 1,41–1,37 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 332,1.

Пример 65: N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



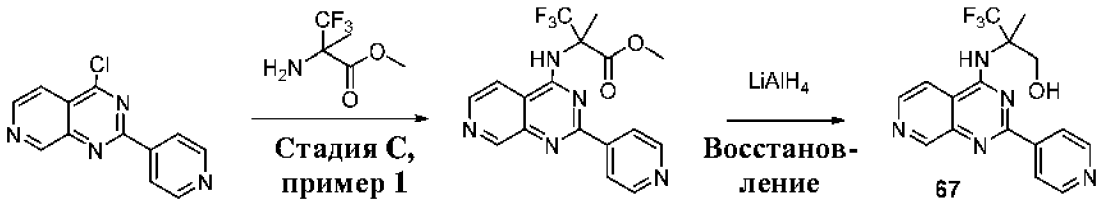
В 20–мл флаконе 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин (**промежуточное соединение 1c**) (200 мг, 0,82 ммоль) перемешивали в DCM (5 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли DIEA (324 микролитра, 1,85 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (48 мг, 0,82 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли циклопентанамин (84 мг, 0,99 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (51%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) 9,20(s, 1H), 8,78(d, 2H), 8,55(d, 1H), 8,31(d, 2H), 8,03(d, 1H), 5,15–5,10(m, 1H), 3,34(s, 3H), 1,35(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 292,2.

Пример 66: 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ол



1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,77 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,30 (dt, J=4,5, 1,7 Гц, 2H), 7,62 (s, 1H), 4,95–4,89 (m, 1H), 3,86 (d, J=6,1 Гц, 2H), 1,57 (s, 5H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 296,1.

Пример 67: 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ол



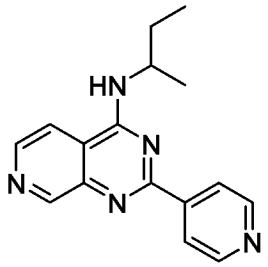
Указанное в заголовке соединение получали из метил–2–амино–3,3,3–трифтор–2–метилпропаноата гидрохлорида и 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина, как описано на **стадии C примера 1**, с последующим восстановлением метилового

сложного эфира до спирта с помощью алюмогидрида лития.

Восстановление: метил–3,3,3–трифтор–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноат (12 мг, 0,032 ммоль) перемешивали с алюмогидридом лития (4,8 мг, 0,127 ммоль) в THF при 0°C в течение 25 часов. С помощью TLC или LCMS исходный материал не наблюдали. Реакционную смесь разбавляли с помощью DCM/MeOH, промывали с помощью H_2O и солевого раствора, затем концентрировали. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (17%).

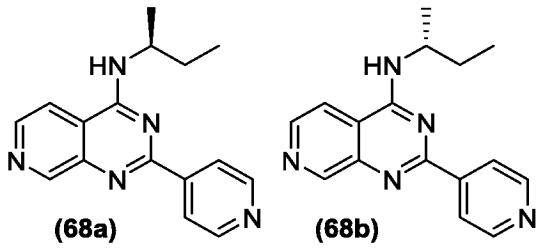
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 8,37 (d, J=1,0 Гц, 1H), 7,86–7,81 (m, 2H), 7,74 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,54–7,49 (m, 2H), 7,32 (dt, J=5,7, 1,3 Гц, 1H), 3,77 (d, J=11,6 Гц, 1H), 3,19–3,12 (m, 1H), 1,02 (d, J=1,2 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 350,1.

<u>Пример 68:</u> N–(бутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80–8,74 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,43 (d, J=7,8 Гц, 1H), 8,36–8,27 (m, 3H), 4,56 (гепт., J=6,4 Гц, 1H), 1,83–1,63 (m, 2H), 1,33 (d, J=6,6 Гц, 3H), 0,97 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

Пример 68a: (S)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (68a) и (R)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (68b)



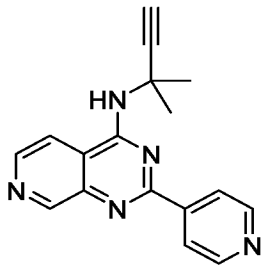
(68a) **(68b)**

Соединение N–(бутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (26,7 мг) (пример 68) подвергали хиральному разделению с получением двух энантиомеров, изомера, соответствующего пику 1 (T_R=1,44 мин.) (11,7 мг), и 11,6 мг изомера, соответствующего пику 2 (T_R=1,94 мин.). Определение хирального центра является экспериментальным. Условия хирального разделения: растворитель A CO_2 (85%), растворитель B MeOH (15%), расход 2 мл/мин., темп. 30°C, колонка 21×250 мм AD–H, время анализа: последовательные введения с интервалом 3,5 минут, время элюирования 7 минут.

Изомер, соответствующий пику 1 (T_R=1,44 мин.): 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (s, 1H), 8,77 (d, J=5,5 Гц, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,43 (d, J=7,8 Гц, 1H), 8,36–8,31 (m, 2H), 8,29 (d, J=5,6 Гц, 1H), 4,56 (p, J=7,2 Гц, 1H), 1,85–1,62 (m, 2H), 1,33 (d, J=6,6 Гц, 3H), 0,97 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

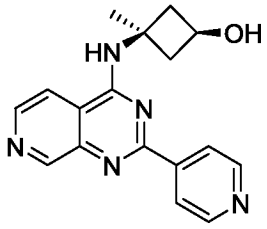
Изомер, соответствующий пику 2 (T_R=1,94 мин.): 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (s, 1H), 8,80–8,72 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,43 (d, J=7,8 Гц, 1H), 8,35–8,31 (m, 2H), 8,30 (dd, J=5,6, 0,8 Гц, 1H), 4,57 (гепт., J=6,7 Гц, 1H), 1,82–1,63 (m, 2H), 1,33 (d, J=6,6 Гц, 3H), 0,97 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 280,2.

Пример 69: N–(2–метилбут–3–ин–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



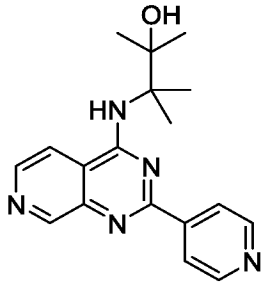
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,25 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,77–8,71 (m, 2H), 8,64–8,58 (m, 3H), 8,23 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 2,81 (s, 1H), 1,93 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 290,1.

Пример 70: (1r,3s)–3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–ол



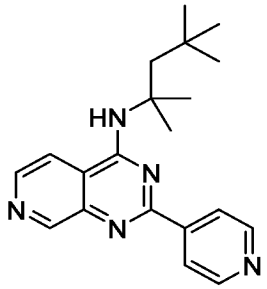
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) 9,21(s, 1H), 8,78(d, 2H), 8,55(d, 1H), 8,31(d, 2H), 8,05(d, 1H), 3,94(q, 2H), 3,50(s, 3H), 1,39(t, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 308,1.

Пример 71: 2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ол



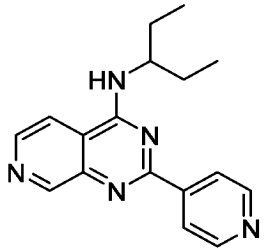
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,20 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,77 (m, 2H), 8,67 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,28–8,23 (m, 2H), 8,07 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,49 (s, 1H), 1,64 (s, 6H), 1,27 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 324,2.

Пример 72: 2–(пиридин–4–ил)–N–(2,4,4–триметилпентан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



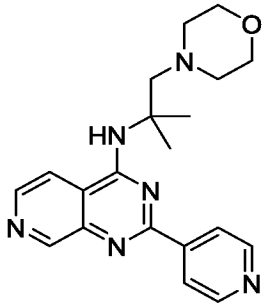
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,19 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78–8,72 (m, 2H), 8,58 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,50–8,45 (m, 2H), 8,22 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 2,33 (d, J=1,2 Гц, 2H), 1,77 (s, 6H), 1,01 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 336,2.

Пример 73: N–(пентан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



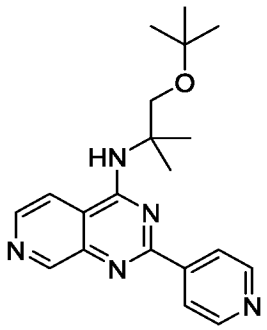
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79–8,74 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,37–8,30 (m, 4H), 4,47 (dtd, J=13,2, 8,2, 5,1 Гц, 1H), 1,83–1,63 (m, 4H), 0,95 (t, J=7,4 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,2.

Пример 74: (N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



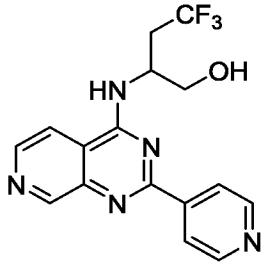
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,83–8,77 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,35 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,32–8,28 (m, 2H), 7,79 (s, 1H), 3,55–3,49 (m, 4H), 2,99 (s, 2H), 2,51–2,45 (m, 4H), 1,62 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 365,2.

Пример 75: N–[1–(трет–бутокси)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



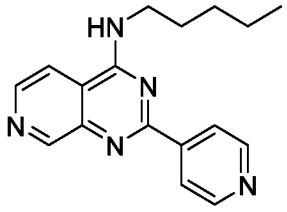
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,77 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,33–8,28 (m, 2H), 7,66 (s, 1H), 3,84 (s, 2H), 1,60 (s, 6H), 1,05 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 352,2.

Пример 76: 4,4,4–трифтор–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ол



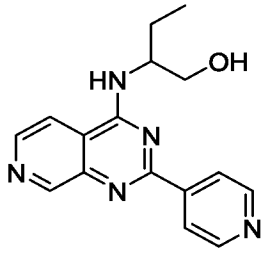
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,23 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,81–8,76 (m, 2H), 8,70 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,62 (d, J=8,2 Гц, 1H), 8,36–8,31 (m, 2H), 8,22 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 5,19 (dd, J=6,3, 5,4 Гц, 1H), 4,98 (tq, J=9,6, 5,9 Гц, 1H), 3,72 (dt, J=10,9, 5,5 Гц, 1H), 3,61 (dt, J=11,0, 6,3 Гц, 1H), 2,87–2,71 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 350,1.

Пример 77: N–пентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



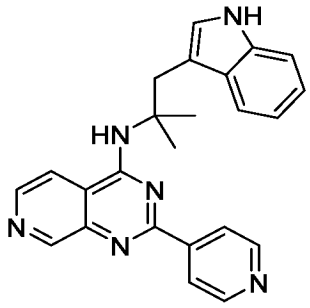
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,83 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,79–8,73 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,36–8,29 (m, 2H), 8,18 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,70 (td, J=7,2, 5,6 Гц, 2H), 1,81–1,68 (m, 2H), 1,47–1,30 (m, 4H), 0,93–0,86 (m, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,2.

Пример 78: 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ол



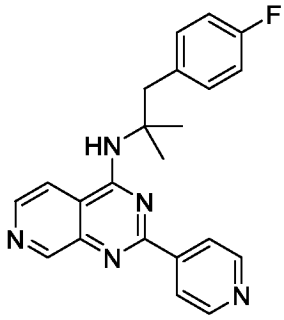
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80–8,74 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,40–8,30 (m, 4H), 4,83 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,54 (td, J=8,4, 4,9 Гц, 1H), 3,72–3,56 (m, 2H), 1,84 (ddd, J=14,0, 7,4, 5,1 Гц, 1H), 1,68 (ddd, J=13,8, 8,8, 7,3 Гц, 1H), 0,96 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 296,1.

Пример 79: N–[1–(1H–индол–3–ил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



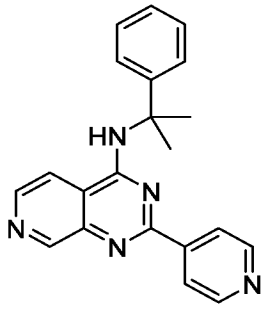
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 10,78 (d, J=2,6 Гц, 1H), 9,21 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,86–8,78 (m, 2H), 8,60 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,42–8,36 (m, 2H), 8,30 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,47–7,40 (m, 1H), 7,29 (dt, J=8,2, 0,9 Гц, 1H), 7,00 (ddd, J=8,1, 7,0, 1,1 Гц, 1H), 6,91–6,82 (m, 2H), 3,59 (s, 2H), 1,66 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 395,2.

Пример 80: N–[1–(4–фторфенил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,23 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80–8,75 (m, 2H), 8,58–8,51 (m, 3H), 8,13 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,11–7,04 (m, 2H), 6,95–6,87 (m, 2H), 3,56 (s, 2H), 1,69 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 374,2.

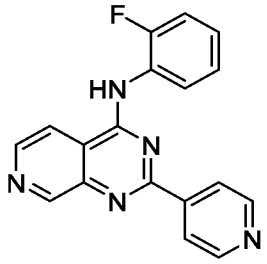
Пример 81: N–(2–фенилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,16 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,69 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,61–8,56 (m, 2H), 8,53 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 7,80–7,75 (m, 2H), 7,55–7,48 (m, 2H),

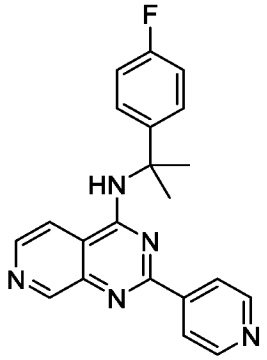
7,35–7,28 (m, 2H), 7,20–7,12 (m, 1H), 1,89 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 342,2.

Пример 82: **N–(2–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



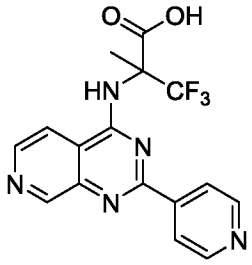
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,33 (d, J=1,0 Гц, 1H), 8,71 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,68–8,64 (m, 2H), 8,32 (ddd, J=9,5, 5,1, 1,3 Гц, 3H), 7,81 (td, J=8,0, 2,0 Гц, 1H), 7,41 (d, J=1,1 Гц, 1H), 7,38–7,31 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 318,1.

Пример 83: **N–[2–(4–фторфенил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



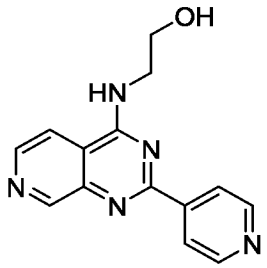
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,18 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,63 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,59–8,53 (m, 2H), 8,36 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,97–7,92 (m, 2H), 7,61–7,53 (m, 2H), 7,11–7,02 (m, 2H), 1,96 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 360,2.

Пример 84: **3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановая кислота**



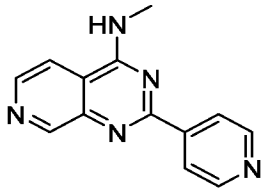
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,38 (s, 1H), 9,24 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,81–8,75 (m, 2H), 8,71 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,34–8,29 (m, 2H), 7,84 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,07 (s, 1H), 2,03 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 364,1.

Пример 85: **2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этан–1–ол**



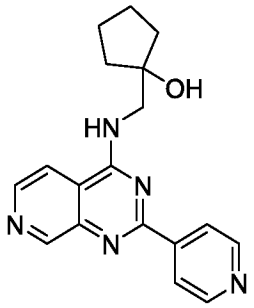
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,88 (t, J=5,3 Гц, 1H), 8,82–8,73 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38–8,31 (m, 2H), 8,21 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 4,90 (t, J=5,3 Гц, 1H), 3,76 (ttd, J=7,9, 5,5, 2,5 Гц, 4H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 268,1.

Пример 86: **N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



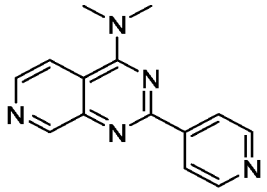
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,88 (q, J=4,4 Гц, 1H), 8,80–8,73 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,40–8,33 (m, 2H), 8,12 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,18 (d, J=4,5 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 238,1.

Пример 87: **1–({[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}метил)циклопентан–1–ол**



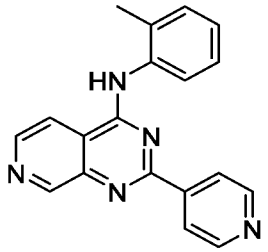
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,81–8,74 (m, 2H), 8,67 (dd, J=11,8, 5,8 Гц, 2H), 8,37–8,33 (m, 2H), 8,30 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 4,70 (s, 1H), 3,89 (d, J=5,9 Гц, 2H), 1,78–1,50 (m, 8H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 322,2.

Пример 88: **N, N–диметил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



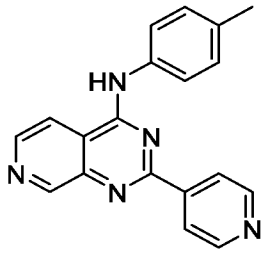
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80–8,73 (m, 2H), 8,57 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,38–8,31 (m, 2H), 8,15 (dd, J=5,8, 0,8 Гц, 1H), 3,53 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 252,1.

Пример 89: **N–(2–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



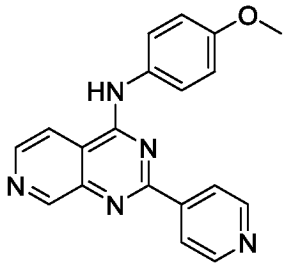
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,22 (s, 1H), 9,29 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,76 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,72–8,67 (m, 2H), 8,42 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 8,09–8,04 (m, 2H), 7,50 (dd, J=7,7, 1,5 Гц, 1H), 7,43 (dd, J=7,1, 1,8 Гц, 1H), 7,40–7,29 (m, 2H), 2,27 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 314,1..

Пример 90: **N–(4–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



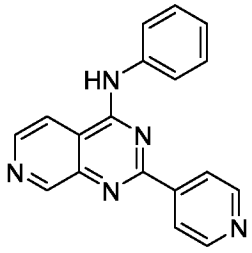
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,25 (s, 1H), 9,29 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,81–8,73 (m, 3H), 8,49 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 8,30–8,25 (m, 2H), 7,87–7,80 (m, 2H), 7,36–7,30 (m, 2H), 2,38 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 314,1.

Пример 91: **N–(4–метоксифенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 10,24 (s, 1H), 9,27 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,80–8,72 (m, 3H), 8,46 (dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 8,29–8,23 (m, 2H), 7,88–7,79 (m, 2H), 7,14–7,05 (m, 2H), 3,83 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 330,1.

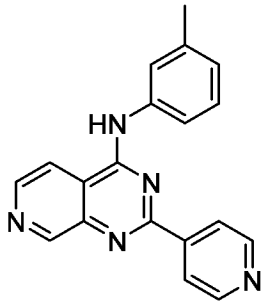
Пример 92: **N–фенил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 10,31 (s, 1H), 9,30 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,74 (m, 3H), 8,51 (dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 8,31–8,24 (m, 2H), 8,00–7,92 (m, 2H), 7,58–7,48 (m, 2H),

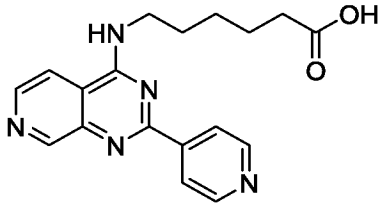
7,26 (tt, J=7,3, 1,2 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 300,1.

Пример 93: **N–(3–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



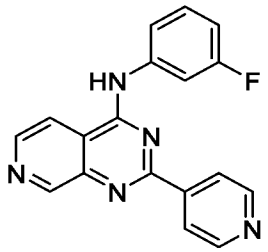
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,24 (s, 1H), 9,30 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,82–8,75 (m, 3H), 8,51 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,31–8,26 (m, 2H), 7,83–7,76 (m, 2H), 7,41 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,08 (ddt, J=7,6, 1,7, 0,9 Гц, 1H), 2,43 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 314,1.

Пример 94: **6–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}гексановая кислота**



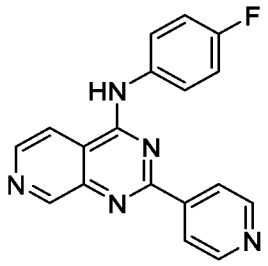
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,02 (s, 1H), 9,19 (s, 1H), 8,84 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,80–8,73 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,37–8,31 (m, 2H), 8,18 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,76–3,66 (m, 2H), 2,23 (t, J=7,3 Гц, 2H), 1,81–1,69 (m, 2H), 1,61 (p, J=7,3 Гц, 2H), 1,43 (tt, J=9,6, 6,1 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,2.

Пример 95: **N–(3–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



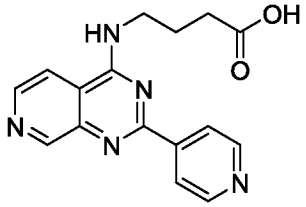
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,39 (s, 1H), 9,34 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,84–8,78 (m, 3H), 8,51 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,31–8,26 (m, 2H), 7,96 (dt, J=11,7, 2,3 Гц, 1H), 7,81 (ddd, J=8,2, 2,0, 0,9 Гц, 1H), 7,56 (td, J=8,2, 6,8 Гц, 1H), 7,08 (tdd, J=8,5, 2,6, 0,9 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 318,1.

Пример 96: **N–(4–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



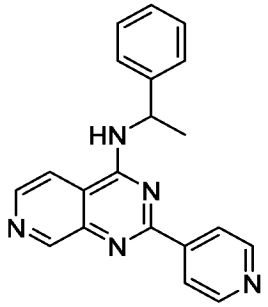
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 10,34 (s, 1H), 9,31 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,81–8,75 (m, 3H), 8,47 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,31–8,24 (m, 2H), 7,99–7,92 (m, 2H), 7,41–7,33 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 318,1.

Пример 97: 4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановая кислота



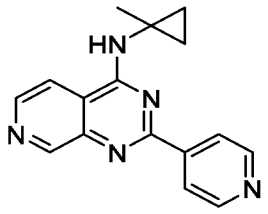
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 10,43 (s, 1H), 9,16 (s, 1H), 8,79–8,72 (m, 2H), 8,62 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,39–8,32 (m, 2H), 8,19 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,67 (q, J=6,0 Гц, 2H), 2,33 (t, J=6,5 Гц, 2H), 1,94 (p, J=6,6 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 365,2.

Пример 98: N–(1–фенилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (DMSO–d6) d 1,67 (d, J=6,8 Гц, 3H), 5,73 (m, 1H), 7,22 (m, 1H), 7,47 (m, 2H), 7,55 (m, 2H), 8,26 (d, J=5 Гц, 2H), 8,41 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,69 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,74 (d, J=5 Гц, 1H), 9,08 (d, J=7,2 Гц, 1H), 9,19 (s, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 328,2.

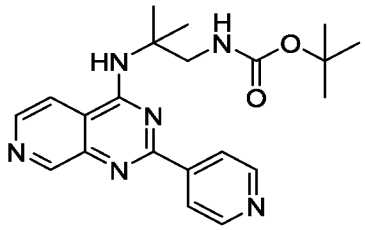
Пример 99: N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,19 (s, 1H), 8,73 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,55 (m, 3H), 8,01 (dd, J=5,7, 0,7 Гц, 1H), 1,64 (s, 3H), 0,99 (m, 2H), 0,93 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 278,1.

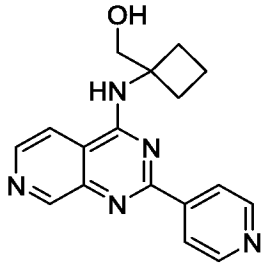
Пример 100: трет–бутил–N–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–

d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)карбамат



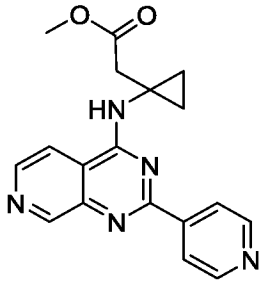
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21 (s, 1H), 8,87 (s, 2H), 8,67 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,49 (d, J=4,6 Гц, 2H), 8,24 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,33 (t, J=6,4 Гц, 1H), 3,54 (d, J=6,4 Гц, 2H), 1,57 (s, 6H), 1,36 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 395,2.

Пример 101: (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанол



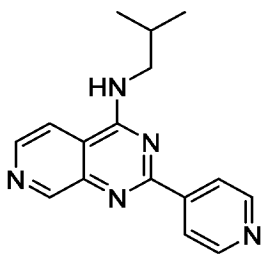
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,16 (s, 1H), 8,78–8,72 (m, 2H), 8,68 (s, 1H), 8,62 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,36 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,31–8,20 (m, 2H), 4,94 (t, J=6,0 Гц, 1H), 3,96 (d, J=6,0 Гц, 2H), 2,41 (dt, J=12,5, 7,2 Гц, 4H), 1,89 (p, J=8,0 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 308,1.

Пример 102: метил–2–(1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)ацетат



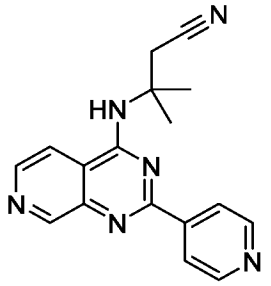
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) 9,25(s, 1H), 9,05(t, 1H), 8,90(d, 2H), 8,70(d, 1H), 8,60(d, 2H), 8,24(d, 1H), 3,90(m, 2H), 3,79(t, 2H), 3,59(m, 2H), 3,55–3,49(m, 4H), 3,45(m, 2H), 3,41(m, 2H), 2,40(t, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 336,1.

Пример 103: N–(2–метилпропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



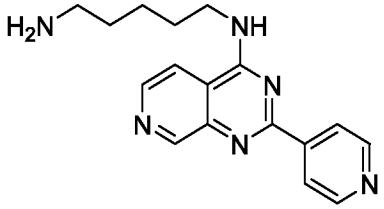
1НЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) d 9,35 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79 (d, J=5,6 Гц, 2H), 8,64 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39 (d, J=5,6 Гц, 2H), 7,52 (dd, J=5,6, 0,8 Гц, 1H), 6,00 (t, J=6,0 Гц, 1H), 3,66 (dd, J=6,8, 6,0 Гц, 2H), 2,09 (нонет, J=6,8 Гц, 1H), 1,12 (d, J=6,8 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 280,1.

Пример 104: 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутаннитрил



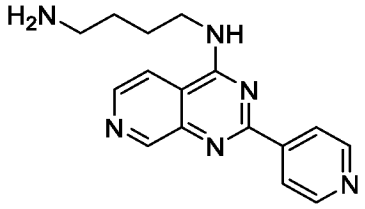
1H ЯМР (500 МГц, Ацетон–d6) δ 9,23 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,82–8,75 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,42–8,33 (m, 2H), 8,17 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 3,64 (s, 2H), 1,83 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 305,1.

Пример 105: N–(6–аминогексил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



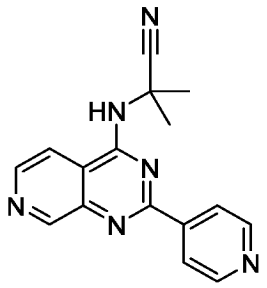
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (s, 1H), 8,88–8,80 (m, 1H), 8,82–8,73 (m, 2H), 8,68–8,61 (m, 1H), 8,37–8,31 (m, 2H), 8,19 (d, J=5,6 Гц, 1H), 3,71 (q, J=6,5 Гц, 2H), 2,53 (d, J=1,6 Гц, 2H), 1,75 (dt, J=14,2, 7,1 Гц, 2H), 1,47–1,32 (m, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 323,2.

Пример 106: N–(4–аминобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



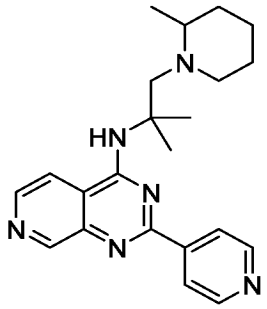
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,23 (s, 1H), 8,96 (t, J=5,7 Гц, 1H), 8,88–8,82 (m, 2H), 8,70 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,51–8,44 (m, 2H), 8,20 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,65 (s, 2H), 3,80–3,72 (m, 2H), 2,86 (td, J=7,5, 5,5 Гц, 2H), 1,85–1,73 (m, 2H), 1,67 (ddt, J=12,8, 9,9, 5,8 Гц, 2H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 295,2.

Пример 107: 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаннитрил



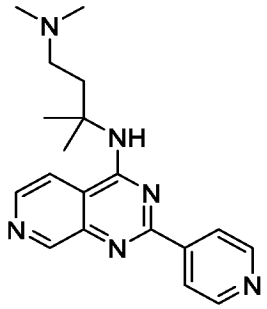
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,31 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,85–8,80 (m, 2H), 8,78–8,72 (m, 2H), 8,45–8,40 (m, 2H), 8,37 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 1,93 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 291,1.

Пример 108: N–[2–метил–1–(2–метилпиперидин–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



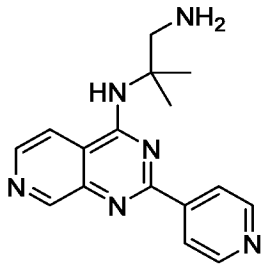
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,08 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,65–8,58 (m, 2H), 8,50 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,37–8,29 (m, 2H), 7,94 (dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 3,18 (d, J=14,7 Гц, 1H), 3,00–2,92 (m, 2H), 2,66 (s, 1H), 2,44 (dq, J=12,3, 5,9, 5,1 Гц, 1H), 1,86 (s, 1H), 1,69–1,43 (m, 10H), 1,38–1,25 (m, 2H), 0,97 (d, J=6,4 Гц, 3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 377,2.

Пример 109: диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амин



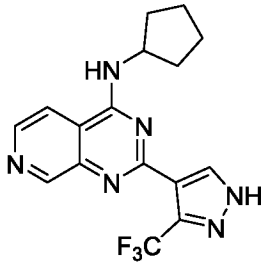
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,23 (s, 1H), 8,96 (t, J=5,7 Гц, 1H), 8,88–8,82 (m, 2H), 8,70 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,51–8,44 (m, 2H), 8,20 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,65 (s, 2H), 3,80–3,72 (m, 2H), 2,86 (td, J=7,5, 5,5 Гц, 2H), 1,85–1,73 (m, 2H), 1,67 (ddt, J=12,8, 9,9, 5,8 Гц, 2H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 295,2.

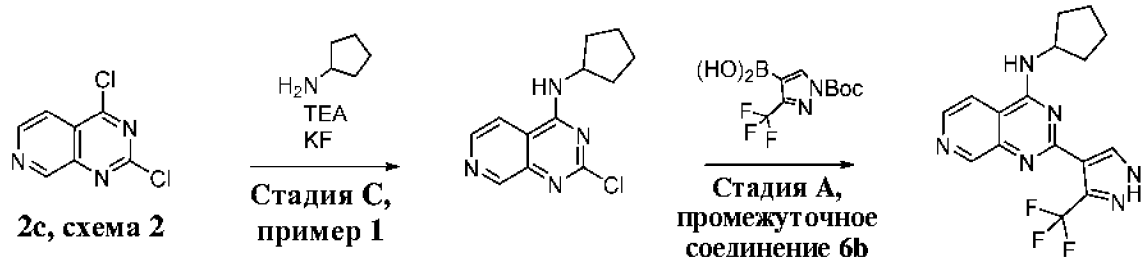
Пример 110: N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,25 (s, 1H), 8,88 (s, 2H), 8,72 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,45 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,39 (d, J=4,9 Гц, 2H), 7,87 (s, 1H), 7,79 (s, 2H), 3,67 (d, J=5,9 Гц, 2H), 1,64 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 295,2.

Пример 111: N–циклопентил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



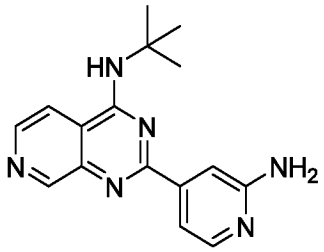


Указанное в заголовке соединение получали из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение 2c), как на **схеме 2**, с применением **стадии C** для примера **1** и **стадии A** для **промежуточного соединения 6b**. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,10(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,60(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,36(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,09(dd, J=5,3, 0,8 Гц, 1H), 7,77(s, 1H), 7,50(dd, J=1,5, 0,8 Гц, 1H), 7,42(dd, J=5,3, 1,5 Гц, 1H), 6,10(s, 2H), 1,60(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 349,1.

Примеры 112–197

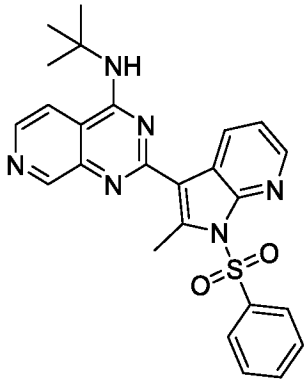
Данные соединения синтезировали в соответствии с протоколом, описанным выше, с применением 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и различных аминов и партнеров по сочетанию соответственно, за исключением конкретно указанных.

Пример 112: 4–[4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил]пиридин–2–амин



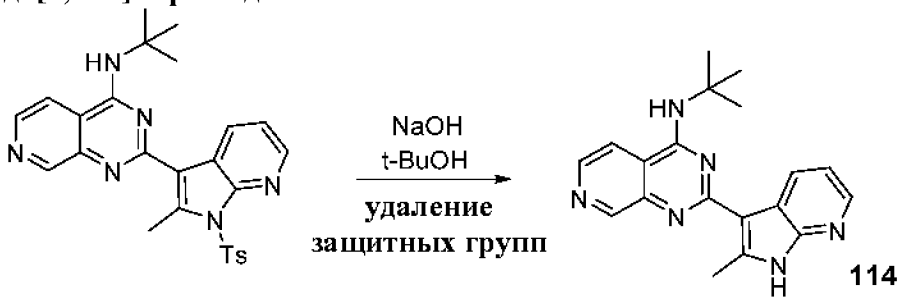
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,10(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,60(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,36(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,09(dd, J=5,3, 0,8 Гц, 1H), 7,77(s, 1H), 7,50(dd, J=1,5, 0,8 Гц, 1H), 7,42(dd, J=5,3, 1,5 Гц, 1H), 6,10(s, 2H), 1,60(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 295,2

Пример 113: 2–[1–(бензолсульфонил)–2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил]–N–трет–бутилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,70(dd, J=7,9, 1,7 Гц, 1H), 8,58(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,20(m, 2H), 7,71(m, 1H), 7,66–7,59(m, 5H), 7,35(dd, J=7,9, 4,7 Гц, 1H), 3,24(s, 3H), 1,59(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 473,2.

Пример 114: N–трет–бутил–2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



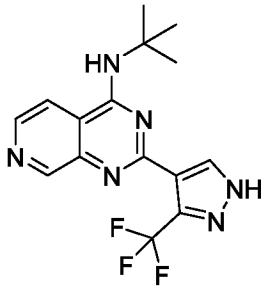
Указанное в заголовке соединение получали посредством удаления защитных групп с тозильной группы примера **113**.

Удаление защитных групп: N–(трет–бутил)–2–(2–метил–1–(фенилсульфонил)–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (32 мг, 0,068 ммоль) перемешивали в 1 мл трет–бутанола при комнатной температуре. Затем добавляли гидроксид натрия (270 микролитров (5 М), 1,35 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух часов, при этом за это время расходовалось все исходное вещество. Материал концентрировали до грязно–белого масла и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–20% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке продукта,

представляющего собой N–трет–бутил–2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (55%).

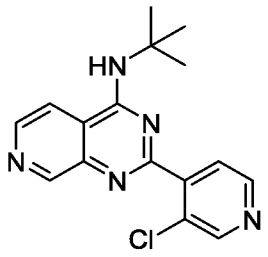
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,01(s, 1H), 9,05(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,97(dd, J=8,0, 1,7 Гц, 1H), 8,45(d, J=5,5 Гц, 1H), 8,25(ddd, J=23,7, 5,2, 1,3 Гц, 1H), 8,19(m, 1H), 7,42(s, 1H), 7,15(dd, J=7,9, 4,7 Гц, 1H), 2,96(s, 3H), 1,63(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 333,2.

Пример 115: N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



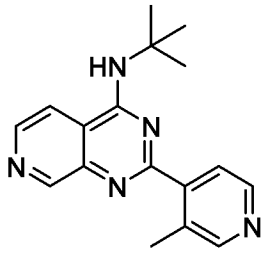
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 8,95(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,54(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,46(s, 1H), 8,30(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,62(s, 1H), 1,58(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 337,1.

Пример 116: N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



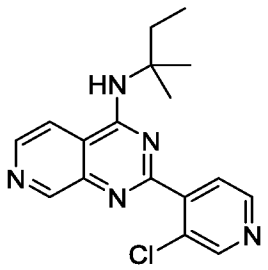
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(d, J=0,5 Гц, 1H), 8,68(m, 2H), 8,41(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,92(s, 1H), 7,77(dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 1,55(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 314,1.

Пример 117: N–трет–бутил–2–(3–метилпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



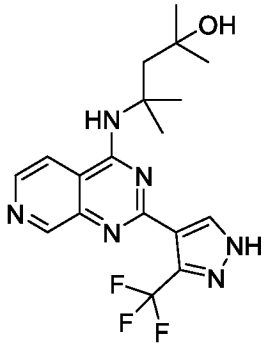
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,11(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,63(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,55(m, 2H), 8,39(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,79(m, 1H), 7,76(m, 1H), 2,59(s, 3H), 1,58(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 294,2.

Пример 118: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



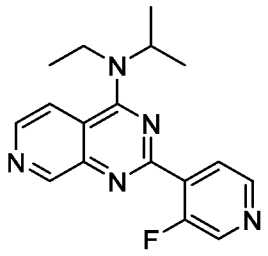
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78(d, J=0,6 Гц, 1H), 8,68(dd, J=5,3, 2,2 Гц, 1H), 8,66(m, 2H), 8,41(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,74(m, 1H), 2,00(q, J=7,3 Гц, 2H), 1,49(s, 6H), 0,80(t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 328,1.

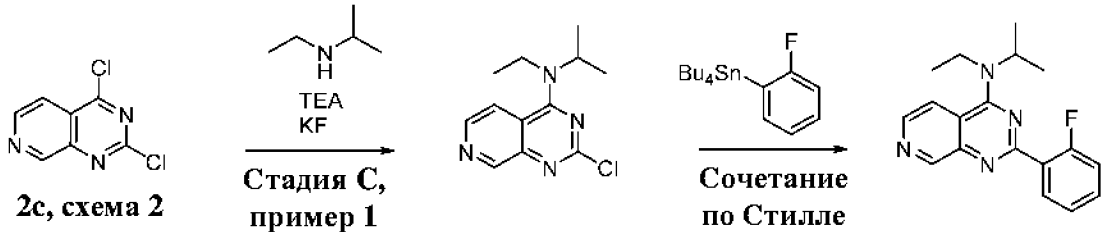
Пример 119: 2,4–диметил–4–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пентан–2–ол



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,29(s, 1H), 8,99(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,55(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,49(s, 1H), 7,73(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 5,61(s, 1H), 1,97(s, 2H), 1,70(s, 6H), 1,30(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 395,2.

Пример 120: N–этил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин





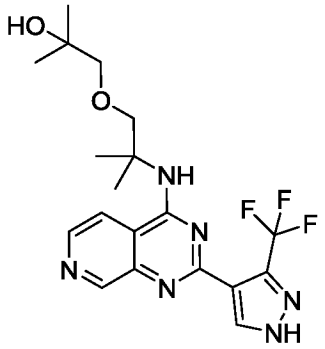
2c, схема 2

Указанное в заголовке соединение получали из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение **2c**) подобно тому, как описано в примере **111**, за исключением использования сочетания по Стилле в качестве второй стадии.

Сочетание по Стилле: 2–хлор–N–этил–N–изопропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (30 мг, 0,12 ммоль) перемешивали в сухом DMF (1 мл) при комнатной температуре.

Добавляли 3–фтор–4–(трибутилстаннил)пиридин (50,8 мг, 0,13 ммоль), затем аддукт PdCl2(dppf).CH2Cl2 (9,8 мг, 0,012 ммоль) и CuI (2,3 мг, 0,012 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 130°C. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,72(d, J=2,9 Гц, 1H), 8,61(m, 1H), 8,59(m, 1H), 8,08(dd, J=6,7, 4,9 Гц, 1H), 7,90(m, 1H), 4,92–4,88(m, 1H), 3,79(q, J=7,0 Гц, 2H), 1,37(m, 6H), 1,32(dd, J=23,7, 6,8 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 312,2.

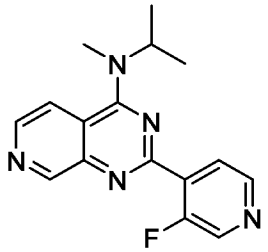
<u>Пример 121:</u> 2–метил–1–[2–метил–2–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пропокси]пропан–2–ол



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **111**, и амина, как описано в примере **12**.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 13,80(s, 1H), 8,99(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,55(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,44(s, 1H), 8,25(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,53(s, 1H), 4,35(s, 1H), 3,82(s, 2H), 3,17(s, 2H), 1,54(s, 6H), 1,00(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 425,2.

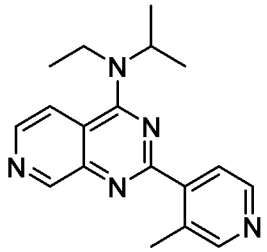
<u>Пример 122:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **120**.

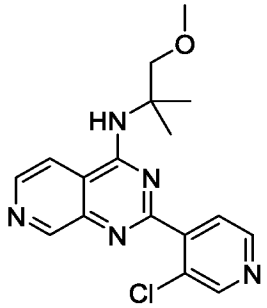
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,74(d, J=2,9 Гц, 1H), 8,60(m, 2H), 8,11(m, 1H), 8,09(m, 1H), 5,11–5,06(d, J=6,6 Гц, 1H), 3,37(s, 3H), 1,34(d, J=6,7 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 298,1.

<u>Пример 123:</u> N–этил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



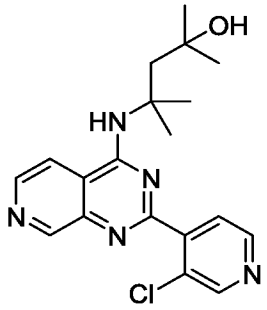
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,59(m, 1H), 8,56(m, 1H), 8,54(m, 1H), 7,89(m, 1H), 7,85(m, 1H), 4,95–4,90(d, J=6,6 Гц, 1H), 3,79(q, J=7,0 Гц, 2H), 2,60(s, 3H), 1,36(d, J=6,6 Гц, 6H), 1,30(t, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 308,2.

Пример 124: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



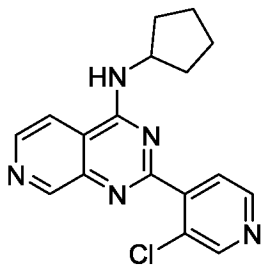
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12(s, 1H), 8,79(s, 1H), 8,69(dd, J=5,2, 1,8 Гц, 2H), 8,40(dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 7,78(s, 1H), 7,75(m, 1H), 3,73(s, 2H), 3,22(s, 3H), 1,50(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 344,1.

Пример 125: 4–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ол



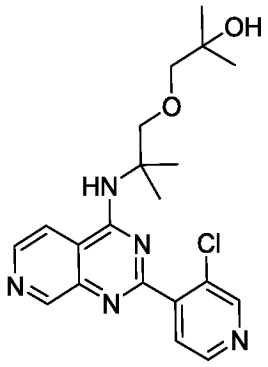
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,45(s, 1H), 9,13(d, J=0,7 Гц, 1H), 8,79(s, 1H), 8,68(dd, J=5,3, 3,4 Гц, 1H), 8,66(m, 1H), 7,83(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,77(dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 5,57(s, 1H), 1,96(s, 2H), 1,65(s, 6H), 1,29(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 372,2.

Пример 126: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–циклопентилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,14(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78(d, J=0,6 Гц, 1H), 8,69(dd, J=9,4, 5,2 Гц, 1H), 8,67(d, J=6,9 Гц, 1H), 8,61(d, J – 6,8 Гц, 1H), 8,32(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,81(m, 1H), 4,61–4,57(m, 1H), 2,10–2,01(m, 2H), 1,80–1,54(m, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 326,1.

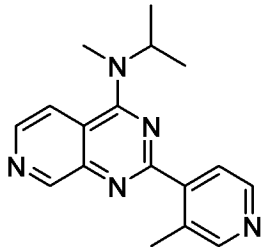
Пример 127: 1–(2–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ол



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **111**, и амина, как описано в примере **12**.

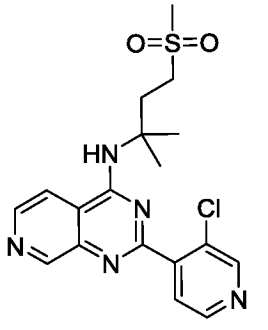
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,13(m, 1H), 8,80(d, J=0,6 Гц, 1H), 8,69(m, 2H), 8,40(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,83(dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 7,76(dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 4,38(s, 1H), 3,80(s, 2H), 3,16(s, 2H), 1,51(s, 6H), 1,00(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 402,2.

Пример 128: N–метил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,58(m, 2H), 8,53(m, 1H), 8,03(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,87(d, J=5,0 Гц, 1H), 5,09–5,00(m, 1H), 3,29(s, 3H), 2,60(s, 3H), 1,31(d, J=6,7 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 294,2.

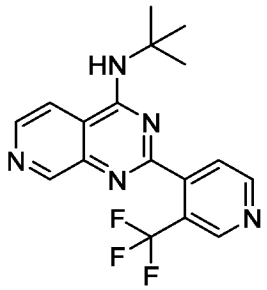
Пример 129: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,15(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(d, J=0,6 Гц, 1H), 8,69(dd,

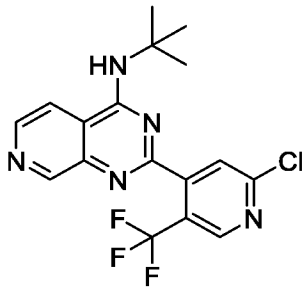
J=21,3, 5,3 Гц, 1H), 8,65(m, 1H), 8,40(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,80(m, 1H), 7,78(m, 1H), 3,12–3,08(m, 2H), 2,87(s, 3H), 2,49–2,46(m, 2H), 1,53(s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 406,1.

Пример 130: N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



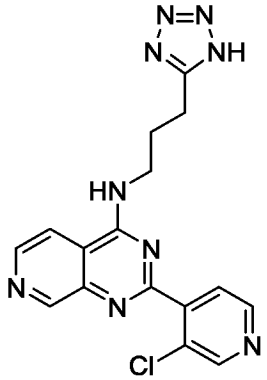
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 8,92(m, 1H), 8,89(m, 1H), 8,08(d, J=4,9 Гц, 1H), 7,76(d, J=0,8 Гц, 1H), 7,70(m, 1H), 7,67(m, 1H), 7,56(dd, J=5,0, 0,8 Гц, 1H), 1,49(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 348,1.

Пример 131: N–трет–бутил–2–[2–хлор–5–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



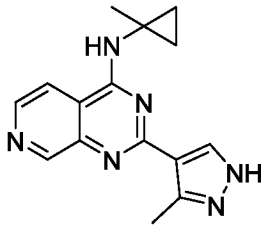
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,08(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,87(s, 1H), 8,61(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,22(dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 7,83(s, 1H), 1,20(s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 382,1.

Пример 132: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



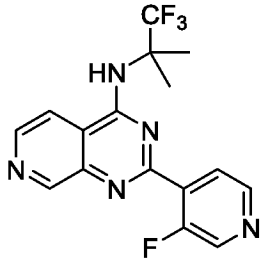
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,30(s, 1H), 9,15(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77(s, 1H), 8,70(dd, J=18,4, 5,2 Гц, 1H), 8,65(m, 1H), 8,25(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,81(d, J=4,9 Гц, 1H), 3,70–3,65(td, J=6,8, 5,1 Гц, 2H), 2,90(t, J=7,4 Гц, 2H), 2,12–2,07(m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 368,1.

Пример 133: 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,01 (s, 1H), 8,41 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,91 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 2,83 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,05–0,94 (m, 2H), 0,91–0,82 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

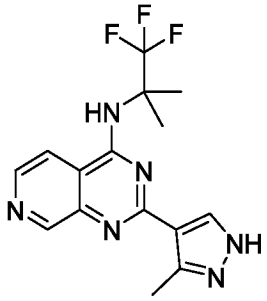
<u>Пример 134:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **120**.

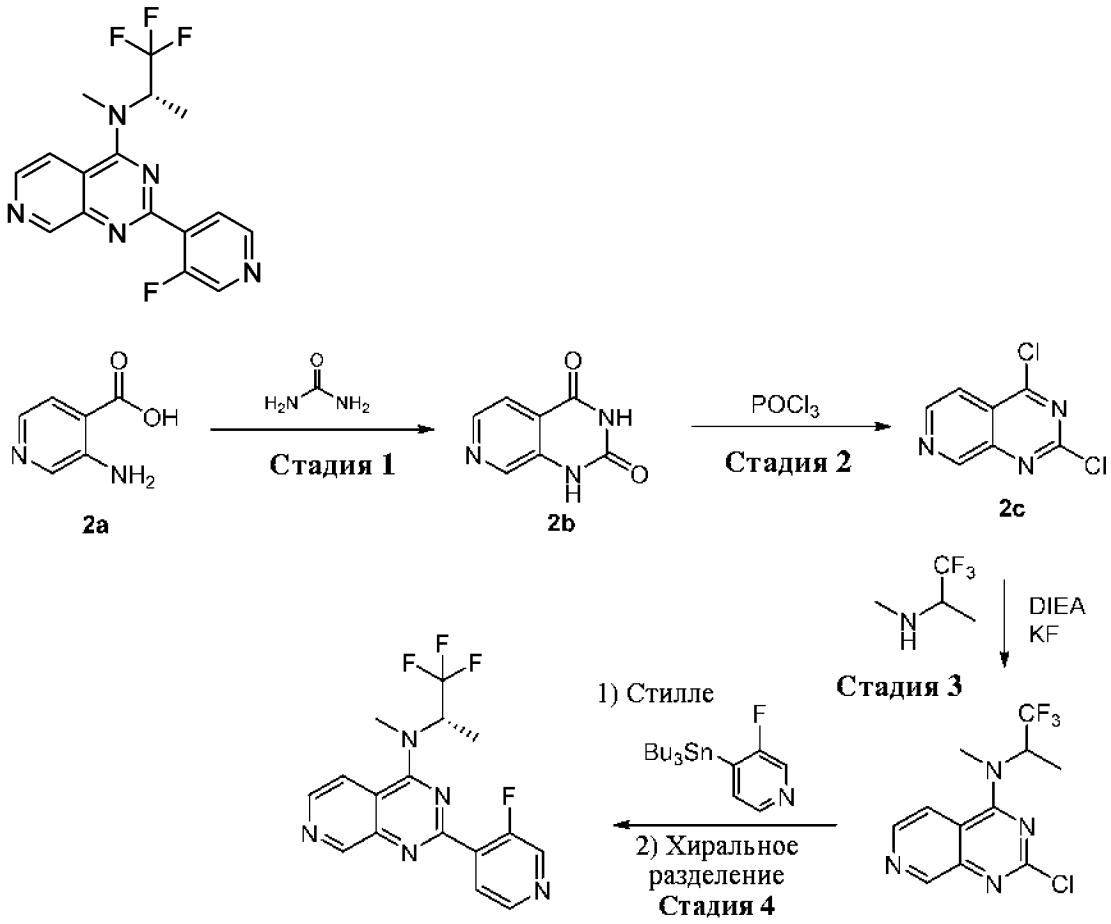
1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d6) δ 9,24 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77–8,73 (m, 2H), 8,62 (dd, J=4,9, 0,8 Гц, 1H), 8,52 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 8,04 (dd, J=6,7, 4,9 Гц, 1H), 7,99 (s, 1H), 1,86 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 352,1.

<u>Пример 135:</u> 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (600 МГц, Метанол–d4) δ 9,06 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,47 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,16 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,11 (s, 1H), 2,74 (d, J=34,7 Гц, 3H), 1,92 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 337,1.

<u>Пример 136:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Стадия 1. Смесь мочевины (40,00 г, 666,00 ммоль) и 3–аминоизоникотиновой кислоты (**2a,** 18,40 г, 133,20 ммоль) нагревали при 210°C в течение 1 ч. (ПРИМЕЧАНИЕ: не применяли растворитель). Добавляли NaOH (2 н., 320 мл) и смесь перемешивали при 90°C в течение 1 ч. Твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали с помощью воды. Полученный таким образом неочищенный продукт суспендировали в HOAc (400 мл) и перемешивали при 100°C в течение 1 ч. Смесь охлаждали до к. т., фильтровали и твердое вещество промывали с помощью большого количества воды и затем высушивали под вакуумом с получением пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b,** 17,00 г, выход 78%) без дополнительной очистки. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 164,0.

Стадия 2. К смеси пиридо[3,4–d]пиримидин–2,4(1H,3H)–диона (**2b**, 20,00 г, 122,60 ммоль) и $POCl_3$ (328,03 г, 2,14 моль) в толуоле (200 мл) добавляли по каплям DIEA (31,69 г, 245,20 ммоль) и данную реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение ночи (18 ч.) с получением суспензии.

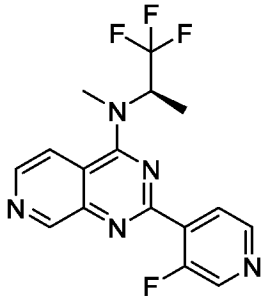
Растворитель и $POCl_3$ удаляли под вакуумом, разбавляли с помощью DCM (50 мл), нейтрализовали с помощью DIEA до pH=7 при –20°C и концентрировали снова, остаток очищали с помощью колонки (20–50% EA/PE) с получением 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**2c**, 20,00 г, 99,99 ммоль, выход 82%) в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ–d) δ 9,52 (s, 1 H), 8,92 (d, J=5,6 Гц, 1 H), 8,04 (d, J=5,6 Гц, 1 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 200,0.

Стадия 3. В 20–мл флаконе 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидин (600 мг, 3,0 ммоль) перемешивали в DMSO (0,7 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. Добавляли DIEA (1 мл, 6 ммоль) и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли KF (174 мг, 3 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли рацемический 1,1,1–трифтор–N–метилпропан–2–амин (419 мг, 3,3 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 60°C в течение 4 часов. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением 2–хлор–N–метил–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина (680 мг, 74%). 1H ЯМР (500 МГц, Ацетон–d6) δ 9,09 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,59 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,22 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 5,93 (dddd, J=15,3, 8,3, 7,0, 1,2 Гц, 1H), 3,61 (q, J=1,0 Гц, 3H), 1,63 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 291,7.

Стадия 4. В 20–мл флаконе 2–хлор–N–метил–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин (100 мг, 0,34 ммоль) перемешивали в сухом DMF (1 мл) при комнатной температуре. Добавляли 3–фтор–4–(трибутилстаннил)пиридин (133 мг, 0,34 ммоль), затем аддукт $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ (28,1 мг, 0,034 ммоль) и CuI (6,55 мг, 0,034 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 0,5 часа при 130°C. Неочищенную смесь разбавляли с помощью DCM, H_2O, разделяли и экстрагировали с помощью DCM x3. Объединяли органические слои и высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением рацемического продукта, затем следовала хиральная HPLC (колонка 21×250 мм OJ–H с 85% CO_2 в качестве фазы A и 15% MeOH в качестве фазы B, расход 2 мл/мин., 30°C, время элюирования 2,75 мин.) с разделением энантиомеров с получением **примеров 136** и **137**.

Пример 136: 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,30 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,75 (d, J=3,0 Гц, 1H), 8,66 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,62 (dd, J=4,9, 0,8 Гц, 1H), 8,24 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 6,12–5,98 (m, 1H), 3,51 (d, J=1,1 Гц, 3H), 1,57 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 352,1. Хиральная HPLC: T_R=0,88 мин.

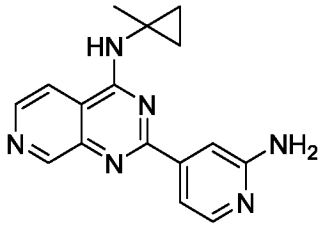
Пример 137: 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,30 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,75 (d, J=3,0 Гц, 1H), 8,66 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,62 (dd, J=4,9, 0,8 Гц, 1H), 8,24 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9

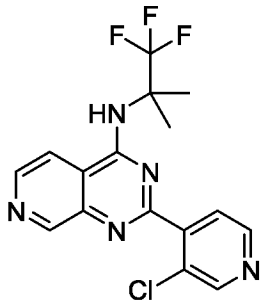
Гц, 1H), 6,12–5,98 (m, 1H), 3,51 (d, J=1,1 Гц, 3H), 1,57 (d, J=7,0 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 352,1. Хиральная HPLC: TR=0,70 мин.

Пример 138: **4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–амин**



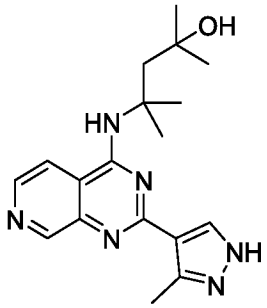
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,15 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,55 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,17–8,09 (m, 2H), 7,98 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,81–7,70 (m, 2H), 1,61 (s, 3H), 1,00–0,94 (m, 2H), 0,91–0,84 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 293,1.

Пример 139: **2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



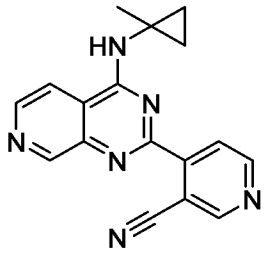
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,20 (s, 1H), 8,74 (s, 1H), 8,68 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,63 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,33 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,79 (d, J=4,9 Гц, 1H), 1,88 (d, J=1,0 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 368,1.

Пример 140: **2,4–диметил–4–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ол**



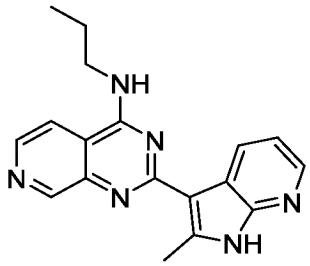
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,14 (s, 1H), 8,80 (s, 1H), 8,37 (t, J=5,8 Гц, 2H), 7,50–7,38 (m, 1H), 2,81 (s, 3H), 1,99 (s, 2H), 1,81 (s, 6H), 1,49 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 341,2.

Пример 141: **4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрил**



1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,23 (d, J=0,9 Гц, 1H), 9,09 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,99 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,59–8,53 (m, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,07 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,04–0,97 (m, 2H), 0,90–0,81 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 303,1.

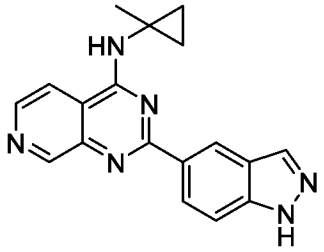
Пример 142: 2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **114**.

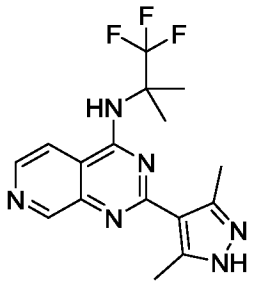
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,02 (s, 1H), 9,06 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,98 (dd, J=7,9, 1,7 Гц, 1H), 8,50 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,46 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,19 (dd, J=4,7, 1,7 Гц, 1H), 8,06 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 7,16 (dd, J=7,9, 4,7 Гц, 1H), 3,62 (dt, J=8,1, 6,0 Гц, 2H), 2,96 (s, 3H), 1,90–1,69 (m, 2H), 1,00 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 319,2.

Пример 143: 2–(1H–индазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



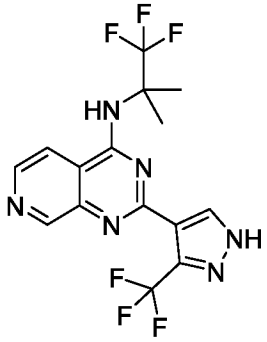
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12 (d, J=0,9 Гц, 1H), 9,00 (dd, J=1,5, 0,8 Гц, 1H), 8,85 (s, 1H), 8,61 (dd, J=8,9, 1,5 Гц, 1H), 8,52 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,11 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 7,65 (d, J=8,8 Гц, 1H), 1,62 (s, 3H), 0,97–0,81 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 317,1.

Пример 144: 2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



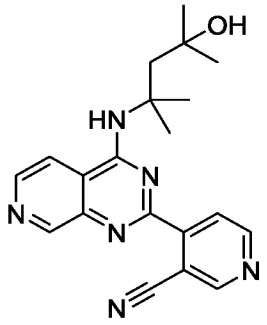
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,06 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,50 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,17 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 2,58 (s, 6H), 1,91 (d, J=1,1 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 3511.

Пример 145: N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



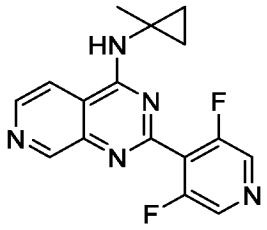
1H ЯМР (600 МГц, Метанол–d4) δ 9,06 (d, J=1,0 Гц, 1H), 8,54 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,38–8,36 (m, 1H), 8,20 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 1,90 (d, J=1,1 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 391,1.

Пример 146: 4–{4–[(4–гидрокси–2,4–диметилпентан–2–ил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрил



1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,55 (s, 1H), 9,38 (s, 1H), 9,07 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,95 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,62 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,27 (dd, J=5,2, 0,8 Гц, 1H), 7,86–7,80 (m, 1H), 2,02 (s, 2H), 1,84 (s, 6H), 1,53 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 363,2.

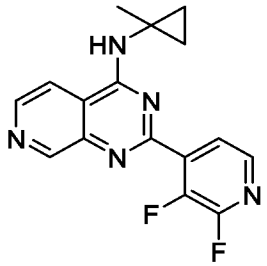
Пример 147: 2–(3,5–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **120**.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,16 (s, 1H), 9,14 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,71 (s, 2H), 8,68 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,19 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 1,45 (s, 3H), 0,87–0,77 (m, 2H), 0,75–0,64 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 314,1.

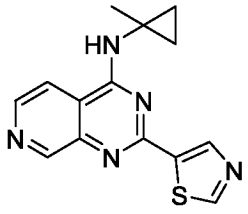
Пример 148: 2–(2,3–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **120**.

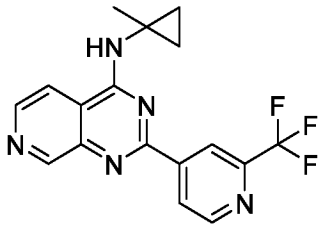
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,36 (s, 1H), 8,90 (dd, J=5,0, 0,9 Гц, 1H), 8,85 (dd, J=1,6, 0,9 Гц, 1H), 8,69 (dd, J=5,1, 1,6 Гц, 1H), 8,66 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,64–7,52 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,04–0,94 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 314,1.

Пример 149: N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–тиазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



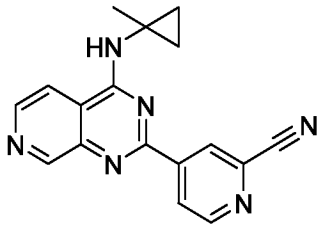
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22 (d, J=0,8 Гц, 1H), 9,08 (d, J=0,8 Гц, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,69–8,62 (m, 1H), 8,56 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,10 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 1,55 (s, 3H), 0,92–0,86 (m, 2H), 0,86–0,76 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 284,1.

Пример 150: N–(1–метилциклопропил)–2–[2–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



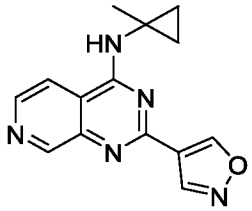
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,41 (s, 1H), 8,97–8,89 (m, 1H), 8,88 (dd, J=1,5, 0,8 Гц, 1H), 8,70–8,66 (m, 1H), 8,66–8,61 (m, 1H), 7,89–7,77 (m, 1H), 6,95–6,80 (m, 1H), 1,65 (s, 3H), 1,07–1,01 (m, 2H), 1,01–0,92 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 346,1.

Пример 151: 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–карбонитрил



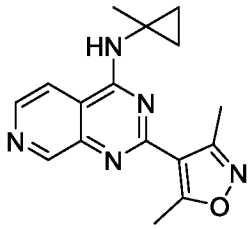
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,36 (s, 1H), 8,90 (dd, J=5,0, 0,9 Гц, 1H), 8,85 (dd, J=1,6, 0,9 Гц, 1H), 8,69 (dd, J=5,1, 1,6 Гц, 1H), 8,66 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,64–7,52 (m, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,04–0,94 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 303,1.

Пример 152: N–(1–метилциклопропил)–2–(1,2–оксазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



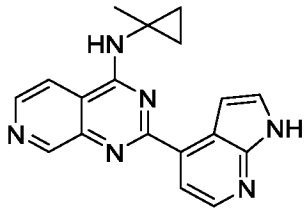
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,25 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,54 (dd, J=6,0, 0,7 Гц, 1H), 7,94–7,88 (br s, 1H), 7,32–7,27 (br s, 1H), 6,61 (dd, J=6,0, 0,7 Гц, 1H), 0,91 (s, 3H), 0,85–0,73 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 268,1.

Пример 153: 2–(диметил–1,2–оксазол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



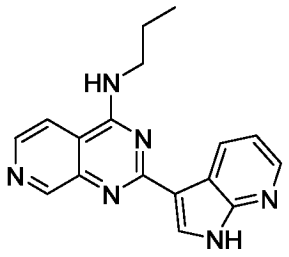
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,05 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,89 (s, 1H), 8,54 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,10 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 2,90 (s, 3H), 2,65 (s, 3H), 1,51 (s, 3H), 0,96–0,84 (m, 2H), 0,83–0,71 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 296,1.

Пример 154: N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



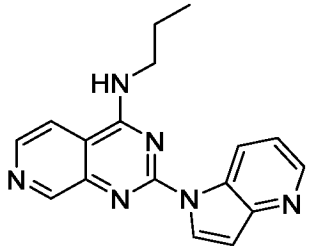
1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d6) δ 11,77 (s, 1H), 9,23 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,92 (s, 1H), 8,59 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,38 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,22 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,16 (dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 7,69 (dd, J=3,4, 2,0 Гц, 1H), 7,61 (t, J=2,9 Гц, 1H), 1,61 (s, 3H), 0,99–0,94 (m, 2H), 0,92–0,87 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 317,1.

Пример 155: N–пропил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



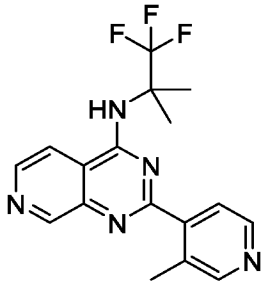
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,18 (s, 1H), 9,07 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,96 (dd, J=7,9, 1,6 Гц, 1H), 8,51 (dd, J=16,1, 5,5 Гц, 2H), 8,35–8,27 (m, 2H), 8,09 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 7,25 (dd, J=7,9, 4,6 Гц, 1H), 3,67 (dt, J=7,7, 5,9 Гц, 2H), 1,78 (h, J=7,4 Гц, 2H), 1,03 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 305,1.

Пример 156: N–пропил–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



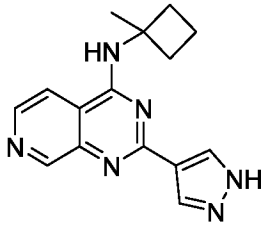
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (ddd, J=8,4, 1,5, 0,8 Гц, 1H), 9,13 (d, J=0,9 Гц, 1H), 9,02 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,65 (d, J=3,7 Гц, 1H), 8,55 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,48 (dd, J=4,6, 1,5 Гц, 1H), 8,16 (dd, J=5,5, 0,9 Гц, 1H), 7,35 (dd, J=8,4, 4,6 Гц, 1H), 6,88 (dd, J=3,8, 0,8 Гц, 1H), 3,71–3,63 (m, 2H), 1,85–1,74 (m, 2H), 1,04 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 305,1.

Пример 157: 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



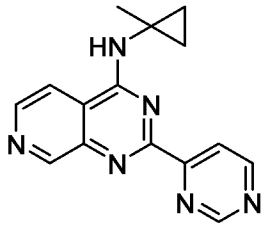
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,73 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,58 (d, J=5,8 Гц, 2H), 8,52 (dd, J=5,8, 1,0 Гц, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,75 (d, J=5,0 Гц, 1H), 2,59 (s, 3H), 1,85 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 348,1.

Пример 158: N–(1–метилциклобутил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 13,11 (s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,47 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,14 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,07 (s, 1H), 2,48–2,41 (m, 2H), 2,25 (td, J=9,0, 4,3 Гц, 2H), 1,99–1,81 (m, 2H), 1,67 (s, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

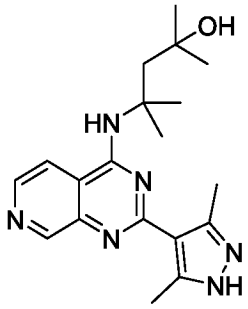
Пример 159: N–(1–метилциклопропил)–2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали с применением процедур, описанных в примере **120**.

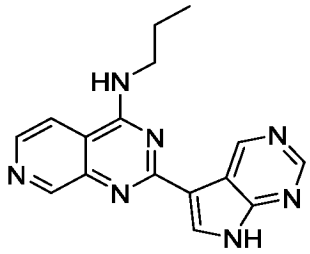
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,15 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,55 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,17–8,09 (m, 2H), 7,98 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,81–7,70 (m, 2H), 1,61 (s, 3H), 1,00–0,94 (m, 2H), 0,91–0,84 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 279,1.

Пример 160: 4–{[2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ол



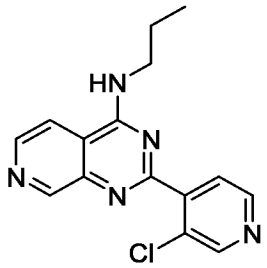
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 12,43 (s, 1H), 9,15 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,46 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,69 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 5,61 (s, 1H), 2,61 (s, 3H), 2,55 (s, 3H), 1,95 (s, 2H), 1,70 (s, 6H), 1,32 (s, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 355,2.

Пример 161: 4–N–пропил–2–{7H–пирроло[2,3–d]пиримидин–5–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



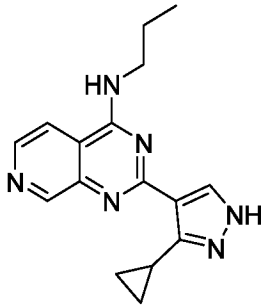
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 12,59 (d, J=2,5 Гц, 1H), 9,87 (s, 1H), 9,12 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,60 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,53 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,36 (d, J=2,6 Гц, 1H), 8,11 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 3,72–3,64 (m, 2H), 1,85–1,72 (m, 2H), 1,03 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 306,1.

Пример 162: 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



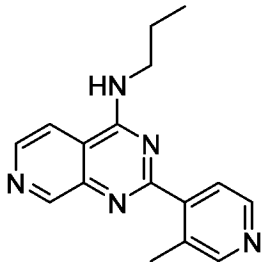
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,15 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,89 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,78 (d, J=0,6 Гц, 1H), 8,68 (dd, J=12,2, 5,2 Гц, 2H), 8,22 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 7,82 (dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 3,60–3,52 (m, 2H), 1,76–1,65 (m, 2H), 0,95 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 300,1.

Пример 163: 2–(3–циклопропил–1H–пиразол–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



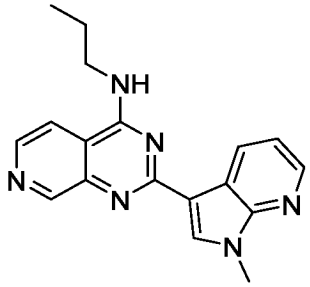
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,47 (s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,54 (t, J=5,4 Гц, 1H), 8,48 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,06 (dd, J=5,6, 0,9 Гц, 1H), 3,55 (dt, J=7,8, 5,9 Гц, 2H), 3,24 (t, J=7,1 Гц, 1H), 3,17 (d, J=5,1 Гц, 1H), 1,77–1,63 (m, 2H), 0,93 (m, 7H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 295,2.

Пример 164: 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



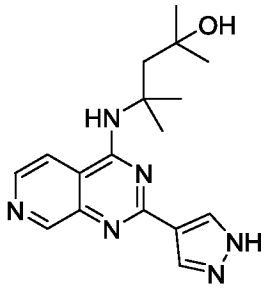
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,14 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,79 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,65 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,58–8,52 (m, 2H), 8,20 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,85 (d, J=5,0 Гц, 1H), 3,62–3,54 (m, 2H), 2,60 (s, 3H), 1,77–1,66 (m, 2H), 0,97 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 280,2.

Пример 165: 2–{1–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



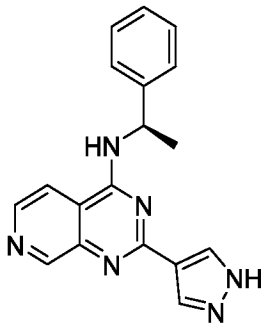
1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 9,06 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,97 (dd, J=7,9, 1,7 Гц, 1H), 8,48 (d, J=5,5 Гц, 2H), 8,44 (s, 1H), 8,36 (dd, J=4,7, 1,7 Гц, 1H), 8,09 (dd, J=5,7, 1,0 Гц, 1H), 7,29 (dd, J=7,9, 4,6 Гц, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,72–3,64 (m, 2H), 1,85–1,73 (m, 2H), 1,04 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 319,2.

Пример 166: 2,4–диметил–4–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ол



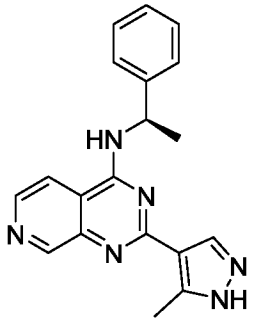
1H ЯМР (DMSO–d6) d 1,29 (s, 6H), 1,72 (s, 6H), 1,98 (s, 2H), 5,5 (s, 1H, NH), 7,69 (d, J=3,6 Гц, 1H), 8,09 (s, 1H) 8,30 (s, 1H), 8,48 (d, J=3,6 Гц, 1H), 8,99 (s, 1H), 9,13 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 327,2.

Пример 167: N–[(1R)–1–фенилэтил]–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



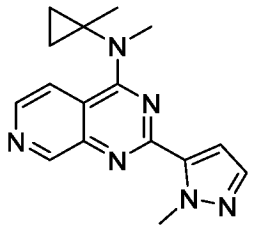
1H ЯМР (MeOH–d4) d 1,70 (d, J=6,8 Гц, 3H), 5,63 (m, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,32 (m, 2H), 7,49 (m, 2H), 8,17 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,20–8,23 (2H), 8,48 (d, J=5,6 Гц, 1H), 9,00 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 317,2.

Пример 168: 2–(5–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



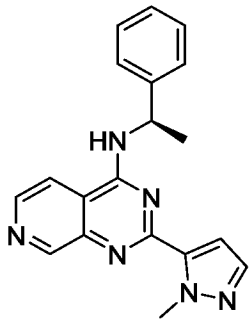
1H ЯМР (MeOH–d4) d1,70 (d, J=6,8 Гц, 3H), 2,54 (s, 3H), 5,65 (m, 1H), 7,20 (m, 1H), 7,32 (m, 2H), 7,44(m, 2H), 8,14–8,18 (2H), 8,46 (s, 1H), 9,00 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 331,2.

Пример 169: N–метил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



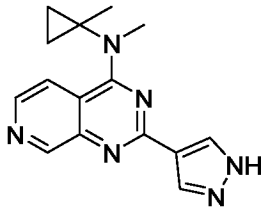
1H ЯМР (DMSO–d6) d 0,95 (s, 4H), 1,70 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 4,35 (s, 3H), 7,04 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,51 (d, J=2,0 Гц, 1H), 8,16 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,56 (d, J=5,6 Гц, 1H), 9,16 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 295,2.

Пример 170: 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



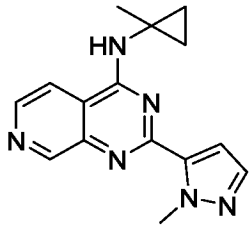
1H ЯМР (MeOH–d4) d 1,60 (d, J=7,2 Гц, 3H), 4,02 (s, 3H), 5,46 (m, 1H), 6,86 (d, J=2 Гц, 1H), 7,10 (m, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,33 (m, 2H), 8,11 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,44 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,96 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 331,2.

Пример 171: N–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



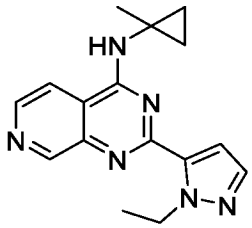
1H ЯМР (DMSO–d6) d 0,92 (s, 4H), 1,68 (s, 3H), 3,37(s, 3H), 8,10 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,13 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,45 (m, 1H), 9,05 (s, 1H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

Пример 172: 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 8,99 (s, 1H), 8,43 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,87 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 7,48 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,08 (d, J=2,0 Гц, 1H), 4,42 (s, 3H), 1,55 (s, 3H), 0,98–0,93 (m, 2H), 0,85–0,80 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

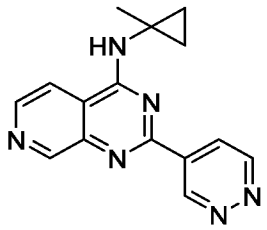
Пример 173: 2–(1–этил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,10 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 7,98 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,56 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,15 (d, J=2,0 Гц, 1H), 5,07 (q, J=7,1 Гц, 2H), 1,59 (s, 3H), 1,49 (t, J=7,1 Гц, 3H), 1,04–0,95 (m, 2H), 0,93–0,76 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 295,2.

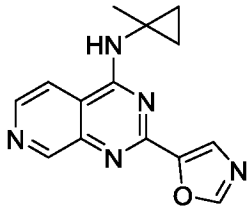
Пример 174: N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридазин–4–ил)пиридо[3,4–

d]пиримидин–4–амин



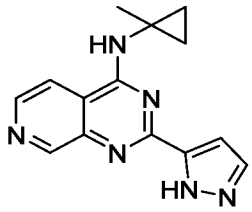
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 10,19 (dd, J=2,1, 1,3 Гц, 1H), 9,39 (dd, J=5,3, 1,2 Гц, 1H), 9,20 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,70 (dd, J=5,3, 2,2 Гц, 1H), 8,57 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,01 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,04–0,98 (m, 2H), 0,97–0,91 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 279,1.

<u>Пример 175:</u> N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–оксазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



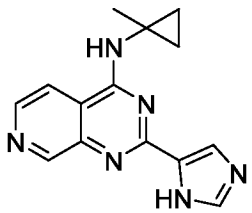
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,12 (s, 1H), 8,53 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,99–7,95 (m, 1H), 7,95 (s, 1H), 1,60 (s, 3H), 0,96 (m, 2H), 0,88 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 268,1.

<u>Пример 176:</u> N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



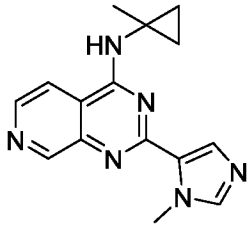
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,09 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,94 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 7,69 (d, J=2,1 Гц, 1H), 7,11 (d, J=2,1 Гц, 1H), 1,60 (s, 3H), 0,94 (m, 2H), 0,90–0,84 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 267,1.

<u>Пример 177:</u> 2–(1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



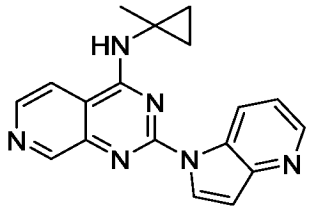
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,06 (s, 1H), 8,44 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,98–7,90 (m, 2H), 1,60 (s, 3H), 0,95 (m, 2H), 0,92–0,84 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 267,1.

Пример 178: 2–(1–метил–1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



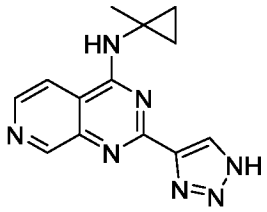
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,03 (s, 1H), 8,41 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,90 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 7,70 (d, J=0,8 Гц, 2H), 4,25 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 0,99–0,94 (m, 2H), 0,85–0,79 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

Пример 179: N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



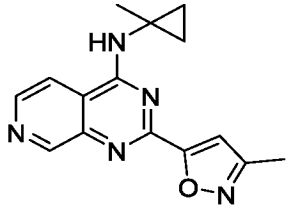
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,69 (d, J=8,3 Гц, 1H), 9,39 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,88 (d, J=3,5 Гц, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,18 (d, J=5,4 Гц, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,10–7,02 (m, 1H), 1,59 (s, 3H), 0,99 (m, 2H), 0,98–0,95 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 317,1.

Пример 180: N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–1,2,3–триазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



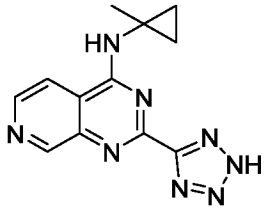
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (s, 1H), 8,64 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,16 (d, J=5,5 Гц, 1H), 1,55 (s, 3H), 0,90 (m, 2H), 0,87 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 268,1.

Пример 181: 2–(3–метил–1,2–оксазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



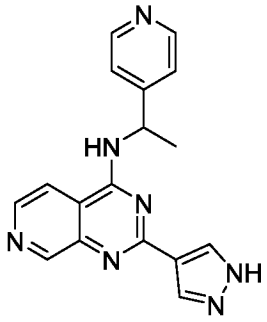
1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,41 (s, 1H), 8,63 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,43 (d, J=5,6 Гц, 1H), 6,98 (s, 1H), 2,44 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 0,99–0,93 (m, 2H), 0,93–0,85 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 282,1.

Пример 182: N–(1–метилциклопропил)–2–(2H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



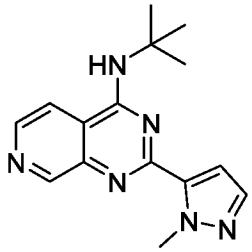
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21 (s, 2H), 8,69 (s, 1H), 8,21 (d, J=5,2 Гц, 1H), 1,57 (s, 3H), 0,89 (m, 2H), 0,85 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 269,1.

Пример 183: 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



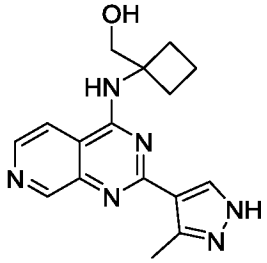
1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,17 (s, 1H), 8,75 (d, J=5,6 Гц, 3H), 8,37 (d, J=4,8 Гц, 1H), 8,32 (d, J=1,6 Гц, 2H), 8,14–8,09 (m, 2H), 5,89 (q, J=7,3 Гц, 1H), 1,84 (d, J=7,2 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 318,1.

Пример 184: N–трет–бутил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



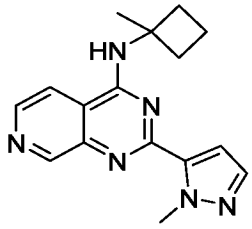
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,13 (d, J=2,5 Гц, 1H), 8,61 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38 (t, J=5,2 Гц, 1H), 7,85 (d, J=7,9 Гц, 1H), 7,53 (d, J=1,9 Гц, 1H), 6,97 (d, J=1,9 Гц, 1H), 4,37 (s, 3H), 1,59 (s, 9H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 283,1.

Пример 185: (1–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанол



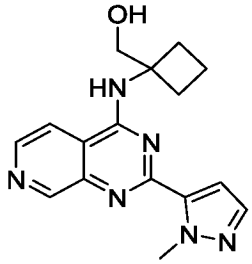
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,07 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 8,38 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,25–8,12 (m, 1H), 3,93 (s, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,39 (t, J=7,8 Гц, 4H), 1,85 (dq, J=12,0, 8,4 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 311,2.

Пример 186: 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



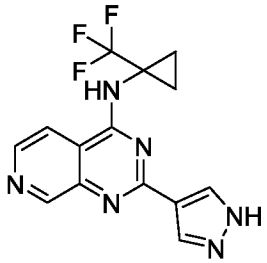
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,12 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,62 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,31–8,24 (m, 1H), 7,53–7,46 (m, 1H), 6,97 (d, J=1,9 Гц, 1H), 4,38–4,31 (m, 3H), 2,48–2,41 (m, 2H), 2,22 (tt, J=8,4, 3,2 Гц, 2H), 1,98–1,78 (m, 2H), 1,65 (s, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 295,2.

Пример 187: (1–{[2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанол



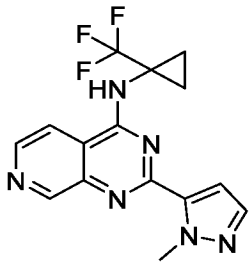
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19–9,11 (m, 1H), 8,76 (s, 1H), 8,63 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,40 (dd, J=5,7, 0,7 Гц, 1H), 7,54–7,47 (m, 1H), 6,95 (d, J=1,9 Гц, 1H), 4,32 (s, 3H), 3,90 (s, 2H), 2,35 (t, J=7,2 Гц, 4H), 1,92–1,76 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 311,2.

Пример 188: 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



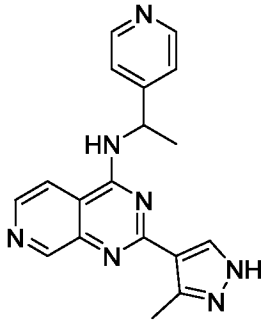
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21 (s, 1H), 9,10 (s, 1H), 8,56 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,27 (s, 2H), 8,16 (d, J=5,7 Гц, 1H), 1,61–1,53 (m, 2H), 1,33 (d, J=6,0 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 321,1.

Пример 189: 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



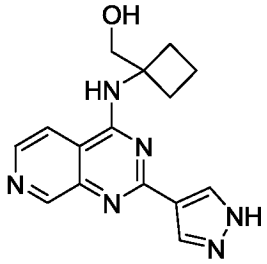
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,32 (s, 1H), 9,19 (d, J=0,7 Гц, 1H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,23 (dd, J=5,7, 0,8 Гц, 1H), 7,58–7,47 (m, 1H), 7,07 (d, J=1,9 Гц, 1H), 4,37 (s, 3H), 1,64–1,49 (m, 2H), 1,37 (d, J=5,8 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 335,1.

Пример 190: 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



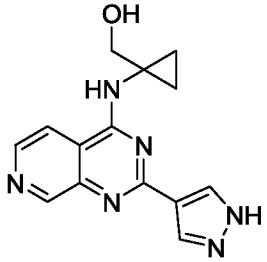
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,00 (d, J=0,7 Гц, 1H), 8,77 (s, 1H), 8,54 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,51–8,47 (m, 2H), 8,30 (dd, J=5,6, 0,8 Гц, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,50–7,40 (m, 2H), 5,54 (d, J=6,6 Гц, 1H), 2,48 (s, 3H), 1,63 (d, J=7,1 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 332,2.

Пример 191: (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанол



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ9,11(m, 2H), 8,69(m, 2H), 8,39 (s, 2H), 3,92 (s, 2H), 2,39 (t, J=7,3 Гц, 4H), 1,87 (p, J=7,7, 6,6 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 297,1.

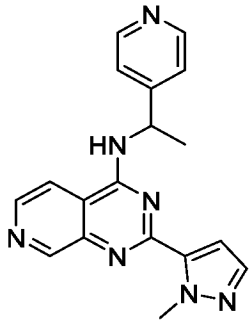
Пример 192: (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)метанол



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ9,65(s, 1H), 9,12 (s, 1H), 8,65 (d, J=5,4 Гц, 1H), 8,41

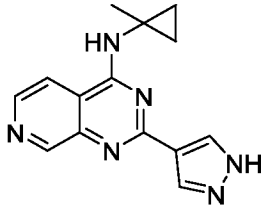
(s, 2H), 8,26 (d, J=5,5 Гц, 1H), 3,73 (m, 2H), 1,06–0,96 (m, 2H), 0,94–0,77 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 283,1.

Пример 193: 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



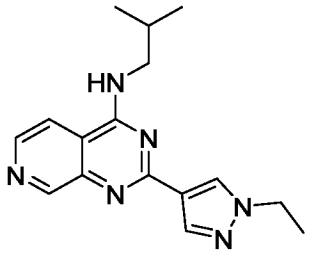
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 8,37 (s, 1H), 7,93 (d, J=6,4 Гц, 2H), 7,85 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,51 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,31 (d, J=6,6 Гц, 2H), 6,63 (d, J=2,0 Гц, 1H), 6,01 (d, J=2,0 Гц, 1H), 4,89 (q, J=7,2 Гц, 1H), 3,43 (s, 3H), 1,00 (d, J=7,2 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 332,2.

Пример 194: N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



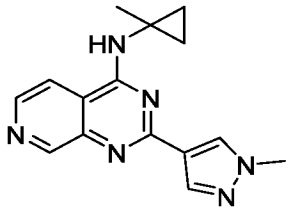
1НЯМР (400 МГц, CD3OD) d 9,03 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,43 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,24 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,93 (dd, J=5,6, 0,8 Гц, 1H), 1,61 (s, 3H), 0,99–0,95 (m, 2H), 0,90–0,85 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 267,1.

Пример 195: 2–(1–этил–1H–пиразол–4–ил)–N–(2–метилпропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



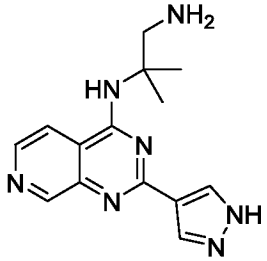
1НЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) d 9,20 (s, 1H), 8,50 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,43 (d, J=5,6 Гц, 1H), 5,87 (br s, 1H), 4,25 (q, J=7,2 Гц, 2H), 3,58 (dd, J=6,8, 6,0 Гц, 2H), 2,11 (нонет, J=6,8 Гц, 1H), 1,56 (t, J=7,2 Гц, 3H), 1,06 (d, J=6,8 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 297,2.

Пример 196: 2–(1–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



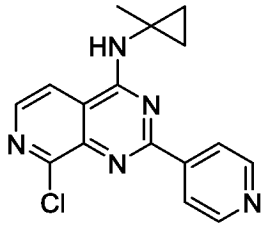
1НЯМР (400 МГц, DMSO–d6) d 8,99 (s, 1H), 8,72 (s, 1H), 8,46 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,05 (s, 1H), 8,03 (d, J=5,6 Гц, 1H), 3,93 (s, 3H), 1,54 (s, 3H), 0,90–0,80 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 281,1.

Пример 197: N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



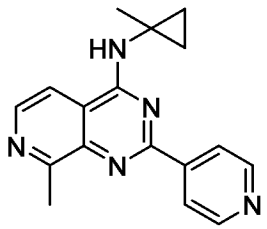
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,05 (s, 1H), 8,56 (d, J=5,4 Гц, 1H), 8,32 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,28 (m, 1H), 7,76 (m, 3H),3,63 (d, J=5,9 Гц, 2H), 1,59 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 284,2.

Пример 198: 8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение **3c**), как на схеме **3**, с применением процедуры из примера **1** с 1–метилциклопропанамином. 1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 8,78–8,66 (m, 2H), 8,61–8,49 (m, 2H), 8,30 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,94 (d, J=5,6 Гц, 1H), 1,63 (s, 3H), 1,04–0,96 (m, 2H), 0,95–0,86 (m, 2H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 312,1.

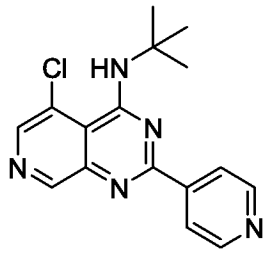
Пример 199: 8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали согласно примеру **198** с применением

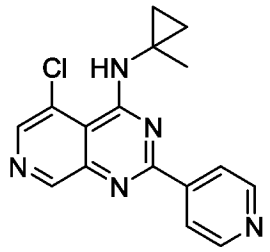
процедуры для промежуточного соединения **6b** с 2,4,6–триметил–1,3,5,2,4,6–триоксатриборинаном вместо 4–пиридинбороновой кислоты. 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 8,79 (d, J=5,1 Гц, 2H), 8,44 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,41 (d, J=5,0 Гц, 2H), 7,98 (dd, J=5,8, 0,8 Гц, 1H), 2,91 (s, 3H), 1,57 (s, 3H), 0,97–0,75 (m, 4H). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 292,2.

Пример 251: N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



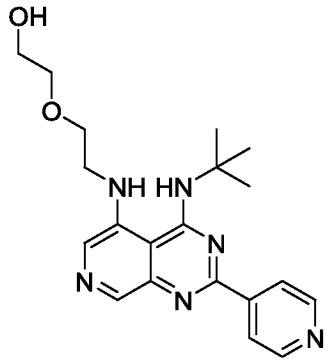
Указанное в заголовке соединение получали из 4,5–дихлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение 5d), как на схеме 5, с применением **стадии C** примера **1** с трет–бутиламином. 1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,07 (s, 1H), 8,73 (s, 2H), 8,55 (s, 1H), 8,46–8,39 (m, 2H), 1,72 (s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 314,1.

Пример 252: 5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали согласно примеру **251** с применением 4,5–дихлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение 5d) и 1–метилциклопропан–1–амина. 1НЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) d 9,18 (s, 1H), 8,81 (br s, 2H), 8,50 (s, 1H), 8,42 (d, J=4,8 Гц, 2H), 8,00 (br s, 1H), 1,64 (s, 3H), 1,00–0,90 (m, 4H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 312,1.

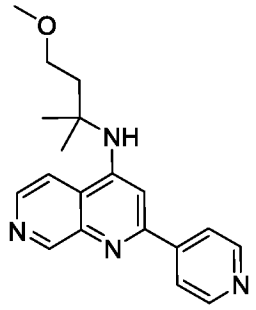
Пример 253: 5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин



N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин

(пример **251**, 10 мг, 0,032 ммоль) и 2–(2–аминоэтокси)этанол (670 мг, 6,37 ммоль) растворяли в NMP (1 мл) в 2–мл микроволновом реакторе. Реакционную смесь нагревали при 160°C в течение 1 ч. (обработка микроволновым излучением). Реакционную смесь охлаждали до к. т. и разбавляли с помощью воды (20 мл), экстрагировали с помощью EtOAc (3×20 мл). Объединенные органические слои высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и выпаривали. Остаток очищали посредством масс–направленной HPLC с получением указанного в заголовке соединения (40%). 1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 8,63 (s, 1H), 8,23 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,18 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,08 (s, 1H), 3,4–3,8 (m, 8H), 1,72 (s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 383,2.

Пример 254: N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



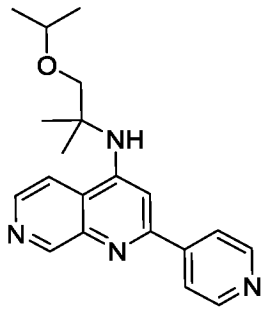
Указанное в заголовке соединение получали из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (промежуточное соединение **6b**) с применением **стадии B**, как на **схеме 6**.

Стадия B. В 20–мл флакон добавляли триэтиламин (0,044 мл, 0,25 ммоль), фторид калия (7,2 мг, 0,124 ммоль), 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин (промежуточное соединение **6b**, 30 мг, 0,124 ммоль) и 4–метокси–2–метилбутан–2–амин (16 мг, 0,137 ммоль) в DMSO (1 мл) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 130°C в течение 24 ч. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (21%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,7 Гц, 1H), 8,71(m, 2H), 8,48(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,09(ddd, J=12,9, 5,2, 1,3 Гц, 2H), 8,05(m, 1H), 7,26(s, 1H), 6,81(s, 1H), 3,50(t, J=6,5 Гц, 2H), 3,22(s, 3H), 2,11(t, J=6,5 Гц, 2H), 1,52(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 323,2.

Примеры 255–268

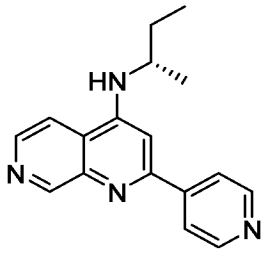
Данные соединения синтезировали в соответствии с протоколом, описанным для примера **1**, с применением 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (промежуточное соединение **6b**) и различных аминов соответственно, за исключением конкретно указанных.

Пример 255: N–[2–метил–1–(пропан–2–илокси)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



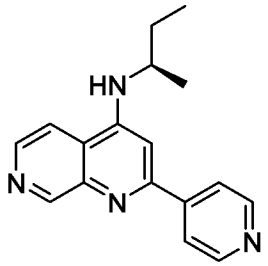
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18(dd, J=7,4, 0,9 Гц, 1H), 8,80(m, 2H), 8,64(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39(dd, J=5,7, 0,9 Гц, 1H), 8,29(d, J=6,1 Гц, 2H), 7,70(s, 1H), 3,90(s, 2H), 3,55–3,50(m, 1H), 1,61(s, 6H), 1,00(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 337,2.

Пример 256: N–[(2S)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



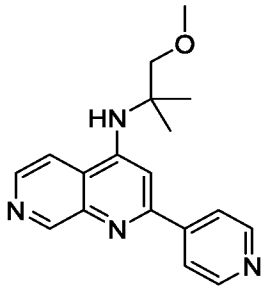
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=7,4, 0,9 Гц, 1H), 8,73(m, 2H), 8,49(m, 1H), 8,29(d, J=6,1 Гц, 1H), 8,20(m, 2H), 7,24(s, 1H), 7,19(d, J=0,9 Гц, 1H), 4,02–3,99(m, 1H), 1,79–1,75(m, 1H), 1,69–1,65(m, 1H), 1,29(m, 3H), 0,09(t, J=4,9 Гц,3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 279,1.

Пример 257: N–[(2R)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



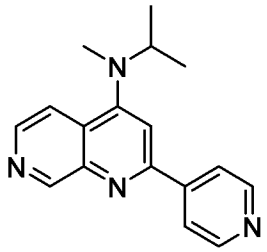
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,21(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,73(m, 2H), 8,49(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,29(dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 8,20(m, 2H), 7,24(s, 1H), 7,19(d, J=8,3 Гц, 1H), 4,02–3,99(dt, J=13,6, 6,5 Гц, 1H), 1,79–1,75(dq, J=14,4, 7,2 Гц, 1H), 1,69–1,65(m, 1H), 1,29(d, J=6,4 Гц, 3H), 0,09(t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 279,3.

Пример 258: N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



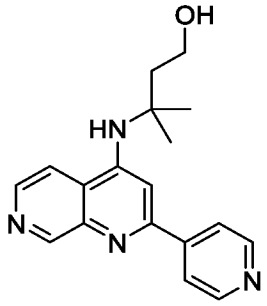
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,25(dd, J=6,6, 0,8 Гц, 1H), 8,77(m, 2H), 8,75(s, 1H), 8,24(dt, J=4,5, 1,9 Гц, 2H), 8,21(s, 1H), 8,11(m, 1H), 7,52(s, 1H), 3,62(s, 2H), 3,34(s, 3H), 1,52(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 309,4.

Пример 259: **N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин**



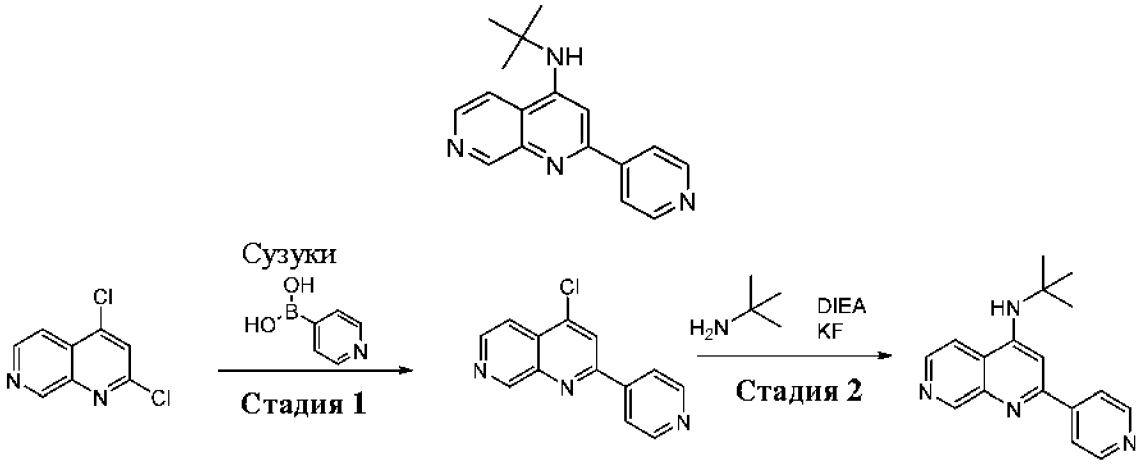
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,34(dd, J=5,2, 0,9 Гц, 1H), 8,77(ddd, J=6,2, 4,4, 1,7 Гц, 2H), 8,50(dd, J=6,5, 5,8 Гц, 1H), 8,20(m, 2H), 7,80(s, 1H), 7,58(s, 1H), 4,20–4,14(m, 1H), 2,97(s, 3H), 1,25(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 279,4.

Пример 260: **3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутан–1–ол**



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,40(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,79(m, 2H), 8,60(d, J=5,6 Гц, 1H), 8,26(m, 2H), 7,95(dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 7,89(s, 1H), 4,55(t, J=6,8 Гц, 2H), 4,08–4,04(q, J=5,2 Гц, 1H), 1,95(t, J=6,9 Гц, 2H), 1,14(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 309,3.

Пример 261: **N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин**

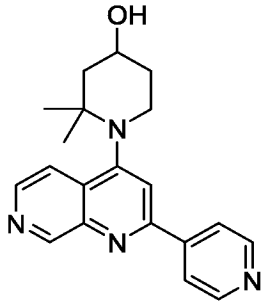


Стадия 1. В 20–мл микроволновой реактор добавляли тетракиспалладий (58,1 мг, 0,050 ммоль), карбонат калия (1,256 мл, 2,51 ммоль) и 2,4–дихлор–1,7–нафтиридин (200 мг, 1,005 ммоль) и пиридин–4–илбороновую кислоту (130 мг, 1,055 ммоль) в

ацетонитриле (объем: 2 мл) с получением оранжевой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 60 мин. в условиях обработки микроволновым излучением. Неочищенную смесь разбавляли с помощью DCM, H_2O, разделяли и экстрагировали с помощью DCM x3. Объединяли органические слои и высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта (62%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,58 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,85–8,78 (m, 4H), 8,32–8,29 (m, 2H), 8,11 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H). LCMS [M+H] = 242.

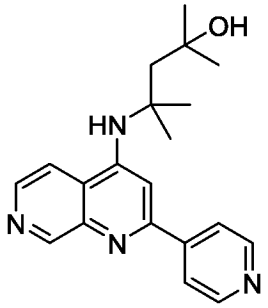
Стадия 2. В 40–мл флакон добавляли фторид калия (11,54 мг, 0,199 ммоль), 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин (40 мг, 0,166 ммоль) и 2–метилпропан–2–амин (0,035 мл, 0,331 ммоль) в DMSO (объем: 2 мл) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 130°C в течение 24 ч. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта (82%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22 (d, J=0,7 Гц, 1H), 8,78–8,72 (m, 2H), 8,48 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,30 (dd, J=6,0, 0,9 Гц, 1H), 8,15–8,06 (m, 2H), 7,28 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 1,56 (s, 9H). LCMS [M+H] = 279,2.

Пример 262: 2,2–диметил–1–[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]пиперидин–4–ол



1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,41 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,80–8,75 (m, 2H), 8,60 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,23–8,20 (m, 2H), 8,18–8,14 (m, 1H), 8,11 (s, 1H), 4,15–3,99 (m, 1H), 3,52 (d, J=16,1 Гц, 1H), 3,16 (s, 1H), 1,86–1,68 (m, 2H), 1,46 (d, J=16,0 Гц, 3H), 1,16–1,00 (m, 3H), 0,87 (d, J=6,8 Гц, 2H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 335,2.

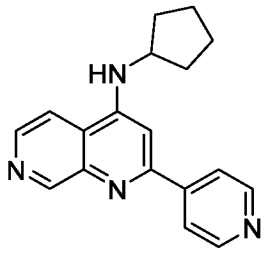
Пример 263: 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пентан–2–ол



1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,22 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78–8,67 (m, 2H), 8,63 (s,

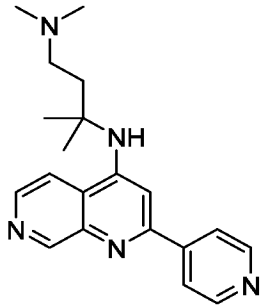
1H), 8,40 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,19–8,09 (m, 2H), 7,81 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 7,36 (s, 1H), 2,08 (s, 2H), 1,75 (s, 6H), 1,47 (d, J=0,7 Гц, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 337,2.

Пример 264: **N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин**



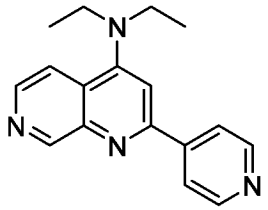
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,26 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,77–8,66 (m, 2H), 8,44 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,23–8,15 (m, 2H), 8,06 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,34 (s, 1H), 6,70 (d, J=6,6 Гц, 1H), 4,40–4,25 (m, 1H), 2,29–2,19 (m, 2H), 1,86–1,68 (m, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 279,1.

Пример 265: **диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутил)амин**



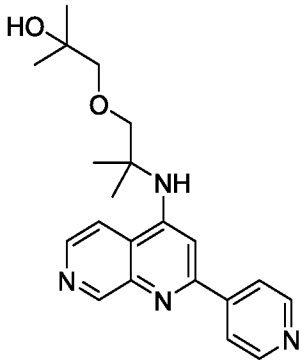
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,40 (s, 1H), 8,91 (s, 2H), 8,62 (d, J=3,5 Гц, 1H), 8,48 (s, 2H), 8,40 (d, J=6,0 Гц, 1H), 7,46 (d, J=2,8 Гц, 1H), 3,28–3,23 (m, 2H), 2,92–2,81 (m, 6H), 2,48 (dd, J=8,3, 5,1 Гц, 2H), 1,71 (d, J=2,7 Гц, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 336,2.

Пример 266: **N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин**



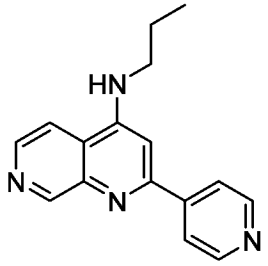
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,35 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78–8,74 (m, 2H), 8,51 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,23–8,19 (m, 2H), 7,90 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,69 (s, 1H), 3,62 (q, J=7,1 Гц, 4H), 1,29 (t, J=7,1 Гц, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 279,2.

Пример 267: **2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ол**



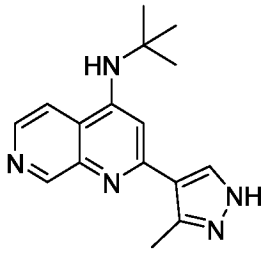
1H ЯМР (500 МГц, Метанол–d4) δ 9,25 (s, 1H), 8,73 (d, J=5,2 Гц, 2H), 8,45 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,14–8,08 (m, 3H), 7,40 (s, 1H), 3,73 (s, 2H), 3,39 (s, 2H), 1,63 (s, 6H), 1,18 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 367,2.

Пример 268: N–пропил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



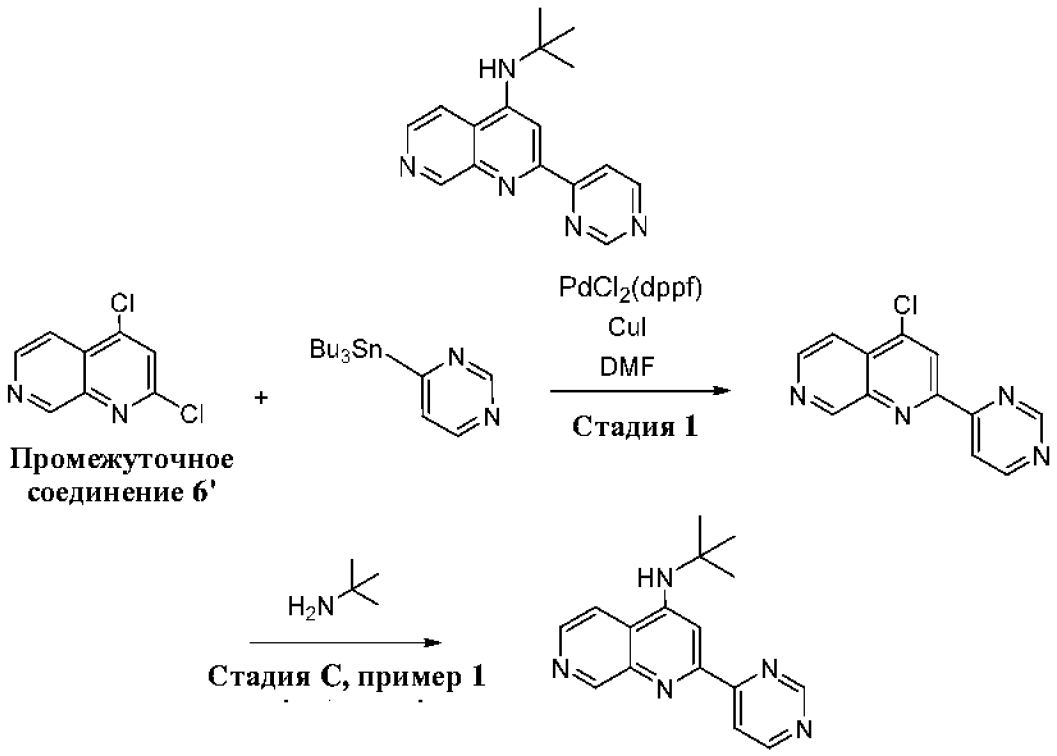
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,22 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,77–8,70 (m, 2H), 8,48 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,22–8,16 (m, 3H), 7,60 (t, J=5,5 Гц, 1H), 7,21 (s, 1H), 3,43 (ddd, J=7,6, 6,6, 5,5 Гц, 2H), 1,79–1,67 (m, 2H), 1,01 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 265,1.

Пример 269: N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



Указанное в заголовке соединение получали из 2,4–дихлор–1,7–нафтиридина (промежуточное соединение **6a'**), как на **схеме 6**, с применением трет–бутил–3–метил–4–(4,4,5,5–тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)–1H–пиразол–1–карбоксилата и трет–бутиламина. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) 12,81(s, 1H), 9,00(d, J=0,7 Гц, 1H), 8,31(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,14(dd, J=5,9, 0,8 Гц, 1H), 8,00(s, 1H), 6,97(s, 1H), 6,36(s, 1H), 2,65(s, 3H), 1,51(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 282,4.

Пример 270: N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин

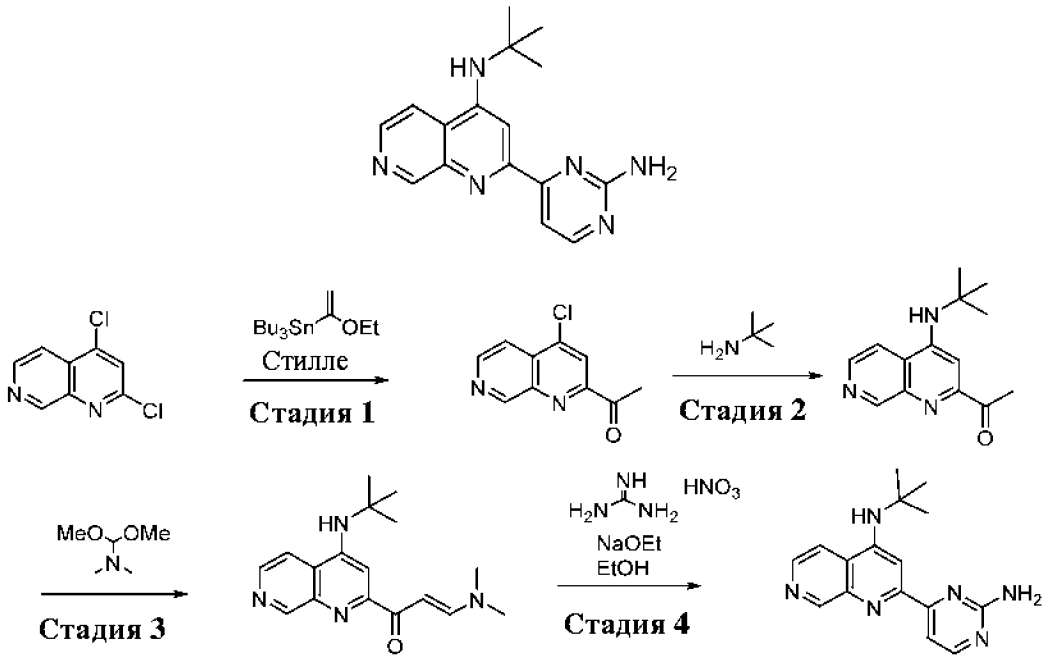


Стадия 1. 2,4–Дихлор–1,7–нафтиридин (6a, 100 мг, 0,502 ммоль) перемешивали в сухом DMF при комнатной температуре. Добавляли 4–(трибутилстаннил)пиримидин (165 мкл, 0,502 ммоль), затем 41 мг аддукта $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ (41 мг, 0,05 ммоль, оранжевое твердое вещество) и наконец CuI (10 мг, 0,05 ммоль, бежевое твердое вещество). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при 130°C. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта, представляющего собой 4–хлор–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин (30%). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 243,6.

Указанное в заголовке соединение: получали с помощью 4–хлор–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридина с применением процедуры, подробно описанной в **стадии C примера 1**.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,48(d, J=1,4 Гц, 1H), 9,25(d, J=0,8 Гц, 1H), 9,00(d, J=5,3 Гц, 1H), 8,54(m, 1H), 8,50(m, 1H), 8,31(dd, J=6,1, 0,9 Гц, 1H), 8,01(s, 1H), 6,80(s, 1H), 1,56(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 280,3.

<u>Пример 271:</u> 2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амин



Стадия 1. 2,4–дихлор–1,7–нафтиридин (**6a'**, 400 мг, 2 ммоль), Pd2(dba)3 (58 мг, 0,1 ммоль) и PPh_3 (53 мг, 0,2 ммоль) перемешивали в 3 мл толуола при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем добавляли 680 микролитров трибутил(1–этоксивинил)станнана (680 микролитров, 2 ммоль) в 1,5 мл толуола и реакционную смесь перемешивали при 110°C в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Добавляли 4 мл 1 н. HCl и смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь затем нейтрализовали с помощью NaOH и экстрагировали с помощью простого эфира. Неочищенный остаток затем очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–70% EtOAc/гексана с получением продукта, представляющего собой 1–(4–хлор–1,7–нафтиридин–2–ил)этанон (40%). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 207,5.

Стадия 2. 1–(4–Хлор–1,7–нафтиридин–2–ил)этанон (38 мг, 0,18 ммоль) перемешивали в DMF (2 мл) при комнатной температуре и дегазировали с помощью N_2. TEA (37 микролитров, 0,27 ммоль) добавляли и перемешивали в течение 5 минут, затем добавляли 14 мг KF(14 мг, 0,27 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем добавляли 2–метилпропан–2–амин (28 микролитров, 0,27 ммоль) и дегазировали, затем перемешивали при 80°C в течение двух ч. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–100% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой 1–(4–(трет–бутиламино)–1,7–нафтиридин–2–ил)этанон (60%). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 244,3.

Стадия 3. 1–(4–(трет–Бутиламино)–1,7–нафтиридин–2–ил)этанон (25 мг, 0,1 ммоль) перемешивали в 0,8 мл DMF/DMA при 110°C в течение 6 ч. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–100% EtOAc/гексан с получением продукта, представляющего собой (E)–1–(4–(трет–бутиламино)–1,7–нафтиридин–2–ил)–3–

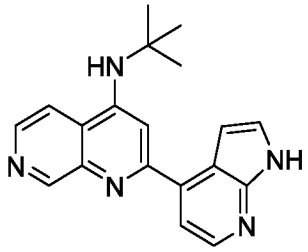
(диметиламино)проп–2–ен–1–он (30%). LCMS (масса/заряд [M+H]+): 299,4.

Стадия 4. (E)–1–(4–(трет–бутиламино)–1,7–нафтиридин–2–ил)–3–(диметиламино)проп–2–ен–1–он (8 мг, 0,027 ммоль) перемешивали в EtOH (0,7 мл) при комнатной температуре. Добавляли нитрат гуанидина (4 мг, 0,034 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 20 минут. Затем добавляли этоксид натрия (в EtOH, 20 микролитров, 0,054 ммоль) и перемешивали с обратным холодильником в течение ночи. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–20% MeOH/DCM с получением указанного в заголовке соединения (30%). 1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,48(m, 1H), 8,41(m, 1H), 8,29(dd, J=6,0, 0,9 Гц, 1H), 7,91(s, 1H), 7,62(d, J=5,0 Гц, 1H), 6,74(s, 2H), 6,65(s, 1H), 1,56(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 295,4.

Примеры 272–274

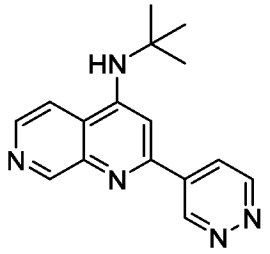
Данные соединения синтезировали в соответствии с протоколом, применяемым для получения **примера 269**, с помощью 2,4–дихлор–1,7–нафтиридина (**6a'**) и различных бороновых кислот или сложных эфиров соответственно.

Пример 272: N–трет–бутил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}–1,7–нафтиридин–4–амин



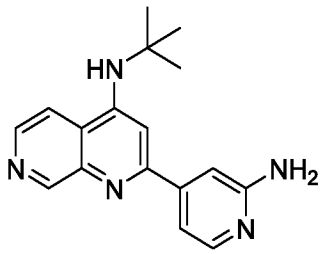
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) 11,86(s, 1H), 9,23(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,50(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,39(d, J=4,9 Гц, 1H), 8,30(m, 1H), 7,63(m, 1H), 7,61(m, 1H), 7,32(s, 1H), 6,96(dd, J=3,4, 1,9 Гц, 1H), 6,67(s, 1H), 1,56(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 318,4.

Пример 273: N–трет–бутил–2–(пиридазин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,97(s, 1H), 9,40(d, J=0,8 Гц, 1H), 9,24(s, 1H), 8,50(d, J=4,6 Гц, 1H), 8,36(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,31(m, 1H), 7,35(s, 1H), 6,80(s, 1H), 1,58(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 280,3.

Пример 274: 2–(2–аминопиридин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амин

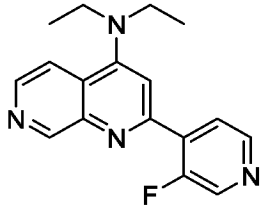


1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,45(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,26(m, 1H), 8,05(dd, J=5,3 0,7 Гц, 1H), 7,20(m, 1H), 7,17(m, 1H), 7,14(m, 1H), 6,63(s, 1H), 6,09(s, 2H), 1,55(s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 294,4.

Примеры 275–286

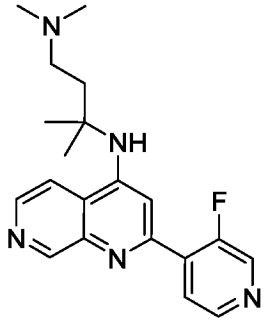
Данные соединения синтезировали в соответствии с протоколом, применяемым для получения **примера 270**. с помощью 2,4–дихлор–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6a'**, **схема 6**) и различных оловоорганических реагентов и аминов соответственно.

Пример 275: N, N–диэтил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



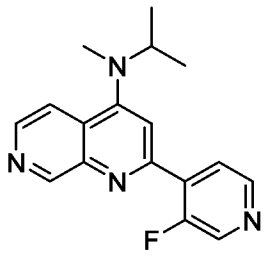
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,33(d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78(d, J=2,7 Гц, 1H), 8,62(dd, J=4,9, 1,1 Гц, 1H), 8,55(d, J=5,9 Гц, 1H), 8,02(dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,88(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,42(d, J=1,5 Гц, 1H), 3,50(q, J=7,0 Гц, 4H), 1,21(t, J=7,0 Гц, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 297,1.

Пример 276: (3–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–3–метилбутил)диметиламин



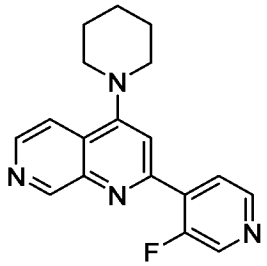
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,74(d, J=2,8 Гц, 1H), 8,60(dd, J=4,9, 1,1 Гц, 1H), 8,53(d, J=5,8 Гц, 1H), 8,04(dd, J=6,9, 4,9 Гц, 1H), 7,91–7,83(s, 1H), 7,25(d, J=1,4 Гц, 1H), 2,60–2,54(m, 2H), 2,33–2,24(m, 6H), 1,96–1,88(m, 2H), 1,51(s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 354,2.

Пример 277: 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



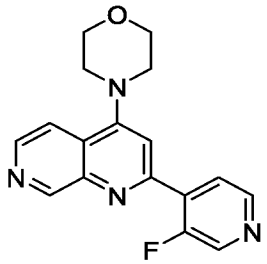
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,33(m, 1H), 8,78(d, J=2,7 Гц, 1H), 8,61(dd, J=4,9, 1,1 Гц, 1H), 8,55(dd, J=5,9, 2,5 Гц, 1H), 8,05–8,01(dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,85(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,41(d, J=1,4 Гц, 1H), 4,20–4,14(m, 1H), 2,93(s, 3H), 1,28(m, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 297,1.

<u>Пример 278:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(пиперидин–1–ил)–1,7–нафтиридин



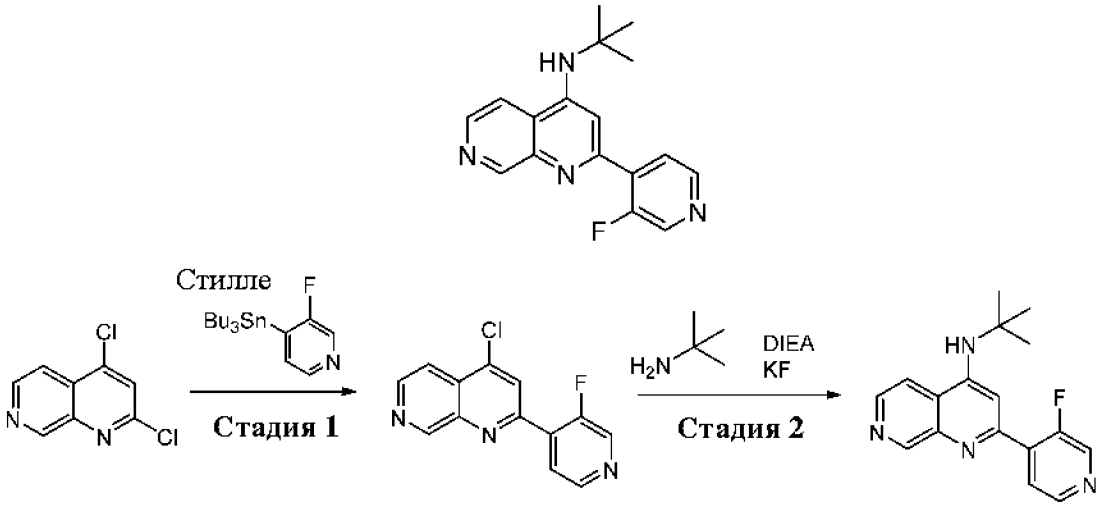
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,39(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,78(d, J=2,7 Гц, 1H), 8,63(m, 1H), 8,60(m, 1H), 8,03(dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,85(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,50(d, J=1,5 Гц, 1H), 3,32–3,28(m, 4H), 1,87–1,79(m, 4H), 1,72–1,65(m, 2H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 309,4.

<u>Пример 279:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(морфолин–4–ил)–1,7–нафтиридин



1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,40(d, J=0,8 Гц, 1H), 8,79(d, J=2,6 Гц, 1H), 8,62(m, 1H), 8,60(m, 1H), 8,03(dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,95(dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,54(d, J=1,4 Гц, 1H), 3,91–3,86(m, 4H), 3,36–3,33(m, 4H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 311,1.

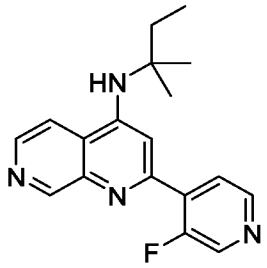
<u>Пример 280:</u> N–трет–бутил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



Стадия 1. В 20–мл микроволновом реакторе перемешивали 2,4–дихлор–1,7–нафтиридин (**6a**, 100 мг, 0,502 ммоль) в сухом DMF (1 мл) при комнатной температуре. Добавляли 3–фтор–4–(трибутилстаннил)пиридин (194 мг, 0,502 ммоль), затем аддукт $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ (41,0 мг, 0,050 ммоль) и CuI (9,6 мг, 0,050 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 0,5 часа при 130°C. Неочищенную смесь разбавляли с помощью DCM, H_2O, разделяли и экстрагировали с помощью DCM x3. Объединяли органические слои и высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта, представляющего собой 4–хлор–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин (71%). 1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,56 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,83 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,74 (d, J=2,9 Гц, 1H), 8,67 (dd, J=5,0, 1,2 Гц, 1H), 8,44 (d, J=1,4 Гц, 1H), 8,18 (dd, J=6,7, 4,9 Гц, 1H), 8,14 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H). LCMS [M+H] = 260.

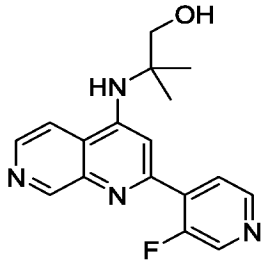
Стадия 2. В 40–мл флакон добавляли фторид калия (7 мг, 0,12 ммоль), 4–хлор–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин (26 мг, 0,10 ммоль) и 2–метилпропан–2–амин (0,035 мл, 0,331 ммоль) в DMSO (объем: 1 мл) с получением желтой суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 130°C в течение 24 ч. Растворитель выпаривали в потоке воздуха. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением продукта (42%). 1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,24 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,65 (d, J=3,0 Гц, 1H), 8,59 (dd, J=4,9, 1,2 Гц, 1H), 8,46 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 8,06 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 7,48 (d, J=1,4 Гц, 1H), 6,30 (s, 1H), 1,61 (s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД $[M+H]^+$): 297,1.

<u>Пример 281:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



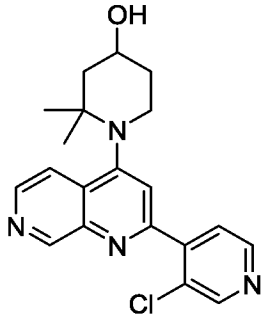
1H ЯМР (500 МГц, Ацетон–d6) δ 9,24 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,64 (d, J=3,0 Гц, 1H), 8,58 (dd, J=4,9, 1,2 Гц, 1H), 8,47 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 8,07 (dd, J=5,9, 0,9 Гц, 1H), 7,47 (d, J=1,4 Гц, 1H), 6,12 (s, 1H), 2,03–1,98 (m, 2H), 1,56 (s, 6H), 0,94 (t, J=7,5 Гц, 3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 311,2.

<u>Пример 282:</u> 2–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–2–метилпропан–1–ол



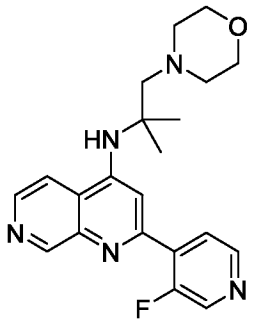
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,24 (d, J=0,8 Гц, 1H), 8,59 (dd, J=4,9, 1,2 Гц, 1H), 8,49 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,97 (dt, J=5,8, 1,3 Гц, 1H), 7,50 (d, J=1,4 Гц, 1H), 6,29 (s, 1H), 3,78 (d, J=5,6 Гц, 2H), 1,56 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 313,1.

<u>Пример 283:</u> 1–[2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]–2,2–диметилпиперидин–4–ол



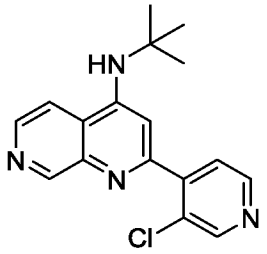
1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,40(s, 1H), 8,79(d, 1H), 8,62(d, 1H), 8,60(d, 1H), 8,03(dd, 1H), 7,95(d, 1H), 7,54(s, 1H), 3,91–3,86(m, 4H), 3,36–3,33(m, 4H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 311,3.

<u>Пример 284:</u> 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–1,7–нафтиридин–4–амин



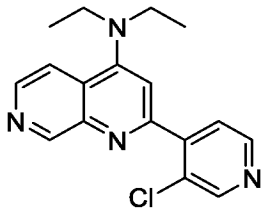
1H ЯМР (500 МГц, Ацетон–d6) δ 9,25 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,64 (d, J=3,0 Гц, 1H), 8,59 (dd, J=4,9, 1,2 Гц, 1H), 8,52 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,15 (dd, J=6,8, 4,9 Гц, 1H), 7,89 (dd, J=5,9, 0,8 Гц, 1H), 7,54 (d, J=1,4 Гц, 1H), 6,77 (s, 1H), 3,70–3,64 (m, 4H), 2,75 (s, 2H), 2,69–2,62 (m, 4H), 1,60 (s, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 382,2.

Пример 285: **N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин**



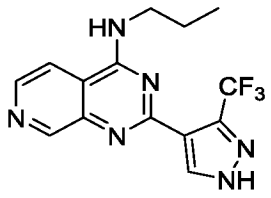
1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,20 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,78–8,69 (m, 1H), 8,65 (d, J=4,9 Гц, 1H), 8,47 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,06 (dt, J=5,9, 1,0 Гц, 1H), 7,79–7,70 (m, 1H), 7,25 (s, 1H), 1,60 (s, 9H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 313,1.

Пример 286: **2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N, N–диэтил–1,7–нафтиридин–4–амин**



1H ЯМР (400 МГц, Ацетон–d6) δ 9,31 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,75 (d, J=0,6 Гц, 1H), 8,67 (d, J=4,9 Гц, 1H), 8,54 (d, J=5,9 Гц, 1H), 7,93 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 7,76 (dd, J=4,9, 0,6 Гц, 1H), 7,39 (s, 1H), 3,58 (q, J=7,1 Гц, 4H), 1,29 (t, J=7,1 Гц, 6H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД [M+H]+): 313,1.

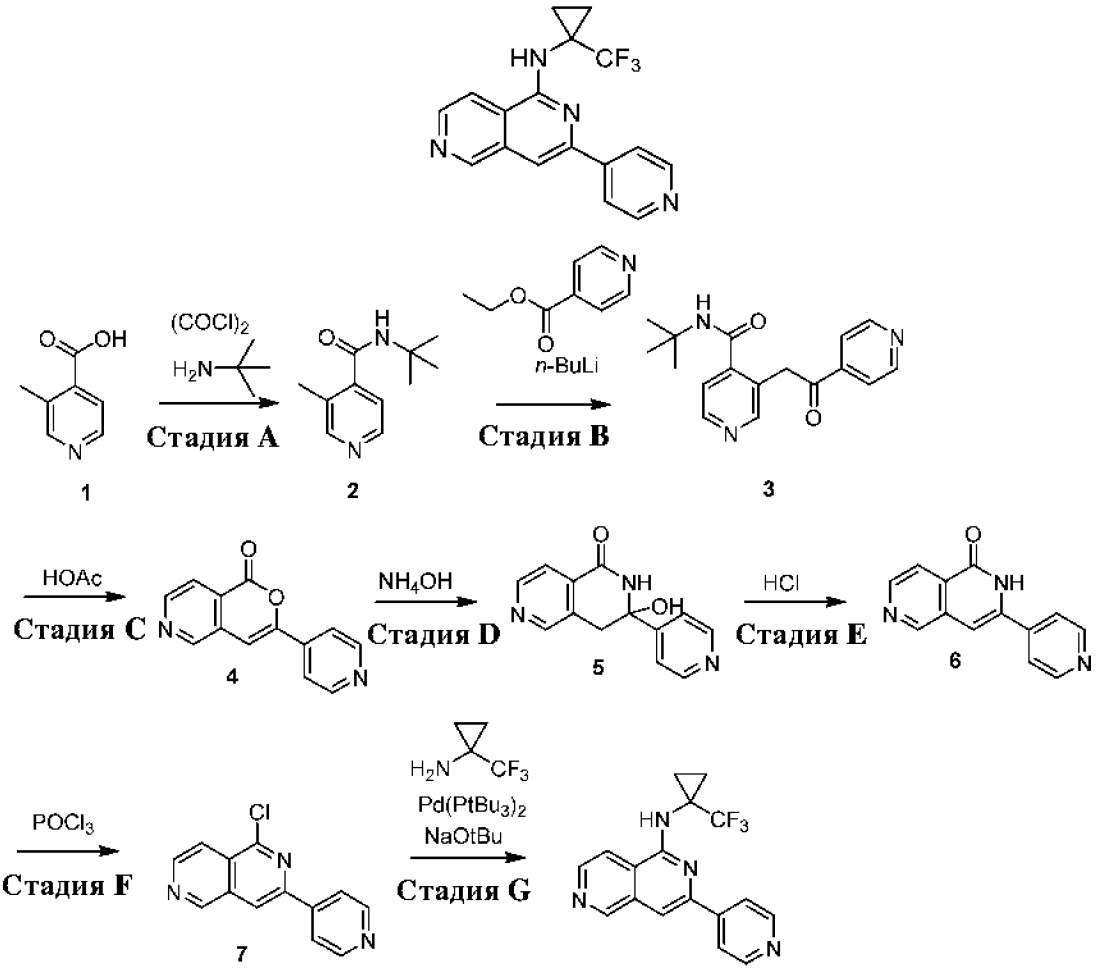
Пример 287: **N–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин**



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с протоколом, описанным для **примера 111**, с применением 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**), и пропан–1–амина, и трет–бутил–4–(4,4,5,5–

тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)–3–(трифторметил)–1H–пиразол–1–карбоксилата. 1H ЯМР (500 МГц, DMSO–d6) δ 13,81 (s, 1H), 9,01 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,64 (t, J=5,7 Гц, 1H), 8,61–8,57 (m, 1H), 8,55 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,11 (dd, J=5,6, 1,0 Гц, 1H), 3,64–3,56 (m, 2H), 1,73–1,62 (m, 2H), 0,96 (t, J=7,4 Гц, 3H). LCMS (МАССА/ЗАРЯД $[M+H]^+$): 323,1.

Пример 288: 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амин



Стадия A. К суспензии 3–метилизоникотиновой кислоты (**1**) (10 г, 72,9 ммоль) в дихлорметане (200 мл) добавляли DMF (200 мл) при 0°C. Этилхлорформиат (8,6 мл, 12,5 г, 98,4 ммоль) добавляли по каплям в течение 10 мин. при 0°C до получения смеси, которую перемешивали при 0°C в течение 15 мин. Добавляли по каплям *трет*–бутиламин (35,0 мл, 24,2 г, 330,0 ммоль) к реакционной смеси в течение 15 мин. при 0°C и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который подвергали хроматографии (гексаны:EtOAc) с получением **2** (11,6 г, 83%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 8,46 (s, 1 H), 8,43 (d, J=5,0 Гц, 1 H), 7,20 (d, J=5,0 Гц, 1 H), 2,29 (s, 3H), 1,37 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 193.

Стадия B. К раствору **2** (11,6 г, 60,3 ммоль) в THF (440 мл) добавляли по каплям раствор n–BuLi (58,0 мл, 145,0 ммоль, 2,5 М в гексанах) в течение 15 мин. при –45°C в атмосфере N_2 с получением смеси, которую перемешивали в течение 45 мин. при –45°C. Затем добавляли по каплям раствор этилизоникотината (10,0 г, 66,3 моль) в THF (20 мл) в

течение 15 мин. при –45°C. Обеспечивали нагревание реакционной смеси до комнатной температуры в течение 2 ч. и выливали в насыщенный водный раствор NH_4Cl (1000 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (3 × 400 мл). Объединенные органические слои промывали с помощью насыщенного водного раствора NaCl (100 мл), высушивали над $MgSO_4$ и выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного **3**. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 298. Неочищенный продукт применяли на следующей стадии без очистки.

Стадия C. Раствор неочищенного **3** из стадии B в уксусной кислоте (200 мл) нагревали при 100°C в течение 16 ч., охлаждали до комнатной температуры и концентрировали до ~80 мл при пониженном давлении. Добавляли воду (120 мл) и смесь фильтровали с получением белого осадка, который промывали с помощью воды (2×50 мл) и высушивали при пониженном давлении с получением неочищенного **4** (8,08 г). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 225. Неочищенный продукт применяли на следующей стадии без очистки.

Стадия D. К суспензии неочищенного **4** (8,08 г) в EtOH (100 мл) добавляли водный раствор NH_4OH (80 мл, 28,5%) при комнатной температуре с получением смеси, которую перемешивали в течение 2,5 ч. и выпаривали с получением неочищенного **5**. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 242. Неочищенный продукт применяли на следующей стадии без очистки.

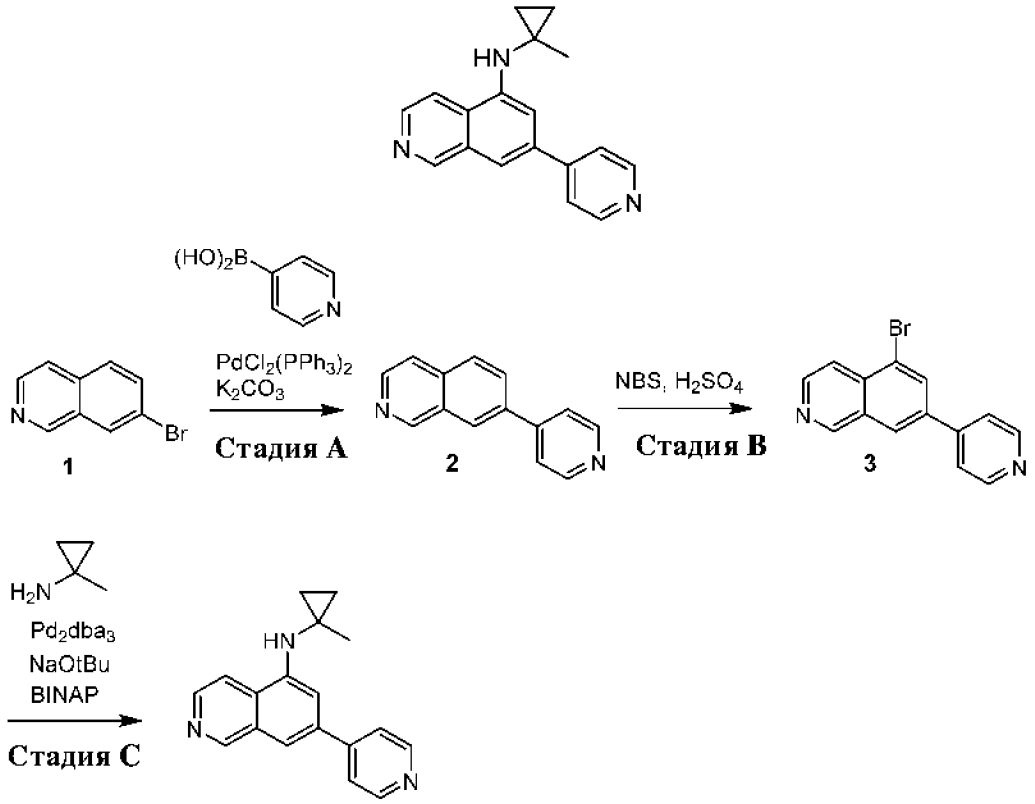
Стадия E. К суспензии неочищенного соединения **5** из стадии D в EtOH (100 мл) добавляли воду (20 мл) и затем добавляли водный раствор HCl (12 M, 25 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 19 ч. при комнатной температуре и фильтровали с получением белого твердого вещества, которое высушивали при пониженном давлении с получением неочищенного **6** (10,2 г). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 224. Неочищенный продукт применяли на следующей стадии без очистки.

Стадия F: Суспензию неочищенного **6** (10,2 г) в $POCl_3$ (75 мл) очень медленно нагревали в открытом толстостенном сосуде (350 мл) высокого давления с закругленным днищем от ChemGlass, пока температура не достигала 100°C, и перемешивали при 100°C в течение 30 мин. Затем герметичный сосуд закрывали и реакционную смесь нагревали при 135°C в течение 14 ч. Удаляли $POCl_3$ при пониженном давлении и остаток смешивали с водой со льдом (50 г льда и 50 мл воды). Регулировали pH смеси до ~7 с помощью водного раствора NaOH (1 M) и затем до ~10 с помощью насыщенного водного раствора Na_2CO_3. Фильтрация смеси обеспечивала получение белого твердого вещества, которое высушивали при пониженном давлении с получением **7** (7,1 г, выход 49% за 5 стадий, начиная с **2**). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,59 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,89 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,78 (d, J=4,8 Гц, 2H), 8,15 (d, J=4,8 Гц, 2H), 8,14 (d, J=5,6 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 242.

Стадия G. К раствору промежуточного соединения **7** (60,0 мг, 0,25 ммоль) и 1–(трифторметил)циклопропан–1–амина (93,0 мг, 0,74 ммоль) в диоксане (1,0 мл) добавляли бис(три–трет–бутилфосфин)палладий (13,0 мг, 0,2 микромоль) и *трет*–бутоксид натрия

(71,0 мг, 0,74 ммоль). Реакционную смесь нагревали в атмосфере N_2 при 130°C в течение ночи и концентрировали с получением остатка, который подвергали хроматографии (MeOH/DCM) с получением указанного в заголовке соединения. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,35 (s, 1H), 8,95 (d, J=8,0 Гц, 2H), 8,75 (d, J=4,0 Гц, 1H), 8,71 (s, 1H), 8,57 (d, J=8,0 Гц, 2H), 8,34 (s, 1H), 8,31 d, J=4,0 Гц, 1H), 1,57 (m, 2H), 1,31 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 331.

Пример 289: **N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амин**



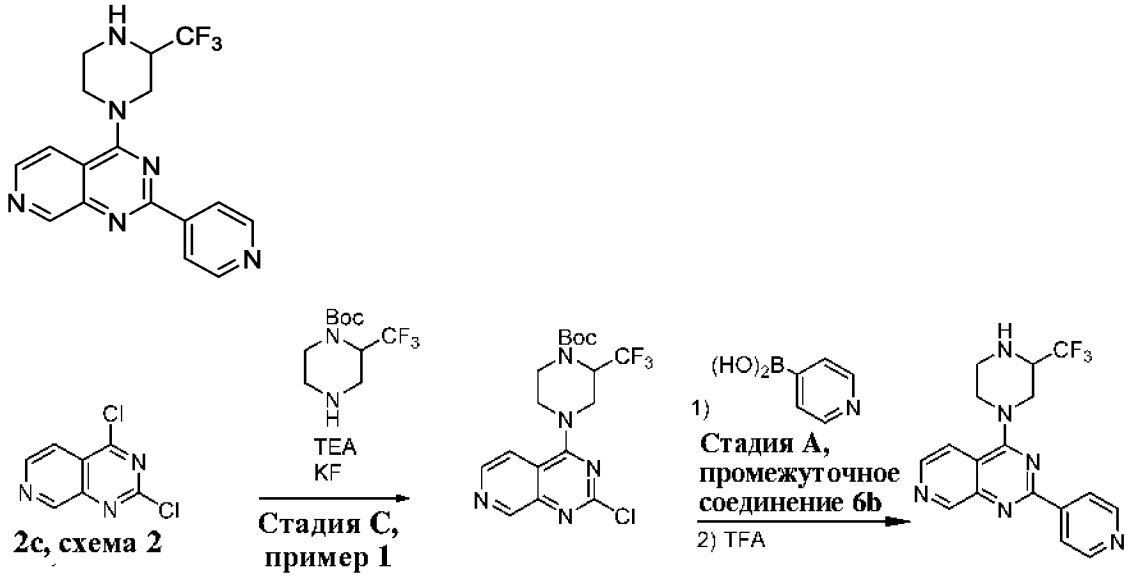
Стадия A. Суспензию 7–бромизохинолина (**1**) (300 мг, 1,44 ммоль), пиридин–4–илбороновой кислоты (213 мг, 1,73 ммоль), дихлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) ($PdCl_2(PPh_3)_2$, 98 мг, 0,14 ммоль) и карбоната калия (2 н., 4,3 мл) в DMF (7 мл) перемешивали и нагревали при 100°C в течение 3 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит. Раствор разбавляли с помощью воды и экстрагировали с помощью EtOA x3. Объединенные органические слои промывали с помощью насыщенного водного раствора NaCl, высушивали над $MgSO_4$ и выпаривали при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением 7–(пиридин–4–ил)изохинолина (**2**, 282 мг) в виде бледно–коричневого масла. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 207.

Стадия B. К раствору 7–(пиридин–4–ил)изохинолина (**2**) (282 мг, 1,37 ммоль) в концентрированной H_2SO_4 (3 мл) добавляли N–бромсукцинимид (NBS, 488 мг, 2,74 ммоль) при 0°C. Обеспечивали нагревание реакционной смеси до комнатной температуры в течение 2 ч. и выливали ее в ледяную воду (20 мл) и добавляли насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ до pH ~8. Водный слой экстрагировали с помощью EtOA x3.

Объединенные органические слои промывали с помощью насыщенного водного раствора NaCl, высушивали над $MgSO_4$ и выпаривали при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт очищали посредством флэш–хроматографии на системе COMBIFLASH® (ISCO) с применением 0–10% MeOH/DCM с получением 5–бром–7–(пиридин–4–ил)изохинолина (**3**, 110 мг). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 285/287.

Стадия C. Суспензию 5–бром–7–(пиридин–4–ил)изохинолина (**3**) (30 мг, 0,105 ммоль), 1–метилциклопропан–1–амина гидрохлорида (28,3 мг, 0,263 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладия(0) (Pd_2dba_3, 9,7 мг, 0,0105 ммоль), 2,2'–бис(дифенилфосфино)–1,1'–бинафтила (BINAP, 6,5 мг, 0,0105 ммоль) и *трет*–бутоксида натрия (44,3 мг, 0,462) в толуоле (1,5 мл) нагревали в атмосфере N_2 при 90°C в течение 16 ч., охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Остаток разбавляли в MeOH и фильтровали, затем очищали посредством масс–направленной препаративной HPLC с обращенной фазой с помощью 10–90% ацетонитрил/вода с получением указанного в заголовке соединения (6 мг). 1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,24 (s, 1H), 8,74 (s, 2H), 8,49 (s, 1H), 7,69–7,60 (m, 2H), 7,59–7,56 (m, 1H), 7,52–7,46 (m, 1H), 7,39–7,36 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 0,98–0,92 (m, 2H), 0,88–0,81 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 276.

<u>Пример 290:</u> 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин

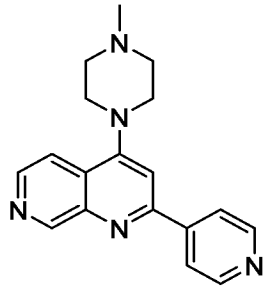


Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с протоколом, описанным для примера **111**, с применением 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (промежуточное соединение **2c**) с трет–бутил–2–(трифторметил)пиперазин–1–карбоксилатом и пиридин–4–илбороновой кислоты с последующим удалением защитной группы N–Boc с помощью TFA.

1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ–d) δ 9,46 (d, J=0,9 Гц, 1H), 8,83–8,78 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,35–8,30 (m, 2H), 7,74 (dd, J=5,8, 0,9 Гц, 1H), 5,80–5,67 (m, 1H), 4,07 (dt, J=24,3, 12,4 Гц, 2H), 3,65 (d, J=14,2 Гц, 1H), 3,34 (d, J=14,6 Гц, 1H), 3,18 (d, J=13,5 Гц, 1H),

2,89 (t, J=11,0 Гц, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 361,1.

Пример 291: 4–(4–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин

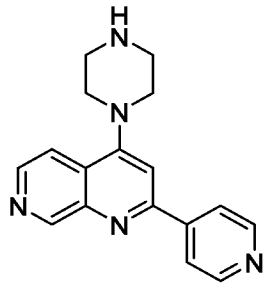


Указанное в заголовке соединение синтезировали из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 1–метилпиперазина следующим образом.

Раствор 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**, 30 мг, 0,124 ммоль), 1–метилпиперазина (50 мг, 0,499 ммоль), фосфата калия (132 мг, 0,621 ммоль), RuPhos Pd G3 (16 мг, 0,019 ммоль) и RuPhos (13 мг, 0,028 ммоль) в диоксане (2 мл) нагревали в атмосфере аргона в сосуде для микроволновой обработки при 130°C в течение 10 мин. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии с применением 20–100% этилацетат/циклогексан, затем 2–30% метанол/дихлорметан с получением указанного в заголовке соединения (21%).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,38 (s, 1H), 8,76 (d, J=4,8 Гц, 2H), 8,55 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,23 (d, J=4,8 Гц, 2H), 7,85 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 3,37 (s, 4H), 2,63 (s, 4H), 2,30 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 306,3, Rt_1=0,38 мин.

Пример 292: 4–(пиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил–пиперазин–1–карбоксилата (стадия 1) и с удалением Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2).

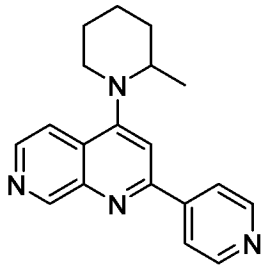
Стадия 2 (удаление Boc–защитной группы).

К раствору трет–бутил–4–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пиперазин–1–карбоксилата (24 мг, 0,061 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли 6 М HCl в диэтиловом эфире (2 мл, 12 ммоль). Полученную желтую суспензию перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Желтый осадок отфильтровывали и промывали с помощью дихлорметана. Хлористоводородную соль растворяли в MeOH и раствор наносили на картридж PoraPak

Rxn CX 20cc (2 г). Картридж затем промывали дважды с помощью 5 мл MeOH. Наконец, соединение элюировали с помощью 7 н. NH_3 в MeOH. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (76%).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,37 (s, 1H), 8,76 (d, J=4,7 Гц, 2H), 8,55 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,22 (d, J=4,8 Гц, 2H), 7,86 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H), 3,28 (s, 4H), 2,99 (s, 4H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 292,3, Rt_1=0,38 мин.

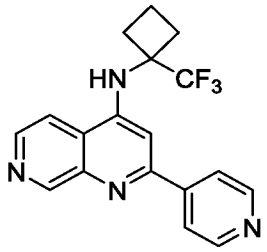
Пример 293: 4–(2–метилпиперидин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 2–метилпиперидина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,48–9,32 (m, 1H), 8,86–8,74 (m, 2H), 8,56 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,30–8,16 (m, 2H), 7,86 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,72 (s, 1H), 4,10 (d, J=6,3 Гц, 1H), 3,53–3,41 (m, 1H), 3,21 (d, J=12,4 Гц, 1H), 2,05 (s, 1H), 1,86–1,74 (m, 3H), 1,62 (s, 2H), 1,06 (d, J=6,5 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 305,3, Rt_1=0,98 мин.

Пример 294: 2–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклобутил)–1,7–нафтиридин–4–амин



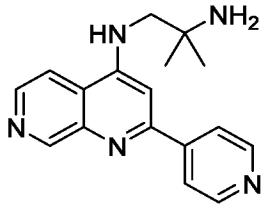
Указанное в заголовке соединение синтезировали из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 1–(трифторметил)циклобутан–1–амина следующим образом.

Раствор 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (промежуточное соединение **6b**, 100 мг, 0,414 ммоль), 1–(трифторметил)циклобутан–1–амина (115 мг, 0,828 ммоль), трет–бутилата калия (139 мг, 1,241 ммоль), $Pd_2(dba)_3$ x $CHCl_3$ (43 мг, 0,042 ммоль) и PhCPhos (36 мг, 0,085 ммоль) в диоксане (5 мл) нагревали в атмосфере аргона в сосуде для микроволновой обработки при 100°C в течение 30 мин. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии с применением 20–100% этилацетат/циклогексан, затем 2–10% метанол/дихлорметан с получением указанного в заголовке соединения (9%).

1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ 9,30 (s, 1H), 8,78–8,74 (m, 2H), 8,57 (d, J=5,8 Гц,

1H), 8,40 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,08–8,04 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 2,85–2,78 (m, 2H), 2,74 (d, J=11,6 Гц, 2H), 2,04 (dd, J=18,6, 9,7 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 345,3, Rt_1=0,84 мин.

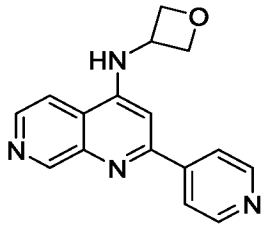
Пример 295: 2–метил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2, описанная в **примере 292**).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,24 (s, 1H), 8,75 (d, J=5,14 Гц, 2H), 8,51 (d, J=5,75 Гц, 1H), 8,26 (d, J=5,75 Гц, 1H), 8,21 (d, J=5,26 Гц, 2H), 7,40 (s, 1H), 7,29 (br s, 1H), 3,38 (br s, 2H), 1,63–2,22 (m, 2H), 1,16 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,4, Rt_1=0,37 мин.

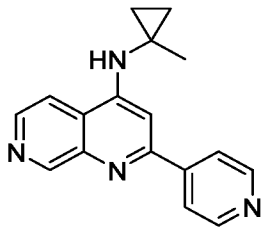
Пример 296: N–(оксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и оксетан–3–амина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,28 (s, 1H), 8,76 (d, J=5,99 Гц, 2H), 8,57 (d, J=5,75 Гц, 1H), 8,29 (d, J=5,75 Гц, 1H), 8,21 (d, J=5,99 Гц, 2H), 8,11 (br d, J=5,75 Гц, 1H), 7,03 (s, 1H), 4,99–5,17 (m, 3H), 4,73 (t, J=5,93 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 279,3, Rt_1=0,49 мин.

Пример 297: N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин

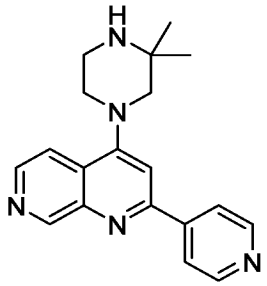


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 1–

метилциклопропан–1–амина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,34 (s, 1H), 8,78 (d, J=5,75 Гц, 2H), 8,48 (d, J=5,87 Гц, 1H), 8,20 (d, J=5,87 Гц, 2H), 8,07 (d, J=5,87 Гц, 1H), 7,69 (s, 1H), 3,29 (s, 3H), 3,14–3,20 (m, 1H), 0,89–0,97 (m, 2H), 0,52–0,61 (m, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 277,3, Rt_1=0,73 мин.

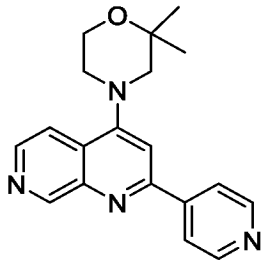
Пример 298: 4–(3,3–диметилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил–2,2–диметилпиперазин–1–карбоксилата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2, описанная в **примере 292**).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,41 (s, 1H), 8,79 (d, J=6,0 Гц, 2H), 8,59 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,26 (d, J=6,0 Гц, 2H), 7,90 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 3,31 (s, 1H), 3,25 (d, J=4,9 Гц, 2H), 3,10 (s, 4H), 1,26 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 320,3, Rt_1=0,45 мин.

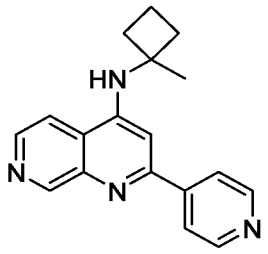
Пример 299: 2,2–диметил–4–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)морфолин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 2,2–диметилморфолина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,43 (s, 1H), 8,80 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,61 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,27 (d, J=6,0 Гц, 2H), 7,93 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,75 (s, 1H), 4,01–3,94 (m, 2H), 3,31 (s, 2H), 3,21 (s, 2H),1,39 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 321,3, Rt_1=0,81 мин.

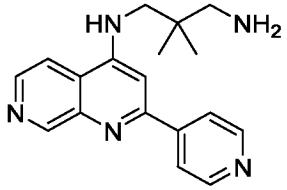
Пример 300: N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и 1–метилциклобутан–1–амина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,23 (s, 1H), 8,75 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,49 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,26 (d, J=5,8 Гц, 1H), 8,08 (d, J=5,9 Гц, 2H), 7,64 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 2,45 (t, J=10,4 Гц, 2H), 2,32 (t, J= 9,2 Гц, 2H), 1,97 (ddd, J=25,6, 20,0, 9,7 Гц, 2H), 1,62 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 291,3, Rt_1=0,70 мин.

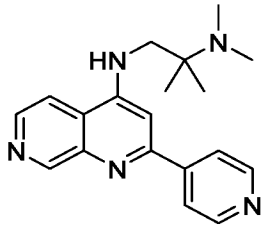
<u>Пример 301:</u> 2,2–диметил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил(3–амино–2,2–диметилпропил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2, описанная в **примере 292**).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,20 (s, 1H), 8,72 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,47 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,17 (d, J=6,0 Гц, 2H), 8,01 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,31 (s, 1H), 3,36 (s, 2H), 3,27 (s, 2H), 2,60 (s, 2H), 0,97 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 308,3, Rt_1=0,41 мин.

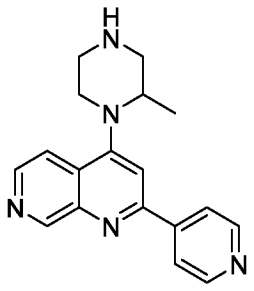
<u>Пример 302:</u> N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и N^2,N^2,2–триметилпропан–1,2–диамина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,27 (s, 1H), 8,76 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,54 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,23 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,05 (s, 1H), 7,33 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 3,42 (s, 2H), 2,29 (d, J=15,6 Гц, 6H), 1,16 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 322,3, Rt_1=0,39 мин.

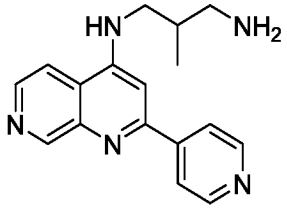
Пример 303: **4–(2–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил–3–метилпиперазин–1–карбоксилата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2, описанная в **примере 292**).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,44 (s, 1H), 8,80 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,60 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,28 (d, J=5,9 Гц, 2H), 7,98 (d, J=5,7 Гц, 1H), 7,84 (s, 1H), 4,08 (d, J=5,9 Гц, 1H), 3,60 (t, J=9,6 Гц, 1H), 3,42 (dd, J=12,3, 2,9 Гц, 1H), 3,29–3,17 (m, 2H), 3,12 (t, J=9,3 Гц, 1H), 2,98 (dd, J=12,3, 4,1 Гц, 1H), 1,10 (d, J=6,5 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 306,3, Rt_1=0,43 мин.

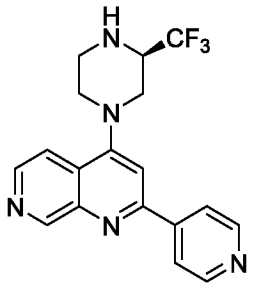
Пример 304: **2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамин**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и трет–бутил–(3–амино–2–метилпропил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением HCl в диэтиловом эфире (стадия 2, описанная в **примере 292**).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,25 (s, 1H), 8,76 (d, J=5,9 Гц, 2H), 8,51 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,24–8,16 (m, 3H), 7,96 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,50 (dd, J=13,4, 6,8 Гц, 1H), 3,40 (dd, J=13,8, 6,8 Гц, 1H), 2,80 (dd, J=12,6, 6,0 Гц, 1H), 2,70 (dd, J=12,5, 6,4 Гц, 1H), 2,11 (dq, J=13,2, 6,6 Гц, 1H), 1,04 (d, J=6,7 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 294,3, Rt_1=0,37 мин.

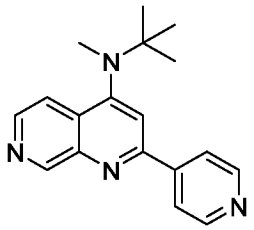
Пример 305: **(R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)–1,7–нафтиридин**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 291** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и (R)–2–(трифторметил)пиперазина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,40 (s, 1H), 8,84–8,71 (m, 2H), 8,58 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,35–8,18 (m, 2H), 7,88 (d, J=5,8 Гц, 1H), 7,79 (s, 1H), 3,79 (s, 1H), 3,66 (d, J=11,9 Гц, 1H), 3,53 (d, J=10,3 Гц, 1H), 3,23–2,94 (m, 5H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 360,3, Rt_1=0,71 мин.

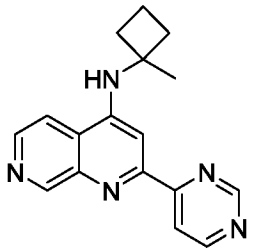
<u>Пример 306:</u> N–(трет–бутил)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6b**) и N,2–диметилпропан–2–амина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,43 (s, 1H), 8,81 (d, J=5,6 Гц, 2H), 8,61 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,24 (d, J=5,7 Гц, 2H), 8,13 (d, J=6,2 Гц, 2H), 2,97 (s, 3H), 1,30 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 293,3, Rt_1=1,01 мин.

<u>Пример 307:</u> N–(1–метилциклобутил)–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амин

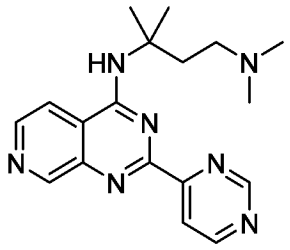


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 270** в 2 стадии из 2,4–дихлор–1,7–нафтиридина (**промежуточное соединение 6a`**) и 4–(трибутилстаннил)пиримидина (стадия 1) и из 4–хлор–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридина и 1–метилциклобутан–1–амина (стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,37 (s, 1H), 9,27 (s, 1H), 9,01 (dd, J=5,2, 1,5 Гц, 1H), 8,59–8,48 (m, 2H), 8,29 (d, J=5,9 Гц, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,58 (d, J=1,5 Гц, 1H), 2,46 (s, 2H),

2,27 (t, J=9,8 Гц, 2H), 1,98 (dq, J=31,9, 10,6, 10,2 Гц, 2H), 1,62 (s, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 292,4, Rt_1=0,82 мин.

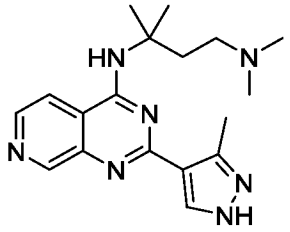
Пример 308: N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 159** в 2 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1) и из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и 4–(трибутилстаннил)пиримидина (стадия 2).

^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ ppm 9,29–9,48 (m, 2 H), 9,22 (s, 1 H), 9,05 (br d, J=5,01 Гц, 1 H), 8,70 (br d, J=5,50 Гц, 1 H), 8,38 (br d, J=5,01 Гц, 1 H), 7,91 (br d, J=4,89 Гц, 1 H), 2,21–2,43 (m, 8 H), 2,05 (br s, 2 H), 1,66 (s, 6 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,3, Rt_1=0,47 мин.

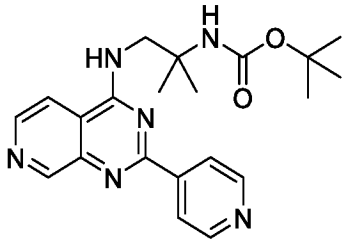
Пример 309: N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 111** в 2 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1) и из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и *трет*–бутил–3–метил–4–(4,4,5,5–тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)–1H–пиразол–1–карбоксилата (CAS №1009071–34–4, стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ ppm 12,57–12,95 (m, 1 H), 8,89–9,00 (m, 2 H), 8,48 (d, J=5,50 Гц, 1 H), 7,93–8,29 (m, 1 H), 7,75 (br d, J=5,38 Гц, 1 H), 2,55–2,84 (m, 5 H), 2,25 (s, 6 H), 1,99 (br s, 2 H), 1,61 (s, 6 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 340,3, Rt_1=0,48 мин.

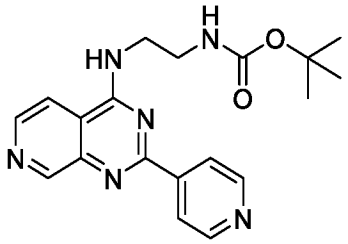
Пример 310: *трет*–бутил–(2–метил–1–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–2–ил)карбамат



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и трет–бутил–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)карбамата.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,21 (s, 1H), 8,78 (dd, J=8,9, 4,9 Гц, 3H), 8,68 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,44–8,34 (m, 2H), 8,22 (d, J=5,7 Гц, 1H), 6,88 (s, 1H), 3,90 (d, J=6,1 Гц, 2H),1,35 (s, 6H), 1,27 (d, J=6,1 Гц, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 395,2, Rt_1=0,97 мин.

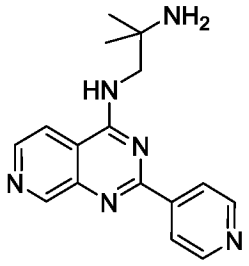
Пример 311: ***трет*–бутил–(2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)этил)карбамат**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и трет–бутил–(2–аминоэтил)карбамата.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,19 (s, 1H), 8,93–8,81 (m, 1H), 8,79–8,68 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,39 (d, J=5,1 Гц, 2H), 8,13 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,03 (t, J=6,0 Гц, 1H),3,73 (q, J=6,2 Гц, 2H), 3,40–3,32 (m, 2H), 1,33 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 367,2, Rt_1=0,78 мин.

Пример 312: **2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамин**

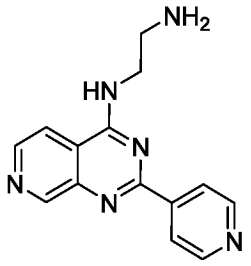


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и трет–бутил–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением TFA (стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,18 (s, 1H), 8,83–8,74 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,38–8,33 (m, 2H), 8,31 (d, J=5,6 Гц, 1H), 3,70 (s, 2H), 1,13 (s, 6H). LCMS (масса/заряд

$[M+H]^+$): 295,2, Rt_1=0,41 мин.

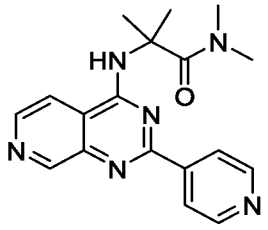
Пример 313: N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)этан–1,2–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и трет–бутил–(2–аминоэтил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением TFA (стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,18 (s, 1H), 8,81–8,71 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,43–8,30 (m, 2H), 8,20 (d, J=5,6 Гц, 1H), 3,73 (t, J=6,4 Гц, 2H), 2,94 (t, J=6,4 Гц, 2H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 267,2, Rt_1=0,38 мин.

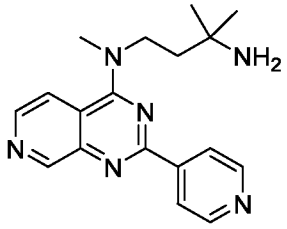
Пример 314: N, N,2–триметил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамид



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и 2–амино–N, N,2–триметилпропанамида.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,22 (s, 1H), 8,74 (dd, J=6,9, 2,4 Гц, 3H), 8,68 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,38 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,36–8,31 (m, 2H), 2,95–2,69 (m, 6H), 1,6(s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 337,2, Rt_1=0,58 мин.

Пример 315: N^1,3–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин

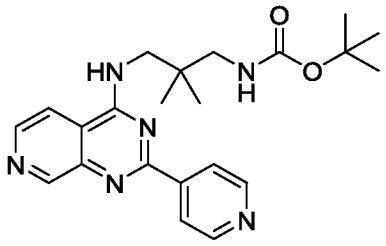


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и N^1,3–диметилбутан–1,3–диамина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,20 (s, 1H), 8,83–8,69 (m, 2H), 8,55 (d, J=5,8 Гц,

1H), 8,40–8,29 (m, 2H), 8,12 (d, J=5,9 Гц, 1H), 4,04–3,92 (m, 2H), 3,52 (s, 3H), 1,87–1,74 (m, 2H), 1,56 (s, 2H), 1,15 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 323,2, Rt_1=0,49 мин.

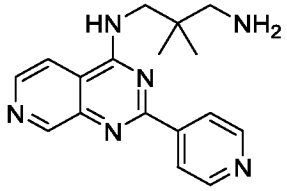
Пример 316: ***трет*–бутил–(2,2–диметил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)карбамат**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и *трет*–бутил–(3–амино–2,2–диметилпропил)карбамата.

1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ 9,20 (s, 1H), 8,77 (d, J=4,9 Гц, 2H), 8,68 (d, J=5,4 Гц, 1H), 8,61 (t, J=6,4 Гц, 1H), 8,43–8,30 (m, 2H), 8,17 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,01 (t, J=6,6 Гц, 1H), 3,62 (d, J=6,2 Гц, 2H), 2,93 (d, J=6,3 Гц, 2H), 1,38 (s, 9H), 0,92 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 409,3, Rt_1=1,06 мин.

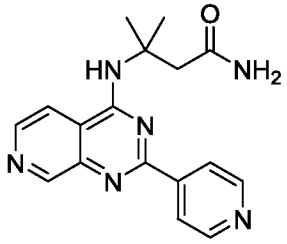
Пример 317: 2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и *трет–бутил*–(3–амино–2,2–диметилпропил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением TFA (стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,18 (s, 1H), 8,81–8,71 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39–8,29 (m, 2H), 8,16 (d, J=5,6 Гц, 1H), 3,67 (s, 2H), 0,95 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 309,2, Rt_1=0,43 мин.

Пример 318: 3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутанамид

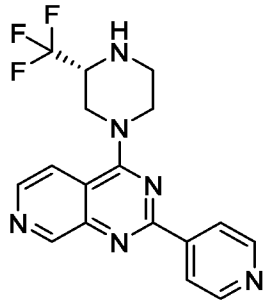


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и 3–

амино–3–метилбутанамида.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,21 (s, 1H), 8,94–8,80 (m, 2H), 8,77–8,60 (m, 2H), 8,48–8,35 (m, 2H), 8,10 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 2,76 (s, 2H), 1,71 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 323,3, Rt_1=0,57 мин.

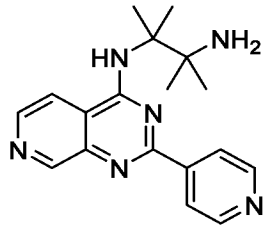
Пример 319: (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и (R)–2–(трифторметил)пиперазина.

1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ 9,31 (s, 1H), 8,79 (d, J=5,3 Гц, 2H), 8,63 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,31 (d, J=4,9 Гц, 2H), 7,97 (d, J=5,7 Гц, 1H), 4,60–4,49 (m, 1H), 4,28–4,21 (m, 1H), 3,82–3,74 (m, 1H), 3,71–3,64 (m, 1H), 3,63–3,56 (m, 1H), 3,20–3,12 (m, 1H), 3,12–3,04 (m, 1H), 2,96–2,87 (m, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 361,1, Rt_1=0,72 мин.

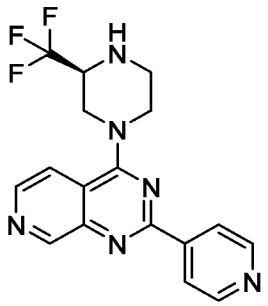
Пример 320: 2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и 2,3–диметилбутан–2,3–диамина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,18 (s, 1H), 8,88–8,74 (m, 2H), 8,66 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,40–8,19 (m, 2H), 7,74 (d, J=5,5 Гц, 1H), 1,63 (s, 6H), 1,21 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 323,2, Rt_1=0,48 мин.

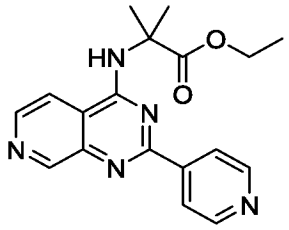
Пример 321: (S)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и (S)–2–(трифторметил)пиперазина.

1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ 9,31 (s, 1H), 8,81–8,77 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,34–8,29 (m, 2H), 7,97 (d, J=5,6 Гц, 1H), 4,57–4,52 (m, 1H), 4,28–4,21 (m, 1H), 3,83–3,74 (m, 1H), 3,71–3,65 (m, 1H), 3,63–3,57 (m, 1H), 3,20–3,14 (m, 1H), 3,11–3,05 (m, 1H), 2,95–2,88 (m, 1H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 361,1, Rt_1=0,72 мин.

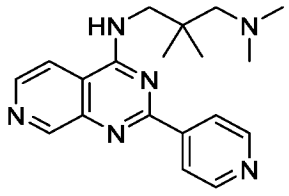
Пример 322: этил 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноат



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и этил–2–амино–2–метилпропаноата.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ 9,23 (s, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,80–8,74 (m, 2H), 8,69 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,39 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,28–8,23 (m, 2H), 3,99 (q, J=7,1 Гц, 2H), 1,69 (s,6H), 0,91 (t, J=7,1 Гц, 3H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 338,2, Rt_1=0,78 мин.

Пример 323: N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамин

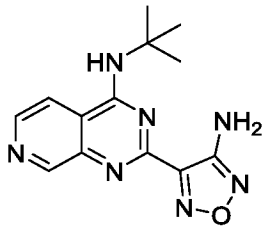


Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и N^1,N^1,2,2–тетраметилпропан–1,3–диамина.

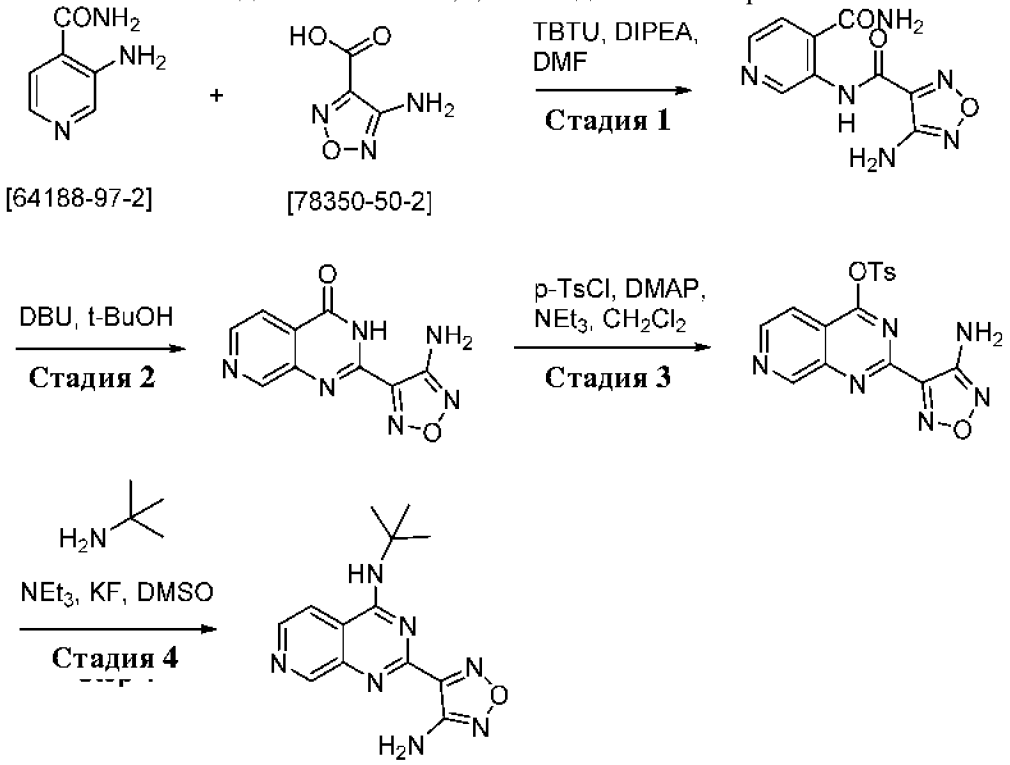
1H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ 9,20–9,17 (m, 1H), 9,04 (t, J=5,6 Гц, 1H), 8,80–8,74 (m, 2H), 8,68–8,63 (m, 1H), 8,38–8,31 (m, 2H), 8,13–8,08 (m, 1H), 3,72–3,65 (m, 2H), 2,36–2,28 (m, 8H), 0,99 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 337,2, Rt_1=0,46 мин.

Пример 324: 4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–

оксадиазол–3–амин



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии со схемой ниже из 3–аминоизоникотинамида и 4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–карбоновой кислоты.



Стадия 1. 4–Амино–N–(4–карбамоилпиридин–3–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–карбоксамид

В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную карманом для термометра и впускным отверстием для азота, добавляли TBTU (4,75 г, 14,8 ммоль) и N, N–диизопропилэтиламин (2,6 мл, 14,8 ммоль) к перемешиваемому раствору 3–аминоизоникотинамида (1,7 г, 12,4 ммоль) и 4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–карбоновой кислоты (1,92 г, 14,8 ммоль) в DMF (40 мл) при 25–30°C. Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 72 ч. при 25–30°C. Реакционную смесь выливали в воду (200 мл) и осажденное твердое вещество собирали посредством фильтрации. Промывали с помощью воды (100 мл). Очистку проводили посредством растирания с применением 20% этилацетата в н–гексане с получением 4–амино–N–(4–карбамоилпиридин–3–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–карбоксамида (0,84 г, 27,45%) в виде грязно–белого твердого вещества.

^{1}H–ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6): δ 12,60 (s, 1H, способный к обмену с D_2O), 9,70 (s, 1H), 8,64 (s, 1H, способный к обмену с D_2O), 8,52 (d, J=4,4Гц, 1H), 8,81 (s, 1H, способный к обмену с D_2O), 7,80 (d, J=4,8 Гц, 1H), 6,25 (s, 2H, способный к обмену с D_2O). LCMS

(масса/заряд $[M+H]^+$): 249,1, Rt_2=1,312 мин.

Стадия 2. 2–(4–Амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4(3H)–он

В закрытую пробирку добавляли DBU (0,98 г, 6,45 ммоль) к перемешиваемой суспензии 4–амино–N–(4–карбамоилпиридин–3–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–карбоксамида (0,8 г, 3,22 ммоль) в *трет*–бутаноле (8,0 мл). Реакционную смесь закрывали крышкой и нагревали до 100°C в течение 16 ч. Растворитель выпаривали, полученный осадок разбавляли с помощью воды (20 мл) и перемешивали в течение 0,5 ч. при 25–30°C. Осажденное твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали твердое вещество с помощью воды (2×10 мл) и *н*–гексана (10 мл). Полученное твердое вещество высушивали при 55°C во вращающейся колбе с получением 2–(4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4(3H)–она (0,421 г, 56,73%) в виде грязно–белого твердого вещества.

^{1}H–ЯМР(400 МГц, DMSO–d_6): δ 13,31 (s, 1H, способный к обмену с D_2O), 9,36(s, 1H), 8,74 (d, J=5,2Гц, 1H), 8,01 (d, J=5,2 Гц, 1H), 6,95 (s, 2H, способный к обмену с D2O). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 231,2, Rt_2=1,279 мин.

Стадия 3. 2–(4–Амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил–4–метилбензолсульфонат

В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную карманом для термометра и впускным отверстием для азота добавляли DMAP (0,015 г, 0,116 ммоль) к перемешиваемому раствору 2–(4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4(3H)–она (0,27 г, 1,168 ммоль) и триэтиламина (0,245 мл, 1,752 ммоль) в дихлорметане (10 мл) при 0°C. Добавляли p–TsCl (0,245 г, 1,168 ммоль) и перемешивали полученную реакционную смесь в течение 0,5 ч. Обеспечивали нагревание реакционной смеси до 25–30°C посредством удаления ледяной бани и перемешивали при 25–30°C в течение 1,5 ч. Смесь разбавляли с помощью DCM (20 мл), промывали с помощью воды (2×20 мл) и солевого раствора (20 мл). Высушивали органические слои над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали на роторном испарителе с получением 2–(4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил–4–метилбензолсульфоната (0,285 г, 63,21%) в виде неочищенного продукта. Неочищенный продукт применяли для следующей стадии без очистки. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 385,1, Rt_2=1,779 мин.

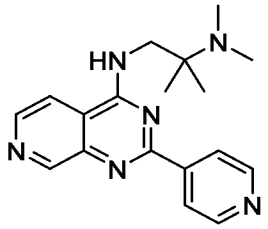
Стадия 4. 4–(4–(трет–Бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амин

В двугорлую круглодонную колбу, оснащенную карманом для термометра и впускным отверстием для азота добавляли *трет*–бутиламин (0,0714 г, 0,976 ммоль) к перемешиваемому раствору 2–(4–амино–1,2,5–оксадиазол–3–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил–4–метилбензолсульфоната (0,25 г, 0,651 ммоль) в DMSO (2,5 мл) с последующим добавлением KF (0,0566 г, 0,976 ммоль) и триэтиламина (0,18 мл, 1,304 ммоль) при 25–30°C. После перемешивания при к. т. в течение 45 мин. реакционную смесь выливали в воду (25 мл). Осажденное твердое вещество собирали посредством

фильтрации. Твердое вещество промывали с помощью воды (25 мл) и н–гексана (10 мл). Очистку проводили посредством растирания в н–гексан:диэтиловый эфир; 1:1 (5 мл) с получением 4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина (0,135 г, 72,75%) в виде грязно–белого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO–d_6) δ ppm 9,30 (s, 1 H), 8,67 (d, J=5,57 Гц, 1 H), 8,39 (d, J=5,58 Гц, 1 H), 8,00 (s, 1 H), 6,89 (s, 2 H), 1,60 (s, 9 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 286,1, Rt_1=0,92 мин.

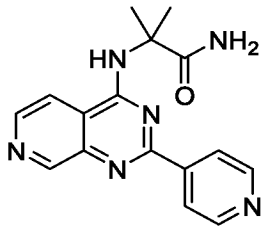
Пример 325: N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и N^2,N^2,2–триметилпропан–1,2–диамина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,19 (s, 1H), 8,85–8,72 (m, 2H), 8,65 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,36–8,31 (m, 2H), 8,27 (t, J=6,4 Гц, 2H), 3,79 (d, J=5,6 Гц, 2H), 2,27 (s, 6H), 1,09 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 323,2, Rt_1=0,44 мин.

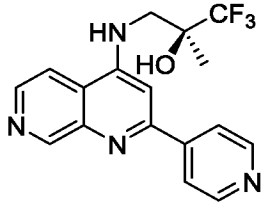
Пример 326: 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамид



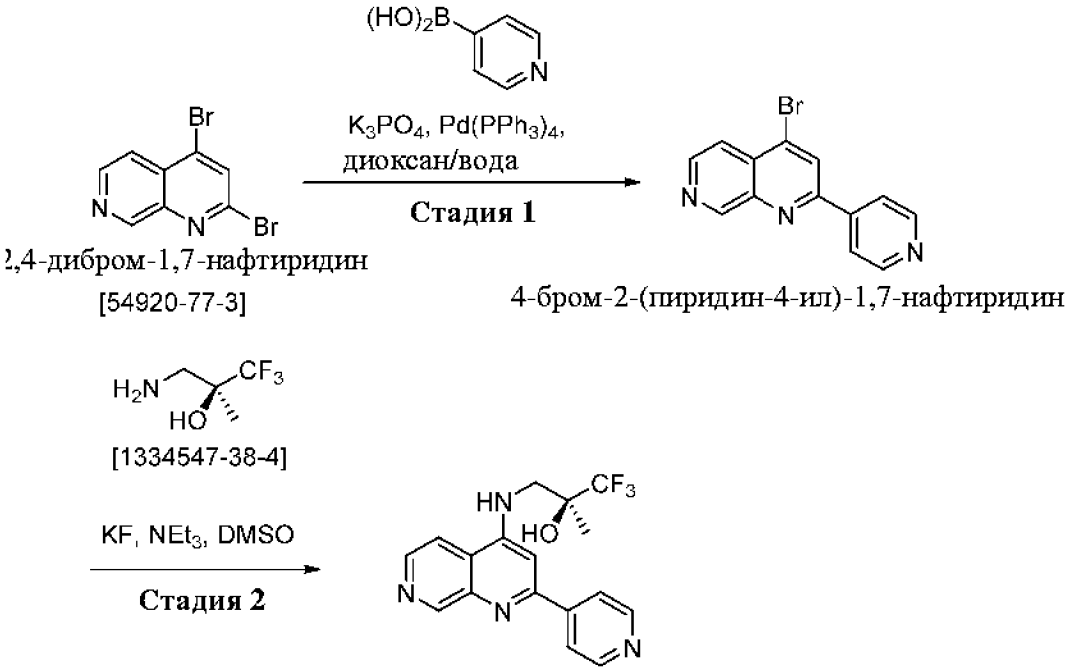
Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и 2–амино–2–метилпропанамида.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,20 (s, 1H), 8,77–8,71 (m, 2H), 8,67 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,49 (s, 1H), 8,39 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,36–8,30 (m, 2H), 7,29 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 1,63 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 309,2, Rt_1=0,50 мин.

Пример 327: (S)–1,1,1–трифтор–2–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)амино)пропан–2–ол



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии со схемой ниже из 2,4–дибром–1,7–нафтиридина.

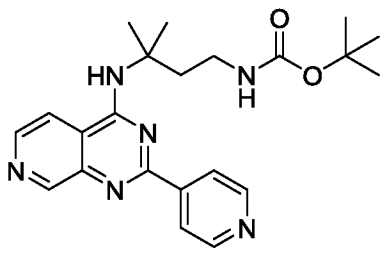


Стадия 1. Раствор 2,4–дибром–1,7–нафтиридина (350 мг, 1,22 ммоль), 4–пиридинилбороновой кислоты (194 мг, 1,58 ммоль), фосфата калия (1032 мг, 4,86 ммоль) и Pd (PPh_3)$_4$ (140 мг, 0,122 ммоль) в диоксане (6 мл) / воде (1,5 мл) нагревали в атмосфере аргона в сосуде для микроволновой обработки при 110°C в течение 60 мин. Добавляли воду при к. т. и реакционную смесь экстрагировали 3 раза с помощью дихлорметана. Объединенные органические фазы промывали солевым раствором, высушивали с помощью сульфата натрия и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии с применением 0–100% этилацетата/циклогексана с получением 4–бром–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина (44%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 286,0/288,0, Rt_1=0,83 мин.

Стадия 2. Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 254** из 4–бром–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина и (S)–3–амино–1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ола [1334547–38–4].

^{1}H ЯМР (600 МГц, DMSO–d_6) δ ppm 9,26 (s, 1 H), 8,77 (d, J=5,69 Гц, 2 H), 8,53 (d, J=5,87 Гц, 1 H), 8,20 (d, J=5,69 Гц, 1 H), 8,14–8,18 (m, 2 H), 7,48–7,55 (m, 2 H), 6,34 (s, 1 H), 3,82 (dd, J=14,58, 6,33 Гц, 1 H), 3,69–3,76 (m, 1 H), 1,40 (s, 3 H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 349,3, Rt=0,62 мин.

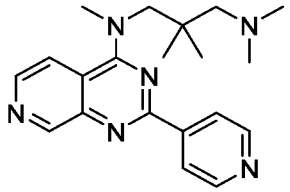
<u>Пример 328:</u> ***трет*–бутил–(3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамат**



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и *трет*–бутил–(3–амино–3–метилбутил)карбамата.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (s, 1H), 8,88–8,73 (m, 2H), 8,64 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,37 (d, J=5,7 Гц, 1H), 8,33–8,25 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 2,97 (t, J=7,6 Гц, 2H), 2,31–2,19 (m, 2H), 1,60 (s, 6H), 1,25 (s, 9H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 409,2, Rt_1=0,96 мин.

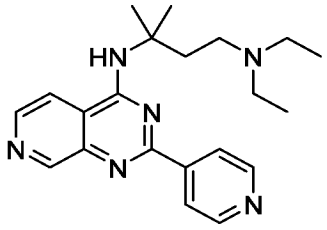
<u>Пример 329:</u> N^1,N^1,N^3,2,2–пентаметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамин



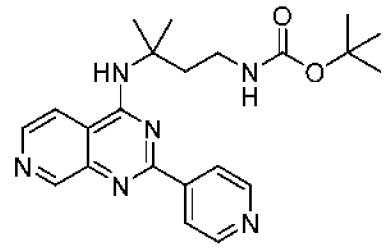
Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и N^1,N^1,N^3,2,2–пентаметилпропан–1,3–диамина.

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (s, 1H), 8,76 (d, 2H), 8,54 (d, J=5,9 Гц, 1H), 8,34 (d, 2H), 8,23 (d, J=5,9 Гц, 1H), 4,11 (s, 2H), 3,66 (s, 3H), 2,30 (s, 6H), 2,23 (s, 2H), 0,96 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 351,2, Rt_1=0,50 мин.

<u>Пример 330:</u> N^1,N^1–диэтил–3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин



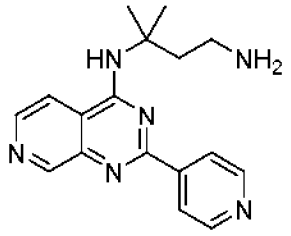
Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии со схемой ниже из **примера 328** (*трет*–бутил–(3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамат).



Пример 328

TFA, CH_2Cl_2

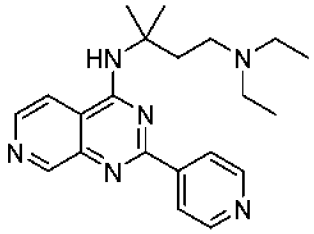
Стадия 1



3-метил-N^3-(2-(пиридин-4-ил)пирило[3,4-*d*]-пиримидин-4-ио)бутан-1,3-диамин

$NaBH(OAc)_3$, AcOH, CH_3CHO, CH_2Cl_2

Стадия 2



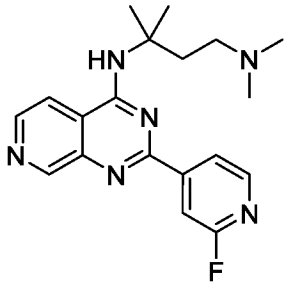
Стадия 1. К раствору *трет*–бутил–(3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамата (80 мг, 0,196 ммоль) в дихлорметане (2 мл) добавляли TFA (0,377 мл, 4,90 ммоль) и полученный желтый раствор перемешивали при к. т. в течение 2 ч. Затем раствор выпаривали до сухого состояния. Остаток растворяли в MeOH и раствор наносили на картридж PoraPak Rxn CX 20cc (2 г). Картридж затем промывали дважды с помощью 5 мл MeOH. Наконец, соединение элюировали с помощью 7 н. NH_3 в MeOH. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении с получением 3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина (66%). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 309,1, Rt_1=0,53 мин.

Стадия 2. Раствор 3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина (40 мг, 0,130 ммоль), уксусной кислоты (0,037 мл, 0,649 ммоль) и ацетальдегида (57 мг, 1,297 ммоль) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Затем добавляли $NaBH(OAc)_3$ (137 мг, 0,649 ммоль) и смесь дополнительно перемешивали в течение 1 ч. при к. т. Добавляли насыщенный $NaHCO_3$–раствор и водную фазу экстрагировали 3 раза с помощью дихлорметана (3×20 мл). Объединенные органические фазы промывали солевым раствором, высушивали с помощью сульфата натрия и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством флэш–хроматографии с применением градиента 12–100% этилацетат/циклогексан с последующим градиентом 2–30% метанол (+10% 7 н. NH_3 в метаноле)/дихлорметан с получением желтого масла. Масло поглощали в дихлорметане (2 мл) и добавляли 4 н. HCL в диоксане (0,2 мл). Осадок отфильтровывали и промывали с помощью пентана с получением указанного в заголовке соединения в виде HCL–соли (17%).

1H ЯМР (400 МГц, Метанол–d4) δ 9,52 (s, 1H), 9,22–9,02 (m, 4H), 8,82 (d, J=6,2 Гц,

1H), 8,74 (dd, J=6,2, 0,9 Гц, 1H), 3,27 (dd, J=8,4, 4,7 Гц, 2H), 3,21 (q, J=7,3 Гц, 4H), 2,84 – 2,70 (m, 2H), 1,79 (s, 6H), 1,23 (t, J=7,3 Гц, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 365,2, Rt_1=0,59 мин.

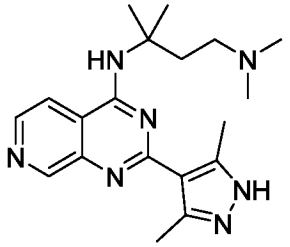
Пример 331: N^3–(2–(2–фторпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 111** в 2 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1) и из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и (2–фторпиридин–4–ил)бороновой кислоты (CAS № 401815–98–3, стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,53 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,69 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,46 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8,26 (dd, J=4,7, 2,0 Гц, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,85 (d, J=5,6 Гц, 1H), 2,26 (s, 6H), 2,00 (t, J=6,4 Гц, 2H), 1,66 (s, 6H), примечание: один сигнал CH2 перекрывается сигналом DMSO. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 355,2, Rt_1=0,67 мин.

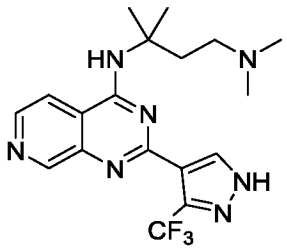
Пример 332: N^3–(2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 111** в 2 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1) и из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и *трет*–бутил–3,5–диметил–4–(4,4,5,5–тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)–1H–пиразол–1–карбоксилата (CAS № 1073354–70–7, стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 12,41 (s, 1H), 9,11 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,49 (d, J=5,5 Гц, 1H), 7,68 (d, J=5,6 Гц, 1H), 2,56 (s, 6H), 2,27 (s, 6H), 1,92 (t, J=6,1 Гц, 2H), 1,61 (s, 6H). Примечание: один сигнал CH2 перекрывается сигналом DMSO. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 354,2, Rt_1=0,50 мин.

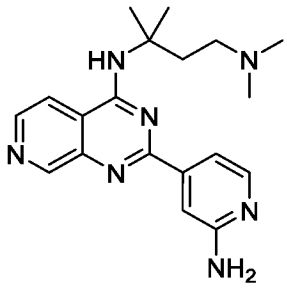
Пример 333: N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 111** в 2 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1) и из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и 4–(4,4,5,5–тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)–3–(трифторметил)–1H–пиразола (CAS № 1218790–40–9, стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 13,80 (s, 1H), 9,25 (s, 1H), 8,96 (s, 1H), 8,57 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,75 (d, J=5,6 Гц, 1H), 2,25 (s, 6H), 1,93 (t, J=6,3 Гц, 2H), 1,60 (s, 6H). Примечание: один сигнал CH2 перекрывается сигналом DMSO. LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 394,3, Rt_1=0,62 мин.

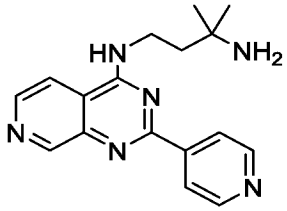
<u>Пример 334:</u> N^3–(2–(2–аминопиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 111** в 3 стадии из 2,4–дихлорпиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 2c**) и N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина (стадия 1), из N^3–(2–хлорпиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и *трет*–бутил–(4–(4,4,5,5–тетраметил–1,3,2–диоксаборолан–2–ил)пиридин–2–ил)карбамата CAS № 1095708–32–9 (стадия 2) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением TFA (стадия 3).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,30 (s, 1H), 9,11 (s, 1H), 8,62 (d, J=5,6 Гц, 1H), 8,07 (d, J=5,3 Гц, 1H), 7,82 (d, J=5,6 Гц, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,43 (dd, J=5,3, 1,4 Гц, 1H), 6,11 (s, 2H), 2,47 (d, J=8,1 Гц, 2H), 2,24 (s, 6H), 1,99 (t, J=6,4 Гц, 2H), 1,66 (s, 6H). LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 352,2, Rt_1=0,48 мин.

<u>Пример 335:</u> 3–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамин



Указанное в заголовке соединение синтезировали по аналогии с **примером 1** в 2 стадии из 4–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина (**промежуточное соединение 1c**) и *трет*–бутил–(4–амино–2–метилбутан–2–ил)карбамата (стадия 1) и проводили удаление Boc–защитной группы с применением TFA (стадия 2).

1H ЯМР (400 МГц, DMSO–d6) δ 9,18 (s, 1H), 8,80–8,71 (m, 2H), 8,63 (d, J=5,5 Гц, 1H), 8,37–8,31 (m, 2H), 8,07 (d, J=5,5 Гц, 1H), 3,83–3,73 (m, 2H), 1,80–1,68 (m, 2H), 1,15 (s, 6H), 3 взаимозаменяемых протона.LCMS (масса/заряд $[M+H]^+$): 309,2, Rt_1=0,45 мин.

Ex–vivo увеличение популяции клеток и применение в терапии

Исходный материал для получения увеличенной популяции клеток

Аутологический способ

Высеваемая популяция клеток для применения в способе увеличения популяции клеток с получением увеличенной популяции клеток может быть получена от самого реципиента. У пациентов, у которых дефицит ткани, органа или клетки является частичным, например присутствуют здоровые клетки, высеваемая популяция клеток может быть получена из источника, являющегося непораженными тканью, или органом, или клеткой. Например, в случае одностороннего дефицита клеток глаза высеваемая популяция может быть получена из биоптата непораженного глаза. Она также может быть получена из здоровой ткани, оставшейся в частично поврежденном органе.

Аллогенный способ

В предпочтительном варианте осуществления высеваемая популяция клеток для применения в способе увеличения популяции клеток с целью получения увеличенной популяции клеток может быть получена из клеток, первоначально полученных из донорской ткани (например, человека, кролика, обезьяны и т. д., предпочтительно человека).

Например, источником человеческой ткани являются доноры трупной ткани или ткани живых доноров, включая живых родственников.

Из аутологической или аллогенной ткани, полученной, как описано выше, с помощью аутологических и аллогенных способов, которая была выделена из организма, клетки, например, могут быть экстрагированы и получены следующим образом: необходимый участок может быть рассечен, например, с помощью скальпелей, а затем клетки диссоциированы (например, с использованием коллагеназы, диспазы, трипсина, аккутазы или TripLE; например, 1 мг/мл коллагеназы при 37^0 C), пока отслоение клеток не станет очевидным при наблюдении под микроскопом (например, с использованием инвертационного микроскопа Zeiss Axiovert) от 45 минут до 3 часов.

Для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению выделенные клетки затем добавляют в среду, например, пипеткой, как описано ниже в разделе "Увеличение популяции клеток".

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения осуществляют оценку качества клеточного материала, собранного у донора. Например, через примерно 24 часа после сбора клеток и начала культивирования в среде (ростовой

среде или среде для пролиферации клеток, как описано ниже) под светлопольным микроскопом можно провести визуальную оценку на предмет наличия плавающих клеток (как индикатора мертвых клеток). В идеале эта оценка должна показать, что имеется менее примерно 10% плавающих клеток для материала, подходящего для применения с целью создания увеличенной популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Количество клеток, подходящих для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, не ограничено, но в качестве примера для иллюстративных целей засевающая популяция клеток, подходящая для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может содержать примерно 1000 клеток.

Если необходимо измерить количество клеток в засевающей популяции клеток, это может быть сделано, например, путем ручного или автоматического подсчета клеток с использованием светового микроскопа, иммуногистохимии или FACS в соответствии со стандартными протоколами, хорошо известными в уровне техники.

Ex–vivo увеличение популяции клеток глаза и применение в терапии

Ниже приведено более подробное описание метода, касающегося увеличения популяций клеток глаза (получение исходного материала с последующей фазой увеличения популяции клеток, хранение клеток), применительно к клеткам глаза с конкретными примерами лимбальных стволовых клеток и роговичных эндотелиальных клеток.

Исходный материал для получения увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток Роговичные эпителиальные и лимбальные клетки

Аутологический способ

Высеваемая популяция клеток для применения в способе увеличения популяции клеток с получением увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток может быть получена от самого реципиента. У пациентов, у которых дефицит лимбальных стволовых клеток является частичным, высеваемая популяция клеток может быть получена из непораженных частей лимба. Например, в случае одностороннего дефицита лимбальных стволовых клеток высеваемая популяция может быть получена из биоптата непораженного глаза. Она также может быть получена из здоровой ткани, оставшейся в частично поврежденном лимбе.

Аллогенный способ

В предпочтительном варианте осуществления высеваемая популяция клеток для применения в способе увеличения популяции клеток с целью получения увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток может быть получена из клеток, первоначально полученных из донорской роговичной ткани млекопитающих (например, человека, кролика, обезьяны и т. д., предпочтительно человека).

Например, источником человеческой роговичной ткани являются доноры трупной ткани (например, из банков глаз) или ткани живых доноров, включая живых родственников. Для применения согласно настоящему изобретению подходит ряд

донорской лимбальной ткани. В предпочтительном варианте осуществления лимбальную ткань получают от живых родственников или доноров с совместимым профилем HLA.

Ткань, которая используется для получения LSC, может, например, представлять собой кольцо лимбальной ткани шириной примерно 4 мм и высотой 1 мм.

Из роговичной ткани, полученной, как описано выше, с помощью аутологических и аллогенных способов, которая была выделена из организма, LSC, например, могут быть экстрагированы и получены следующим образом: участок лимбального эпителия может быть рассечен, например, с помощью скальпелей, а затем клетки диссоциированы (например, с использованием коллагеназы, диспазы, трипсина, аккутазы или TripLE; например, 1 мг/мл коллагеназы при 37^0 C), пока отслоение клеток не станет очевидным при наблюдении под микроскопом (например, с использованием инвертационного микроскопа Zeiss Axiovert) от 45 минут до 3 часов.

Для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению выделенные клетки затем добавляют в среду, например, пипеткой, как описано ниже в разделе "Увеличение популяции клеток".

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения осуществляют оценку качества клеточного материала, собранного из роговицы донора. Например, через примерно 24 часа после сбора клеток и начала культивирования в среде (ростовой среде или среде для пролиферации клеток, как описано ниже) под светлопольным микроскопом можно провести визуальную оценку на предмет наличия плавающих клеток (как индикатора мертвых клеток). В идеале эта оценка должна показать, что имеется менее примерно 10% плавающих клеток для материала, подходящего для применения с целью создания увеличенной популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Количество клеток, подходящих для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, не ограничено, но в качестве примера для иллюстративных целей высеваемая популяция клеток, подходящая для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может содержать примерно 1000 лимбальных стволовых клеток.

Если необходимо измерить количество клеток в засевающей популяции клеток, это может быть сделано, например, путем ручного или автоматического подсчета клеток с использованием светового микроскопа, иммуногистохимии или FACS в соответствии со стандартными протоколами, хорошо известными в уровне техники.

Исходный материал для получения увеличенной популяции роговичных эндотелиальных клеток

Высеваемая популяция роговичных эндотелиальных клеток (CEC) для применения в способе увеличения популяции клеток может быть получена из клеток, первоначально полученных из роговичной ткани млекопитающих (например, человека, кролика, обезьяны и т. д., предпочтительно человека). Например, источником человеческой роговичной ткани являются доноры трупной ткани человека (например, из банков глаз).

Возраст доноров может варьировать, например, от детского возраста до 70 лет. Предпочтительно подходящими донорами также являются те, которые не имеют в анамнезе заболевания или травмы роговицы. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предпочтительными донорскими роговицами являются те, в которых число роговичных эндотелиальных клеток превышает 2000 клеток/мм^2 (площадь). В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения число роговичных эндотелиальных клеток составляет от 2000 до 3500 клеток/мм^2 (площадь). Это измеряют, например, путем обследования роговицы донорского материала под прямым световым микроскопом или зеркальным микроскопом в соответствии со стандартными методиками банка глаз, известными в уровне техники, для оценки донорской ткани перед трансплантацией пациентам (см. Tran et al (2016) Comparison of Endothelial Cell Measurements by Two Eye Bank Specular Micorscopes; International Journal of Eye Banking; vol 4., no 2; 1–8, которая включена в данный документ посредством ссылки).

Поверхность роговицы, которую применяют для получения CEC, не ограничена, и может быть, например, площадью прим. 8–10 мм в диаметре.

CEC могут быть, например, экстрагированы и получены из донорской роговичной ткани следующим образом. Слой роговичных эндотелиальных клеток и десцеметову оболочку (DM) царапают, например, с помощью обратного эндотелиального крючка Sinsky хирургического класса. Слой DM–эндотелиальных клеток отделяются от стромы роговицы и клетки отделяют от DM, например с использованием 1 мг/мл коллагеназы при 37^0 C, пока отслоение клеток не станет очевидным при наблюдении под микроскопом (например, с использованием инвертационного микроскопа Zeiss Axiovert) (от 45 минут до 3 часов). Поскольку DM несет только роговичные эндотелиальные клетки в роговице, популяция клеток, выделенная таким образом, представляет собой популяцию CEC, которая подходит для применения в качестве высеваемой популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению выделенные роговичные эндотелиальные клетки могут быть добавлены в среду, как описывается ниже в разделе "Увеличение популяции клеток".

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения осуществляют оценку качества клеточного материала, собранного из роговицы донора. Например, через примерно 24 часа после сбора клеток и начала культивирования в среде (ростовой среде или среде для пролиферации клеток, как описано ниже) под светлопольным микроскопом можно провести визуальную оценку на предмет наличия плавающих клеток (как индикатора мертвых клеток). В идеале эта оценка должна показать, что имеется менее примерно 10% плавающих клеток для материала, подходящего для применения с целью создания увеличенной популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Исходное количество клеток, подходящих для применения в способе увеличения

популяции клеток согласно настоящему изобретению, не ограничено, но в качестве примера для иллюстративных целей высеваемая популяция роговичных эндотелиальных клеток, подходящих для применения в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может составлять от 100000 до 275000 клеток.

Если необходимо измерить количество клеток в засевающей популяции клеток, это может быть сделано, например, путем отбора аликвоты и выполнения иммуноцитохимии (например, для подсчета ядер, окрашенных Sytox Orange) или путем визуализации живых клеток под светлопольным микроскопом, чтобы подсчитать количество клеток.

Анализ с помощью Sytox Orange может быть выполнен в соответствии со стандартными протоколами, известными в уровне техники. Вкратце, после прикрепления клеток к чашке для культивирования клеток (обычно через 24 часа после посева клеток) клетки фиксируют в параформальдегиде. Затем клетки пермеабилизируют (например, с использованием раствора 0,3% Triton X–100), а затем их метят в растворе Sytox Orange (например, с использованием 0,5 микромоль/л Sytox Orange в PBS). Количество ядер, окрашенных Sytox Orange, на площадь поверхности затем подсчитывают под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss.

Увеличение популяции клеток

В одном варианте осуществления настоящего изобретения популяцию клеток, включающих клетки от пациента или донора, можно выращивать в среде в контейнере для культивирования, известном в уровне техники, таком как планшеты, многолуночные планшеты и колбы для клеточных культур. Например, может быть применена чашка для культивирования, которая не покрыта или покрыта коллагеном, Synthemax, желатином или фибронектином. Предпочтительным примером подходящего контейнера для культивирования является непокрытый планшет. Также можно применять стандартные контейнеры и оборудование для культивирования, как, например, биореакторы, известные в уровне техники для промышленного применения.

Применяемой средой может быть ростовая среда или среда для пролиферации клеток. Как правило, ростовой средой является культуральная среда, поддерживающая рост и сохраняющая популяцию клеток. Специалисты в данной области смогут легко определить соответствующую ростовую среду для конкретного типа популяции клеток. Подходящие ростовые среды известны в уровне техники для культуры стволовых клеток или культуры эпителиальных клеток, например, DMEM (модифицированная Дульбекко среда Игла), дополненная FBS (эмбриональная бычья сыворотка) (Invitrogen), среда SF (бессывороточная) для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen), дополненная сывороткой человека, среда X–VIVO15 (Lonza) или DMEM/F12 (Thermo Fischer Scientific) (необязательно дополненная хлоридом кальция). Они могут быть, кроме того, дополнены ростовыми факторами (например, bFGF) и/или антибиотиками, такими как пенициллин и стрептомицин.

В качестве альтернативы, выделенные клетки могут быть добавлены первыми в среду для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению. Среда для

пролиферации клеток, определяемая в данном документе, содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления среда для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению. Ингибитор LATS предпочтительно выбран из группы, содержащей соединения формулы A1 или ее подформул, и далее описан в разделе "Ингибиторы LATS".

В предпочтительном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 0,5 до 100 микромоль/л, предпочтительно от приблизительно 0,5 до 25 микромоль/л, более предпочтительно от приблизительно 1 до 20 микромоль/л. В конкретном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 3 до 10 микромоль/л.

В одном варианте осуществления стоковый раствор соединения формулы A1 или ее подформул может быть получен путем растворения порошка соединения до стоковой концентрации 10 мМ в DMSO.

В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор LATS согласно настоящему изобретению ингибирует активность LATS1 и/или LATS2 в популяции клеток. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

Клетки могут подвергаться этапу или этапам добавления свежей ростовой среды и/или среды для пролиферации клеток. Клетки не нуждаются в пересеве для добавления свежей среды, но пересев клеток также является способом добавления свежей среды.

Также может быть применим ряд сред в различных сочетаниях порядка, например, среда для пролиферации клеток с последующим добавлением ростовой среды (которая не дополнена ингибиторами LATS согласно настоящему изобретению и может отличаться от ростовой среды, применяемой в качестве основы для среды для пролиферации клеток).

Фаза увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению происходит на протяжении периода воздействия на клетки среды для пролиферации клеток.

Могут быть применены стандартные температурные условия, известные в уровне техники для культивирования клеток, например, предпочтительно от приблизительно 30°C до 40°C. Особенно предпочтительно фазу роста клеток, а также увеличения популяции клеток осуществляют при приблизительно 37°C. Может быть использован традиционный клеточный инкубатор с уровнями CO_2 5–10%. Предпочтительно клетки подвергают воздействию 5% CO_2.

При необходимости клетки могут быть пересеяны в ходе культивирования в ростовую среду или среду для пролиферации клеток. Клетки могут быть пересеяны, когда они почти сливаются или сливаются. Предпочтительно клетки пересевают при достижении ими примерно 90%–100% слияния, хотя также пересевают при более низких уровнях процентного слияния. Пересев клеток выполняют в соответствии со

стандартными протоколами, известными в уровне техники. Например, вкратце, клетки пересевают путем обработки культур аккутазой (например, в течение 10 минут), промывания клеточной суспензии с помощью центрифугирования и посева клеток в свежую ростовую среду или среду для пролиферации клеток при необходимости. Отношения деления клеток варьируют, например, от 1:2 до 1:5.

Для фазы увеличения популяции клеток в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению увеличение высеваемой популяции клеток в среде для пролиферации клеток можно выполнять до получения необходимого количества клеточного материала.

Клетки могут быть подвергнуты воздействию среды для пролиферации клеток на протяжении ряда периодов времени для наращивания популяции клеток.

В предпочтительном варианте осуществления засевающую популяцию клеток подвергают воздействию ингибиторов LATS согласно настоящему изобретению (таких как соединения формулы A1 или ее подформул) непосредственно после выделения клеток из ткани пациента или донора и выдерживают в течение всего времени, необходимого для пролиферации клеток, например от 12 до 16 суток.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения необязательно может быть выполнена методика генного редактирования для генетической модификации клеток и/или для экспрессии биотерапевтического соединения. Например, клетки могут быть модифицированы для уменьшения или устранения экспрессии и/или функции опосредующего иммунный ответ гена, который в противном случае может способствовать иммунному отторжению при доставке популяции клеток пациенту. Применение методик генного редактирования в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению является необязательным, и вместо этого при желании можно использовать введение пациенту местных иммуносупрессантов и/или противовоспалительных средств (которые описаны далее в разделе "Иммуносупрессант и противовоспалительное средство"), чтобы смягчить проблемы иммунного отторжения трансплантированного материала у пациента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения генетическая модификация предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, связанного с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В предпочтительном варианте осуществления генетическая модификация предусматривает введение в выделенную стволовую клетку или популяцию стволовых клеток системы генного редактирования, которая специфически нацеливается на ген, связанный с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В конкретном варианте осуществления указанная система генного редактирования выбрана из группы, состоящей из CRISPR (CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, также известные как системы CRISPR/Cas), ZFN (нуклеаз с цинковыми пальцами), TALEN (эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции), сконструированных мегануклеаз (например, нуклеаз ARCUS, таких как нуклеаза ARC),

технологий редактирования генома на основе вектора AAV (адено–ассоциированного вируса) и лентивирусных векторов.

Методика генного редактирования, если применяется, может быть выполнена в разных точках, таких как, например, (1) с тканью, перед выделением клеток, или (2) во время выделения клеток, или (3) во время фазы увеличения популяции клеток in vitro (когда клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro), или (4) в конце фазы увеличения популяции клеток in vitro (после того, как клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro). В конкретном варианте осуществления CRISPR применяют после двух недель увеличения популяции клеток in vitro в присутствии ингибитора LATS согласно настоящему изобретению.

Методики генного редактирования, подходящие для применения в способе увеличения популяции клеток, далее описываются в разделе "Снижение иммунного отторжения".

В способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS, которые предпочтительно представляют собой соединения, вызывают более чем 2–кратное увеличение высеянной популяции клеток

В одном аспекте способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению соединения формулы A1 или ее подформул вызывают более чем 30–кратное увеличение высеянной популяции выделенных клеток (т. е. клеток, полученных от пациента или донора). В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 100–2200–кратное увеличение высеянной популяции выделенных клеток. В более конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 600–2200–кратное увеличение высеянной популяции выделенных клеток. Фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут за один или несколько пересевов клеток. В другом аспекте настоящего изобретения фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут после воздействия соединения формулы A1 или ее подформул на протяжении от приблизительно 12 до 16 суток, предпочтительно приблизительно 14 суток.

Если нужно измерить число клеток или степень увеличения популяции клеток, это можно выполнить, например, путем отбора аликвоты и выполнения иммуноцитохимии (например, с подсчетом ядер, окрашенных с помощью Sytox Orange), или путем визуализации живых клеток под светлопольным микроскопом с подсчетом числа клеток, или путем выполнения количественного анализа живых клеток в режиме реального времени на предмет слияния клеток в разные моменты времени в ходе фазы увеличения популяции клеток способа согласно настоящему изобретению.

Анализ с помощью Sytox Orange может быть выполнен в соответствии со стандартными протоколами, известными в уровне техники. Вкратце, после прикрепления клеток к чашке для культивирования клеток (обычно через 24 часа после посева клеток) клетки фиксируют в параформальдегиде. Затем клетки пермеабилизируют (например, с использованием раствора 0,3% Triton X–100), а затем их метят в растворе Sytox Orange (например, с использованием 0,5 микромоль/л Sytox Orange в PBS). Количество ядер, окрашенных Sytox Orange, на площадь поверхности затем подсчитывают под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss.

Популяцию клеток, увеличенную способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, можно добавлять в раствор, а затем хранить, например в растворе для консервации или криоконсервации (таких как описанные ниже), или добавлять непосредственно в композицию, подходящую для доставки пациенту. Раствор для консервации, криоконсервации или композиция, подходящая для глазной доставки, необязательно могут содержать ингибитор LATS согласно настоящему изобретению.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат на основе популяции клеток, который доставляют пациенту, предусматривает уровни, от очень низких до незначительных, соединения, являющегося ингибитором LATS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления способ увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению включает дополнительную стадию промывания для удаления в значительной степени соединения согласно настоящему изобретению (такого как соединение формулы A1 или ее подформул). Это может предусматривать промывание клеток после фазы увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению. Для промывания клеток клетки отсоединяют от чашки для культивирования (например, путем обработки аккутазой), отсоединенные клетки затем центрифугируют и получают клеточную суспензию в PBS или ростовой среде согласно настоящему изобретению. Эта стадия может быть выполнена несколько раз, например от одного до десяти раз, для вымывания клеток. Наконец клетки при необходимости могут быть повторно суспендированы в растворе для консервации, растворе для криоконсервации, композиции, подходящей для глазной доставки, ростовой среде или их комбинациях.

Увеличенная популяция клеток, полученная способом увеличения популяции клеток и промытая средой для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS согласно настоящему изобретению, может быть перенесена в композицию, подходящую для доставки пациенту, такую как, например, средство, обеспечивающее локальную доставку. Необязательно популяцию клеток хранят на протяжении периода перед добавлением к средству, обеспечивающему локальную доставку, подходящему для доставки пациенту. В предпочтительном варианте осуществления увеличенная популяция клеток сначала может быть добавлена в раствор, подходящий для консервации или криоконсервации, который предпочтительно не содержит ингибитор LATS, и популяцию клеток хранят (необязательно с замораживанием) перед добавлением к средству,

обеспечивающему локальную доставку, подходящему для доставки пациенту, которое также предпочтительно не содержит ингибитор LATS.

Типичные растворы, подходящие для криоконсервации, глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид, можно применять в растворе для криоконсервации согласно настоящему изобретению. Криоконсервированный препарат клеток, как правило, держат при –20°C или –80°C.

Увеличение популяции клеток для получения увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток

В одном варианте осуществления настоящего изобретения популяция клеток, включающих роговичные эпителиальные и лимбальные клетки, в том числе лимбальные стволовые клетки, например, полученные, как описано в разделе "Исходный материал для получения увеличенной популяции лимбальных стволовых клеток. Роговичные эпителиальные и лимбальные клетки", можно выращивать в среде в контейнере для культивирования, известном в уровне техники, таком как планшеты, многолуночные планшеты и колбы для клеточных культур. Например, может быть применена чашка для культивирования, которая не покрыта или покрыта коллагеном, Synthemax, желатином или фибронектином. Предпочтительным примером подходящего контейнера для культивирования является непокрытый планшет. Также можно применять стандартные контейнеры и оборудование для культивирования, как, например, биореакторы, известные в уровне техники для промышленного применения.

Применяемой средой может быть ростовая среда или среда для пролиферации клеток. Ростовую среду в данном документе определяют как культуральную среду, поддерживающую рост и сохраняющую популяцию клеток. Подходящие ростовые среды известны в уровне техники для культуры стволовых клеток или культуры эпителиальных клеток, например, DMEM (модифицированная Дульбекко среда Игла), дополненная FBS (эмбриональная бычья сыворотка) (Invitrogen), среда SF (бессывороточная) для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen), дополненная сывороткой человека, среда X–VIVO15 (Lonza) или DMEM/F12 (Thermo Fischer Scientific) (необязательно дополненная хлоридом кальция). Они могут быть, кроме того, дополнены ростовыми факторами (например, bFGF) и/или антибиотиками, такими как пенициллин и стрептомицин. Предпочтительной ростовой средой согласно настоящему изобретению является среда X–VIVO15 (которую дополнительно не дополняют ростовыми факторами).

В качестве альтернативы, выделенные клетки могут быть добавлены первыми в среду для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению. Среда для пролиферации клеток, определяемая в данном документе, содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению. В среде для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению компонент ростовой среды выбран из группы, состоящей из DMEM (модифицированной Дульбекко среды Игла), дополненной FBS (эмбриональной бычьей сывороткой) (Invitrogen), среды SF (бессывороточной) для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen), дополненной сывороткой человека, среды

X–VIVO15 (Lonza) или DMEM/F12 (Thermo Fischer Scientific) (необязательно дополненной хлоридом кальция). Они могут быть, кроме того, дополнены ростовыми факторами (например, bFGF) и/или антибиотиками, такими как пенициллин и стрептомицин.

Предпочтительной средой для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению является среда X–VIVO15 (Lonza) с ингибитором LATS согласно настоящему изобретению. Данная среда для пролиферации клеток имеет преимущество, заключающееся в отсутствии необходимости дополнительных ростовых факторов или питающих клеток для облегчения пролиферации LSC. Среда X–VIVO содержит inter alia человеческий альбумин, рекомбинантный человеческий инсулин и пастеризованный человеческий трансферрин фармацевтической степени чистоты. Необязательно могут быть добавлены антибиотики в среду X–VIVO15. В предпочтительном варианте осуществления среду X–VIVO15 применяют без добавления антибиотиков.

Среда для пролиферации клеток содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению. Ингибитор LATS предпочтительно выбран из группы, содержащей соединения формулы A1 или ее подформул, и далее описан в разделе "Ингибиторы LATS".

В предпочтительном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 0,5 до 100 микромоль/л, предпочтительно от приблизительно 0,5 до 25 микромоль/л, более предпочтительно от приблизительно 1 до 20 микромоль/л. В конкретном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 3 до 10 микромоль/л.

В одном варианте осуществления стоковый раствор соединения формулы A1 или ее подформул может быть получен путем растворения порошка соединения до стоковой концентрации 10 мМ в DMSO.

В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор LATS согласно настоящему изобретению ингибирует активность LATS1 и/или LATS2 в лимбальных клетках. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

Клетки могут подвергаться этапу или этапам добавления свежей ростовой среды и/или среды для пролиферации клеток. Клетки не нуждаются в пересеве для добавления свежей среды, но пересев клеток также является способом добавления свежей среды.

Также может быть применим ряд сред в различных сочетаниях порядка, например, среда для пролиферации клеток с последующим добавлением ростовой среды (которая не дополнена ингибиторами LATS согласно настоящему изобретению и может отличаться от ростовой среды, применяемой в качестве основы для среды для пролиферации клеток).

Фаза увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению происходит на протяжении периода воздействия на клетки среды для пролиферации клеток.

Могут быть применены стандартные температурные условия, известные в уровне

техники для культивирования клеток, например, предпочтительно от приблизительно 30°C до 40°C. Особенно предпочтительно фазу роста клеток, а также увеличения популяции клеток осуществляют при приблизительно 37°C. Может быть использован традиционный клеточный инкубатор с уровнями CO_2 5–10%. Предпочтительно клетки подвергают воздействию 5% CO_2.

При необходимости клетки могут быть пересеяны в ходе культивирования в ростовую среду или среду для пролиферации клеток. Клетки могут быть пересеяны, когда они почти сливаются или сливаются. Предпочтительно клетки пересевают при достижении ими примерно 90%–100% слияния, хотя также пересевают при более низких уровнях процентного слияния. Пересев клеток выполняют в соответствии со стандартными протоколами, известными в уровне техники. Например, вкратце, клетки пересевают путем обработки культур аккутазой (например, в течение 10 минут), промывания клеточной суспензии с помощью центрифугирования и посева клеток в свежую ростовую среду или среду для пролиферации клеток при необходимости. Отношения деления клеток варьируют, например, от 1:2 до 1:5.

Для фазы увеличения популяции клеток в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению увеличение высеваемой популяции клеток в среде для пролиферации клеток можно выполнять до получения необходимого количества клеточного материала.

Клетки могут быть подвергнуты воздействию среды для пролиферации клеток на протяжении ряда периодов времени для наращивания популяции клеток. Например, может быть предусмотрен цельный период времени, на протяжении которого LSC держат в культуре, или на протяжении первой недели после выделения LSC, или в течение 24 часов после иссечения лимба из роговицы.

В предпочтительном варианте осуществления засевающую популяцию клеток подвергают воздействию ингибиторов LATS согласно настоящему изобретению (таких как соединения формулы A1 или ее подформул) непосредственно после выделения клеток из роговицы и выдерживают в течение всего времени, необходимого для пролиферации LSC, например от 12 до 16 суток.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения методика генного редактирования необязательно может быть выполнена для генетической модификации клеток, для уменьшения или устранения экспрессии и/или функции опосредующего иммунный ответ гена, который в противном случае может способствовать иммунному отторжению при доставке популяции клеток пациенту. Применение методик генного редактирования в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению является необязательным, и вместо этого при желании можно использовать введение пациенту местных иммуносупрессантов и/или противовоспалительных средств (которые описаны далее в разделе "Иммуносупрессант и противовоспалительное средство"), чтобы смягчить проблемы иммунного отторжения трансплантированного

материала у пациента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения генетическая модификация предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, связанного с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В предпочтительном варианте осуществления генетическая модификация предусматривает введение в лимбальную стволовую клетку системы генного редактирования, которая специфически нацеливается на ген, связанный с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В конкретном варианте осуществления указанная система генного редактирования выбрана из группы, состоящей из CRISPR (CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, также известные как системы CRISPR/Cas), ZFN (нуклеаз с цинковыми пальцами), TALEN (эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции), сконструированных мегануклеаз (например, нуклеаз ARCUS, таких как нуклеаза ARC), генного редактирования с помощью вектора AAV (адено–ассоциированного вируса) (например, управляемой вектором AAV гомологичной рекомбинации) и технологий редактирования генома на основе лентивирусных векторов. Управляемая вектором AAV доставка гена, такая как управляемая гомологичной рекомбинацией, может быть достигнута с помощью AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или их производной.

Методика генного редактирования, если применяется, может быть выполнена в разных точках, таких как, например, (1) в лимбальной эпителиальной ткани перед выделением LSC, или (2) во время выделения клеток, или (3) во время фазы увеличения популяции клеток in vitro (когда клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro), или (4) в конце фазы увеличения популяции клеток in vitro (после того, как клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro). В конкретном варианте осуществления CRISPR применяют после двух недель увеличения популяции клеток in vitro в присутствии ингибитора LATS согласно настоящему изобретению.

Методики генного редактирования, подходящие для применения в способе увеличения популяции клеток, далее описываются в разделе "Снижение иммунного отторжения".

В способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS, которые предпочтительно представляют собой соединения, вызывают более чем 2–кратное увеличение высеянной популяции клеток

В одном аспекте способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению соединения формулы A1 или ее подформул вызывают более чем 30–кратное увеличение высеянной популяции лимбальных клеток. В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 100–2200–кратное увеличение высеянной популяции лимбальных клеток. В более конкретном варианте

осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 600–2200–кратное увеличение высеянной популяции лимбальных клеток. Фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут за один или несколько пересевов клеток. В другом аспекте настоящего изобретения фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут после воздействия соединения формулы A1 или ее подформул на протяжении от приблизительно 12 до 16 суток, предпочтительно приблизительно 14 суток.

В одном аспекте способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул дают популяцию клеток с более чем 6% p63alpha–положительных клеток от общего количества клеток. В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул дают популяцию клеток с более чем 20% p63alpha–положительных клеток от общего количества клеток. В другом конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул дают популяцию клеток с более чем 70% p63alpha–положительных клеток от общего количества клеток. В еще одном конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул дают популяцию клеток с более чем 95% p63alpha–положительных клеток от общего количества клеток. Увеличение процента p63alpha–положительных клеток, достигаемое с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнуто за один или несколько пересевов клеток. В другом аспекте настоящего изобретения увеличение процента p63alpha–положительных клеток, достигаемое с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнуто после воздействия соединения формулы A1 или ее подформул на протяжении от приблизительно 12 до 16 суток, предпочтительно приблизительно 14 суток.

Если нужно измерить число клеток или степень увеличения популяции клеток, это можно выполнить, например, путем отбора аликвоты и выполнения иммуноцитохимии (например, с подсчетом ядер, окрашенных с помощью Sytox Orange), или путем визуализации живых клеток под светлопольным микроскопом с подсчетом числа клеток, или путем выполнения количественного анализа живых клеток в режиме реального времени на предмет слияния клеток в разные моменты времени в ходе фазы увеличения популяции клеток способа согласно настоящему изобретению.

Анализ с помощью Sytox Orange может быть выполнен в соответствии со

стандартными протоколами, известными в уровне техники. Вкратце, после прикрепления клеток к чашке для культивирования клеток (обычно через 24 часа после посева клеток) клетки фиксируют в параформальдегиде. Затем клетки пермеабилизируют (например, с использованием раствора 0,3% Triton X–100), а затем их метят в растворе Sytox Orange (например, с использованием 0,5 микромоль/л Sytox Orange в PBS). Количество ядер, окрашенных Sytox Orange, на площадь поверхности затем подсчитывают под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss.

В одном аспекте согласно настоящему изобретению популяция LSC, получаемая или полученная способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, предпочтительно, демонстрирует по меньшей мере одну из следующих характеристик. Более предпочтительно она демонстрирует две или более, более предпочтительно все из следующих характеристик.

(1) Препарат на основе клеток является положительным в отношении клеток с p63alpha. Экспрессия p63alpha может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например, иммуногистохимия и количественная RT–PCR.

(2) Препарат на основе клеток предусматривает более 6% p63alpha–положительных клеток. Предпочтительно препарат на основе клеток предусматривает более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% p63alpha–положительных клеток. В предпочтительном варианте осуществления препарат на основе клеток предусматривает более 95% p63alpha–положительных клеток. Процент клеток с p63alpha может быть измерен с помощью иммуногистохимии или FACS.

(3) Клетки экспрессируют один или несколько из ABCB5, ABCG2 и C/EBPδ. Экспрессия ABCB5, ABCG2 и C/EBPδ может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например, иммуногистохимия и количественная RT–PCR.

(4) Клетки могут дифференцироваться в роговичные эпителиальные клетки, что наблюдают по экспрессии кератина–12. Эти характеристики можно наблюдать с помощью иммуногистохимии или FACS.

Популяцию клеток, увеличенную с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, можно добавлять в раствор, а затем хранить, например в растворе для консервации или криоконсервации (таких как описанные ниже), или добавлять непосредственно в композицию, подходящую для глазной доставки. Раствор для консервации, криоконсервации или композиция, подходящая для глазной доставки, необязательно могут содержать ингибитор LATS согласно настоящему изобретению.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат на основе популяции клеток, который доставляют в глаз, предусматривает уровни, от очень низких до незначительных, соединения, являющегося ингибитором LATS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления способ увеличения

популяции клеток согласно настоящему изобретению включает дополнительную стадию промывания для удаления в значительной степени соединения согласно настоящему изобретению (такого как соединение формулы A1 или ее подформул). Это может предусматривать промывание клеток после фазы увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению. Для промывания клеток клетки отсоединяют от чашки для культивирования (например, путем обработки аккутазой), отсоединенные клетки затем центрифугируют и получают клеточную суспензию в PBS или ростовой среде согласно настоящему изобретению. Эта стадия может быть выполнена несколько раз, например от одного до десяти раз, для вымывания клеток. Наконец клетки при необходимости могут быть повторно суспендированы в растворе для консервации, растворе для криоконсервации, композиции, подходящей для глазной доставки, ростовой среде или их комбинациях.

Увеличенная популяция клеток, полученных способом увеличения популяции клеток и промытых средой для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS согласно настоящему изобретению, может быть перенесена в композицию, подходящую для глазной доставки, такую как, например, средство, обеспечивающее локальную доставку. Необязательно популяцию клеток хранят на протяжении периода перед добавлением к средству, обеспечивающему локальную доставку, подходящему для глазной доставки. В предпочтительном варианте осуществления увеличенная популяция клеток сначала может быть добавлена в раствор, подходящий для консервации или криоконсервации, который предпочтительно не содержит ингибитор LATS, и популяцию клеток хранят (необязательно с замораживанием) перед добавлением к средству, обеспечивающему локальную доставку, подходящему для глазной доставки, которое также предпочтительно не содержит ингибитор LATS.

Типичными растворами, подходящими для консервации LSC, являются Optisol или PBS, предпочтительно Optisol. Optisol представляет собой среду для хранения роговицы, содержащую хондроитинсульфат и декстран для усиления дегидратации роговицы на протяжении хранения (см., например, Kaufman et al., (1991) Optisol corneal storage medium; Arch Ophthalmol Jun; 109(6): 864–8). Для криоконсервации можно применять глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид в растворе для криоконсервации согласно настоящему изобретению. Криоконсервированный препарат клеток, как правило, держат при –20°C или –80°C.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к консервированному или криоконсервированному препарату лимбальных стволовых клеток, получаемых способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению. В альтернативном аспекте настоящее изобретение относится к свежему препарату на основе клеток, в котором лимбальные стволовые клетки, получаемые способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, находятся в суспензии в PBS и/или ростовой среде или объединены с средством, обеспечивающим локальную доставку. Свежий препарат на основе клеток, как правило, держат при приблизительно 15–37°C. Для

хранения клеток можно использовать стандартные контейнеры для клеточных культур, известные в уровне техники, такие как флакон или колба.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перед применением для глаза криоконсервированный препарат клеток размораживают (например, путем инкубации при температуре приблизительно 37°C в инкубаторе или на водяной бане). Предпочтительно 10 объемов PBS или ростовой среды можно добавлять для вымывания клеток из раствора для криоконсервации. Затем клетки могут быть промыты центрифугированием, и клеточная суспензия может быть получена в PBS и/или ростовой среде до объединения с средством, обеспечивающим локальную доставку, для глазной доставки, которое также предпочтительно не содержит ингибитор LATS.

В одном аспекте настоящего изобретения увеличенную популяцию клеток, получаемых способом увеличения популяции клеток, получают в виде суспензии (например, в PBS и/или ростовой среде, такой как, например, среда X–VIVO) и объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, подходящим для глазной доставки (таким как биологическая матрица, подобная GelMA). В конкретном варианте осуществления способа лечения согласно настоящему изобретению такую комбинацию клеток, PBS и/или ростовой среды и биологической матрицы доставляют в глаз с помощью носителя (такого как контактная линза). В еще одном конкретном варианте осуществления такая комбинация клеток, PBS и/или ростовой среды и биологической матрицы предусматривает максимум только следовые уровни ингибитора LATS.

Термин "следовые уровни", используемый в данном документе, означает менее 5% вес/объем (например, не более чем 5% вес/объем, 4% вес/объем, 3% вес/объем, 2% вес/объем или 1% вес/объем) и предпочтительно менее 0,01% вес/объем (например, не более чем 0,01% вес/объем, 0,009% вес/объем, 0,008% вес/объем, 0,007% вес/объем, 0,006% вес/объем, 0,005% вес/объем, 0,004% вес/объем, 0,003% вес/объем, 0,002% вес/объем или 0,001% вес/объем), что может быть измерено, например, с использованием хроматографии с высоким разрешением, как описано в примерах в данном документе. В некоторых вариантах осуществления следовые уровни соединения, являющегося ингибитором LATS, согласно настоящему изобретению представляют собой уровни остаточных соединений, присутствующих после одной или нескольких стадий промывания, которые в совокупности ниже эффективности таких соединений в отношении клеток, и, соответственно, они не индуцируют биологический эффект in vivo. Следовательно, остаточные уровни соединений ниже количества, которое, как ожидается, будет оказывать биологический эффект на увеличение популяции клеток в клеточной культуре или у субъекта (например, после трансплантации увеличенной популяции клеток субъекту). Следовые уровни могут быть измерены, например, как эффективность промывания, которая может быть вычислена следующим образом: эффективность промывания=100 – (средняя концентрация в осажденной массе после промывания x объем осажденной массы x молекулярная масса) / (концентрация соединения x объем

культуральной среды x молекулярная масса). Используемая в данном документе фраза "промывание для удаления в значительной степени" соединения, являющегося ингибитором LATS, согласно настоящему изобретению из клеток относится к стадиям для установления следовых уровней соединения, являющегося ингибитором LATS.

В качестве альтернативы, клетки могут быть культивированы, и фаза пролиферации популяции клеток может происходить в среде для пролиферации клеток на средстве, обеспечивающем локальную доставку, подходящем для доставки клеток на поверхность глаза (например, фибрин, коллаген).

Увеличение популяции клеток для получения увеличенной популяции роговичных эндотелиальных клеток

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения роговичные эндотелиальные клетки, например, выделенные и получаемые, как описано в разделе "Исходный материал для получения увеличенной популяции роговичных эндотелиальных клеток", могут быть выращены в среде в контейнере для культивирования, известном в уровне техники, таком как планшеты, многолуночные планшеты и колбы для клеточной культуры. Например, может быть применена чашка для культивирования, которая не покрыта или покрыта коллагеном, Synthemax, желатином или фибронектином. Предпочтительным примером подходящего контейнера для культивирования является непокрытый планшет. Также можно применять стандартные контейнеры и оборудование для культивирования, как, например, биореакторы, известные в уровне техники для промышленного применения.

Применяемой средой может быть ростовая среда или среда для пролиферации клеток. Ростовую среду в данном документе определяют как культуральную среду, поддерживающую рост и сохраняющую популяцию клеток. Подходящие ростовые среды известны в уровне техники для культуры роговичных эндотелиальных клеток, например, DMEM (модифицированная Дульбекко среда Игла), дополненная FBS (эмбриональная бычья сыворотка) (Invitrogen), среда SF (бессывороточная) для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen), дополненная сывороткой человека, среда X–VIVO15 (Lonza) или кондиционированная мезенхимальными стволовыми клетками среда. Они могут быть, кроме того, дополнены ростовыми факторами (например, bFGF) и/или антибиотиками, такими как пенициллин и стрептомицин. Предпочтительной ростовой средой согласно настоящему изобретению является среда X–VIVO15 (которую дополнительно не дополняют ростовыми факторами).

В качестве альтернативы, выделенные клетки могут быть добавлены первыми в среду для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению. Среда для пролиферации клеток, определяемая в данном документе, содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению. В среде для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению компонент ростовой среды выбран из группы, состоящей из DMEM (модифицированной Дульбекко среды Игла), дополненной FBS (эмбриональной бычьей сывороткой) (Invitrogen), среды SF (бессывороточной) для

эндотелиальных клеток человека (Invitrogen), дополненной сывороткой человека, среды X–VIVO15 (Lonza) или кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками среды. Они могут быть, кроме того, дополнены ростовыми факторами (например, bFGF) и/или антибиотиками, такими как пенициллин и стрептомицин.

Предпочтительной средой для пролиферации клеток согласно настоящему изобретению является среда X–VIVO15 (Lonza) с ингибитором LATS согласно настоящему изобретению. Данная среда для пролиферации клеток имеет преимущество, заключающееся в отсутствии необходимости дополнительных ростовых факторов или питающих клеток для облегчения пролиферации CEC. Среда X–VIVO содержит inter alia человеческий альбумин, рекомбинантный человеческий инсулин и пастеризованный человеческий трансферрин фармацевтической степени чистоты. Необязательно могут быть добавлены антибиотики в среду X–VIVO15. В предпочтительном варианте осуществления среду X–VIVO15 применяют без добавления антибиотиков.

Среда для пролиферации клеток содержит ростовую среду и ингибитор LATS согласно настоящему изобретению. Ингибитор LATS предпочтительно выбран из группы, содержащей соединения формулы A1 или ее подформул, и далее описан в разделе "Ингибиторы LATS".

В предпочтительном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 0,5 до 100 микромоль/л, предпочтительно от приблизительно 0,5 до 25 микромоль/л, более предпочтительно от приблизительно 1 до 20 микромоль/л. В конкретном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул добавляют в концентрации от приблизительно 3 до 10 микромоль/л.

В одном варианте осуществления стоковый раствор соединения формулы A1 или ее подформул может быть получен путем растворения порошка соединения до стоковой концентрации 10 мМ в DMSO.

В одном аспекте настоящего изобретения ингибитор LATS согласно настоящему изобретению ингибирует активность LATS1 и/или LATS2 в роговичных эндотелиальных клетках. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

Клетки могут подвергаться этапу или этапам добавления свежей ростовой среды и/или среды для пролиферации клеток. Клетки не нуждаются в пересеве для добавления свежей среды, но пересев клеток также является способом добавления свежей среды.

Также может быть применим ряд сред в различных сочетаниях порядка, например, среда для пролиферации клеток с последующим добавлением ростовой среды (которая не дополнена ингибиторами LATS согласно настоящему изобретению и может отличаться от ростовой среды, применяемой в качестве основы для среды для пролиферации клеток).

Фаза увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению происходит на протяжении периода воздействия на клетки среды для пролиферации клеток.

Могут быть применены стандартные температурные условия, известные в уровне

техники для культивирования клеток, например, предпочтительно от приблизительно 30°C до 40°C. Особенно предпочтительно фазу роста клеток, а также увеличения популяции клеток осуществляют при приблизительно 37°C. Может быть использован традиционный клеточный инкубатор с уровнями CO_2 5–10%. Предпочтительно клетки подвергают воздействию 5% CO_2.

При необходимости клетки могут быть пересеяны в ходе культивирования в ростовую среду или среду для пролиферации клеток. Клетки могут быть пересеяны, когда они почти сливаются или сливаются. Предпочтительно клетки пересевают при достижении ими примерно 90%–100% слияния, хотя также пересевают при более низких уровнях процентного слияния. Пересев клеток выполняют в соответствии со стандартными протоколами, известными в уровне техники. Например, вкратце, клетки отсоединяют от контейнера для культивирования, например, с использованием коллагеназы. Затем клетки центрифугируют и промывают в PBS или клеточной ростовой среде согласно настоящему изобретению и высевают в свежую ростовую среду или среду для пролиферации клеток при необходимости при разбавлении, например, 1:2–1:4.

Для фазы увеличения популяции клеток в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению увеличение высеваемой популяции клеток в среде для пролиферации клеток можно выполнять до получения необходимого количества клеточного материала.

Клетки могут быть подвергнуты воздействию среды для пролиферации клеток на протяжении ряда периодов времени для наращивания популяции клеток. Например, может быть предусмотрен цельный период времени, на протяжении которого CEC держат в культуре, или на протяжении только первых одной – двух недель после выделения CEC, или только в течение 24 часов после иссечения роговицы.

В предпочтительном варианте осуществления роговичные эндотелиальные клетки подвергают воздействию ингибиторов LATS согласно настоящему изобретению (таких как соединения формулы A1 или ее подформул) непосредственно после выделения клеток из роговицы и выдерживают в течение всего времени, необходимого для пролиферации CEC, например одну – две недели.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения после фазы увеличения популяции клеток in vitro (т. е. после воздействия на клетки ингибитора LATS согласно настоящему изобретению на протяжении периода времени для увеличения популяции клеток) способ увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению предусматривает дополнительную стадию, на которой клетки можно выращивать на протяжении периода времени (например, две недели) в ростовой среде без дополнения ингибитором LATS, для обеспечения формирования зрелого роговичного эндотелия. Зрелый роговичный эндотелий в данном документе определяют как монослой CEC с гексагональной морфологией, ZO–1–положительными плотными соединениями и экспрессией Na/K АТФазы. В предпочтительном варианте осуществления клетки не пересевают, пока не сформируется зрелый роговичный эндотелий.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения методика генного редактирования необязательно может быть выполнена для генетической модификации клеток, для уменьшения или устранения экспрессии и/или функции опосредующего иммунный ответ гена, который в противном случае может способствовать иммунному отторжению при доставке популяции клеток пациенту. Применение методик генного редактирования в способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению является необязательным, и вместо этого при желании можно использовать введение пациенту местных иммуносупрессантов и/или противовоспалительных средств (которые описаны далее в разделе "Иммуносупрессант и противовоспалительное средство"), чтобы смягчить проблемы иммунного отторжения трансплантированного материала у пациента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения для сценария, при котором применяют методику генного редактирования, генетическая модификация предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, связанного с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В предпочтительном варианте осуществления генетическая модификация предусматривает введение в роговичную эндотелиальную клетку системы генного редактирования, которая специфически нацеливается на ген, связанный с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В конкретном варианте осуществления указанная система генного редактирования выбрана из группы, состоящей из CRISPR (CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, также известные как системы CRISPR/Cas), ZFN (нуклеаз с цинковыми пальцами), TALEN (эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции), сконструированных мегануклеаз (например, нуклеаз ARCUS, таких как нуклеаза ARC), генного редактирования с помощью вектора AAV (адено–ассоциированного вируса) (например, управляемой вектором AAV гомологичной рекомбинации) и технологий редактирования генома на основе лентивирусных векторов. Управляемая вектором AAV доставка гена, такая как управляемая гомологичной рекомбинацией, может быть достигнута с помощью AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или их производной.

Методика генного редактирования, если применяется, может быть выполнена в разных точках, таких как, например, (1) в ткани роговицы, перед выделением CEC, или (2) во время выделения клеток, или (3) во время фазы увеличения популяции клеток in vitro (когда клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro), или (4) в конце фазы увеличения популяции клеток in vitro (после того, как клетки подвергаются воздействию ингибитора LATS согласно настоящему изобретению in vitro).

Методики генного редактирования, подходящие для применения в способе увеличения популяции клеток, далее описываются в разделе "Снижение иммунного отторжения".

В способе увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS, которые предпочтительно представляют собой соединения, вызывают более чем 2–кратное увеличение высеянной популяции клеток

В одном аспекте способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению соединения формулы A1 или ее подформул вызывают более чем 10–кратное увеличение высеянной популяции роговичных эндотелиальных клеток. В конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 15–600–кратное увеличение высеянной популяции роговичных эндотелиальных клеток. В более конкретном варианте осуществления способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению ингибиторы LATS формулы A1 или ее подформул вызывают 20–550–кратное увеличение посеянной популяции роговичных эндотелиальных клеток. Фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут за один или несколько пересевов клеток. В другом аспекте настоящего изобретения фактор кратности увеличения, достигаемый с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть достигнут после воздействия соединения формулы A1 или ее подформул на протяжении одной – двух недель, предпочтительно через приблизительно 10 суток.

Если нужно измерить число клеток или степень увеличения популяции клеток, это можно выполнить, например, путем отбора аликвоты и выполнения иммуноцитохимии (например, с подсчетом ядер, окрашенных с помощью Sytox Orange), или путем визуализации живых клеток под светлопольным микроскопом с подсчетом числа клеток, или путем выполнения количественного анализа живых клеток в режиме реального времени на предмет слияния клеток в разные моменты времени в ходе фазы увеличения популяции клеток способа согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящего изобретения популяция CEC, получаемая или полученная способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению предпочтительно, демонстрирует по меньшей мере одну из следующих характеристик. Более предпочтительно она демонстрирует две или более, особенно предпочтительно все из следующих характеристик.

(1) Клетки экспрессируют Na/K АТФазу. Экспрессия Na/K АТФазы может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например, иммуногистохимия и количественная RT–PCR, или с помощью анализа FACS.

(2) Клетки экспрессируют один или несколько из коллагена 8a2, AQP1 (аквапорина 1) и SLC4A11 (представителя 11 семейства транспортеров растворенных вещества 4 типа). Предпочтительно относительные уровни экспрессии выше, чем у клеток, которые, как правило, не экспрессируют коллаген 8a2, AQP1 и SLC4A11, таких как, например, фибробласты кожи. Экспрессия коллагена 8a2, AQP1 или SLC4A11 может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например,

иммуногистохимия и количественная RT–PCR, или с помощью анализа FACS.

(3) Клетки не экспрессируют (или экспрессируют не более, чем относительно низкие уровни) RPE65 (маркер ретинального пигментного эпителия) и/или CD31 (маркер сосудистого эндотелия). Относительные уровни экспрессии подобны таковым в клетках, которые, как правило, не экспрессируют RPE65, CD31, таких как, например, фибробласты кожи. Экспрессия RPE65 и CD31 может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например, количественная RT–PCR, иммуногистохимия или анализ FACS.

(4) Клетки экспрессируют относительно низкие уровни CD73. Относительные уровни экспрессии ниже таковых в клетках, которые подверглись эндотелиально–мезенхимальному переходу. Экспрессия CD73 может быть оценена с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как, например, анализ FACS или иммуногистохимия.

В другом аспекте настоящего изобретения, при культивировании в слое, например, при культивировании в планшете, популяция CEC, получаемая способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, предпочтительно демонстрирует по меньшей мере одну из следующих характеристик. Более предпочтительно она демонстрирует две или более, особенно предпочтительно все из следующих характеристик.

(1) Клетки способны формировать однослойную структуру. Это одна из характеристик слоя роговичных эндотелиальных клеток в организме. Это можно наблюдать с помощью окрашивания ядер (например, красителем для ядер, таким как Sytox, Hoechst) с последующей проверкой с помощью микроскопии.

(2) Клетки способны формировать плотные соединения. Это можно проверить с помощью стандартной методики, известной в уровне техники, иммунофлуоресцентного окрашивания маркера плотного соединения Zonula Occludens–1 (ZO–1).

(3) Клетки способны правильно располагаться в клеточном слое. Это можно проверить с помощью стандартной методики, известной в уровне техники, иммунофлуоресцентного окрашивания маркера плотного соединения Zonula Occludens–1 (ZO–1). В слое здоровых роговичных эндотелиальных клеток в организме клетки, составляющие слой, расположены правильно, благодаря чему считается, что роговичные эндотелиальные клетки поддерживают нормальную функцию и высокую прозрачность, а роговица, как считается, надлежащим образом выполняет функцию контроля воды.

Популяцию клеток, увеличенную с помощью способа увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, можно добавлять в раствор, а затем хранить, например в растворе для консервации или криоконсервации (таких как описанные ниже), или добавлять непосредственно в композицию, подходящую для глазной доставки. Раствор для консервации, криоконсервации или композиция, подходящая для глазной доставки, необязательно могут содержать ингибитор LATS согласно настоящему изобретению.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения препарат на основе популяции клеток, который доставляют в глаз, предусматривает уровни, от очень низких до незначительных, соединения, являющегося ингибитором LATS. Таким образом, в конкретном варианте осуществления способ увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению включает дополнительную стадию промывания для удаления в значительной степени соединения согласно настоящему изобретению (такого как соединение формулы A1 или ее подформул). Она может предусматривать промывание клеток после фазы увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению (непосредственно после фазы увеличения популяции клеток и/или после того, как клетки культивировали с образованием зрелого роговичного эндотелия в ростовой среде, которая не была дополнена ингибитором LATS). Для промывания клеток клетки центрифугируют и получают клеточную суспензию в PBS или ростовой среде согласно настоящему изобретению. Эта стадия может быть выполнена несколько раз, например от одного до десяти раз, для вымывания клеток. Наконец клетки при необходимости могут быть повторно суспендированы в растворе для консервации, растворе для криоконсервации, композиции, подходящей для глазной доставки, ростовой среде или их комбинациях.

Увеличенная популяция клеток, полученных способом увеличения популяции клеток и промытых средой для пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS согласно настоящему изобретению, может быть перенесена в композицию, подходящую для глазной доставки, такую как, например, средство, обеспечивающее локальную доставку. Необязательно популяцию клеток хранят на протяжении периода перед добавлением к средству, обеспечивающему локальную доставку, подходящему для глазной доставки. В предпочтительном варианте осуществления увеличенная популяция клеток сначала может быть добавлена в раствор, подходящий для консервации или криоконсервации, который предпочтительно не содержит ингибитор LATS, и популяцию клеток хранят (необязательно с замораживанием) перед добавлением к средству, обеспечивающему локальную доставку, подходящему для глазной доставки, которое также предпочтительно не содержит ингибитор LATS.

Типичными растворами, подходящими для консервации CEC, являются Optisol или PBS, предпочтительно Optisol. Optisol представляет собой среду для хранения роговицы, содержащую хондроитинсульфат и декстран для усиления дегидратации роговицы на протяжении хранения (см., например, Kaufman et al., (1991) Optisol corneal storage medium; Arch Ophthalmol Jun; 109(6): 864–8). Для криоконсервации можно применять глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид в растворе для криоконсервации согласно настоящему изобретению. Криоконсервированный препарат клеток, как правило, держат при –20°C или –80°C.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к консервированному или криоконсервированному препарату роговичных эндотелиальных клеток, получаемому способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению. В

альтернативном аспекте настоящее изобретение относится к свежему препарату на основе клеток, в котором роговичные эндотелиальные клетки, получаемые способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, находятся в суспензии в PBS и/или ростовой среде или объединены со средством, обеспечивающим локальную доставку. Свежий препарат на основе клеток, как правило, держат при приблизительно 37°C. Для хранения клеток можно использовать стандартные контейнеры для клеточных культур, известные в уровне техники, такие как флакон или колба.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения перед применением для глаза криоконсервированный препарат клеток размораживают (например, путем инкубации при температуре приблизительно 37°C в инкубаторе или на водяной бане). Предпочтительно 10 объемов PBS или ростовой среды можно добавлять для вымывания клеток из раствора для криоконсервации. Затем клетки могут быть промыты центрифугированием, и клеточная суспензия может быть получена в PBS и/или ростовой среде до объединения со средством, обеспечивающим локальную доставку для глазной доставки, которое также предпочтительно не содержит ингибитор LATS.

В одном аспекте настоящего изобретения увеличенную популяцию клеток, получаемых способом увеличения популяции клеток (предпочтительно также предусматривающим стадию выращивания в среде без добавки ингибитора LATS с образованием зрелого роговичного эндотелия), получают в виде суспензии (например, в PBS и/или ростовой среде, такой как, например, среда X–VIVO) и объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, подходящим для глазной доставки (таким как биологическая матрица, подобная GelMA). В конкретном варианте осуществления способа лечения согласно настоящему изобретению такую комбинацию клеток, PBS и/или ростовой среды и биологической матрицы доставляют в глаз в виде суспензии. В еще одном конкретном варианте осуществления такая комбинация клеток, PBS и/или ростовой среды и биологической матрицы предусматривает максимум только следовые уровни ингибитора LATS.

В качестве альтернативы, клетки могут быть культивированы, и фаза пролиферации популяции клеток может происходить в среде для пролиферации клеток на средстве, обеспечивающем локальную доставку, подходящем для доставки клеток на поверхность глаза.

В варианте осуществления настоящего изобретения популяция клеток, увеличенная согласно настоящему изобретению, может быть выделена в виде пласта прилегающих клеток для доставки в роговицу с использованием способов, известных в уровне техники (например, см. Kim et al, JSM Biotechnol. Bioeng., 2016, p.1047). Пласты клеток можно механически поддерживать на материале или материалах для доставки в роговицу.

Снижение иммунного отторжения

При трансплантации существует риск отторжения аллогенных лимбальных стволовых клеток иммунной системой реципиента. Можно применять режимы

иммуносупрессии для снижения риска иммунного отторжения трансплантированных клеток, таких как LSC.

Подходящие системные иммуносупрессанты, применяемые для реципиентов аллогенных LSC, включают в себя такролимус, микофенолята мофетил, преднизон, и профилактический валганцикловир, и триметоприм/сульфаметоксазол. (См. Holland EJ, Mogilishetty G, Skeens HM, Hair DB, Neff KD, Biber JM, Chan CC (2012) Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation: results of a 10–year experience. Cornea. 2012 Jun;31(6):655–61).

Поскольку способы увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению обеспечивают высокую степень способности увеличения популяции клеток необязательно можно применять технологии генного редактирования для удаления "усилителей" иммунного отторжения или добавления генов, которые снижают иммунный ответ реципиента.

В одном аспекте настоящего изобретения генное редактирование осуществляют в популяции клеток "ex vivo". В другом аспекте настоящего изобретения технологии генного редактирования необязательно можно применять для снижения или устранения экспрессии гена, связанного с содействием иммунной реакции "трансплантат против хозяина". В предпочтительном варианте осуществления ген выбран из группы, состоящей из: B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C. В конкретном варианте осуществления геном является B2M. B2M представляет собой бета 2 микроглобулин и является компонентом главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса. Он имеет идентификатор Комитета по номенклатуре генов HUGO (HGNC) 914. HLA–A представляет собой главный комплекс гистосовместимости, I класс, A (идентификатор HGNC 4931). HLA–B представляет собой главный комплекс гистосовместимости, I класс, B (идентификатор HGNC 4932). HLA–C представляет собой главный комплекс гистосовместимости, I класс, C (идентификатор HGNC 4933).

Можно применять несколько способов генного редактирования, в том числе без ограничения способы, выбранные из группы, состоящей из CRISPR (CRISPR: короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, также известные как системы CRISPR/Cas), ZFN (нуклеаз с цинковыми пальцами), TALEN (эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции), сконструированных мегануклеаз (например, нуклеаз ARCUS, таких как нуклеаза ARC), генной доставки с помощью вектора AAV (адено–ассоциированного вируса) (например, управляемой вектором AAV гомологичной рекомбинации) и технологий редактирования генома на основе лентивирусных векторов. Управляемая вектором AAV доставка гена, такая как управляемая гомологичной рекомбинацией, может быть достигнута с помощью AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или их производной.

В одном аспекте настоящего изобретения генное редактирование осуществляют в популяции клеток "ex vivo".

Система генного редактирования

Используемый в данном документе термин "система генного редактирования" относится к системе, содержащей один или несколько связывающих ДНК доменов или компонентов и один или несколько модифицирующих ДНК доменов или компонентов или выделенные нуклеиновые кислоты, например один или несколько векторов, кодирующих указанные связывающие ДНК и модифицирующие ДНК домены или компоненты. Системы генного редактирования применяют для модификации нуклеиновой кислоты целевого гена и/или для модулирования экспрессии целевого гена. В известных системах генного редактирования, например, один или несколько связывающих ДНК доменов или компонентов связаны с одним или несколькими модифицирующими ДНК доменами или компонентами, так что один или несколько связывающих ДНК доменов нацеливают один или несколько модифицирующих ДНК доменов или компонентов на определенный сайт нуклеиновой кислоты. Как описано в данном документе, генное редактирование может быть выполнено ex vivo.

Системы генного редактирования на основе AAV

Применение векторов, полученных из AAV, для переноса генов in vitro и in vivo хорошо известно в уровне техники (см. патент США № 9707304, например). Применение вирусных векторов для редактирования генов в клетке описано, например, в Chen et al., 2016, Molecular Therapy, 24:447–457; Gornalusse et al., Nature Biotechnology, 2017, 35(8):765–772 и WO2017087961.

Вектор AAV может быть получен с использованием способов, известных в уровне техники. Такие способы описаны, например, в Flotte T R. Adeno–associated virus–based gene therapy for inherited disorders. Pediatr Res. 2005 December; 58(6):1143–7; Goncalves M A. Adeno–associated virus: from defective virus to effective vector, Virol J. 2005 May 6; 2:43; Surace E M, Auricchio A. Adeno–associated viral vectors for retinal gene transfer. Prog Retin Eye Res. 2003 November; 22(6):705–19; Mandel R J, Manfredsson F P, Foust K D, Rising A, Reimsnider S, Nash K, Burger C. Recombinant adeno–associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. Mol Ther. 2006 March; 13(3):463–83.

Системы генного редактирования CRISPR

Как используется в данном документе, "CRISPR" относится к набору коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, или к системе, содержащей такой набор повторов. Как используется в данном документе, "Cas" относится к ассоциированному с CRISPR белку. Разнообразные системы CRISPR–Cas могут быть разделены на два класса по конфигурации их эффекторных модулей: системы CRISPR 1 класса используют некоторые белки Cas и crRNA для образования эффекторного комплекса, тогда как системы CRISPR 2 класса используют большой однокомпонентный белок Cas в конъюгации с crRNA для опосредования интерференции. В одном примере система CRISPR–Cas 2 класса использует Cpf1 (CRISPR из Prevotella и Francisella 1). См., например, Zetsche et al., Cell 163:759–771 (2015), содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Термин "Cpf1",

используемый в данном документе, включает в себя все ортологи и варианты, которые могут быть использованы в системе CRISPR.

Встречающиеся в природе системы CRISPR находят в примерно 40% секвенированных геномов эубактерий и в 90% секвенированных геномов Archaea. Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172. Эта система является типом прокариотической иммунной системы, которая обеспечивает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму адаптивного иммунитета. Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709–1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843–1845.

Система CRISPR была модифицирована для применения в генном редактировании (сайленсинг, усиление или изменение определенных генов) в эукариотах, таких как мыши или приматы и люди. Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331–8. Это осуществляют, например, путем введения в эукариотическую клетку одного или нескольких векторов, кодирующих специфически сконструированную направляющую РНК (gRNA) (например, gRNA, содержащую последовательность, комплементарную последовательности эукариотического генома), и одной или нескольких соответствующих РНК–направляемых нуклеаз, например белков Cas. РНК–направляемая нуклеаза образует комплекс с gRNA, который затем направляется на целевой сайт ДНК путем гибридизации последовательности gRNA с комплементарной последовательностью эукариотического генома, где РНК–направляемая нуклеаза затем индуцирует разрыв двух нитей или одной нити в ДНК. Вставка или делеция нуклеотидов по разрыву нити или рядом с таковым создает модифицированный геном.

Поскольку они встречаются в природе у многих различных типов бактерий, точное расположение CRISPR и структура, функция и количество генов Cas и их продукт несколько различаются от вида к виду. Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174–182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551–2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653–663; and Stern et al. (2010) Trends. Genet. 28: 335–340. Например, белки Cse (подтип Cas, E. coli) (например, CasA) образуют функциональный комплекс Cascade, который процессирует транскрипты РНК CRISPR в спейсер–единицы повтора, которые сохраняет Cascade. Brouns et al. (2008) Science 321: 960–964. В других прокариотах Cas6 процессирует транскрипт CRISPR. Для основанной на CRISPR фаговой инактивации у E. coli необходимы Cascade и Cas3, но не Cas1 или Cas2. Белки Cmr (модуль RAMP Cas) у Pyrococcus furiosus и других прокариот формируют функциональный комплекс с малыми РНК CRISPR, который распознает и расщепляет комплементарные целевые РНК.

Более простая система CRISPR основывается на белке Cas9, который представляет собой нуклеазу с двумя активными сайтами разрезания, по одному на каждую нить двойной спирали. Объединение Cas9 и модифицированной РНК локуса CRISPR может применяться в системе для генного редактирования. Pennisi (2013) Science 341: 833–836.

В некоторых вариантах осуществления РНК–направляемая нуклеаза представляет

собой молекулу Cas, например молекулу Cas9. "Молекула Cas9" может взаимодействовать с молекулой gRNA (например, последовательностью домена в tracr, также известной как tracrRNA или транс–активирующая РНК CRISPR) и совместно с молекулой gRNA, локализоваться (например, нацеливаться или направляться) в сайте, который содержит целевую последовательность и последовательность PAM (мотив, примыкающий к протоспейсеру).

Согласно настоящему изобретению молекулы Cas9, полученные из белков Cas9 или основанные на таковых из ряда видов, могут быть применены в способах и композициях, описываемых в данном документе. Например, молекулы Cas9, полученные из молекул Cas9 или основанные на таковых, например, из S. pyogenes, S. thermophilus, Staphylococcus aureus и/или Neisseria meningitidis, могут быть применены в системах, способах и композициях, описываемых в данном документе. Дополнительные виды, из которых получен Cas9, включают Acidovorax avenae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus succinogenes, Actinobacillus suis, Actinomyces sp., cycliphilus denitrificans, Aminomonas paucivorans, Bacillus cereus, Bacillus smithii, Bacillus thuringiensis, Bacteroides sp., Blastopirellula marina, Bradyrhizobium sp., Brevibacillus latemsporus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Campylobacter lad, Candidatus Puniceispirillum, Clostridiu cellulolyticum, Clostridium perfringens, Corynebacterium accolens, Corynebacterium diphtheria, Corynebacterium matruchotii, Dinoroseobacter sliibae, Eubacterium dolichum, gamma proteobacterium, Gluconacetobacler diazotrophicus, Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus sputorum, Helicobacter canadensis, Helicobacter cinaedi, Helicobacter mustelae, Ilyobacler polytropus, Kingella kingae, Lactobacillus crispatus, Listeria ivanovii, Listeria monocytogenes, Listeriaceae bacterium, Methylocystis sp., Methylosinus trichosporium, Mobiluncus mulieris, Neisseria bacilliformis, Neisseria cinerea, Neisseria flavescens, Neisseria lactamica, Neisseria sp., Neisseria wadsworthii, Nitrosomonas sp., Parvibaculum lavamentivorans, Pasteurella multocida, Phascolarctobacterium succinatutens, Ralstonia syzygii, Rhodopseudomonas palustris, Rhodovulum sp., Simonsiella muelleri, Sphingomonas sp., Sporolactobacillus vineae, Staphylococcus lugdunensis, Streptococcus sp., Subdoligranulum sp., Tislrella mobilis, Treponema sp. или Verminephrobacter eiseniae.

В некоторых вариантах осуществления способность активной молекулы Cas9 взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой и расщеплять ее является зависимой от последовательности PAM. Последовательность PAM (мотив, примыкающий к протоспейсеру) представляет собой последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Она, как правило, короткая, например 2–7 пар оснований в длину. В одном варианте осуществления расщепление целевой нуклеиновой кислоты происходит выше последовательности PAM. Активные молекулы Cas9 различных видов бактерий могут распознавать различные мотивы последовательности (например, последовательности PAM). В одном варианте осуществления активная молекула Cas9 S. pyogenes распознает мотив последовательности NGG и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты из 1–10, например 3–5, пар оснований выше данной

последовательности. См., например, Mali el al, SCIENCE 2013; 339(6121): 823–826. В варианте осуществления активная молекула Cas9 S. thermophilus распознает мотив последовательности NGGNG (SEQ ID NO: 4) и NNAG AAW (SEQ ID NO: 5) (W=A или T и N представляют собой любое нуклеотидное основание) и направляет расщепление ядерной целевой последовательности нуклеиновой кислоты из 1–10, например 3–5, пар оснований выше данных последовательностей. См., например, Horvath et al., SCIENCE 2010; 327(5962): 167–170, и Deveau et al, J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390–1400. В одном варианте осуществления активная молекула Cas9 S. mutans распознает мотив последовательности NGG или NAAR (R – A или G) и управляет расщеплением коровой целевой последовательности нуклеиновой кислоты из 1–10, например 3–5, пар оснований выше данной последовательности. См., например, Deveau et al., J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390–1400.

В варианте осуществления активная молекула Cas9 S. aureus распознает мотив последовательности NNGRR (SEQ ID NO: 6) (R=A или G) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты из 1–10, например 3–5, пар оснований выше данной последовательности. См., например, Ran F. et al., NATURE, vol. 520, 2015, pp. 186–191. В варианте осуществления активная молекула Cas9 N. meningitidis распознает мотив последовательности NNNNGATT (SEQ ID NO: 7) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты из 1–10, например 3–5, пар оснований выше данной последовательности. См., например, Hou et al., PNAS EARLY EDITION 2013, 1–6. Способность молекулы Cas9 распознавать последовательность PAM можно определить, например, с применением анализа трансформации, описанного в Jinek et al, SCIENCE 2012, 337:816.

Иллюстративные встречающиеся в природе молекулы Cas9 описаны в Chylinski et al, RNA Biology 2013; 10:5, 727–737. Такие молекулы Cas9 включают молекулы Cas9 бактериального семейства кластера 1, бактериального семейства кластера 2, бактериального семейства кластера 3, бактериального семейства кластера 4, бактериального семейства кластера 5, бактериального семейства кластера 6, бактериального семейства кластера 7, бактериального семейства кластера 8, бактериального семейства кластера 9, бактериального семейства кластера 10, бактериального семейства кластера 11, бактериального семейства кластера 12, бактериального семейства кластера 13, бактериального семейства кластера 14, бактериального семейства кластера 15, бактериального семейства кластера 16, бактериального семейства кластера 17, бактериального семейства кластера 18, бактериального семейства кластера 19, бактериального семейства кластера 20, бактериального семейства кластера 21, бактериального семейства кластера 22, бактериального семейства кластера 23, бактериального семейства кластера 24, бактериального семейства кластера 25, бактериального семейства кластера 26, бактериального семейства кластера 27, бактериального семейства кластера 28, бактериального семейства кластера 29, бактериального семейства кластера 30,

бактериального семейства кластера 31, бактериального семейства кластера 32, бактериального семейства кластера 33, бактериального семейства кластера 34, бактериального семейства кластера 35, бактериального семейства кластера 36, бактериального семейства кластера 37, бактериального семейства кластера 38, бактериального семейства кластера 39, бактериального семейства кластера 40, бактериального семейства кластера 41, бактериального семейства кластера 42, бактериального семейства кластера 43, бактериального семейства кластера 44, бактериального семейства кластера 45, бактериального семейства кластера 46, бактериального семейства кластера 47, бактериального семейства кластера 48, бактериального семейства кластера 49, бактериального семейства кластера 50, бактериального семейства кластера 51, бактериального семейства кластера 52, бактериального семейства кластера 53, бактериального семейства кластера 54, бактериального семейства кластера 55, бактериального семейства кластера 56, бактериального семейства кластера 57, бактериального семейства кластера 58, бактериального семейства кластера 59, бактериального семейства кластера 60, бактериального семейства кластера 61, бактериального семейства кластера 62, бактериального семейства кластера 63, бактериального семейства кластера 64, бактериального семейства кластера 65, бактериального семейства кластера 66, бактериального семейства кластера 67, бактериального семейства кластера 68, бактериального семейства кластера 69, бактериального семейства кластера 70, бактериального семейства кластера 71, бактериального семейства кластера 72, бактериального семейства кластера 73, бактериального семейства кластера 74, бактериального семейства кластера 75, бактериального семейства кластера 76, бактериального семейства кластера 77 или бактериального семейства кластера 78.

Иллюстративные встречающиеся в природе молекулы Cas9 включают молекулу Cas9 бактериального семейства кластера 1. Примеры включают молекулу Cas9 из S. pyogenes (например, штамм SF370, MGAS 10270, MGAS 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 и SSI–1), S. thermophilus (например, штамм LMD–9), S. pseudoporcinus (например, штамм SPIN 20026), S. mutans (например, штамм UA 159, NN2025), S. macacae (например, штамм NCTC1 1558), S. gallolylicus (например, штамм UCN34, ATCC BAA–2069), S. equines (например, штамм ATCC 9812, MGCS 124), S. dysdalactiae (например, штамм GGS 124), S. bovis (например, штамм ATCC 700338), S. cmginosus (например, штамм F021 1), S. agalactia* (например, штамм NEM316, A909), Listeria monocytogenes (например, штамм F6854), Listeria innocua (L. innocua, например, штамм Clip 11262), EtUerococcus italicus (например, штамм DSM 15952) или Enterococcus faecium (например, штамм 123408). Дополнительные иллюстративные молекулы Cas9 представляют собой молекулу Cas9 Neisseria meningitidis (Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1–6) и молекулу Cas9 S. aureus.

В варианте осуществления молекула Cas9, например активная молекула Cas9, содержит аминокислотную последовательность, которая на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологична; отличается на не более чем 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% или 40% аминокислотных остатков при сравнении с; отличается по меньшей мере 1, 2, 5, 10 или 20 аминокислотами, но не более чем 100, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 аминокислотами от или идентична по отношению к любой последовательности молекулы Cas9, описываемой в данном документе, или встречающейся в природе последовательности молекулы Cas9, например молекулы Cas9 от видов, перечисленных в данном документе или описанных в Chylinski et al., RNA Biology 2013, 10:5, 727–737 Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1–6.

В варианте осуществления молекула Cas9 содержит аминокислотную последовательность, которая на 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологична; отличается на не более чем 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30% или 40% аминокислотных остатков по сравнению с; отличается по меньшей мере 1, 2, 5, 10 или 20 аминокислотами, но не более чем 100, 80, 70, 60, 50, 40 или 30 аминокислотами от или идентична по отношению к Cas9 S. pyogenes (UniProt Q99ZW2). В вариантах осуществления молекула Cas9 представляет собой вариант Cas9 S. pyogenes, такой как вариант, описанный в Slaymaker et al., Science Express, доступной онлайн с 1 декабря 2015 г. на Science DOI: 10.1126/science.aad5227; Kleinstiver et al., Nature, 529, 2016, pp. 490–495, доступной онлайн с 6 января 2016 г. на doi:10.1038/nature16526; или в US2016/0102324, содержание которых включено в данный документ во всей своей полноте.

В некоторых вариантах осуществления молекула Cas9, например Cas9 S. pyogenes, может дополнительно содержать одну или несколько аминокислотных последовательностей, которые придают дополнительную активность. В некоторых аспектах молекула Cas9 может содержать одну или несколько последовательностей ядерной локализации (NLS), например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше NLS. Как правило, NLS состоит из одной или нескольких коротких последовательностей положительно заряженных остатков лизина или аргинина, расположенных на поверхности белка, но при этом известны и другие типы NLS. Неограничивающие примеры NLS включают в себя последовательность NLS, содержащую или полученную из NLS большого Т–антигена вируса SV40, имеющего аминокислотную последовательность PKKKRKV (SEQ ID NO: 8). Другие подходящие последовательности NLS известны в уровне техники (например, Sorokin, Biochemistry (Moscow) (2007) 72:13, 1439–1457; Lange J Biol Chem. (2007) 282:8, 5101–5). В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления молекула Cas9 может дополнительно (или в качестве альтернативы) содержать метку, например His–метку, например His(6)–метку (SEQ ID NO: 25) или His(8)–метку (SEQ ID NO: 26), например, на N–конце или С–конце.

Таким образом, сконструированные системы генного редактирования CRISPR, например для генного редактирования в эукариотических клетках, как правило, предусматривают (1) молекулу направляющей РНК (gRNA), содержащую нацеливающий домен (который способен гибридизироваться с геномной целевой последовательностью ДНК) и последовательность, которая способна связываться с Cas, например ферментом

Cas9, и (2) белок Cas, например Cas9. Последовательность, которая способна связываться с белком Cas, может содержать домен, называемый tracr–доменом или tracrRNA. Нацеливающий домен и последовательность, которая способна связываться с Cas, например ферментом Cas9, могут быть расположены на одной и той же (иногда называется отдельной gRNA, химерной gRNA или sgRNA) или на разных молекулах (иногда называется двойной gRNA или dgRNA). Если они расположены на разных молекулах, то каждая содержит домен гибридизации, который обеспечивает молекулам возможность ассоциации, например, посредством гибридизации.

Форматы молекулы gRNA известны в уровне техники. Иллюстративная молекула gRNA, например молекула dgRNA, раскрываемая в данном документе, содержит, например состоит из, первую нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность:

5'nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG 3' (SEQ ID NO: 9),

где "n"' относятся к остаткам нацеливающего домена, например который описан в данном документе, и может состоять из 15–25 нуклеотидов, например состоит из 20 нуклеотидов;

и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, имеющею иллюстративную последовательность:

5'AACUUACCAAGGAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC 3', необязательно с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 (например, 4 или 7, например 7) дополнительными нуклеотидами U на 3'–конце (SEQ ID NO: 10).

В качестве альтернативы вторая молекула нуклеиновой кислоты может состоять из фрагмента последовательности, приведенной выше, где такой фрагмент способен к гибридизации с первой нуклеиновой кислотой. Примером такой второй молекулы нуклеиновой кислоты является

5'AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGC 3', необязательно с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 (например, 4 или 7, например 7) дополнительными нуклеотидами U на 3'–конце (SEQ ID NO:11).

Другая иллюстративная молекула gRNA, например молекула sgRNA, раскрываемая в данном документе, содержит, например состоит из, первую нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность:

5'nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC 3' (SEQ ID NO:12), где "n"' относятся к остаткам нацеливающего домена, например который описан в данном документе, и может состоять из 15–25 нуклеотидов, например состоит из 20 нуклеотидов, необязательно с 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 (например, 4 или 7, например 4) дополнительными нуклеотидами U на 3'–конце.

Дополнительные компоненты и/или элементы систем генного редактирования CRISPR, известные в уровне техники, описаны, например, в публикации патентного документа США № 2014/0068797, WO2015/048577 и в Cong (2013) Science 339: 819–823,

содержание которых тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте. Могут быть созданы такие системы, которые ингибируют целевой ген, путем, например, конструирования системы генного редактирования CRISPR с включением молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который гибридизируется с последовательностью целевого гена. В вариантах осуществления gRNA содержит нацеливающий домен, который полностью комплементарен 15–25 нуклеотидам, например 20 нуклеотидам, целевого гена. В вариантах осуществления 15–25 нуклеотидов, например 20 нуклеотидов, из целевого гена расположены непосредственно к 5' в отношении последовательности мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), распознаваемой РНК–направляемой нуклеазой, например белком Cas, системы генного редактирования CRISPR (например, если система содержит белок Cas9 S. pyogenes, последовательность PAM предусматривает NGG, где N может представлять собой любой из A, T, G или C).

В некоторых вариантах осуществления молекула gRNA и РНК–направляемая нуклеаза, например белок Cas, системы генного редактирования CRISPR могут быть связаны в комплекс с образованием комплекса RNP (рибонуклеопротеина). Такие комплексы RNP можно применять в способах, описываемых в данном документе. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая один или несколько компонентов системы генного редактирования CRISPR, может быть применена в способах, описываемых в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления чужеродная ДНК может быть введена в клетку вместе с системой генного редактирования CRISPR, например ДНК, кодирующая необходимый трансген, с активностью промотора или без таковой в целевом типе клеток. В зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и целевой последовательности генома этот процесс может быть применен для встраивания чужеродной ДНК в геном по сайту или рядом с сайтом, на который нацеливается система генного редактирования CRISPR. Например, в чужеродную ДНК могут быть включены 3'– и 5'–последовательности, фланкирующие трансген, которые являются гомологичными генной последовательности, 3' и 5' (соответственно) относительно сайта в геноме, вырезанном системой генного редактирования. Такую молекулу чужеродной ДНК можно называть "матричной ДНК".

В варианте осуществления система генного редактирования CRISPR согласно настоящему изобретению содержит Cas9, например Cas9 S. pyogenes, и gRNA, содержащую нацеливающий домен, который гибридизируется с последовательностью гена, представляющего интерес. В варианте осуществления gRNA и Cas9 связываются в комплекс с образованием RNP (рибонуклеопротеина). В варианте осуществления система генного редактирования CRISPR содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую gRNA, и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas, например Cas9, например Cas9 S. pyogenes. В варианте осуществления система генного редактирования CRISPR содержит gRNA и нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas, например Cas9, например Cas9 S. pyogenes.

В некоторых вариантах осуществления при индуцибельном контроле Cas9 экспрессия sgRNA может быть использована для оптимизации эффективности при снижении частоты нежелательных эффектов с повышением тем самым безопасности. Примеры включают без ограничения транскрипционные и посттранскрипционные переключатели, перечисленные ниже; индуцируемая доксициклином транскрипция, Loew et al. (2010) BMC Biotechnol. 10:81, индуцируемая Shield1 стабилизация белка, Banaszynski et al. (2016) Cell 126: 995–1004, индуцированная тамоксифеном активация белка, Davis et al. (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 316–318, индуцированная рапамицином или оптогенетически индуцированная активация или димеризация расщепленного Cas9, Zetsche (2015) Nature Biotechnol. 33(2): 139–142, Nihongaki et al. (2015) Nature Biotechnol. 33(7): 755–760, Polstein and Gersbach (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 198–200, и индуцируемое меченным SMASh лекарственным средством разложение, Chung et al. (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 713–720.

Как правило, система CRISPR–Cas или CRISPR в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, вовлеченным в экспрессию связанных с CRISPR ("Cas") генов или направляющих активность таковых, в том числе к последовательностям, кодирующим ген Cas, tracr (транс–активирующей CRISPR) последовательности (например, tracrRNA или активной частичной tracrRNA), tracr–комплиментарной последовательности (охватывающей "прямой повтор" и tracrRNA–процессированный частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющей последовательности (также называемой "спейсером" в контексте эндогенной системы CRISPR) или "РНК", как этот термин используется в данном документе (например, РНК для направления Cas9, например, РНК CRISPR и трансактивирующая (tracr) РНК или одиночная направляющая РНК (sgRNA) (химерная РНК)), или к другим последовательностям и транскриптам из локуса CRISPR. Как правило, система CRISPR характеризуется элементами, которые обеспечивают образование комплекса CRISPR по сайту целевой последовательности (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR "целевая последовательность" относится к последовательности, в отношении которой направляющую последовательность конструируют как комплементарную, при этом гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью обеспечивает образование комплекса CRISPR. Целевая последовательность может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность располагается в ядре или цитоплазме клетки. В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным, чтобы в комплексе CRISPR tracr последовательность имела одну или несколько шпилек и имела 30 или больше нуклеотидов в длину, 40 или больше нуклеотидов в длину или 50 или больше нуклеотидов в длину; направляющая последовательность составляла 10–30 нуклеотидов в длину, фермент CRISPR/Cas представлял собой фермент Cas9 II типа. В вариантах осуществления настоящего

изобретения термины "направляющая последовательность" и "направляющая РНК" применяют взаимозаменяемо. Как правило, направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и специфичного для прямой последовательности связывания комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет приблизительно или более чем приблизительно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или больше. Оптимальное выравнивание может быть определено с применением любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающий пример которых включает алгоритм Смита–Уотермана, алгоритм Нидлмана–Вунша, алгоритмы на основе преобразования Барроуза–Уилера (например, Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies); ELAND (Illumina, Сан–Диего, штат Калифорния) и SOAP. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет приблизительно или более чем приблизительно 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или больше нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет менее чем приблизительно 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или меньше нуклеотидов в длину. Предпочтительно длина направляющей последовательности составляет 10–30 нуклеотидов. Способность направляющей последовательности управлять специфическим в отношении последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью может быть оценена любым подходящим анализом. Например, компоненты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, в том числе направляющая последовательность, подлежащая тестированию, могут быть обеспечены в клетке–хозяине, имеющей соответствующую целевую последовательность, например, путем трансфекции векторами, кодирующими компоненты последовательности CRISPR, с последующей оценкой преимущественного расщепления в целевой последовательности, такой как анализ Surveyor. Подобным образом, расщепление целевой полинуклеотидной последовательности может быть оценено в тестовой пробирке путем обеспечения целевой последовательности, компонентов комплекса CRISPR, включая направляющую последовательность, подлежащую тестированию, и контрольную направляющую последовательность, отличную от тестируемой направляющей последовательности, и сравнения связывания или скорости расщепления в целевой последовательности между реакциями с тестируемой и контрольной последовательностями. Возможны и другие анализы, которые будут известны специалистам в данной области. Направляющая последовательность может быть выбрана для нацеливания на любую целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность

представляет собой последовательность в геноме клетки. Иллюстративные целевые последовательности включают в себя последовательности, которые являются уникальными в целевом геноме. Например, для Cas9 S. pyogenes уникальная целевая последовательность в геноме может предусматривать целевой сайт Cas9 формы MM M MMMNNNNNNNNNNNNXGG (SEQ ID NO: 13), где NNN NNN NN XGG (N представляет собой A, G, T или C; а X может быть любым) встречается в геноме один раз. Уникальная целевая последовательность в геноме может предусматривать целевой сайт Cas9 S. pyogenes формы MMM MMMMMNNNNNNNNNNXGG (SEQ ID NO: 14), где N N N N XGG (N представляет собой A, G, T или C; а X может быть любым) встречается в геноме один раз. Для Cas9 CRISPRl S. thermophilus уникальная целевая последовательность в геноме может предусматривать целевой сайт Cas9 формы MMMMMMMMNN N N NN XXAGAAW (SEQ ID NO: 15), где NNN NN N XXAGAAW (SEQ ID NO: 29) (N представляет собой A, G, T или C; X может быть любым; и W представляет собой A или T) встречается в геноме один раз. Уникальная целевая последовательность в геноме может предусматривать целевой сайт Cas9 CRISPRl S. thermophilus формы MMMMMM MN N NNN NNXXAGAAW (SEQ ID NO: 16), где NNNNNNNNNNXXAGAAW (SEQ ID NO: 30) (N представляет собой A, G, T или C; X может быть любым; и W представляет собой A или T) встречается в геноме один раз. Для Cas9 S. pyogenes уникальная целевая последовательность в геноме может включать в себя целевой сайт Cas9 формы MMMMMMMMNNNN NNNNNNXGGXG (SEQ ID NO: 17), где NNNNNNNNNNNXGGXG (N представляет собой A, G, T или C; а X может быть любым) встречается в геноме один раз. Уникальная целевая последовательность в геноме может предусматривать целевой сайт Cas9 S. pyogenes формы MMMMMMMMMNNNNNNNNNNXGGXG (SEQ ID NO: 31) где NNNNNNNNNNXGGXG (SEQ ID NO: 18) (N представляет собой A, G, T или C; а X может быть любым) встречается в геноме один раз. В каждой из этих последовательностей N представляет собой любое нуклеотидное основание, и "M" может представлять собой A, G, T или C, и их не следует рассматривать при идентификации последовательности как уникальной. В некоторых вариантах осуществления направляющую последовательность выбирают для уменьшения степени вторичной структуры в направляющей последовательности. В некоторых вариантах осуществления приблизительно или менее чем приблизительно 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% или меньше нуклеотидов направляющей последовательности участвуют в самокомплементарном спаривании оснований при оптимальном сворачивании. Оптимальное сворачивание может быть определено любым подходящим алгоритмом сворачивания полинуклеотидов. Некоторые программы основаны на расчете минимальной свободной энергии Гиббса. Примером одного такого алгоритма является mFold, как описано Zuker и Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133–148). Другим примером алгоритма сворачивания является онлайн веб–сервер RNAfold, разработанный в Институте теоретической химии при Венском университете с использованием алгоритма

прогнозирования структуры центроида (см., например, A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23–24 и PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1 151–62).

Способы конструирования молекул gRNA

Представлены способы отбора, конструирования и проверки нацеливающих доменов для применения в gRNA, описываемых в данном документе. Иллюстративные нацеливающие домены для включения в gRNA также представлены в данном документе.

Были описаны способы отбора и проверки целевых последовательностей, а также нецелевые анализы (см., например, Mali 2013 ; Hsu 2013; Fu 2014; Heigwer 2014; Bae 2014 и Xiao 2014). Например, целевые последовательности могут быть выбраны путем идентификации последовательности PAM для молекулы Cas9 (например, релевантной PAM, например, PAM NGG для S. pyogenes, PAM NNNNGATT (SEQ ID NO: 19) или NNNNGCTT (SEQ ID NO: 20) для N. meningitides, а также PAM NNGRRT (SEQ ID NO: 21) или NNGRRV (SEQ ID NO: 22) для S. aureus) и идентификации соседней последовательности как целевой последовательности для системы CRISPR с использованием этой молекулы Cas9. Программное обеспечение можно применять для дальнейшей оптимизации выбора потенциальных нацеливающих доменов, соответствующих целевой последовательности пользователя, например, для сведения к минимуму общей нецелевой активности в геноме. Кандидатные нацеливающие домены и gRNA, содержащие эти нацеливающие домены, могут быть функционально оценены с использованием способов, известных в уровне техники и/или изложенных в данном документе.

В качестве неограничивающего примера, нацеливающие домены с целью использования в gRNA для применения с Cas9 S. pyogenes, N. meningiitidis и S. aureus идентифицировали с использованием алгоритма поиска последовательности ДНК. Для каждого Cas9 конструируют 17–олигомерные, 18–олигомерные, 19–олигомерные, 20–олигомерные, 21–олигомерные, 22–олигомерные, 23–олигомерные и/или 24–олигомерные нацеливающие домены. В отношении Cas9 S. pyogenes, предпочтительно, нацеливающий домен является 20–олигомерные. Конструирование gRNA осуществляют с использованием специального программного обеспечения для конструирования gRNA, основанного на общедоступном инструменте Cas–offinder (Bae 2014). Это программное обеспечение оценивает направляющие после расчета их склонности к нецелевой активности по всему геному.

Функциональный анализ кандидатных молекул

Кандидатные молекулы Cas9, кандидатные молекулы gRNA, кандидатные комплексы молекула Cas9/молекула gRNA можно оценивать с помощью способов, известных из уровня техники или описанных в данном документе. Например, иллюстративные способы оценивания эндонуклеазной активности молекулы Cas9 были описаны ранее (Jinek 2012). Каждая методика, описываемая в данном документе, может быть применена отдельно или в комбинации с одной или несколькими методиками для оценивания кандидатной молекулы. Методики, раскрываемые в данном документе, можно

применять для ряда способов, в том числе без ограничения способов определения стабильности комплекса молекула Cas9/молекула gRNA, способов определения условия, которое обеспечивает стабильный комплекс молекула Cas9/молекула gRNA, способов скрининга в отношении стабильного комплекса молекула Cas9/молекула gRNA, способов идентификации оптимальной gRNA для образования стабильного комплекса молекула Cas9/молекула gRNA и способов отбора комплекса Cas9/gRNA для введения субъекту.

Анализ связывания и расщепления. Тестирование эндонуклеазной активности молекулы Cas9. Способность комплекса молекула Cas9/молекула gRNA связывать и расщеплять целевую нуклеиновую кислоту может быть оценена в анализе плазмидного расщепления. В данном анализе синтетическую или in vitro транскрибированную молекулу gRNA предварительно отжигают перед введением в реакцию путем нагревания до 95°C и медленно охлаждают до комнатной температуры. Нативную или линеаризованную рестриктазным ферментом плазмидную ДНК (300 нг (~8 нМ)) инкубируют в течение 60 минут при 37°C с очищенной молекулой белка Cas9 (50–500 нМ) и gRNA (50–500 нМ, 1: 1) в буфере для расщепления плазмиды Cas9 (20 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ KCl, 0,5 мМ DTT, 0,1 мМ EDTA) с или без 10 мМ MgCl2. Реакции останавливают с помощью 5X буфера для загрузки ДНК (30% глицерина, 1,2% SDS, 250 мМ EDTA), разделяют электрофорезом в 0,8 или 1% агарозном геле и визуализируют окрашиванием этидийбромидом. Полученные продукты расщепления указывают, расщепляет ли молекула Cas9 обе нити ДНК или только одну из двух нитей. Например, линейные продукты ДНК указывают на расщепление обеих нитей ДНК. Разорванные продукты с разомкнутым кольцом указывают, что расщепляется только одна из двух нитей.

В качестве альтернативы, способность комплекса молекула Cas9/молекула gRNA связывать и расщеплять целевую нуклеиновую кислоту может быть оценена в анализе расщепления олигонуклеотидной ДНК. В данном анализе олигонуклеотиды ДНК (10 пмоль) метят радиоактивной меткой путем инкубации с 5 единицами полинуклеотидкиназы T4 и 3–6 пмоль (–20–40 мКи) [γ–32P]–ATP в буфере для реакции полинуклеотидкиназы IX T4 при 37°C в течение 30 минут в реакции на 50 микролитров. После тепловой инактивации (65°C в течение 20 мин.) реакционные смеси очищают с помощью колонки для удаления невключенной метки. Дуплексные локализующие средства (100 нМ) создают путем отжига меченых олигонуклеотидов с эквимолярными количествами немеченого комплементарного олигонуклеотида при 95°C в течение 3 минут с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Для анализа расщепления молекулы gRNA отжигают путем нагревания до 95°C в течение 30 секунд с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Cas9 (конечная концентрация 500 нМ) предварительно инкубируют с отожженными молекулами gRNA (500 нМ) в буфере для анализа расщепления (20 мМ HEPES, pH 7,5, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl2, 1 мМ DTT, 5% глицерина) в общем объеме, составляющем 9 микролитров. Реакции инициируют добавлением 1 микролитра целевой ДНК (10 нМ) и инкубируют в

течение 1 часа при 37°C. Реакции гасят добавлением 20 микролитров загрузочного красителя (5 мМ ЭДТА, 0,025% SDS, 5% глицерина в формамиде) и нагревают до 95°C в течение 5 минут. Продукты расщепления разделяют на 12% денатурирующих полиакриламидных гелях, содержащих 7 М мочевины, и визуализируют путем формирования изображения на люминесцентном фосфорном покрытии. Полученные в результате продукты расщепления указывают на то, что расщеплена или комплементарная нить, или некомплементарная нить, или обе.

Один или оба из этих анализов могут использоваться для оценки пригодности кандидатной молекулы gRNA или кандидатной молекулы Cas9.

Выявление и идентификация инсерционно–делеционной мутации. Целевые модификации генома также могут быть выявлены с помощью Sanger или глубокого секвенирования. В первом случае геномную ДНК из модифицированной области можно амплифицировать с помощью любых праймеров, фланкирующих целевую последовательность gRNA. Ампликоны могут быть субклонированы в плазмиду, такую как pUC19 для трансформации, и отдельные колонии должны быть секвенированы для выявления клонального генотипа.

В качестве альтернативы, глубокое секвенирование подходит для отбора большого количества образцов или целевых сайтов. Праймеры NGS предназначены для более коротких ампликонов, обычно в диапазоне размеров 100–200 п. о. Для выявления инсерционно–делеционных мутаций важно сконструировать праймеры, расположенные по меньшей мере в 50 п. о. от целевого сайта Cas9, чтобы можно было выявить более длинные инсерционно–делеционные мутации. Ампликоны можно оценивать с использованием коммерчески доступных инструментов, например системы Illumina. Подробное описание оптимизации и устранения ошибок NGS можно найти в руководстве для пользователя Illumina.

Системы генного редактирования TALEN

TALEN получают искусственно путем слияния ДНК–связывающего домена эффектора TAL с доменом расщепления ДНК. Подобные активаторам транскрипции эффекторы (TALE) могут быть сконструированы для связывания любой требуемой последовательности ДНК, например целевого гена. Путем объединения сконструированного TALE с доменом расщепления ДНК может быть получен рестрикционный фермент, который является специфичным по отношению к любой требуемой последовательности ДНК. Затем он может быть введен в клетку, где может применяться для редактирования генома. Boch (2011) Nature Biotech. 29: 135–6 и Boch et al. (2009) Science 326: 1509–12; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501.

TALE представляют собой белки, секретируемые бактериями Xanthomonas. ДНК–связывающий домен содержит повторную, высоко консервативную последовательность аминокислот 33–34, за исключением 12–ой и 13–ой аминокислот. Эти две позиции сильно варьируют, демонстрируя сильную корреляцию с распознаванием специфичных нуклеотидов. Таким образом, они могут быть сконструированы так, чтобы связываться с

требуемой последовательностью ДНК.

Для получения TALEN обеспечивают слияние белка TALE с нуклеазой (N), которая представляет собой, например, эндонуклеазу FokI дикого типа или мутантную. Несколько мутаций в FokI были сделаны для его использования в TALEN; например, они улучшают специфичность или активность расщепления. Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143–8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731–734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74–79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786–793 и Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96.

Домен FokI функционирует как димер, что требует двух конструкций с уникальными ДНК–связывающими доменами для сайтов в целевом геноме с надлежащей ориентацией и расстоянием. Как количество аминокислотных остатков между ДНК–связывающим доменом TALE и доменом расщепления FokI, так и количество оснований между двумя отдельными сайтами связывания TALEN, по–видимому, являются важными параметрами для достижения высоких уровней активности. Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143–8.

TALEN (или пара TALEN) может применяться внутри клетки для создания двухнитевого разрыва (DSB). Мутацию можно ввести в сайт разрыва, если механизмы репарации неправильно репарируют разрыв посредством негомологичного соединения концов. Например, неправильная репарация может привести к мутации со сдвигом рамки. В качестве альтернативы, чужеродная ДНК может быть введена в клетку вместе с TALEN, например ДНК, кодирующая трансген, и в зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности данный процесс можно применять для встраивания трансгенов в сайт или рядом с сайтом, на который нацеливаются с помощью TALEN. TALEN, специфичные для целевого гена, могут быть сконструированы с использованием любого способа, известного в уровне техники, предусматривающего различные схемы с использованием модульных компонентов. Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149–53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509; патент США 8420782; патент США 8470973, содержание которых тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте.

Система генного редактирования на основе нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN)

"ZFN" или "нуклеаза с цинковыми пальцами" относится к нуклеазе с цинковыми пальцами, искусственной нуклеазе, которую можно применять для модификации, например делеции, одной или нескольких нуклеиновых кислот необходимой последовательности нуклеиновой кислоты.

Подобно TALEN, ZFN содержит домен нуклеазы FokI (или его производное), слитый с ДНК–связывающим доменом. В случае ZFN ДНК–связывающий домен содержит один или несколько "цинковых пальцев". Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773–782 и Kim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156–1160.

"Цинковый палец" представляет собой небольшой белковый структурный мотив,

стабилизированный одним или несколькими ионами цинка. "Цинковый палец" может содержать, например, Cys2His2 и может распознавать последовательность из примерно 3 п. о. Разные "цинковые пальцы" с известной специфичностью могут быть объединены с получением многопальцевых полипептидов, которые распознают последовательности из приблизительно 6, 9, 12, 15 или 18 п. о. Доступны различные методики отбора и модульной сборки для создания "цинковых пальцев" (и их комбинаций), распознающих специфичные последовательности, в том числе фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двухгибридные системы и клетки млекопитающих.

Как и TALEN, ZFN должен димеризоваться, чтобы расщепить ДНК. Таким образом, пара ZFN необходима для нацеливания на непалиндромные сайты ДНК. Два отдельных ZFN должны связывать противоположные нити ДНК с их нуклеазами, правильно расположенными на расстоянии друг от друга. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10570–5.

Также, подобно TALEN, ZFN может создавать двухнитевой разрыв в ДНК, который может создавать мутацию со сдвигом рамки при неправильной репарации, что приведет к снижению экспрессии и количества целевого гена в клетке. ZFN также можно применять с гомологичной рекомбинация для мутирования целевого гена или локуса, или для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей необходимый трансген по сайту в целевой последовательности или рядом с ней.

ZFN, специфические по отношению к последовательностям в целевом гене, могут быть сконструированы с использованием любого способа, известного в уровне техники. См., например, Provasi (2011) Nature Med. 18: 807–815; Torikai (2013) Blood 122: 1341–1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200–7 и Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96; публикацию патентного документа США № 2011/0158957 и публикацию патентного документа США № 2012/0060230, содержание которых тем самым включено посредством ссылки во всей своей полноте. В вариантах осуществления система генного редактирования на основе ZFN также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую один или несколько компонентов системы генного редактирования на основе ZFN.

Система генного редактирования на основе мегануклеазы

"Мегануклеаза" относится к мегануклеазе, искусственной нуклеазе, которую можно применять для редактирования целевого гена.

Мегануклеазы происходят из группы нуклеаз, которые распознают сайты расщепления из 15–40 пар оснований. Мегануклеазы сгруппированы в семейства на основании их структурных мотивов, которые воздействуют на нуклеазную активность и/или распознавание ДНК. Представители семейства LAGLIDADG (SEQ ID NO: 23) характеризуются наличием либо одной, либо двух копий консервативного мотива LAGLIDADG (SEQ ID NO: 23) (см. Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757–3774). Мегануклеазы LAGLIDADG (SEQ ID NO: 23) с одной копией мотива LAGLIDADG

(SEQ ID NO: 23) образуют гомодимеры, тогда как представители с двумя копиями мотива LAGLIDADG (SEQ ID NO: 23) находятся в виде мономеров. Представители семейства GIY–YIG имеют модуль GIY–YIG, который состоит из 70–100 остатков в длину и включает в себя четыре или пять мотивов консервативной последовательности с четырьмя инвариантными остатками, два из которых требуются для активности (см. Van Roey et al. (2002), Nature Struct. Biol. 9: 806–811). His–Cys–бокс мегануклеазы характеризуются высококонсервативными сериями остатков гистидина и цистеина в области, охватывающей несколько сотен аминокислотных остатков (см. Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757–3774). Представителей семейства NHN определяют по мотивам, содержащим две пары консервативных остатков гистидина, окруженных аспарагиновыми остатками (см. Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757–3774).

Стратегии для конструирования мегануклеазы с измененной специфичностью связывания ДНК, например связывания с предопределенной последовательностью нуклеиновой кислоты, известны в уровне техники. Например, Chevalier et al. (2002), Mol. Cell., 10:895–905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res 31: 2952–62; Silva et al. (2006) J Mol Biol 361: 744–54; Seligman et al. (2002) Nucleic Acids Res 30: 3870–9; Sussman et al. (2004) J Mol Biol 342: 31–41; Rosen et al. (2006) Nucleic Acids Res; Doyon et al. (2006) J. Am Chem Soc 128: 2477–84; Chen et al. (2009) Protein Eng Des Sel 22: 249–56; Arnould S (2006) J Mol Biol. 355: 443–58; Smith (2006) Nucleic Acids Res. 363(2): 283–94.

Мегануклеаза может создавать двухнитевой разрыв в ДНК, который может создавать мутацию со сдвигом рамки при неправильной репарации, например за счет соединения негомологичных концов, что приводит к снижению экспрессии целевого гена в клетке. В качестве альтернативы, чужеродная ДНК может быть введена в клетку вместе с мегануклеазой; в зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности этот процесс можно применять для модификации целевого гена, например корректировать дефект в целевом гене, вызывая, таким образом, экспрессию репарированного целевого гена, или, например, вводить такой дефект в ген wt, снижая, таким образом, экспрессию целевого гена, например, как описано в Silva et al. (2011) Current Gene Therapy 11:11–27.

Введение в глаз увеличенной популяции клеток

В одном аспекте настоящего изобретения увеличенную популяцию клеток, получаемую способами согласно настоящему изобретению, которые описаны выше, доставляют в глаз. Доставку выполняют в асептических условиях.

В одном варианте осуществления, относящемся к применению для терапии на основе лимбальных стволовых клеток после 360° лимбальной перитомии, фиброваскулярный паннус роговицы можно осторожно удалить с поверхности.

В одном аспекте настоящего изобретения популяцию клеток объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, подходящим для глазной доставки (как описано далее ниже) и доставляют в глаз. В предпочтительном варианте осуществления

клетки и средство, обеспечивающее локальную доставку, подходящее для глазной доставки, объединяют и вводят в глаз через носитель, такой как, например, терапевтическая контактная линза или амниотическая мембрана. В альтернативном варианте осуществления клетки и средство, обеспечивающее локальную доставку, пригодное для использования в глазу, такое как светоотверждаемая биологическая матрица, подобная GelMA, доставляют в глаз посредством биопечати.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в роговицу субъекта, при этот способ предусматривает увеличение популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, путем культивирования указанной популяции со средой пролиферации клеток, содержащей ингибитор LATS согласно настоящему изобретению, промывание увеличенной популяции клеток для удаления в значительной степени ингибитора LATS и введение указанных клеток в роговицу указанного субъекта. Предпочтительно указанные клетки объединяют с биологической матрицей до указанного введения. В конкретном варианте осуществления указанные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, до указанного введения. В более конкретном варианте осуществления указанные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которую наносят на глазную поверхность посредством биопечати. В частности, предпочтительно указанные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на глазную поверхность посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу трансплантации популяции клеток в глаз субъекта, предусматривающему объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, введение инъекцией смеси в глаз субъекта или нанесение смеси на поверхность глаза субъекта и осуществление биопечати клеток в или на глазу путем нацеливания и фиксации клеток, например на роговице, с применением такого источник света, как источник ультрафиолета А или белого света. В определенных вариантах осуществления источник света испускает свет с длиной волны, которая составляет по меньшей мере 350 нм. В определенных вариантах осуществления источник света испускает свет в диапазоне длин волн от 350 нм до 420 нм. Например, источник света, представляющий собой LED, может использоваться для испускания света с длиной волны, составляющей 365 нм или 405 нм, или любой другой длины волны выше 350 нм, или можно использовать ртутную лампу с пропускающим полосовым фильтром для испускания света с длиной волны, составляющей 365 нм. В другом варианте осуществления источник света испускает видимый белый свет с длиной волны в диапазоне, например, от 400 нм до 700 нм. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой клетки глаза, такие как клетки роговицы (например, роговичные эндотелиальные клетки), клетки хрусталика, клетки трабекулярной сетки или клетки, находящиеся в передней камере. В конкретном

варианте осуществления клетки являются роговичными эндотелиальными клетками. Некоторые варианты осуществления такого способа включают в себя перечисленные ниже.

Вариант осуществления x1. Способ трансплантации популяции выделенных клеток в глаз субъекта, предусматривающий объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, введение инъекцией смеси в глаз субъекта (например, в переднюю камеру) и осуществление биопечати клеток в глазу путем нацеливания и фиксации клеток в глазу с применением источника света.

Вариант осуществления x2. Способ варианта осуществления x1, где выделенные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на роговицу посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

Вариант осуществления x3. Способ варианта осуществления x1 или варианта осуществления x2, где источник света испускает свет с диной волны в диапазоне от 350 нм до 700 нм.

Вариант осуществления x4. Способ любого из вариантов осуществления x1 – x3, где длина волны составляет 350 нм – 420 нм.

Вариант осуществления x5. Способ любого из вариантов осуществления x1 – x4, где длина волны составляет 365 нм.

Вариант осуществления x6. Способ любого из вариантов осуществления x1 – x5, где выделенные клетки являются роговичными эндотелиальными клетками.

Вариант осуществления x7. Способ трансплантации популяции выделенных клеток в глаз субъекта, предусматривающий объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, нанесение смеси на глаз субъекта и осуществление биопечати клеток на глазу путем нацеливания клеток на глаз и их фиксации на нем с использованием источника света.

Вариант осуществления x8. Способ варианта осуществления x7, где выделенные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на поверхность глаза посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

Вариант осуществления x9. Способ варианта осуществления x7 или варианта осуществления x8, где источник света испускает свет с диной волны в диапазоне от 350 нм до 700 нм.

Вариант осуществления x10. Способ любого из вариантов осуществления x7 – x9, где длина волны составляет 350 нм – 420 нм.

Вариант осуществления x11. Способ любого из вариантов осуществления x7 – x10, где длина волны составляет 365 нм.

Вариант осуществления x12. Способ любого из вариантов осуществления x7 – x11, где выделенные клетки являются лимбальными стволовыми клетками.

В альтернативном варианте осуществления увеличенная популяция клеток,

получаемая способами согласно настоящему изобретению, как описано выше, может быть доставлена непосредственно в глаз с помощью терапевтической контактной линзы без применения средства, обеспечивающего локальную доставку, подходящего для глазной доставки (такого как GelMA).

Средство, обеспечивающее локальную доставку, подходящее для глазной доставки

В варианте осуществления согласно настоящему изобретению клеточный препарат может быть доставлен в глаз с помощью средства, обеспечивающего локальную доставку, подходящего для глазного применения. Клетки могут быть погружены в средство, обеспечивающее локальную доставку, или прикреплены к поверхности средства, обеспечивающего локальную доставку или и то, и другое.

Тип средства, обеспечивающего локалькую доставку, не ограничен при условии, что он может нести LSC или CEC и подходит для применения в отношении глаза. В предпочтительном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, является разлагаемым и биосовместимым. При доставке CEC предпочтительно, чтобы средство, обеспечивающее локальную доставку, могло облегчать прикрепление CEC к роговице после хирургической доставки к поверхности глаза.

В предпочтительном варианте осуществления клетки объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку только после увеличения популяции клеток. В особенно предпочтительном варианте осуществления увеличенную популяцию клеток объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, подходящим для глазной доставки, после промывания популяции клеток, чтобы удалить в значительной степени присутствующий ингибитор LAT согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления LSC или CEC и средство, обеспечивающее локальную доставку, объединяют и хранят в форме, подходящей для применения в отношении глаза. В другом варианте осуществления LSC или CEC и средство, обеспечивающее локальную доставку, хранят отдельно и объединяют непосредственно перед применением в отношении глаза.

Средство, обеспечивающее локальную доставку, предпочтительно выбирают из перечня, состоящего из фибрина, коллагена, желатина, целлюлозы, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA (который представляет собой модифицированный метакриламидом желатин, а также известен как желатин метакрилат), средств, обаспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер, или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, поливинилового спирта, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, поливинилпирролидона, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина, коллагена, фибриногена, целлюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилпроизводного гуаровой камеди, геллановой камеди, гуаровой камеди, ксантановой камеди и карбоксиметилцеллюлозы, а также их производных, их сополимеров и их комбинаций.

В более предпочтительном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, выбирают из перечня, состоящего из фибрина, коллагена, желатина, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA, средств, обеспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер, или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, полиакриловой кислоты, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина, коллагена, фибриногена, гидроксипропилметилцеллюлозы и гидроксипропилпроизводного гуаровой камеди, а также их производных, их сополимеров и их комбинаций.

В предпочтительном варианте осуществления увеличенная популяция клеток согласно настоящему изобретению может быть доставлена реципиенту с помощью средства, обеспечивающего локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу. В более предпочтительном варианте осуществления средство, обеспечивающее локальную доставку, представляет собой светоотверждаемую разлагаемую биологическую матрицу. Предпочтительно его можно вводить инъекцией в глаз. Конкретным примером биологической матрицы является GelMA, который представляет собой модифицированный метакриламидом желатин и также известен как желатин метакрилат.

GelMA может быть получен в соответствии со стандартными протоколами, известными в уровне техники (Van Den Bulcke et al., Biomacromolecules, 2000, p.31–38; Yue et al., Biomaterials, 2015, p.254–271). Например, желатин из свиной шкуры (прочность геля 300 г по Блуму, тип А) растворяют в PBS без кальция и магния (PBS по Дульбекко) и метакриловый ангидрид может быть добавлен при энергичном взбалтывании в раствор желатина для достижения необходимой концентрации (например, 8% (объем/объем)). Смесь может быть перемешана до и после добавления дополнительного DPBS. Разбавленная смесь может быть очищена путем диализа против воды качества Milli–Q с использованием диализной трубки для удаления метакриловой кислоты. Очищенные образцы необязательно могут быть лиофилизированы и твердыми могут храниться при –80°C, –20°C или 4°C до последующего применения.

Стоковый раствор GelMA готовят путем растворения лиофилизированного GelMA в составе, подходящем для применения в отношении глаза и содержащем фармацевтически приемлемые вспомогательные средства. Для получения стокового раствора GelMA лиофилизированный GelMA может быть растворен в DPBS. После полного растворения GelMA фотоинициатор (например, такой как лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат) может быть введен в раствор GelMA. Для доведения pH до нейтрального значения может быть добавлен NaOH в раствор перед фильтрованием с использованием 0,22–микрометровых стерильных мембран. Конечный фильтрат можно делить на аликвоты и хранить при 4°C до последующего применения.

В одном аспекте настоящего изобретения клетки инкапсулируют в биологическую

матрицу с использованием фотоинициатора для полимеризации биологической матрицы, которая предпочтительно представляет собой GelMa. Подходящими фотоинициирующими средствами являются Irgacure 2959, лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат, натрия фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат, лития бис(2,4,6–триметилбензоил)фосфинат, натрия бис(2,4,6–триметилбензоил)фосфинат, дифенил(2,4,6–триметилбензоил)фосфина оксид, эозин Y, рибофлавина фосфат, камфорохинон, Quantacure BPQ, Irgacure 819, Irgacure 1850 и Darocure 1173. В предпочтительном варианте осуществления фотоинициатором является лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат, натрия фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат, рибофлавина фосфат. В другом варианте осуществления фотоинициатором является лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат.

До полимеризации светоотверждаемую биологическую матрицу объединяют с подходящим фотоинициатором в состав, подходящий для применения в отношении глаза и содержащий фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, в подходящих контейнерах, известных в уровне техники, таких как флаконы. Фотоинициатор может быть объединен с биологической матрицей до смешивания с клетками; в качестве альтернативы, фотоинициатор может быть объединен с биологической матрицей после смешивания с клетками; в качестве альтернативы, сначала фотоинициатор может быть добавлен в клетки, а затем объединен с биологической матрицей. Концентрация биологической матрицы и фотоинициатора зависит от применяемых конкретной биологической матрицы и конкретного фотоинициатора, но выбирается так, чтобы обеспечить полимеризацию в течение подходящей продолжительности воздействия света, обычно менее приблизительно 5 минут; предпочтительно менее приблизительно 2 минут; более предпочтительно менее приблизительно одной минуты. В одном варианте осуществления фотоинициатором является лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфинат, и его концентрация в составе для доставки клеток в глаз составляет приблизительно от 0,01% вес/объем до приблизительно 0,15% вес/объем. В другом аспекте концентрация лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфината в составе для доставки клеток в глаз составляет приблизительно 0,05% вес/объем или приблизительно 0,075% вес/объем. LAP может быть синтезирован с использованием опубликованной процедуры (Biomaterials 2009, 30, 6702–6707), а также доступен от компании TCI (№ продукта L0290) и Biobots (BioKey).

Клетки могут быть добавлены в GelMA в подходящих контейнерах, известных в уровне техники, таких как флаконы или пробирки. Клетки, например, могут быть добавлены пипеткой в GelMA и смешаны осторожным движением пипетки верх и вниз. В одном варианте осуществления концентрация GelMA в композиции, подходящей для глазной доставки, составляет от приблизительно 10 до приблизительно 200 мг/мл, или от приблизительно 25 до приблизительно 150 мг/мл, или от приблизительно 25 до приблизительно 75 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления концентрация GelMA в композиции, подходящей для глазной доставки, составляет приблизительно 25

мг/мл, приблизительно 50 мг/мл или приблизительно 75 мг/мл.

Для полимеризации светоотверждаемой биологической матрицы биологическую матрицу, фотоинициатор и клетки подвергают воздействию источника света в течение предпочтительного периода времени, который описан выше. Длина волны света, применяемого для полимеризации, будет зависеть от фотохимических свойств конкретного применяемого фотоинициатора. Например, фотоинициация полимеризации для Irgacure 2959 будет происходить со светом с длиной волны от 300 до 370 нм; фотоинициация полимеризации для лития фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфината будет происходить со светом с длиной волны от 300 до 420 нм; фотоинициация полимеризации для рибофлавин–5'–фосфата будет происходить со светом с длиной волны от 300 до 500 нм. Применяемый источник света может испускать диапазон длин волн, подобный тому, который достигается с помощью ламп накаливания, газоразрядных ламп или ламп с разрядом в парах металлов; в качестве альтернативы, применяемый источник света может испускать узкий диапазон длин волн, как это достигается с помощью оптических фильтров или светоиспускающего диода (LED). Предпочтительно применяемый источник света не испускает свет с длиной волны менее 315 нм, чтобы избежать повреждающих воздействий ультрафиолетового излучения на клетки. В одном варианте осуществления источник света представляет собой источник белого света со спектральным диапазоном 415–700 нм. В другом варианте осуществления источник света представляет собой источник света LED со спектральным диапазоном приблизительно 365 ± 5 нм, приблизительно 375 ± 5 нм, приблизительно 385 ± 5 нм, приблизительно 395 ± 5 нм, приблизительно 405 ± 5 нм, приблизительно 415 ± 5 нм, приблизительно 425 ± 5 нм, приблизительно 435 ± 5 нм, приблизительно 445 ± 5 нм, приблизительно 455 ± 5 нм или приблизительно 465 ± 5 нм. Интенсивность света выбирается так, чтобы свести к минимуму фототоксичность и обеспечить полимеризацию в течение подходящей продолжительности воздействия света, обычно менее приблизительно 5 минут; предпочтительно менее приблизительно 2 минут; более предпочтительно менее приблизительно одной минуты. Одним из признаков полимеризации является увеличение вязкости раствора. Другим признаком полимеризации является начало гелеобразования.

Полимеризация биологической матрицы может происходить на поверхности глаза с помощью методик биопечати или, в качестве альтернативы, на носителе, который затем трансплантируют на поверхность глаза. Необязательно полимеризация биологической матрицы может происходить на поверхности роговицы в передней камере или, в качестве альтернативы, на носителе, который затем трансплантируют на поверхность роговицы в передней камере.

Носитель

Клетки и средство, обеспечивающее локальную доставку, подходящее для глазной доставки предпочтительно доставляют с помощью носителя, такого как контактная линза или амниотическая мембрана.

Контактными линзами, подходящими для применения согласно настоящему

изобретению, предпочтительно представляют собой линзы, которые соответствуют кривизне роговицы пациента и могут хорошо переноситься пациентом в клинической практике для непрерывного использования в качестве бандажных контактных линз в течение нескольких дней.

Примеры подходящих типов контактных линз согласно настоящему изобретению согласуются с тем, что было широко подтверждено при клиническом использовании для долговременного применения бандажных контактных линз с бостонским кератопротезом 1 типа (который также можно применять у пациентов с дефицитом лимбальных стволовых клеток), и описаны в: Thomas, Merina M.D.; Shorter, Ellen O.D.; Joslin, Charlotte E. O.D., Ph.D.; McMahon, Timothy J. O.D.; Cortina, M. Soledad M.D.Contact Lens Use in Patients With Boston Keratoprosthesis Type 1: Fitting, Management, and Complications. Eye Contact Lens. 2015 Nov;41(6):334–40.

Контактная линза может быть выполнена из любого подходящего материала, известного в уровне техники или разработанного позже, и может представлять собой мягкую линзу, жесткую линзу или комбинированную линзу, предпочтительно мягкую линзу, более предпочтительно традиционную гидрогелевую контактную линзу или силикон–гидрогелевую (SiHy) контактную линзу.

"Традиционная гидрогелевая контактная линза" относится к контактной линзе, содержащей гидрогелевый объемный (сердцевинный) материал, который является нерастворимым в воде сшитым полимерным материалом, теоретически не содержит силикона и может содержать по меньшей мере 10% по весу воды в своей полимерной матрице при полной гидратации. Традиционную гидрогелевую контактную линзу, как правило, получают путем сополимеризации состава традиционной гидрогелевой линзы (т. е. полимеризируемой композиции), включающего в себя не содержащие силикон гидрофильные полимеризируемые компоненты, известные специалисту в данной области.

Примеры состава традиционной гидрогелевой линзы для изготовления коммерческих гидрогелевых контактных линз включают в себя без ограничения альфафилкон А, акофилкон А, дельтафилкон А, этафилкон А, фокофилкон А, гелфилкон А, гелфилкон В, хилафилкон В, хиоксифилкон А, хиоксифилкон В, хиоксифилкон D, метафилкон А, метафилкон В, нелфилкон А, несофилкон А, окуфилкон А, окуфилкон В, окуфилкон С, окуфилкон D, омафилкон А, фемфилкон А, полимакон, самфилкон А, телфилкон А, тетрафилкон А и вифилкон А.

"Контактная линза SiHy" относится к контактной линзе, содержащей силикон–гидрогелевый объемный (сердцевинный) материал, который представляет собой нерастворимый в воде сшитый полимерный материал, который содержит силикон и может содержать по меньшей мере 10% по весу воды в своей полимерной матрице при полной гидратации. Силикон–гидрогелевую контактную линзу, как правило, получают путем сополимеризации силикон–гидрогелевого состава линзы, содержащего по меньшей мере содержащий силикон полимеризируемый компонент и гидрофильные полимеризируемые компоненты, известные специалисту в данной области.

Примеры состава линзы SiHy для изготовления коммерческих гидрогелевых контактных линз включают в себя без ограничения асмофилкон A, балафилкон A, комфилкон A, делефилкон A, эфрофилкон A, энфилкон A, фанфилкон A, галифилкон A, лотрафилкон A, лотрафилкон B, нарафилкон A, нарафилкон B, сенофилкон A, сенофилкон B, сенофилкон C, смафилкон A, сомофилкон A и стенфилкон A.

В предпочтительном варианте осуществления носителем является контактная линза, выбранная из группы, состоящей из балафилкон A, лотрафилкон A, лотрафилкон B, сенофилкон A и метафилкон A.

В особенно предпочтительном варианте осуществления носителем является контактная линза, которая представляет собой лотрафилкон B.

Носитель можно удерживать на месте на поверхности глаза с помощью фибринового клея или швов, чтобы предотвратить сворачивание конструкции при движениях глаз.

Носитель в сочетании с биологической матрицей и клетками можно оставлять на глазу в течение диапазонов времени для доставки клеток, например от нескольких суток до одной недели, предпочтительно на одну неделю.

Другие способы доставки.

В альтернативном варианте осуществления LSC могут быть доставлены в виде клеточной суспензии на поверхность глаза (без средства, обеспечивающего локальную доставку, такого как биологическая матрица и с носителем или без носителя, такого как контактная линза). В состав могут быть включены соединения и вспомогательные средства, известные в уровне техники, для улучшения адгезии к тканям, такие как мукоадгезивные средства, усилители вязкости или обратимые термозагустители.

Стадия биопечати

Популяция клеток глаза, например роговичных эндотелиальных клеток, получаемых в соответствии со способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению, может быть трансплантирована в глаз субъекта, например в роговицу субъекта.

Популяция клеток согласно настоящему изобретению может быть доставлена с помощью средства, обеспечивающего локальную доставку, подходящего для применения в отношении глаза, которое представляет собой светоотверждаемую разлагаемую биологическую матрицу, такую как GelMA. В следующих способах описываются процедуры для контроля доставки во внутреннюю стенку роговицы.

Способ 1. Способ подавления пузыря (показан на фигуре 22)

Дисфункциональные эндотелиальные клетки можно сначала отделять от внутренней стенки роговицы путем пилинга/соскабливания или контролируемым образом с использованием фотодеструкции с помощью фемтосекундного лазера. Затем небольшой болюс нагруженной клетками биологической матрицы вводят инъекцией рядом с внутренней поверхностью роговицы. Это можно сделать вручную, используя стандартный шприц или специальный аппликатор. Им также можно управлять с помощью

хирургической системы (например, констелляции) или шприцевых насосов. Затем под болюс вводят инъекцией пузырь газа. Пузырь газа сжимает болюс перед задней роговицей, создавая тонкое покрытие. Затем весь гель отверждают с использованием источника ультрафиолетового света, или ближнего ультрафиолетового света, или любого другого спектрального диапазона, необходимого для отверждения биологической матрицы. В качестве альтернативы, дисфункциональная ткань может быть оставлена, и биологическая матрица отверждается поверх нее. Источник света может быть сфокусирован на разные размеры с использованием других способов оптической фокусировки для контроля области отверждения. Оставшуюся неотвержденную область можно вымыть с помощью ирригационной/аспирационной канюли.

Способ 2. Субтрактивный способ с использованием фемтосекундного лазера (показан на фигуре 23)

Дисфункциональные эндотелиальные клетки можно сначала отделять от внутренней стенки роговицы путем пилинга/соскабливания или контролируемым образом с использованием фотодеструкции с помощью фемтосекундного лазера. В качестве альтернативы, их можно оставить на месте. Затем нагруженную клетками биологическую матрицу вводят инъекцией на внутреннюю поверхность роговицы, закрывая пустоту на месте удаленной ткани, или поверх дисфункциональной ткани. Это можно сделать вручную, используя стандартный шприц или специальный аппликатор. Им также можно управлять с помощью хирургической системы (например, констелляции) или шприцевых насосов. Затем биологическую матрицу отверждают с использованием источника ультрафиолетового света, или ближнего ультрафиолетового света, или любого другого спектрального диапазона, необходимого для отверждения биологической матрицы. Затем применяют фемтосекундный лазер для отделения избыточного материала, контролируя толщину и площадь до необходимого распределения. Избыточный материал затем удаляют щипцами через разрез роговицы.

Способ 3. Маска из красителя и контроль толщины на основе поглощения (показан на фигуре 24)

Сначала применяют биосовместимый краситель (трипановый синий, бриллиантовый синий и т. д.) для окрашивания внутренней поверхности роговицы. Дисфункциональные эндотелиальные клетки затем отделяют от внутренней стенки роговицы путем пилинга/соскабливания. Затем нагруженную клетками биологическую матрицу, содержащую биосовместимый краситель, вводят инъекцией на внутреннюю поверхность роговицы, закрывая пустоту на месте удаленной ткани. Затем биологическую матрицу отверждают с использованием источника ультрафиолетового света, или ближнего ультрафиолетового света, или любого другого спектрального диапазона, необходимого для отверждения биологической матрицы. Краситель в роговичной ткани усиливает поглощение света, действуя как маска для контроля области отвержденной биологической матрицы. Подобным образом, краситель в биологической матрице усиливает поглощение света, контролируя тем самым глубину/толщину отвержденного

материала. Неотвержденный гелевый материал затем вымывают из передней камеры с использованием ирригационной/аспирационной канюли.

Способ 4. Нанесение на сухую переднюю камеру (показан на фигуре 25)

Дисфункциональные эндотелиальные клетки можно сначала отделять от внутренней стенки роговицы путем пилинга/соскабливания или контролируемым образом с использованием фотодеструкции с помощью фемтосекундного лазера. В качестве альтернативы, их можно оставлять на месте. С передней камеры переднего сегмента затем вытягивают воду и заменяют газом (например, воздухом). Затем нагруженную клетками биологическую матрицу наносят на внутреннюю поверхность роговицы небольшими контролируемыми капельками (что позволяет поверхностному натяжению диспергировать капли) или окрашивают с использованием кисти или канюли с мягким наконечником. Гиалуроновая кислота может быть нанесена на биологическую матрицу, чтобы изменить ее вязкие свойства и обеспечить лучший контроль над дозированием/нанесением. Затем всю биологическую матрицу отверждают с использованием источника ультрафиолетового света, или ближнего ультрафиолетового света, или любого другого спектрального диапазона, необходимого для отверждения биологической матрицы. Наконец, переднюю камеру затем снова заполняют сбалансированным солевым раствором.

Способ 5. Свободно плавающий состав

Дисфункциональные эндотелиальные клетки можно сначала отделять от внутренней стенки роговицы путем пилинга/соскабливания или контролируемым образом с использованием фотодеструкции с помощью фемтосекундного лазера. Затем небольшой болюс нагруженной клетками биологической матрицы вводят инъекцией рядом с внутренней поверхностью роговицы. Биологическую матрицу составляют для свободной плавучести относительно внутриглазной жидкости или аэрируют для достижения того же эффекта. Это заставляет биологическую матрицу естественным образом подниматься к задней роговице с созданием тонкого покрытия. Затем всю биологическую матрицу отверждают с использованием источника ультрафиолетового света, или ближнего ультрафиолетового света, или любого другого спектрального диапазона, необходимого для отверждения биологической матрицы. В качестве альтернативы, дисфункциональная ткань может быть оставлена, и биологическая матрица отверждается поверх нее. Источник ультрафиолетового света может быть сфокусирован на различные размеры с использованием способов оптической фокусировки для контроля области отверждения. Оставшуюся неотвержденную область можно вымыть с помощью аспирационной канюли.

Другие способы доставки

В альтернативном варианте осуществления увеличенная популяция клеток, такая как CEC, как описано в данном документе, может быть доставлена в виде клеточной суспензии (без средства, обеспечивающего локальную доставку, такого как светоотверждаемая разлагаемая биологическая матрица) и оставлена для прикрепления под действием силы тяжести, при этом пациент должен смотреть вниз в течение 3 часов. В состав могут быть включены соединения и вспомогательные средства, известные в уровне

техники для улучшения адгезии к тканям, такие как адгезивные средства, усилители вязкости или обратимые термозагутители.

В еще одном альтернативном варианте осуществления увеличенная популяция клеток, таких как CEC, как описано в данном документе, также может быть доставлена с использованием магнитных шариков. Получают суспензию CEC/шарики в среде, подходящей для глазной доставки, а затем ее вводят инъекцией в глаз. Прикрепление клеток стимулируют магнитом, приложенным к глазу. (Magnetic field–guided cell delivery with nanoparticle–loaded human corneal endothelial cells. Moysidis SN, Alvarez–Delfin K, Peschansky VJ, Salero E, Weisman AD, Bartakova A, Raffa GA, Merkhofer RM Jr, Kador KE, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL.Nanomedicine. 2015 Apr;11(3):499–509. doi: 10.1016/j.nano.2014.12.002.)

Другие способы применения ингибиторов LATS согласно настоящему изобретению

В одном аспекте настоящего изобретения можно непосредственно добавлять ингибиторы LATS согласно настоящему изобретению непосредственно на поверхность глаза для достижения увеличения популяции клеток. Например, это может быть выполнено, если потеря клеток не была полной, и есть оставшаяся высеваемая популяция клеток, количество которой будет увеличено. Например, если в глазу пациента остаются лимбальные стволовые клетки, или если в роговице пациента имеются оставшиеся роговичные эндотелиальные клетки, в зависимости от обстоятельств. Например, это может быть достигнуто путем получения соединений, раскрываемых в данном документе, в составе, подходящем для применения в отношении глаза, содержащем фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, и нанесения глазных капель на глаз. В качестве альтернативы, соединения, раскрываемые в данном документе, в составе, подходящем для применения в отношении глаза, содержащем фармацевтически приемлемые вспомогательные средства, могут быть применены внутрь глаза, например внутрь камеры.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства усиливают или стабилизируют композицию или облегчают получение композиции. Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства включают растворители, дисперсионные среды, средства для покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми.

Ингибитор LATS согласно настоящему изобретению может быть объединен с офтальмически приемлемыми консервантами, поверхностно–активными средствами, усилителями вязкости, усилителями проницаемости, буферами, хлоридом натрия или водой с образованием водных офтальмических суспензии или раствора. Местные офтальмологические продукты могут быть упакованы, например, в форме многократных доз. Таким образом, могут потребоваться консерванты для предотвращения микробного загрязнения во время использования. Подходящие консерванты включают в себя хлорбутанол, метилпарабен, пропилпарабен, фенилэтиловый спирт, динатрия эдетат,

сорбиновую кислоту, поликватерниум–1 или другие средства, известные специалистам в данной области. Такие консерванты обычно используются в количестве от 0,001 до 1,0% вес/объем.

В варианте осуществления настоящего изобретения ингибиторы LATS согласно настоящему изобретению могут быть использованы для сохранения клеток, например роговичных эпителиальных и лимбальных клеток, до трансплантации. После посмертного вскрытия специалистами банка глаз роговицы консервируют в таких средах, как Optisol или PBS, до трансплантации. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор LATS может быть добавлен в раствор, обычно используемый для трансплантации роговицы, такой как Optisol или PBS. Предпочтительно концентрация ингибитора LATS в растворе для консервации составляет от 0,5 до 100 микромоль/л, более предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль/л, особенно предпочтительно от 1 до 20 микромоль/л. В конкретном варианте осуществления ингибиторы LATS формулы I добавляют при концентрации от приблизительно 3 до 10 микромоль/л.

Иммуносупрессантные, противовоспалительные и антибиотические средства

В качестве дополнения к или альтернативы применению методики генного редактирования, выполняемого in vitro на популяции клеток, как описано для лимбальных стволовых клеток или роговичных эндотелиальных клеток, для снижения риска иммунного отторжения трансплантированных клеток у пациента, популяцию клеток согласно настоящему изобретению можно вводить одновременно или последовательно с иммунодепрессантом и/или противовоспалительными средствами или средствами. Можно использовать стандартные средства для иммуносупрессии или противовоспалительные средства или средства, в том числе без ограничения дексаметазон или циклоспорин.

Антибиотики могут также вводиться пациенту в сочетании с увеличенной популяцией клеток (например, лимбальных стволовых клеток или роговичных эндотелиальных клеток, как описано в данном документе), такие как антибиотики цефазолин и тобрамицин.

Когда клеточную популяцию согласно настоящему изобретению вводят вместе с другим средством или другими средствами, то популяцию клеток и средство(а) можно вводить последовательно в любом порядке или одновременно. В некоторых вариантах осуществления увеличенную популяцию клеток согласно настоящему изобретению вводят в сочетании с хирургическими способами лечения. В других вариантах осуществления популяцию лимбальных стволовых клеток согласно настоящему изобретению вводят в сочетании с хирургическими способами лечения. В других вариантах осуществления популяцию роговичных эндотелиальных клеток согласно настоящему изобретению вводят в сочетании с хирургическими способами лечения.

Варианты терапевтического применения

Популяцию клеток глаза согласно настоящему изобретению можно применять в способе лечения или профилактики глазного заболевания или нарушения, предусматривающем введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически

эффективного количества популяции клеток, содержащей клетки глаза.

Популяцию лимбальных стволовых клеток согласно настоящему изобретению можно применять в способе лечения или профилактики глазного заболевания или нарушения, предусматривающем введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества популяции клеток, содержащей лимбальные стволовые клетки. Предпочтительно глазное заболевание или нарушение связано с дефицитом лимбальных стволовых клеток.

Дефицит лимбальных стволовых клеток может возникать в результате некоторых разнообразных состояний, в том числе без ограничения

– непосредственное повреждение стволовых клеток химическими или термическими ожогами или лучевое поражение;

– врожденные состояния, такие как аниридия, склерокорнея, множественная эндокринная неоплазия;

– аутоиммунные нарушения, такие как синдром Стивенса–Джонсона, или глазной рубцующийся пемфигоид, или коллагеноз;

– хронические неаутоиммунные воспалительные нарушения, такие как возникающие вследствие применения контактных линз, синдром сухого глаза, розацеа, стафилококковый краевой кератит, кератит (бактериальный кератит, кератит, вызванный грибковой инфекцией, и вирусный кератит), птеригиум или новообразование;

– ятрогенные, такие как возникающее после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, удаление птеригиума или новообразования, криотерапия;

– в результате токсического воздействия лекарственного препарата, такого как консерванты (тимеросал, бензалконий), местные анестетики, пилокарпин, бета–блокаторы, митомицин, 5–фторурацил, нитрат серебра и лекарственные препараты для перорального введения, вызывающие синдром Стивенса–Джонсона.

(См. Dry Eye: a practical guide to ocular surface disorders and stem cell surgery. SLACK 2006 – Rzany B, Mockenhaupt M, Baur S et al. J. Clin. Epidemiol. 49, 769–773 (1996)).

Наиболее частыми встреченными причинами дефицита лимбальных стволовых клеток в клинической практике являются химические ожоги, аниридия, синдром Стивенса–Джонсона и использование контактных линз.

Более предпочтительно глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает из–за поражения, или заболевания, или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, термических ожогов, лучевого поражения, аниридии, склерокорнеи, множественной эндокринной неоплазии, синдрома Стивенса–Джонсона, глазного рубцующегося пемфигоида, коллагеноза, хронических неаутоиммунных воспалительных нарушений, возникающих вследствие применения контактных линз, синдрома сухого глаза, розацеа, стафилококкового краевого кератита, кератита (в том числе бактериального кератита, кератита, вызванного грибковой инфекцией, и вирусного кератита), птеригиума или

новообразования, дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, или удаления птеригиума или новообразования, или криотерапии; и дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего вследствие токсического воздействия лекарственного препарата, выбранного из группы, состоящей из консервантов (тимеросал, бензалконий), местных анестетиков, пилокарпина, бета–блокаторов, митомицина, 5–фторурацила, нитрата серебра и лекарственных препаратов для перорального введения, вызывающих синдром Стивенса–Джонсона.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения дефицита лимбальных стволовых клеток путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества популяции лимбальных стволовых клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

В более конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения дефицита лимбальных стволовых клеток, который возникает из–за поражения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, термических ожогов, лучевого поражения, аниридии, склерокорнеи, множественной эндокринной неоплазии, синдрома Стивенса–Джонсона, глазного рубцующегося пемфигоида, коллагеноза, хронических неаутоиммунных воспалительных нарушений, возникающих вследствие применения контактных линз, синдрома сухого глаза, розацеа, стафилококкового краевого кератита, кератита (в том числе бактериального кератита, кератита, вызванного грибковой инфекцией, и вирусного кератита), птеригиума или неоплазии, дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, или удаления птеригиума или новообразования, или криотерапии; и дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего вследствие токсического воздействия лекарственного препарата, выбранного из группы, состоящей из консервантов (тимеросал, бензалконий), местных анестетиков, пилокарпина, бета–блокаторов, митомицина, 5–фторурацила, нитрата серебра и лекарственных препаратов для перорального введения, вызывающих синдром Стивенса–Джонсона, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества популяции лимбальных стволовых клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

В еще более конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения дефицита лимбальных стволовых клеток, который возникает в результате поражения, или заболевания, или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, аниридии, синдрома Стивенса–Джонсона и возникающего в результате применения контактных линз, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества популяции лимбальных стволовых клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Когда взрослый индивид является реципиентом (реципиентом трансплантата), предпочтительно более 1000 клеток, экспрессирующих p63alpha, могут быть введены пациенту при способах лечения согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления от 1000 до 100000 клеток, экспрессирующих p63alpha, могут быть введены пациенту при способах лечения согласно настоящему изобретению.

Популяцию роговичных эндотелиальных клеток согласно настоящему изобретению можно применять в способе лечения или профилактики глазного заболевания или нарушения, предусматривающем введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества популяции клеток, содержащей роговичные эндотелиальные клетки. Предпочтительно глазное заболевание или нарушение связано со снижением плотности роговичных эндотелиальных клеток. В предпочтительном варианте осуществления глазным заболеванием или нарушением является нарушенная функция эндотелия роговицы.

Более предпочтительно глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушение функции эндотелия роговицы, которое выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии), недостаточности трансплантата роговицы, задней полиморфной дистрофии роговицы, врожденной наследственной эндотелиальной дистрофии, сцепленной с X–хромосомой эндотелиальной дистрофии роговицы, аниридии и эндотелита роговицы. В конкретном варианте осуществления глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии) и недостаточности трансплантата роговицы.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушенной функции эндотелия роговицы путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

В более конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения нарушенной функции эндотелия роговицы, которая выбрана из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии), недостаточности трансплантата роговицы, задней полиморфной дистрофии роговицы, врожденной наследственной эндотелиальной дистрофии, сцепленной с X–хромосомой эндотелиальной дистрофии роговицы, аниридии и эндотелита роговицы, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

В еще более конкретном варианте осуществления настоящее изобретение

относится к способу лечения нарушенной функции эндотелия роговицы, выбранной из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии) и недостаточности трансплантата роговицы, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества популяции роговичных эндотелиальных клеток, получаемой способом увеличения популяции клеток согласно настоящему изобретению.

Когда взрослый индивид является реципиентом (реципиентом трансплантата), слой роговичных эндотелиальных клеток для применения в способе лечения согласно настоящему изобретению предпочтительно имеет конечную плотность клеток в глазу по меньшей мере приблизительно 500 клеток/мм^2 (площадь), предпочтительно от 1000 до 3500 клеток/мм^2 (площадь), более предпочтительно от 2000 до приблизительно 4000 клеток/мм^2 (площадь).

РАЗДЕЛ ПРИМЕРОВ A–C

Следующие примеры предусмотрены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, а не для ограничения его объема. Другие варианты использования настоящего изобретения будут полностью очевидны рядовому специалисту в данной области и охвачены прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Пример A1. Биохимический анализ LATS1: Анализ методом гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (соединения из примеров 1–290)

Биохимический анализ LATS1 методом HTRF проводили с использованием набора для HTRF KinEASE–STK S1 (CisBio, номер по каталогу 62ST1PEC) в соответствии с инструкциями производителя. Белок LATS1 человека с киназным доменом, который содержал каталитический домен из аминокислот 589–1130, приобретали в CarnaBio (номер по каталогу 01–123), и его очищали совместно с His–меченным MOBKL1A человека (NP_775–739). Соединения добавляли с помощью устройства для манипуляции с жидкостями ECHO (Labcyte) в 384–луночные планшеты. Затем в лунки добавляли 5 микролитров следующего раствора (50 мМ HEPES, 0,01% BSA, 100 нМ ортованадата, 1 мМ MgCl2, 1 мМ DTT, 0,6 нг/микролитр фермента LATS1 (CarnaBio, 01–123), 2 микромоля/л вспомогательного вещества для определения локализации STK1 (CisBio), после чего добавляли 5 микролитров 2 мМ ATP в буфере для киназы (50 мМ HEPES, 0,01% BSA, 100 нМ ортованадата, 1 мМ MgCl2, 1 мМ DTT) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. 10 микролитров детекторной смеси (50 мМ HEPES, 0,01% BSA, 100 нМ ортованадата, 1 мМ MgCl2, 1 мМ DTT, антитело к STK, меченное криптатом (CisBio), стрептавидин–XL665 (CisBio), 500 микромоль/л фторида калия, 50 нМ EDTA) добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты прочитывали на PHERAstar (BMG Labtech) для анализа методом

HTRF (665 нм/620 нм). IC_{50} измеряется, если эффект соединения обуславливает снижение сигнала HTRF на 50%. Значения IC_{50} в отношении LATS1 для приведенных в качестве примеров соединений показаны в таблице 1A.

Пример A2. Биохимический анализ LATS1 с помощью Caliper

Белок LATS1 человека с киназным доменом, который содержал каталитический домен из аминокислот 589–1130, приобретали в CarnaBio (номер по каталогу 01–123), и его очищали совместно с His–меченным MOBKL1A человека (NP_775–739). 5 микролитров буфера для фермента, 100 нл соединений и 5 микролитров буфера, содержащего вспомогательное вещество для определения локализации, добавляли в 384–луночные планшеты. Конечная реакционная смесь для анализа содержит 100 мМ HEPES, pH 7,5, 0,1% BSA, 0,01% Triton X–100, 1 мМ DTT, 10 мМ MgCl2, 10 микромоль/л ортованадата натрия, 10 микромоль/л бета–глицерофосфата, 400 микромоль/л ATP, 1% DMSO, 1,1 нМ фермента LATS1 (CarnaBio, 01–123), 1 микромоль/л вспомогательного вещества FAM–KKLRRTLSVA–COOH для определения локализации (SEQ ID NO: 24) (NanoSyn). Планшеты инкубировали при 25°C в течение 3 часов. В каждую лунку для прекращения реакции добавляли 40 микролитров останавливающего буфера с 25 мМ EDTA (NanoSyn). Вспомогательные вещества для определения локализации и продукты разделяли с помощью электрофореза с использованием микрофлюидной системы для изыскания новых лекарственных средств Caliper Labchip 3000 (Caliper Life Sciences). Планшеты прочитывали с использованием возбуждения синим лазером и детектирования зеленой флуоресценции, и количественно определяли интенсивность флуоресценции. IC_{50} измеряется, если эффект соединения обуславливает снижение сигнала флуоресценции продукта на 50%. В соответствии с этим анализом значения IC_{50} в микромолях в отношении LATS1 для следующих соединений составляют:

Пример 49: 0,012, пример 14: 0,034, пример 65: 0,022, пример 139: 0,028, пример 133: 0,004.

Пример A3. Биохимический анализ LATS2 с помощью Caliper (соединения из примеров 1–290)

Белок LATS2 человека с киназным доменом, который содержал каталитический домен из аминокислот 553–1088, приобретали в CarnaBio (номер по каталогу 01–124), и его очищали совместно с His–меченным MOBKL1A человека (NP_775–739). 5 микролитров буфера для фермента, 100 нл соединений и 5 микролитров буфера, содержащего вспомогательное вещество для определения локализации, добавляли в 384–луночные планшеты. Конечная реакционная смесь для анализа содержит 100 мМ HEPES, pH 7,5, 0,1% BSA, 0,01% Triton X–100, 1 мМ DTT, 10 мМ MgCl2, 10 микромоль/л ортованадата натрия, 10 микромоль/л бета–глицерофосфата, 400 микромоль/л ATP, 1% DMSO, 1,1 нМ фермента LATS2 (CarnaBio, 01–124), 1 микромоль/л вспомогательного вещества FAM–KKLRRTLSVA–COOH для определения локализации (SEQ ID NO: 24) (NanoSyn). Планшеты инкубировали при 25°C в течение 3 часов. В каждую лунку для прекращения реакции добавляли 40 микролитров останавливающего буфера с 25 мМ

EDTA (NanoSyn). Вспомогательные вещества для определения локализации и продукты разделяли с помощью электрофореза с использованием микрофлюидной системы для изыскания новых лекарственных средств Caliper Labchip 3000 (Caliper Life Sciences). Планшеты прочитывали с использованием возбуждения синим лазером и детектирования зеленой флуоресценции, и количественно определяли интенсивность флуоресценции. IC_{50} измеряется, если эффект соединения обуславливает снижение сигнала флуоресценции продукта на 50%. Значения IC_{50} в отношении LATS2 для приведенных в качестве примеров соединений 1–290 показаны в таблице 1A.

Таблица 1A. Ингибирующая активность в отношении LATS1 и LATS2

№ примера	LATS1, IC_{50} (мкМ)	LATS2, IC_{50} (мкМ)		№ примера	LATS1, IC_{50} (мкМ)	LATS2, IC_{50} (мкМ)
1	0,001	н.о.		117	0,004	н.о.
2	0,001	н.о.		118	0,005	н.о.
3	0,001	н.о.		119	0,009	н.о.
4	0,001	0,001		120	0,01	н.о.
5	0,002	н.о.		121	0,014	н.о.
6	0,001	0,008		122	0,015	н.о.
7	0,002	н.о.		123	0,018	н.о.
8	0,003	н.о.		124	0,022	н.о.
9	0,003	н.о.		125	0,023	н.о.
10	0,003	н.о.		126	0,053	н.о.
11	0,003	0,012		127	0,055	н.о.
12	0,004	0,015		128	0,077	н.о.
13	0,004	н.о.		129	0,187	н.о.
14	0,002	0,05		130	1,153	н.о.
15	0,004	н.о.		131	>0,833	н.о.
16	0,005	н.о.		132	>2,5	н.о.
17	0,005	н.о.		133	0,002	0,004
17a	0,003	н.о.		134	0,001	н.о.
17b	0,0009	н.о.		135	0,002	н.о.
17c	0,003	н.о.		136	0,002	н.о.
17d	0,001	н.о.		137	0,022	н.о.
18	0,006	н.о.		138	0,002	н.о.
19	0,006	н.о.		139	0,003	0,02
20	0,006	н.о.		140	0,004	н.о.

21	0,007	н.о.		141	0,004	н.о.
22	0,007	н.о.		142	0,006	н.о.
23	0,01	н.о.		143	0,007	н.о.
24	0,017	н.о.		144	0,01	н.о.
25	0,03	н.о.		145	0,012	н.о.
26	0,031	н.о.		146	0,033	н.о.
27	0,035	н.о.		147	0,069	н.о.
28	0,036	н.о.		148	0,168	н.о.
29	0,036	н.о.		149	0,171	н.о.
30	0,039	н.о.		150	4,27	н.о.
31	0,041	н.о.		151	>10	н.о.
32	0,047	н.о.		152	>2,5	н.о.
33	0,071	н.о.		153	>5	н.о.
34	0,095	н.о.		154	0,0	н.о.
35	0,118	н.о.		155	0,001	н.о.
36	0,199	н.о.		156	0,006	н.о.
37	0,233	н.о.		157	0,006	н.о.
38	0,24	н.о.		158	0,008	н.о.
39	0,244	н.о.		159	0,016	н.о.
40	0,328	н.о.		160	0,024	н.о.
41	0,708	н.о.		161	0,025	н.о.
42	0,711	н.о.		162	0,049	н.о.
43	>1,97	н.о.		163	0,051	н.о.
44	>2,5	н.о.		164	0,159	н.о.
45	>2,5	н.о.		165	>2,5	н.о.
46	>2,5	н.о.		166	0,014	н.о.
47	0,002	0,006		167	0,143	н.о.
48a	0,002	0,002		168	0,028	н.о.
48b	0,006	0,018		169	0,098	н.о.
49	0,001	0,021		170	1,28	н.о.
50	0,005	н.о.		171	0,054	н.о.
51	0,006	н.о.		172	0,017	н.о.
52	0,012	н.о.		173	0,061	н.о.
53	0,04	н.о.		174	0,197	н.о.

54	0,078	н.о.		175	0,324	н.о.
55	0,46	н.о.		176	>2,5	н.о.
56	1,16	н.о.		177	>2,5	н.о.
57	1,44	н.о.		178	>2,5	н.о.
58	0,001	0,17		179	0,002	н.о.
59	0,001	0,004		180	0,322	н.о.
60	0,001	н.о.		181	9,0	н.о.
61	0,001	н.о.		182	>10	н.о.
62	0,001	0,002		183	0,797	н.о.
63	0,001	н.о.		184	0,004	н.о.
64	0,001	н.о.		185	0,009	н.о.
65	0,002	0,03		186	0,009	0,05
66	0,002	0,011		187	0,016	н.о.
67	0,002	н.о.		188	0,017	н.о.
68	0,002	н.о.		189	0,083	н.о.
68a	0,001	н.о.		190	0,099	н.о.
68b	0,002	н.о.		191	0,189	н.о.
69	0,003	н.о.		192	0,201	н.о.
70	0,003	н.о.		193	>10	н.о.
71	0,004	н.о.		194	0,005	н.о.
72	0,004	н.о.		195	>10	н.о.
73	0,006	н.о.		196	>2,5	н.о.
74	0,006	н.о.		197	0,023	н.о.
75	0,008	н.о.		198	0,001	н.о.
76	0,009	н.о.		199	0,001	н.о.
77	0,009	н.о.		251	0,004	н.о.
78	0,011	н.о.		252	0,002	н.о.
79	0,011	н.о.		253	0,085	н.о.
80	0,011	н.о.		254	0,005	н.о.
81	0,011	н.о.		255	0,008	н.о.
82	0,013	н.о.		256	0,008	н.о.
83	0,017	н.о.		257	0,022	н.о.
84	0,021	н.о.		258	0,023	н.о.
85	0,025	н.о.		259	0,061	н.о.

86	0,026	н.о.		260	0,459	н.о.
87	0,03	н.о.		261	0,001	0,004
88	0,037	н.о.		262	0,003	н.о.
89	0,044	н.о.		263	0,007	н.о.
90	0,126	н.о.		264	0,007	н.о.
91	0,148	н.о.		265	0,008	н.о.
92	0,304	н.о.		266	0,009	н.о.
93	0,809	н.о.		267	0,013	н.о.
94	1,15	н.о.		268	0,018	н.о.
95	>1,44	н.о.		269	0,001	н.о.
96	>1,70	н.о.		270	0,002	н.о.
97	>2,5	н.о.		271	0,002	н.о.
98	1,35	н.о.		272	0,002	н.о.
99	0,001	н.о.		273	0,463	н.о.
100	0,004	н.о.		274	0,013	н.о.
101	0,005	0,03		275	0,011	н.о.
102	0,126	н.о.		276	0,017	н.о.
103	0,002	н.о.		277	0,065	н.о.
104	0,005	н.о.		278	0,09	н.о.
105	0,001	н.о.		279	>2,5	н.о.
106	0,003	н.о.		280	0,003	н.о.
107	0,008	н.о.		281	0,004	н.о.
108	0,027	н.о.		282	0,01	н.о.
109	0,001	н.о.		283	0,02	н.о.
110	0,002	н.о.		284	0,03	н.о.
111	0,001	н.о.		285	0,19	н.о.
112	0,002	н.о.		286	0,56	н.о.
113	0,235	н.о.		287	0,002	0,015
114	0,002	н.о.		288	0,004	0,034
115	0,002	н.о.		289	0,004	н.о.
116	0,003	н.о.		290	0,004	0,008

н.о. означает не определено

Пример А4. Биохимический анализ LATS1 с помощью Caliper (соединения из примеров 291–335)

Биохимический анализ LATS1 с помощью Caliper проводили в соответствии с нижеследующим.

Белок LATS1 человека с киназным доменом приобретали в CarnaBio (номер по каталогу 01–123; партия 15CBS–0098D). Каталитический домен LATS1 человека [аминокислоты 589–1130(конец), номер доступа NP_004681.1] совместно экспрессировался в виде белка, слитого на N–конце с GST (90 кДа), с His–меченным MOBKL1A человека [аминокислоты 1–216(конец), номер доступа NP_775739.1] с использованием бакуловирусной системы экспрессии. GST–LATS1 очищали с использованием хроматографии на глутатион–сефарозе. Субстрат (Fluo–SGKtide; пептид для LATS1; партия BS–41067) имеет следующую последовательность: 5–Fluo–Nva–KKRNRRLSVA–амид (SEQ ID NO: 27) x TFA и был приобретен в Biosyntan.

Реакцию проводят в реакционном буфере, содержащем 50 мМ Hepes с pH 7,5; 0,02% Tween20; 0,02% BSA; 1 мМ DTT; 10 мкМ Na_3VO_4 и 10 мМ бета–глицерофосфата, и добавляют свежие 1 мМ $MgCl_2$ и qsp H_2O.

Раствор субстрата (в 2x концентрации) в реакционном буфере содержит 300 мкМ ATP и 4 мкМ Fluo–SGKtide.

Раствор киназы (в 2x концентрации) в реакционном буфере содержит 20 нМ киназы LATS1.

4,5 мкл раствора киназы в 2x концентрации, 50 нл 1,8 мМ соединений и 4,5 мкл раствора субстрата добавляли в черные малообъемные 384–луночные планшеты от Greiner и инкубировали при 32°C в течение 1 часа. В каждую лунку для прекращения реакции добавляли 15 микролитров останавливающего буфера, содержащего 100 мМ Hepes, pH 7,5; 5% DMSO; 0,1% покрывающего реагента; 10 мМ EDTA и 0,02% Brij–35 и qsp H_2O.

Субстраты и продукты разделяли с помощью электрофореза с использованием микрофлюидной системы считывания

Caliper EZ (Caliper Life Sciences), в которой используется чип для 12 сипперов (номер по каталогу 760404). Разделение происходит в покрывающем буфере (то же самое, что и останавливающий буфер), который содержит 0,1% покрывающего реагента CR3 и 0,5% покрывающего реагента CR8 (Perkin Elmer).

Планшеты прочитывали с использованием LED с возбуждением при 488 нм и детектированием при 520 нм для количественного определения интенсивности флуоресценции. IC_{50} измеряется, если эффект соединения обуславливает снижение сигнала флуоресценции продукта на 50%. Значения IC_{50} в отношении LATS1 для приведенных в качестве примеров соединений 291–335 показаны в таблице 1B.

Таблица 1B. Ингибирующая активность в отношении LATS1

№ примера	**LATS1** **IC_{50} (мкМ)**
291	0,4570

292	0,0433
293	0,0160
294	0,0045
295	0,0100
296	0,2089
297	0,0075
298	0,0590
299	0,0971
300	0,0012
301	0,0052
302	0,0595
303	0,0102
304	0,0096
305	0,6629
306	0,0012
307	0,0019
308	0,0687
309	0,0008
310	0,1639
311	1,0336
312	0,0024
313	0,0038
314	0,4667
315	0,0050
316	0,0425
317	0,0008
318	0,0018
319	0,0581
320	0,0007
321	0,0038
322	0,0292
323	0,0045
324	0,0104
325	0,0037

326	0,0572
327	0,1251
328	0,0189
329	0,0030
330	0,0031
331	0,0105
332	0,0076
333	0,0023
334	0,0061
335	н.т.

н.т.: не тестировали

Пример A5. Анализ пролиферации печеночных клеток–предшественников мышей

Анализ пролиферации состоит в измерении индуцированного соединением трехмерного роста печеночных клеток–предшественников (HPC) с образованием мелких органоидов с помощью способов высокодетализированной визуализации. Клетки–предшественники выделяли из мышей C57Bl/6 дикого типа и размножали, как описано (Lu, W. Y. et al., Nat. Cell Biol. 17, 971–983 (2015)). Клетки хранят в жидком азоте, размораживают при необходимости и тестируют с использованием следующего протокола.

HPC собирают из их культурального сосуда, покрытого коллагеном I типа (Corning; номер по каталогу 354487), подсчитывают и оценивают их жизнеспособность с использованием счетчика клеток CEDEX (Roche). После центрифугирования 12 миллионов клеток ресуспендируют в 2 мл среды Уильяма E (Life Technologies; номер по каталогу 22551089), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой крови (Amimed; номер по каталогу 2–01F10–l); 1% смесью пенициллин/стрептомицин (Sigma; номер по каталогу 15140–122); 17,6 мМ NaHCO3 (Sigma; номер по каталогу S8761); 20 мМ HEPES (Gibco; номер по каталогу H3375); 10 мМ никотинамида (Sigma; номер по каталогу N0636–100); 14 мМ глюкозы (Sigma; номер по каталогу G7021); 1 мМ пирувата натрия (Sigma; номер по каталогу TMC–005); инсулин–трансферрин–селенитом (ITS), разбавленным в 100 раз из исходного раствора (Sigma; номер по каталогу l3148); 100 нМ дексаметазона (Sigma; номер по каталогу D4902); 0,2 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma; номер по каталогу A7506–100G); 10 нг/мл рекомбинантного IL–6 человека (Preprotech; номер по каталогу 200–06); 10 нг/мл HGF мыши (Preprotech; номер по каталогу 315–23; партия 0711S527); 10 нг/мл EGF мыши (Preprotech; номер по каталогу 315–09; партия 0217179–1). Шесть миллилитров Matrigel (Corning; номер по каталогу 354277; партия 5187006) добавляют к раствору клеток и среды, за счет чего, таким образом, конечная концентрация клеток составляет 1,5 миллиона HPC на миллилитр в 25% культуральной

среды и 75% Matrigel. Пять микролитров (мкл) суспензии клеток в Matrigel переносят в каждую лунку 96–луночного аналитического планшета с прозрачным дном (Corning; номер по каталогу 356649) с использованием дозатора Star (Hamilton). После 20–минутного инкубирования при 37°C и 5% CO_2 для обеспечения возможности полимеризации Matrigel поверх него вносят 45 мкл среды для культивирования клеток.

В исходном планшете с соединениями 300 мкл среды для культивирования клеток вносят поверх 1,2 мкл соединений, растворенных в 90% DMSO. После надлежащего перемешивания 50 мкл раствора соединения переносят в аналитический планшет с помощью CyBi Well (CyBio). Каждое соединение тестируют по 8–точечным кривым изменения концентрации с коэффициентом разбавления 3,16 между каждыми двумя последовательными концентрациями. Максимальная тестируемая концентрация соединения составляет 20 мкМ, а наиболее низкая составляет 9 нМ. Аналитические планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37°C и 5% CO_2.

После инкубирования органоиды фиксируют в фосфатно–солевом буферном растворе (PBS) (Gibco; номер по каталогу 10010–015), содержащем 4% параформальдегид (Electron Microscopy Sciences; номер по каталогу 15714–S) и Hoechst 33342 (Life Technologies; номер по каталогу H3570) в разведении 1/5000 из исходного раствора для окрашивания ядер. Планшеты инкубируют в течение 90 минут при комнатной температуре и промывают один раз с помощью 300 мкл PBS, содержащего 1% смесь пенициллин/стрептомицин.

Планшеты визуализируют с помощью устройства для визуализации CV7000 (Yokogawa) с 10–кратным увеличением с использованием светлопольного осветителя (мощность осветителя: 10%; время воздействия: 20 мс) и лазера, работающего при длине волны 405 нанометров (мощность лазера: 100%; время воздействия 200 мс). Четыре различных изображения на каждую лунку получали и анализировали с помощью программного обеспечения для анализа изображений Yokogawa (YAS). Выходной характеристикой, используемой для определения размера органоида, является среднее количество ядер на органоид, усредненное по лунке. Среднее количество ядер на органоид (x) нормализуют относительно обработки нейтральным контролем (DMSO) с использованием следующего расчета: [xn = +100 (x – NC) / NC]. Данные, нормализованные относительно нейтрального контроля, используются для автоматизированного подбора кривой для получения параметров кривой для каждого соединения, включая значения EC50.

Анализ пролиферации печеночных клеток–предшественников мышей можно без труда использовать для тестирования эффективности соединения в отношении индуцирования пролиферации печеночных клеток–предшественников. Некоторые соединения согласно настоящему изобретению тестировали в анализе пролиферации печеночных клеток–предшественников мышей, и было обнаружено, что они характеризуются значениями EC_{50}, составляющими менее 20 мкМ, например, было обнаружено, что примеры 48a и 58 характеризуются значениями EC_{50}, составляющими

соответственно 0,26 и 0,84 мкМ. Некоторые другие соединения согласно настоящему изобретению тестировали в анализе пролиферации печеночных клеток–предшественников мышей, и было обнаружено, что они характеризуются значениями EC_{50}, составляющими более 20 мкМ, например, в случае с примером 303.

Пример A6. Анализ pYAP методом HTRF (клетки HaCaT)

Биохимический анализ pYAP методом HTRF проводили с использованием набора для тестирования Phospho–YAP (SER127) 10000 (CisBio, номер по каталогу 64YAPPEH) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки HaCaT суспендировали при 1,1 × 10^6 клеток/мл в DMEM (без фенолового красного) + 10% FBS со смесью пенициллин/стрептомицин/глутамин. 5 мкл клеток вносили в 1536–луночные обработанные планшеты для культур тканей с белым твердым дном (5500 клеток на лунку) и инкубировали в течение 48 часов при 37°C. 50 нл тестируемого соединения переносили в аналитические планшеты, содержащие клетки HaCaT, с помощью Pintool (GNF) и инкубировали в течение 2 часов. Лизирующий буфер (CisBio) добавляли в лунки для анализа и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с последующим добавлением 2 мкл детекторных антител (каждое из Ab к pYAP, меченного d2, и антитела к pYAP, меченного криптатом, в разведении 1:40 из исходного раствора). Планшеты инкубировали в течение ночи (20 ч.) при комнатной температуре, накрыв металлическими крышками. Планшеты прочитывали на PHERAstar (BMG Labtech) для анализа методом HTRF (665 нм/620 нм). IC_{50} измеряется, если эффект соединения обуславливает снижение сигнала HTRF на 50%. Результаты показаны в таблице 1C.

Пример A7. Анализ транслокации YAP (клетки HaCaT)

Клетки HaCaT суспендировали при 0,4 × 10^6 клеток/мл в DMEM+10% FBS со смесью пенициллин/стрептомицин/глутамин. 50 мкл клеток вносили в 384–луночные аналитические планшеты с прозрачным дном (20000 клеток на лунку) и инкубировали в течение ночи при 37°C. 100 нл тестируемого соединения переносили в лунки для анализа, содержащие клетки HaCaT, с помощью ECHO (Labcyte). После 24–часового инкубирования при 37°C в каждую лунку вносили 7 мкл 32% PFA и инкубировали в течение 45 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза с помощью PBS, оставляя 20 мкл PBS на лунку, затем обрабатывали с помощью 0,1% Triton и 1,5% BSA в PBS в течение 45 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали 5 раз с помощью PBS, оставляя 20 мкл PBS на лунку. В каждую лунку добавляли 20 мкл 1:1000 первичного Ab к YAP (Santa Cruz Biotechnology, номер по каталогу 63.7) и 1:1500 Draq5 в PBS с 1,5% BSA и инкубировали в течение 4 ч. при комнатной температуре. После 3–кратного промывания с помощью PBS с оставлением 20 мкл PBS на лунку содержимое каждой лунки инкубировали с 20 мкл 1:2000 вторичного антитела AlexaFluor 488_A21202 (Molecular Probes) в течение 4 ч. при комнатной температуре. Планшеты дополнительно промывали 3 раза с помощью PBS, запечатывали и визуализировали с помощью системы высокодетализированной визуализации Opera (PerkinElmer). Результаты показаны в таблице 1C.

Таблица 1С. Ингибирование фосфорилирования YAP и ядерная транслокация YAP

№ примера	pYAP в HaCaT, IC_{50} (мкМ)	Ядерная транслокация в HaCaT; EC_{50} (мкМ)		№ примера	pYAP в HaCaT, IC_{50} (мкМ)	Ядерная транслокация в HaCaT; EC_{50} (мкМ)
1	0,019	0,326		117	2,31	4,47
2	0,067	0,584		118	2,05	5,01
3	0,853	0,641		119	н.о.	5,18
4	1,15	2,53		120	2,14	2,93
5	2,19	2,48		121	н.о.	8,17
6	1,24	1,70		122	7,4	5,8
7	0,165	0,733		123	9,45	9,2
8	0,198	1,20		124	8,01	12,0
9	2,10	2,42		125	н.о.	8
10	2,96	3,55		126	н.о.	>20
11	0,646	1,43		127	н.о.	>20
12	1,15	1,75		128	н.о.	>20
13	13,45	8,51		129	н.о.	>20
14	7,31	4,25		130	н.о.	>20
15	0,66	3,48		131	н.о.	>20
16	9,79	15,8		132	н.о.	>20
17	0,606	2,63		133	0,414	1,67
17a	4,95	4,1		134	0,539	1,19
17b	0,765	1,22		135	0,488	0,85
17c	4,28	4,68		136	1,14	2,96
17d	0,402	1,72		137	35,5	>17,8
18	1,52	3,46		138	3,37	9,07
19	24,8	17,6		139	0,38	2,66
20	1,77	5,18		140	1,24	2,26
21	19,2	8,81		141	13,56	>10
22	11,4	13,0		142	>100	>28,02
23	9,58	11,8		143	>10	>20
24	34,7	33,1		144	0,606	4,44
25	н.о.	>20		145	>100	9,31

26	54,6	>100		146	н.о.	>20
27	н.о.	>14,4		147	>10	>20
28	н.о.	>20		148	н.о.	>20
29	н.о.	>20		149	>10	>20
30	н.о.	>20		150	н.о.	н.о.
31	н.о.	>20		151	н.о.	н.о.
32	>10	>20		152	н.о.	>20
33	>20	>20		153	>10	>20
34	н.о.	>20		154	2,53	1,06
35	н.о.	>20		155	1,58	1,05
36	н.о.	>20		156	>100	90,1
37	н.о.	>6,67		157	4,05	3,78
38	>10	>20		158	11,2	6,29
39	н.о.	>11,6		159	>10	>20
40	>10	>20		160	6,8	>20
41	>10	>20		161	>100	>20
42	н.о.	11,6		162	н.о.	>20
43	н.о.	>20		163	н.о.	>20
44	>10	>20		164	н.о.	>20
45	н.о.	>20		165	н.о.	>20
46	н.о.	>20		166	н.о.	8,45
47	0,55	1,31		167	н.о.	>20
48a	0,37	0,80		168	26,5	11,6
48b	7,25	7,22		169	н.о.	н.о.
49	0,607	1,17		170	>10	>20
50	17,0	3,81		171	н.о.	17,2
51	57,8	4,39		172	>10	>20
52	11,3	>20		173	н.о.	>20
53	н.о.	>20		174	>10	>20
54	н.о.	>20		175	>10	>20
55	>10	>20		176	н.о.	>20
56	>10	>20		177	н.о.	>20
57	н.о.	>20		178	н.о.	>20
58	0,185	0,302		179	>10	>20

59	0,019	0,341		180	>10	>20
60	н.о.	0,44		181	н.о.	>10
61	0,141	0,517		182	н.о.	>20
62	0,040	0,538		183	н.о.	>20
63	0,131	0,338		184	2,51	2,81
64	0,063	0,479		185	н.о.	11,5
65	0,895	1,99		186	н.о.	>20
66	0,534	1,01		187	>100	>20
67	н.о.	0,685		188	>100	12,0
68	1,23	3,39		189	н.о.	>10
68a	1,43	1,68		190	н.о.	>20
68b	4,27	2,92		191	н.о.	н.о.
69	4,72	11,5		192	>10	>20
70	0,422	1,68		193	н.о.	н.о.
71	0,026	1,57		194	11,3	4,24
72	1,17	3,65		195	н.о.	н.о.
73	9,07	8,26		196	>10	>20
74	3,4	12,7		197	н.о.	н.о.
75	3,8	6,91		198	2,18	3,23
76	6,42	9,41		199	н.о.	9,1
77	>100	13,4		251	1,96	10,87
78	12,1	14,3		252	6,98	>10
79	0,765	3,87		253	16,67	>20
80	21,6	12,9		254	2,91	4,63
81	42,8	17,0		255	3,18	5,39
82	>100	>20		256	11,07	15,6
83	42,1	28,2		257	н.о.	>20
84	65,2	>20		258	н.о.	9,92
85	31,0	9,81		259	н.о.	17,31
86	56,0	>20		260	н.о.	>20
87	51,6	>20		261	0,202	1,22
88	69,8	29,3		262	н.о.	0,311
89	>100	>100		263	3,22	5,99
90	н.о.	>20		264	14,8	11,2

91	>10	>20		265	22,3	>20
92	н.о.	>20		266	н.о.	5,35
93	н.о.	>20		267	7,19	9,75
94	н.о.	>20		268	н.о.	>20
95	>10	>20		269	0,294	0,438
96	н.о.	>20		270	0,423	0,873
97	н.о.	>20		271	0,187	1,07
98	н.о.	н.о.		272	3,51	5,97
99	0,113	0,606		273	>100	>20
100	11,6	4,83		274	н.о.	17,3
101	5,4	>20		275	н.о.	15,1
102	н.о.	н.о.		276	н.о.	>20
103	2,64	2,27		277	н.о.	>20
104	2,6	5,19		278	н.о.	>20
105	19,9	>20		279	н.о.	>20
106	14,2	>20		280	0,476	2,73
107	31,2	20,0		281	0,656	2,89
108	11,8	>19,3		282	8,27	11,32
109	0,977	4,71		283	8,25	14,19
110	2,97	15,29		284	46,46	>41,19
111	0,33	2,70		285	н.о.	>20
112	1,21	3,52		286	н.о.	>20
113	н.о.	>20		287	2,99	3,88
114	0,565	1,33		288	18,3	7,42
115	1,05	1,66		289	34,1	6,50
116	0,782	2,18		290	н.о.	1,39

н.о. означает не определено

Пример А8. Идентификация мишеней

SiRNA, направленные на MST1/2 или LATS1/2, вводили в клетки HaCaT человека путем трансфекции. Спустя сорок восемь часов клетки обрабатывали с помощью 1 мкМ окадаиковой кислоты в течение двух часов для усиления сигналов pYAP. Клеточные лизаты подвергали вестерн–блот–анализу для выявления pYAP (Ser127), описанному ниже. Результаты эксперимента представлены на фигурах 33A–33C.

Вестерн–блот–анализ

Клеточные лизаты (25 мкг на дорожку) смешивали с буфером для образцов XT и

восстановителем (Bio–Rad), разделяли с помощью 4–12% готового градиентного геля SDS Criterion (Bio–Rad) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio–Rad). Белки выявляли с помощью первичных антител и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, с использованием набора для усиленной хемилюминесценции (ThermoFisher). В качестве первичных антител использовали антитело к pYAP (Cell Signaling, номер по каталогу 13008S) и антитело к актину (Abcam, номер по каталогу ab8227).

Пример A9. Фармакодинамические характеристики (PD) in vivo

Для исследования PD in vivo использовали самцов мышей C57BL6 (Envigo) в возрасте 8–10 недель. Использовали стерильный хирургический 6–миллиметровый инструмент для трепанобиопсии для создания двух иссеченных ран на всю толщу кожи на спине анестезированной мыши. Ингибиторы LATS составляли в смеси 49,5% пропиленгликоля/0,5% Tween–80/49% PBS/1% HPMC и вводили местно в объеме дозирования 3 мкл. Область раны закрывали адгезивной повязкой (Tegaderm). Затем животных обматывали самоклеющимся бинтом. После введения двух ежедневных доз забор образцов кожи вокруг краев раны (кольцевидные образцы диаметром 2 мм) производили с помощью ножниц через 7 часов после введения последней дозы.

Собранные образцы подвергали экстракции РНК с использованием набора RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкцией производителя. Двухстадийный анализ по методу ОТ–ПЦР TaqMan проводили на термоциклере PTC–200 на элементах Пельтье (MJ Research) и в системе для выявления последовательностей ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). кДНК синтезировали с использованием набора высокопроизводительного получения архивов кДНК (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Анализы TaqMan проводили с использованием универсального мастер–микса TaqMan (Applied Biosystems) и зондов Cyr61 и Gapdh (Applied Biosystems) в соответствии с инструкциями производителя. Уровни экспрессии мРНК генов–мишеней нормализовали относительно уровней мРНК Gapdh, а данные анализировали с помощью программного обеспечения SDS 2.0 (Applied Biosystems) для расчета относительных количеств РНК.

Все исследования на животных проводились в Институте геномики исследовательского фонда Novartis (GNF). Протоколы экспериментов соответствовали правилам содержания животных и были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию при GNF.

Полученные относительные уровни экспрессии Cyr61/Gapdh в зависимости от концентраций тестируемых соединений были представлены графически в виде гистограммы на фигуре 34.

Пример A10. Гистологическое исследование in vivo и окрашивание Ki67

Для гистологического исследования in vivo использовали самцов мышей C57BL6 в возрасте 7 недель. Ингибиторы LATS составляли в смеси 70% PG/30% EtOH и вводили местно в объеме дозирования 25 мкл (250 мкг на дозу) на бритую поверхность спины.

Спустя 3 дня дозирования дважды в день производили забор образцов кожи, которые подвергали иммуногистологическому окрашиванию на Ki67 (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу RM–9106). Срезы изучали визуально, и Ki67–положительные клетки подсчитывали с помощью собственного алгоритма визуализации. Иллюстративные микрофотографии окрашивания Ki67 показаны на фигуре 35A. Обилие Ki67–положительных клеток в необработанных и обработанных клетках кожи мышей было представлено графически в виде диаграммы рассеяния на фигуре 35B.

Пример A11. Анализ pYAP методом HTRF (клетки JHH–5)

Анализ pYAP методом HTRF проводят с использованием обработанных соединением клеток JHH–5 (Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457–60), которые анализируют с помощью набора для тестирования Phospho–YAP (Ser127) 50000 (CisBio, номер по каталогу 64YAPPEI) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки JHH–5 суспендируют при 0,48 × 10^6 клеток/мл в среде Уильяма E без фенолового красного (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу A1217601), дополненной 10% (об./об.) инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой крови (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу 16140071) и смесью пенициллин/стрептомицин по 100 ед/мл каждого (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу 15140122). Клетки вносят в 384–луночные культуральные планшеты с прозрачным дном (50 мкл/лунка, при 24000 клеток на лунку, Greiner, номер по каталогу 781091) и инкубируют в течение 24 часов в инкубаторе для культур клеток при 37°C. Тестируемые соединения переносят в культуральные планшеты, содержащие клетки JHH–5, с помощью акустического дозатора Echo550 (Labcyte) (50 нл/лунка) с последующим инкубированием в течение 2 часов при 37°C. Лизирующий буфер (часть набора CisBio, номер по каталогу 64YAPPEI) добавляют в аналитические планшеты в виде четырехкратного концентрата (соответствует 16 мкл/лунка) и инкубируют со взбалтыванием в течение 30 минут при комнатной температуре. Лизат переносят из культуральных планшетов в белые малообъемные 384–луночные аналитические планшеты (12 мкл/лунка, Greiner, номер по каталогу 784075) с последующим добавлением 3 мкл/лунка детекторных антител (часть набора CisBio, номер по каталогу 64YAPPEI: каждое из антитела к pYAP, меченного d2, и антитела к pYAP, меченного криптатом, в разведении 1:40 из исходного раствора). Планшеты запечатывают и инкубируют в течение ночи (18 часов) при комнатной температуре в защищенном от света месте. Планшеты прочитывают на планшет–ридере EnVision (Perkin Elmer) при длинах волн испускания 665 нм и 620 нм. Соотношение сигналов HTRF x в каждой лунке рассчитывается как [x=сигнал (665 нм) / сигнал (620 нм) x 10000], как указано в протоколе производителя. Соотношение сигналов x в каждой лунке нормализуют относительно обработки активным контролем и нейтральным контролем (DMSO), оценивая медианный уровень NC как 0% и медианный уровень AC как –100%, для расчета нормализованного соотношения сигналов xn в каждой лунке как [xn = ±100 (x – NC) / (AC – NC)]. Данные, нормализованные относительно контроля, используются для автоматизированного подбора кривой для

получения параметров кривой для каждого соединения, включая значения IC_{50}. Значения IC_{50} в отношении pYAP в клетках JHH–5 для приведенных в качестве примера соединений показаны в таблице 1D.

Таблица 1D. Ингибирование фосфорилирования YAP в клетках JHH5

№ примера	JHH–5 pYAP IC_{50} (мкМ)	№ примера	JHH–5 pYAP IC_{50} (мкМ)
1		**150**	н.о.
2	> 10	**151**	н.о.
3	1,0	**152**	н.о.
4	> 10	**153**	н.о.
5	2,3	**154**	н.о.
6	2,6	**155**	2,6
7	1,6	**156**	н.о.
8	1,9	**157**	9,2
9	н.о.	**158**	н.о.
10	8,7	**159**	н.о.
11	н.о.	**160**	н.о.
12	2,9	**161**	н.о.
13	н.о.	**162**	н.о.
14	> 10	**163**	н.о.
15	4,1	**164**	н.о.
16	н.о.	**165**	н.о.
17	н.о.	**166**	н.о.
18	н.о.	**167**	н.о.
19	н.о.	**168**	н.о.
20	н.о.	**169**	н.о.
21	н.о.	**170**	н.о.
22	н.о.	**171**	н.о.
23	н.о.	**172**	н.о.
24	н.о.	**173**	н.о.
25	н.о.	**174**	н.о.
26	н.о.	**175**	н.о.
27	н.о.	**176**	н.о.
28	н.о.	**177**	н.о.

29	н.о.	**178**	н.о.
30	> 10	**179**	н.о.
31	н.о.	**180**	н.о.
32	н.о.	**181**	н.о.
33	н.о.	**182**	н.о.
34	н.о.	**183**	н.о.
35	н.о.	**184**	6,5
36	н.о.	**185**	н.о.
37	н.о.	**186**	н.о.
38	н.о.	**187**	н.о.
39	н.о.	**188**	н.о.
40	> 10	**189**	н.о.
41	н.о.	**190**	н.о.
42	н.о.	**191**	н.о.
43	н.о.	**192**	н.о.
44	н.о.	**193**	н.о.
45	н.о.	**194**	н.о.
46	н.о.	**195**	н.о.
47	н.о.	**196**	н.о.
48a	0,6	**197**	н.о.
48b	н.о.	**198**	1,3
49	1,6	**199**	3,2
50	> 10	**251**	1,5
51	н.о.	**252**	н.о.
52	н.о.	**253**	н.о.
53	н.о.	**254**	1,3
54	н.о.	**255**	7,1
55	н.о.	**256**	> 10
56	н.о.	**257**	> 10
57	н.о.	**258**	> 10
58	0,6	**259**	н.о.
59	1,1	**260**	н.о.
60	н.о.	**261**	0,6
61	1,4	**262**	н.о.

62	0,6	**263**	> 10
63	н.о.	**264**	> 10
64	2,1	**265**	> 10
65	5,8	**266**	н.о.
66	6,2	**267**	5,9
67	н.о.	**268**	> 10
68	3,5	**269**	0,8
69	н.о.	**270**	0,8
70	4,0	**271**	0,8
71	> 10	**272**	8,1
72	4,6	**273**	> 10
73	н.о.	**274**	> 10
74	н.о.	**275**	> 10
75	н.о.	**276**	> 10
76	н.о.	**277**	н.о.
77	н.о.	**278**	н.о.
78	н.о.	**279**	н.о.
79	2,1	**280**	3,8
80	н.о.	**281**	5,9
81	н.о.	**282**	н.о.
82	н.о.	**283**	> 10
83	н.о.	**284**	н.о.
84	> 10	**285**	н.о.
85	> 10	**286**	н.о.
86	н.о.	**287**	9,0
87	н.о.	**288**	н.о.
88	н.о.	**289**	н.о.
89	н.о.	**290**	3,0
90	н.о.	**291**	н.о.
91	н.о.	**292**	н.о.
92	н.о.	**293**	н.о.
93	н.о.	**294**	1,1
94	н.о.	**295**	> 10
95	н.о.	**296**	н.о.

96	н.о.	**297**	> 10
97	н.о.	**298**	н.о.
98	н.о.	**299**	н.о.
99	5,7	**300**	0,9
100	н.о.	**301**	> 10
101	3,3	**302**	н.о.
102	н.о.	**303**	> 10
103	н.о.	**304**	> 10
104	н.о.	**305**	н.о.
105	н.о.	**306**	1,0
106	н.о.	**307**	1,3
107	н.о.	**308**	> 10
108	н.о.	**309**	2,0
109	1,5	**310**	н.о.
110	1,5	**311**	н.о.
111	2,4	**312**	7,7
112	3,2	**313**	7,8
113	н.о.	**314**	н.о.
114	н.о.	**315**	5,7
115	3,4	**316**	н.о.
116	2,2	**317**	3,2
117	> 10	**318**	3,1
118	4,0	**319**	> 10
119	н.о.	**320**	1,0
120	н.о.	**321**	н.о.
121	н.о.	**322**	н.о.
122	8,0	**323**	н.о.
123	н.о.	**324**	н.о.
124	н.о.	**325**	н.о.
125	н.о.	**326**	н.о.
126	н.о.	**327**	н.о.
127	н.о.	**328**	н.о.
128	н.о.	**329**	н.о.
129	н.о.	**330**	н.о.

130	н.о.	**331**	н.о.
131	н.о.	**332**	н.о.
132	н.о.	**333**	н.о.
133	1,7	**334**	н.о.
134	1,0	**335**	н.о.
135	н.о.		
136	1,3		
137	н.о.		
138	н.о.		
139	1,7		
140	2,2		
141	н.о.		
142	н.о.		
143	н.о.		
144	н.о.		
145	н.о.		
146	н.о.		
147	н.о.		
148	н.о.		
149	н.о.		

н.о. означает не определено

Пример А12. Анализ ядерной транслокации YAP (клетки JHH–5)

Анализ ядерной транслокации YAP проводят с использованием обработанных соединением клеток JHH–5 (Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457–60), которые анализируют с помощью высокодетализированной визуализации после окрашивания антителом к YAP1. Вкратце, клетки JHH–5 суспендируют при 0,48 × 10^6 клеток/мл в среде Уильяма Е без фенолового красного (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу A1217601), дополненной 10% (об./об.) инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой крови (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу 16140071) и смесью пенициллин/стрептомицин по 100 ед/мл каждого (Thermo Fisher Scientific Gibco, номер по каталогу 15140122). Клетки вносят в 384–луночные культуральные планшеты с прозрачным дном (50 мкл/лунка, при 24000 клеток на лунку, Greiner, номер по каталогу 781091) и инкубируют в течение 24 часов в инкубаторе для культур клеток при 37°C. Тестируемые соединения переносят в культуральные планшеты, содержащие клетки JHH–5, с помощью акустического дозатора Echo550 (Labcyte) (50 нл/лунка). После инкубирования в течение 4 часов при 37°C в каждую лунку вносят 12,5

мкл 20% исходного раствора PFA (Electron Microscopy Sciences, номер по каталогу 15713S) до конечной концентрации 4% (об./об.) и инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре. Планшеты промывают с помощью TBS (полученного из десятикратного концентрата, Sigma Aldrich, номер по каталогу T5912), и затем клетки в них пермеабилизируют 0,1% (об./об.) раствором Triton X–100 (Sigma Aldrich, номер по каталогу 93443) в DPBS в течение 15 минут при комнатной температуре. Планшеты снова промывают с помощью TBS с последующим добавлением антитела к YAP1 (Novus Biologicals, номер по каталогу NB110–58358) в каждую лунку в разведении 1:500 в 3% (вес/об.) BSA в DPBS (полученном из 35% исходного раствора, Sigma Aldrich, номер по каталогу A7979) и инкубированием в течение ночи при 4°C. После удаления раствора первичного антитела и промывания с помощью TBS содержимое каждой лунки инкубируют в течение 2 часов при комнатной температуре со вторичным антителом козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированным с Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу A–21244), в разведении 1:1000 в 3% (вес/об.) BSA в DPBS (полученном из 35% исходного раствора, Sigma Aldrich, номер по каталогу A7979), дополненном раствором Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 3570) в разведении 1:10000. Планшеты снова промывают с помощью TBS, а затем запечатывают и визуализируют в системе для высокодетализированного анализа IN Cell Analyzer (GE Healthcare Life Sciences). Путем сравнения окрашивания ядер с помощью Hoechst с окрашиванием общего внутриклеточного YAP с помощью Alexa Fluor 647 с использованием программного обеспечения для анализа изображений CellProfiler (Carpenter et al., Genome Biol. 2006;7(10):R100) получают сигнал, соответствующий ядерному YAP. Сигнал ядерного YAP x нормализуют относительно обработки активным контролем и нейтральным контролем (DMSO), оценивая медианный уровень NC как 0% и медианный уровень AC как +100%, для расчета нормализованного сигнала ядерного YAP xn в каждой лунке как [xn = ±100 (x – NC) / (AC – NC)]. Данные, нормализованные относительно контроля, использовали для автоматизированного подбора кривой для получения параметров кривой для каждого соединения, включая значения EC_{50}.

Пример A13. In vivo обработка мышей

Все исследования на животных проводились в соответствии с федеральными, государственными, местными и институциональными руководящими принципами, регулирующими использование лабораторных животных в исследованиях. Самцов мышей C57BL/6J (в возрасте 8–10 недель) приобретали в Jackson Labs (Бар–Харбор, Мэн). Пример 46 был составлен для перорального введения в дозе 3 мг/мл, а пример 261 – в дозе 1 мг/мл в виде суспензии метилцеллюлоза:Tween–80:вода (0,5:0,5:99). Однократная пероральная доза любого из соединений составляла 10 мл/кг массы тела. Забор крови и ткани печени производили под глубокой анестезией (изофлуран) через 2 ч. после введения дозы (для анализа мРНК) либо через 24 ч. после введения дозы (для иммуногистохимического исследования).

Анализ фосфо–YAP (pYAP) методом HTRF в ткани печени

Замороженную ткань печени переносили в пробирку с лизирующей матрицей (MP, номер по каталогу 6913–500) с 1:50 раствором ингибитора протеазы (Sigma–Aldrich, номер по каталогу P8340) в экстракционном буфере PhosphoSafe (Novagen, номер по каталогу 71296–3) и гомогенизировали с помощью FastPrep–24 (MP Biomedicals). Смесь выдерживали на льду в течение 20 мин. и затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Концентрацию белка измеряли с помощью набора для анализа белка BCA (Pierce, номер по каталогу 23227) в соответствии с протоколом производителя. Все образцы нормализовали до конечной концентрации 5 мкг/мкл в общем объеме 180 мкл Phosphosafe и высевали в 96–луночный планшет для анализа методом HTRF. pYAP анализировали методом HTRF с помощью набора для тестирования Phospho–YAP (SER127) 50000 (Cisbio, номер по каталогу 64YAPPEI). Лизаты печени мыши в экстракционном буфере в отдельности (Phosphosafe) или в смеси Phosphosafe и лизирующего буфера для HTRF 1:1 (Cisbio) анализировали в дублирующих лунках 384–луночных аналитических планшетов (12 мкл/лунка). Для каждого образца использовалось одно и то же входное количество, определенное на основании общего содержания белка (30–60 мкг на образец на лунку). Добавляли детектирующие антитела – антитело к фосфо–YAP, меченное d2, и антитело к фосфо–YAP, меченное криптатом, каждое в разведении 1:40 в буфере для выявления (Cisbio) (3 мкл/лунка, конечное разведение 1:200 для каждого антитела), после чего планшеты запечатывали и инкубировали в течение ночи (18 ч.) при комнатной температуре в защищенном от света месте. Планшеты прочитывали на EnVision (PerkinElmer) при длинах волн испускания 665 нм и 620 нм. Соотношение сигналов HTRF рассчитывали как сигнал (665 нм) / сигнал (620 нм) x 10000, как указано в протоколе производителя. Для каждого образца лизата на графиках по группам обработки использовали одно значение сигнала HTRF (среднее значение для дублирующих лунок).

Количественная ОТ–ПЦР

Общую РНК печени выделяли из ткани после хранения в реагенте RNAlater (Qiagen), используя способ TRIzol в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Относительное обилие мРНК измеряли с помощью количественной ОТ–ПЦР с использованием анализов экспрессии генов и реагентов TaqMan в соответствии со стандартными протоколами (Applied Biosystems). Мышиными зондами для генов–мишеней YAP были CTGF (Mm01192933_g1) и Cyr61 (Mm00487498_m1). GAPDH мыши использовали в качестве внутреннего контроля (зонд 4351309). Относительные изменения количества мРНК рассчитывали с помощью способа ΔΔCt. Изменения в экспрессии генов при обработке соединениями выражены в виде кратности изменения по сравнению с группой, получавшей носитель.

Иммуногистохимическое исследование (IHC) Ki67

Ткань печени фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24–48 ч. Обработку и заливку в парафин проводили по стандартным процедурам. Срезы нарезали толщиной 5 микрон и окрашивали с использованием автоматизированной

системы Ventana. Первичным антителом к Ki67 мыши был IgG кролика (Bethyl Labs). Ki67–положительные гепатоциты оценивали количественно с помощью анализа изображений с использованием платформы HALO. Анализировали по меньшей мере 3 среза на животное из середины медиальной доли.

Таблица 1E. Результаты обработки соединениями у мышей

	pYAP (% от контроля)	мРНК CTGF (кратность изменения)	мРНК Cyr61 (кратность изменения)	IHC Ki67 (кратность изменения)
Пример 46 30 мг/кг	64	2,1 (+/– 0,4)	3,5 (+/– 0,5)	3,3 (+/– 0,2)
Пример 261 10 мг/кг	60	2,5 (+/– 0,2)	3,9 (+/– 0,6)	3,1 (+/– 0,5)

Количество мРНК генов–мишеней YAP CTGF и Cyr61 увеличивалось через 2 ч., а пролиферация,

на которую указывало иммуногистохимическое исследование (IHC) Ki67, увеличивалась через 24 ч. после приема однократной пероральной дозы ингибиторов LATS–киназы. Значения выражены в виде кратности изменения по сравнению с группой, получавшей носитель (среднее +/– SEM).

Пример B1. Выделение лимбальных эпителиальных клеток человека

Человеческие трупные роговицы с имеющимся согласием на исследование были получены из глазных банков. Лимбальные кольца иссекали и частично диссоциировали в 1,2 мг/мл раствора диспазы в течение 2 часов при 37°C, а затем в течение 10 минут в TrypLE (Life Technologies). Фрагменты лимбальных крипт затем аккуратно вырезали из частично диссоциированных лимбальных колец и прополаскивали путем центрифугирования. Клетки, полученные таким образом, использовали в примерах B2–B11, описанных ниже.

Пример B2. Воздействие на клетки ингибиторов LATS и измерение внутриклеточного распределения YAP

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 24–луночные планшеты со стеклянным дном и черными стенками в среду для культивирования лимбальных эпителиальных клеток (DMEM F12, дополненную 10% человеческой сывороткой крови и 1,3 мМ хлорида кальция), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или № 49 в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали в этих условиях в течение 24 часов при 37°C и 5% CO2.

Для измерения эффекта ингибиторов LATS в отношении их нижележащей мишени YAP анализировали внутриклеточное распределение YAP путем иммуногистохимического исследования. Культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе,

содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C. В качестве первичного антитела использовали антитело к YAP от Santa Cruz Biotechnology. Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. В отрицательном контроле первичное антитело не использовалось (данные не показаны). Флуоресценцию наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

В ядрах LSC, культивируемых без ингибиторов LATS (с контролем DMSO), наблюдалось лишь слабое иммуноокрашивание YAP. Иммуноокрашивание YAP было более сильным в ядрах LSC, подвергнутых воздействию соединения–ингибитора LATS из примера № 133 или № 49 (данные не показаны).

Пример B3. Воздействие на клетки ингибиторов LATS и измерение фосфорилирования YAP

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, отделяли от культуральной чашки с помощью Accutase в течение 10 минут при 37°C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и высевали в DMEM F12, дополненную 10% человеческой сывороткой крови и 1,3 мМ хлорида кальция, в 6–луночные планшеты (Corning) и культивировали без соединений–ингибиторов LATS в течение 2–4 дней.

Затем среду заменяли свежей средой для культивирования лимбальных эпителиальных клеток (DMEM F12, дополненной 10% человеческой сывороткой крови и 1,3 мМ хлорида кальция), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или № 49 в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали в этих условиях в течение 1 часа при 37°C и 5% CO2.

Для измерения эффекта ингибиторов LATS в отношении их нижележащей мишени YAP измеряли уровни фосфорилирования YAP путем вестерн–блоттинга в соответствии с нижеследующим. Клеточные осадки получали путем диссоциации трипсином и центрифугирования и промывали с помощью PBS. Осадки лизировали с помощью 30 микролитров лизирующего буфера для RIPA, содержащего коктейль ингибиторов протеаз (Life Technologies), в течение 30 минут с вихревым перемешиванием каждые 10 минут. Клеточный дебрис затем осаждали при 4°C в течение 15 минут при 14000 об/мин, и производили забор белкового лизата. Концентрацию белка определяли количественно с помощью набора Micro BCA (Pierce). Пятнадцать микрограммов общего белка загружали в каждую лунку с 4–20% гелями TGX (BioRad), и проводили вестерн–блоттинг в соответствии с инструкциями производителя. Мембраны зондировали с помощью антитела к фосфо–YAP (ser127) (CST, 1:500) или общему YAP (Abnova, 1:500), и в качестве контроля нагрузки использовали мечение актина (Abcam). Мембраны окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с HRP, прополаскивали и визуализировали с помощью системы ChemiDoc (Biorad) в соответствии с инструкциями

производителя.

Вестерн–блот–анализ (см. фигуру 1) показал, что как соединение из примера № 133, так и соединение из примера № 49 вызывали снижение уровней фосфорилирования YAP в LSC человека. Эти результаты позволяют предположить, что соединения–ингибиторы LATS из примера № 133 и № 49 могут активировать передачу сигналов, опосредованную YAP, в LSC человека.

Пример B4. Увеличение популяции лимбальных стволовых клеток человека и иммуногистохимическое изучение клеточного фенотипа

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 24–луночные планшеты (Corning) в среду для культивирования лимбальных эпителиальных клеток (DMEM F12, дополненную 10% человеческой сывороткой крови и 1,3 мМ хлорида кальция), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или № 49 в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки сначала культивировали при 37°C и 5% CO2 в течение 6 дней после выделения без пассирования (фигуры 2A, 2B и 2C).

Чтобы оценить способность соединений обеспечивать увеличение количества LSC после двух пассажей, LSC пассировали и культивировали в течение двух недель в присутствии соединения из примера 49 для обеспечения увеличения количества клеток (фигура 2D). Лимбальные стволовые клетки (LSC) пассировали путем обработки культур с помощью Accutase в течение 10 минут при 37°C, прополаскивания суспензии клеток путем центрифугирования и высевания клеток в свежую среду для культивирования LSC, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера 49.

Для изучения экспрессии p63–альфа в увеличенной популяции клеток ее измеряли путем иммуногистохимического исследования в соответствии с нижеследующим. Культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C. В качестве первичного антитела использовали антитело к p63–альфа от Cell Signaling. Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки подвергали контрастному окрашиванию антителом к человеческому ядерному антигену (Millipore) в разведении 1:500, чтобы пометить все клетки в культуре и подтвердить их человеческую принадлежность. В отрицательном контроле первичное антитело не использовалось (данные не показаны). Флуоресценцию наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

На фигуре 2A показано, что в присутствии среды для роста и DMSO только несколько выделенных клеток прикрепляются к культуральной чашке и выживают в течение периода до 6 дней. Большинство клеток экспрессировали человеческий ядерный

маркер, но лишь некоторые экспрессировали p63–альфа. В отличие от этого, в присутствии ингибиторов LATS, соединения из примера № 133 (фигура 2B) и соединения из примера № 49 (фигура 2C), клетки образовывали колонии и экспрессировали p63–альфа. Данный результат указывает на то, что ингибиторы LATS способствуют увеличению популяции клеток с p63–альфа–положительным фенотипом. Фигура 2D. Пассажирование клеток и культивирование их в присутствии ингибитора LATS, соединения из примера № 49, в течение двух недель обеспечивало увеличение популяции клеток и образование конфлюэнтных культур, экспрессирующих p63–альфа.

Пример B5. Увеличение популяции лимбальных стволовых клеток человека и его измерение

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 48–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15 (Lonza), дополненную ингибиторами LATS (как указано в таблицах 2 и 3 ниже) в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2.

Для каждого соединения были получены два набора культур. Первый набор культур фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут при комнатной температуре после того, как клетки, выделенные из роговицы, прикреплялись к чашке для культивирования клеток (обычно через 24 ч. после посева клеток). Второй набор культур фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут при комнатной температуре после культивирования в течение двух пассажей. Клетки пассировали, когда они достигали 90–100% конфлюэнтности.

Для изучения экспрессии p63–альфа в увеличенной популяции клеток ее измеряли путем иммуногистохимического исследования в соответствии с нижеследующим. Фиксированные культуры клеток пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C. В качестве первичного антитела использовали антитело к p63–альфа от Cell Signaling. Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Ядра клеток затем метили с помощью 0,5 микромоля/л раствора Sytox оранжевого (ThermoFisher) в PBS в течение 5 минут при комнатной температуре.

Для оценивания процентной доли p63–альфа–положительных клеток подсчитывали количество клеток, меченных антителом к p63–альфа, и определяли общее количество клеток путем подсчета количества ядер, окрашенных Sytox оранжевым. Затем определяли относительное количество p63–альфа–положительных клеток путем расчета процентной доли ядер, положительных по окрашиванию Sytox оранжевым, которые также экспрессировали p63–альфа.

Для оценки показателей увеличения клеток подсчитывали ядра с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880. Затем определяли коэффициент увеличения путем расчета соотношения увеличившейся популяции клеток и популяции высеянных

клеток.

Результаты в приведенных ниже таблицах указывают на то, что ингибиторы LATS обеспечивали увеличение популяции клеток. В присутствии ингибиторов LATS 57–97 процентов клеток экспрессируют p63–положительный фенотип.

Таблица 2

Соединение из примера №	**Коэффициент увеличения**	**Соединение из примера №**	**Коэффициент увеличения**
Пример 47	2137	Пример 290	1051
Пример 12	2087	Пример 65	1048
Пример 49	2029	Пример 287	991
Пример 261	1717	Пример 17	976
Пример 62	1712	Ex.139	961
Пример 14	1423	Пример 11	705
Пример 6	1275	Пример 289	681
Пример 288	1241	Пример 33	39
Пример 133	1205	DMSO	35
Пример 66	1160		

Таблица 3

Соединение из примера №	**Процентная доля p63a–положительных клеток**	**Соединение из примера №**	**Процентная доля p63a–положительных клеток**
Пример 47	97	Пример 290	90
Пример 12	95	Пример 65	87
Пример 49	92	Пример 287	86
Пример 261	93	Пример 17	86
Пример 62	95	Пример 139	87
Пример 14	93	Пример 11	86
Пример 6	93	Пример 289	80
Пример 288	95	Пример 33	6
Пример 133	89	DMSO	3
Пример 66	89		

Пример B6. Нокдаун LATS1 и LATS2, опосредованный siRNA, в лимбальных клетках человека

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 24–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15 (Lonza). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2. Производили нокдаун LATS1 и LATS2 путем трансфекции (липофекции с использованием RNAiMax, ThermoFisher). Клетки в каждой лунке планшета для культивирования клеток трансфицировали с помощью 0,5 микрограмма пулов 4 siRNA, нацеливающихся на каждый ген. siRNA, используемые в данном исследовании, представляли собой siRNA SI00067172 для LATS1 и siRNA SI00106925 для LATS2 от Qiagen. Скремблированные siRNA использовали в качестве отрицательных контролей в соответствии с протоколом производителя (Qiagen).

Для измерения пролиферации клеток проводили окрашивание с помощью EdU в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies) через 48 часов после

трансфекции с помощью siRNA для LATS1 и LATS2 или контрольных скремблированных siRNA. Ядра клеток метили Sytox оранжевым. Флуоресценцию EdU и Sytox оранжевого наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 в целях измерения процентной доли EdU–положительных ядер клеток.

На фигуре 3 показано, что процентная доля EdU–положительных клеток увеличивалась при нокдауне LATS1 и LATS2, что демонстрирует, что нокдаун LATS приводит к пролиферации клеток.

Пример B7. Увеличение популяции лимбальных стволовых клеток человека и иммуногистохимическое изучение маркеров дельта–N–p63–альфа/бета/гамма, ABCG2 и C/EBP–дельта

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 48–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15 (Lonza), дополненную ингибиторами LATS (пример соединения 49 и пример соединения 133) в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2 в течение 8–10 дней.

Для изучения экспрессии в увеличенной популяции клеток маркеров, обычно экспрессируемых лимбальными стволовыми клетками, измеряли способность клеток экспрессировать дельта–N–p63–альфа/бета/гамма, ABCG2 и C/EBP–дельта путем иммуногистохимического исследования в соответствии с нижеследующим. Культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C. В качестве первичных антител использовали антитела к p63α (Cell Signaling Technology), ABCG2 (EMD Millipore) и C/EBPδ (Abcam), цитокератину 15, цитокератину 12 (Abcam). Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Ядра клеток затем метили с помощью 0,5 микромоля/л раствора Sytox оранжевого (ThermoFisher) в PBS в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем образцы изучали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Результаты указывали на то (см. фигуру 4), что клетки, культивируемые в среде X–VIVO, дополненной только DMSO (без соединения–ингибитора LATS), как правило, не экспрессируют маркеры, обычно экспрессируемые LSC. В отличие от этого, клетки, культивируемые в присутствии ингибиторов LATS, экспрессируют маркеры, обычно экспрессируемые LSC.

Пример B8. Дифференцировка лимбальных стволовых клеток человека в эпителиальные клетки роговицы

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 48–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15, дополненную соединениями–ингибиторами

LATS из примеров №№ 49, 47, 12 или 261 в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2 в течение 8–10 дней.

Затем проводили анализ для определения того, сохранила ли популяция p63–альфа–положительных LSC, увеличившихся в присутствии ингибиторов LATS, способность дифференцироваться в кератин–12–положительные эпителиальные клетки роговицы, что необходимо для восстановления прозрачности роговицы у пациентов, которым производят трансплантацию LSC.

Для способствования дифференцировке LSC в эпителиальные клетки роговицы культуральную среду заменяли на DMEM (Invitrogen) без сыворотки крови или ингибиторов LATS, и клетки культивировали в течение 4–8 дней. Для изучения дифференцировки LSC в эпителиальные клетки роговицы культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4°C. В качестве первичных антител использовали антитела к p63α (Cell Signaling Technology) и цитокератину 12 (Abcam). Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 647 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем образцы изучали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Результаты указывали на то, что культуры, которые поддерживались в присутствии ингибиторов LATS и в которых затем индуцировали дифференцировку, содержали зоны, где скопления p63–альфа–положительных клеток прилегали к скоплениям клеток, которые являются p63–альфа–отрицательными, но кератин–12–положительными (фигура 5). Следовательно, лимбальные клетки, количество которых увеличивается в присутствии ингибиторов LATS, могут дифференцироваться в кератин–12–положительные клетки при соответствующих условиях.

Пример B9. Доставка препарата LSC в биоматрице в глаза кролика

Кроличья модель дефицита лимбальных стволовых клеток

В правом глазу кроликов NZA создавали односторонний дефицит лимбальных стволовых клеток (LSCD) путем удаления эпителиальных клеток и абляции лимбальных стволовых клеток (LSC) с помощью ватманской бумаги, пропитанной 1M раствором гидроксида натрия. Лимбальную часть конъюнктивы обрабатывали митомицином C для снижения неоваскуляризации роговицы. Левый глаз оставляли нетронутым. Популяцию клеток, увеличившуюся в присутствии соединения–ингибитора LATS из примера № 12, доставляли согласно описанному ниже. После доставки клеток кролики получали обезболивающее лечение (трамадол – 10 мг/кг PO BID в первые 2 недели, мелоксикам – 0,3 мг/кг PO SID в первые 2 недели или до тех пор, пока у животного наблюдались признаки дискомфорта в глазах), противовоспалительное лечение (Ancef® (цефазолин) –

50 мг в субтеноновое пространство сразу после процедуры, офтальмологический раствор Tobrex® – TID в течение 1–й недели, а затем BID, ампициллин – 80 мг/кг/день (40 мг BID) SQ в течение первой недели) и иммуносупрессивное лечение (циклоспорин А (0,5%) местно в глаз TID в течение 1–й недели, а затем BID, Gentocin®–durafilm® (гентамицина сульфат и бетаметазон, MERCK) местно в глаз TID в течение 1–й недели, а затем BID, циклоспорин А (5 мг/кг/день) SQ в течение 1–й недели, а затем ½ дозы).

Получение биоматрицы

Метакрилированный желатин (GelMA) синтезировали в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Nichol, J. W. et al. Cell–laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. Biomaterials 31, 5536–5544, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010)). Вкратце, 20 г желатина свиного происхождения (номер по каталогу G2500, Sigma) растворяли в течение ночи при 50°C в 200 мл PBS без кальция и магния (DPBS, номер по каталогу 21–031, Corning). При сильном взбалтывании в раствор желатина по каплям (примерно 1 мл/мин) добавляли метакриловый ангидрид (номер по каталогу 276685, Sigma) до достижения концентрации 8% (об./об.). Смесь помешивали при 60°C на масляной бане в течение 3 часов перед добавлением 200 мл DPBS и затем тщательно перемешивали в течение еще 15 минут. Разбавленную смесь очищали путем диализа против воды Milli–Q с использованием диализных трубок (MWCO 15 кДа, Spetra/Por) в течение 1 недели при 45°C для удаления метакриловой кислоты. Очищенные образцы лиофилизировали и хранили при –80°C до дальнейшего использования.

Для получения 15% исходного раствора GelMA 1,5 грамма высушенной сублимацией пены GelMA растворяли в 10 мл предварительно нагретого DPBS при 37°C. После полного растворения пены GelMA вводили фотоинициатор путем добавления в раствор GelMA 15 мг фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфината лития (LAP). К раствору добавляли 500 микролитров 1 н. NaOH (номер по каталогу BDH–7222–1, VWR) для доведения pH до нейтрального перед фильтрацией раствора с помощью стерильных мембран с размером пор 0,22 микрометра (Millipore). Конечный фильтрат разделяли на аликвоты по 500 микролитров и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Трансплантация LSC in vivo

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 6–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 12 в концентрации 10 микромоль/л. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2 в течение двух пассажей (двух недель).

Суспензии клеток для трансплантации получали в соответствии с нижеследующим. Клетки отделяли от культуральной чашки с помощью Accutase в течение 10 минут при 37°C. Затем клетки прополаскивали путем центрифугирования и ресуспендировали в 16 микролитрах среды X–VIVO 15 без ингибиторов LATS.

5% раствор GelMA получали путем смешивания 16 микролитров суспензии LSC или контрольного солевого раствора с 8 микролитрами 15% исходного раствора GelMA и последующего добавления всей смеси к терапевтической контактной линзе (лотрафилкон

B, Alcon) на поддерживающем предметном стекле. Конечный раствор содержал 300000 клеток и 5% GelMA. Мощность LED–источника UV–света (365 нм, Hamamatsu) доводили до 15% с показанием интенсивности UV–излучения 30 мВт/см2. Кратковременное воздействие UVA–света в течение 25 секунд использовали для процесса фотополимеризации для биопечати LSC человека на внутренней поверхности контактной линзы. После процесса полимеризации контактную линзу, заполненную LSC, накладывали на рассеченный глаз кролика ex vivo или на глаз кролика in vivo.

Для экспериментов, в которых контактную линзу, покрытую LSC, накладывали ex vivo, образцы изучали под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss в течение двух часов.

Для экспериментов in vivo контактную линзу, покрытую LSC, накладывали на правый глаз кролика в модели LSCD, описанной выше, и проводили тарзорафию для удерживания контактной линзы на поверхности глаза в течение 1 недели. Через одну неделю контактную линзу удаляли, и кроликов оставляли в живых еще на 4 недели.

Кроликов умерщвляли через пять недель после доставки клеток, роговицы иссекали и фиксировали в 4% PFA. Образцы заливали в парафин и нарезали на срезы. Иммуногистохимическое исследование проводили для выявления присутствия кератина–12, маркера эпителиальных клеток роговицы, и кератина–19, маркера клеток конъюнктивы. Первичные антитела к кератину 12 и 19 были получены от Abcam. Для подтверждения человеческого происхождения клеток использовали человеческий митохондриальный белок. Первичное антитело к человеческому митохондриальному белку было получено от Novus. Затем образцы окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с HRP (ThermoFisher), и изучали под микроскопом Zeiss.

Результаты указывали на то, что LSC, прикрепленные к контактной линзе посредством полимеризации GelMA, могут быть доставлены на поверхность глаза кролика ex vivo (фигура 6).

На фигуре 7 показано, что в кроличьей модели дефицита лимбальных стволовых клеток популяция LSC, размножающаяся в присутствии ингибитора LATS (примера соединения 12), прикрепленная к контактной линзе посредством полимеризации GelMA и доставляемая in vivo на поверхность роговицы кролика, приводит к регенерации кератин–12–положительного эпителия роговицы и предотвращает конъюнктивализацию кератин–19–положительными клетками конъюнктивы в подвергнутом трансплантации глазу (фигуры 7A и B соответственно). В отличие от этого глаза кролика, не подвергнутые трансплантации, демонстрировали отсутствие восстановления кератин–12–положительного эпителия роговицы. Вместо этого наблюдались признаки конъюнктивализации, что показано по наличию окрашивания кератина–19 (фигуры 7C и D соответственно).

На фигуре 8 показано, что клетки, которые восстанавливали эпителий роговицы в глазах, подвергнутых трансплантации, были человеческими, что продемонстрировано по присутствию человеческого митохондриального белка (фигура 8A). В отличие от этого, глазная поверхность глаз, не подвергнутых трансплантации, не демонстрировала

окрашивания человеческого митохондриального белка (фигура 8B).

Пример B10. Доставка LSC ex vivo с помощью TISSEEL

Для получения рабочего раствора TISSEEL (Baxter, номер по каталогу NDC 0944–4301–02) следовали инструкциям производителя для восстановления поставляемых ингредиентов. Дальнейшее разбавление восстановленного раствора фибриногена может быть произведено путем добавления стерильной воды для достижения желаемой концентрации фибриногена. Рабочий раствор тромбина разбавляли в 500 раз фосфатно–солевым буфером Дульбекко (DPBS, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с получением раствора 1 ед/мл.

Доставка LSC на поверхность культуры in vitro

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 6–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 12 в концентрации 10 микромоль/л. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение двух пассажей (двух недель).

Суспензии клеток для трансплантации получали в соответствии с нижеследующим. Клетки отделяли от культуральной чашки с помощью Accutase в течение 10 минут при 37°C. Затем клетки прополаскивали путем центрифугирования и ресуспендировали в рабочем растворе тромбина, упомянутом выше, и конечные значения плотности клеток доводили путем серийного разведения до уровня от 0,1 миллионов на мл до 30 миллионов на мл.

Сразу после смешивания суспензии клеток с раствором фибриногена 10 мкл смеси высевали в центр покрытого коллагеном 24–луночного планшета и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут для отверждения фибрина. После пополнения каждой лунки средой X–VIVO 15 без ингибиторов LATS во всех образцах в течение 2 недель отслеживали распад фибрина и репопуляции клеток. Результаты (фигура 9) позволяют предположить, что TISSEEL успешно использовался для доставки LSC, и в образцах с изначально доставленными 100000 и 300000 LSC площадь культуры, аналогичная по размеру человеческой роговице, может быть покрыта в течение периода от 1 недели до 2 недель.

Доставка LSC в человеческую роговицу ex vivo

Клетки, полученные согласно описанному в примере B1, высевали в 6–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 12 в концентрации 10 микромоль/л. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2 в течение двух пассажей (двух недель). За один день до эксперимента по доставке клетки метили красителем CellTracker CMFDA зеленым (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя.

Суспензии клеток для трансплантации получали в соответствии с нижеследующим. Клетки отделяли от культуральной чашки с помощью Accutase в течение 10 минут при 37°C. Затем клетки прополаскивали путем центрифугирования и ресуспендировали в рабочем растворе тромбина, упомянутом выше, до достижения конечной плотности

клеток 30 миллионов на мл.

Сразу после смешивания суспензии клеток с раствором фибриногена 10 мкл смеси высевали в центр человеческой роговицы и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут для отверждения фибрина. Контактную линзу LotraB (Air Optix Night and Day, Alcon) использовали для покрытия конструкции на основе LSC и фибрина на человеческой роговице для имитации реальной клинической процедуры. Флуоресцентные изображения получали с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Nikon. Данные (фигура 10) продемонстрировали, что TISSEEL успешно использовался для доставки большого количества LSC на поверхность роговицы ex vivo, и конструкция на основе LSC и фибрина, по–видимому, устойчиво переносит дальнейшие манипуляции, такие как наложение защитной контактной линзы.

Пример B11. Доставка нескольких популяций клеток на поверхность глаза посредством биопечати с образованием установленных картин расположения

Индивидуально разработанный биопринтер был изготовлен на основе технологии DOPsL, опубликованной в Advanced Materials (2015, DOI: 10.1002/adma.201202024).

Суспензии клеток для биопечати получали в соответствии с нижеследующим. Клетки HEK–293 перед сбором предварительно метили красителем CellTracker CMFDA зеленым или красителем CMTPX красным (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). 25 мкл суспензии клеток смешивали с 25 мкл 15% исходного раствора GelMA до достижения конечной плотности клеток 200 миллионов клеток/мл.

Глазные яблоки кролика помещали на чашку Петри, заполненную 1% легкоплавкой агарозой, и эпителий аккуратно удаляли хирургическим скальпелем непосредственно перед процессом биопечати. Затем смесь клеток с GelMA наносили на роговицу с помощью уплотнительного кольца из полидиметилсилоксана (PDMS) (Specialty Silicone Products, Inc., Боллстон–Спа, Нью–Йорк), помещенного на лимб роговицы для предотвращения стекания смеси клеток с GelMA с криволинейной поверхности глаза.

Индивидуально настроенную картину освещения (т. е. половину рисунка Инь–Ян) проецировали на смесь клеток (окрашенных зеленым) с GelMA на глазу кролика в течение 4 секунд перед смыванием неполимеризовавшейся смеси. Другую картину освещения (т. е. другую половину рисунка Инь–Ян) проецировали на образец в течение 4 секунд после нанесения новой смеси клеток (окрашенных красным) с GelMA на ту же роговицу кролика. Перед визуализацией проводили несколько процедур прополаскивания раствором PBS. См. фигуру 11.

Пример B12. Снижение иммунного отторжения с помощью CRISPR/Cas9–опосредованной делеции гена бета–2–микроглобулина в LSC

В приведенном ниже примере экспрессия HLA I класса устранялась с поверхности LSC путем CRISPR–опосредованной делеции гена бета–2–микроглобулина.

Трансфекция клеток. LSC, полученные согласно описанному в примере B1, культивировали в среде X–VIVO 15, дополненной соединением–ингибитором LATS из

примера № 48a, до 50–60% конфлюэнтности в чашке Петри диаметром 35 мм через восемь дней после выделения LSC. LSC трансфицировали смесью tracrRNA–crRNA–мРНК Cas9. Для получения смеси для чашки Петри диаметром 35 мм 12,5 микролитров 10 микромоль/л tracrRNA (Dharmacon, номер по каталогу U–002000–20), 12,5 микролитров 10 микромоль/л crRNA, нацеливающейся на B2M человека (Dharmacon, номер по каталогу CR–004366–01), 50 микролитров 0,1 микрограмма/микролитр мРНК Cas9 (Dharmacon, номер по каталогу CAS11195) и 15 микролитров реагента для трансфекции DharmaFECT Duo (Dharmacon, номер по каталогу T–2010–02) объединяли и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Смесь добавляли по каплям в культуральную чашку в 2,5 мл среды (X–VIVO 15, дополненной соединением–ингибитором LATS из примера 48a) (без антибиотиков). Для снижения цитотоксичности мРНК в среду добавляли 0,2 микрограмма/мл B18R (eBioscience, номер по каталогу 34–8185–81). Реагент для трансфекции в отдельности представляет отрицательный контроль трансфекции.

Спустя 6 ч. инкубирования в 5% CO_2 при 37°C среду заменяли свежей средой X–VIVO 15, дополненной соединением–ингибитором LATS из примера 48a (без антибиотиков), содержащей соединение и B18R. Через 72 ч. в инкубаторе с 5% CO2 клетки пассируют с разведением 1:2 и размножают в течение еще 72 ч. в среде LSC (без антибиотиков), содержащей соединение и B18R, в чашках Петри, покрытых Synthemax, чтобы получить больше клеток для FACS–сортировки.

Анализ методом FACS. LSC обрабатывали с помощью Accutase (ThermoFisher, номер по каталогу A1110501) в течение 20 минут в 5% CO2 при 37°C. После соскребания клеток реакцию останавливали путем использования среды для культивирования клеток, содержащей 10% сыворотку крови, и материал переносили в пробирку Falcon для стадии центрифугирования (1000 об/мин, 5 минут). После аспирации среды клетки ресуспендировали в 200 микролитрах буфера для FACS (PBS/10% FBS).

Для анализа экспрессии B2M и HLA–ABC 5 микролитров конъюгированного с APC антитела мыши к β2–микроглобулину человека (Biolegend, номер по каталогу 316312) и 20 микролитров конъюгированного с PE антитела мыши к HLA–ABC человека (BD Bioscience, номер по каталогу 560168) добавляли к суспензии клеток и инкубировали в течение 30 минут на льду. После мечения антителами клетки промывали 3 раза буфером для FACS и ресуспендировали в 500 микролитрах буфера для FACS. Перед FACS–сортировкой клетки фильтровали через фильтр с размером пор 70 микрометров и хранили на льду до сортировки.

Чтобы предотвратить прилипание клеток к стенке, пробирки для сбора образцов перед сортировкой заполняли сывороткой крови на 30 минут. Клетки сортировали на приборе BD FACSAria II в подготовленные пробирки для сбора образцов, используя обогащенную человеческой сывороткой крови среду для LSC, содержащую соединение и B18R. Данные FACS анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

Результаты, представленные на фигуре 12, показывают, что CRISPR–

опосредованная делеция B2M и последующее устранение HLA A, B и C происходили в 21 проценте LSC. Поскольку среда X–VIVO 15, дополненная соединением–ингибитором LATS из примера 48a, обеспечивает эффективное увеличение количества LSC, 21–процентную B2M–отрицательную/HLA A, B, C–отрицательную популяцию LSC можно, таким образом, размножить с получением клеточного препарата, где 97% клеток не экспрессируют факторы иммунного отторжения, относящиеся к HLA I класса (фигура 13).

Пример B13. Оценочное исследование остаточных соединений

Получение калибровочной кривой

Была получена серия разведений исходных стандартных растворов в концентрациях 100 микромоль/л, 10 микромоль/л, 1 микромоль/л, 500 нМ, 100 нМ и 0 микромоль/л. Исходный раствор соединения из примера № 48a (10 мМ в DMSO) добавляли в смесь 50% ацетонитрила и 50% воды с получением добавляемых стандартных растворов. Добавляемые стандартные растворы использовали для добавки в образцы чистой среды. 10 микролитров добавляемого стандартного раствора добавляли к 90 микролитрам среды с получением сред с добавками стандартного раствора. Для получения калибровочной кривой соединение из примера № 48a использовали среды со стандартным раствором в концентрации 10000 нМ, 1000 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ и 0 нМ.

50 микролитров каждого образца среды обрабатывали 400 микролитрами экстракционного раствора. Экстракционный раствор состоит из смеси ацетонитрил/метанол (3:1). Образцы из калибровочной кривой экстрагировали с использованием тех же объемов и условий, что и образцы неизвестных сред. Экстрагированные образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования 200 микролитров надосадочной жидкости из каждого образца переносили в чистый 96–луночный планшет. Экстрагированные образцы анализировали с помощью LC–MS высокого разрешения. Для построения калибровочной кривой и расчета значений концентрации использовали программное обеспечение Thermo Xcalibur и Quan Browser. Для расчета концентрации соединение из примера № 48a в образцах культуральных сред использовали способ внешней калибровки.

Анализ методом LC–MS

Хроматографию высокого разрешения проводили с использованием системы Thermo UltiMate для UPLC и колонки Kinetex C18 RP 2,1 × 50 мм (частицы размером 2,6 микрона). Подвижные фазы состояли из 5 мМ ацетата аммония в H2O в случае с буфером A и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле в случае с буфером B. Для обращенно–фазовой хроматографии использовали стандартный бинарный линейный градиент. Для этого исследования использовали масс–спектрометр Thermo Q Exactive. Эффлюент из системы для UPLC направляли в масс–спектрометр Q Exactive, который был оборудован ESI–источником ионов. Масс–спектрометр был запрограммирован для работы в режиме полного сканирования с

высоким разрешением и в режиме MS2.

Тест–система

Подготовка клеток для отмывания LSC: эксперимент по отмыванию проводили в трех повторностях, где каждый образец содержал 0,5 миллиона клеток. Все образцы (только среда, среда с клетками, дополненная соединением из примера № 48a, и клетки в среде, дополненной примером соединения № 48a) культивировали в инкубаторе при 37 градусах в течение всего эксперимента. Средой, используемой для эксперимента, была X–VIVO 15.

Клетки культивировали до пассажа 2 в среде X–VIVO 15, дополненной 3 микромолями/л соединением из примера № 48a. Когда культура достигала 70% конфлюэнтности, среду удаляли путем аспирации и заменяли свежей средой, дополненной 3 микромоль/л соединения из примера № 48a; клетки культивировали в течение еще шести дней. На седьмой день получали следующие образцы:

1. 2 мл "чистой" среды (не дополненной соединением)

2. 2 мл среды, культивируемой в присутствии соединения (до промывания)

3. 2 мл среды для каждого из промываемых образцов 1–10

4. Клеточные осадки (после промывания)

Забор клеток производили, используя клеточный скребок (Costar, номер по каталогу 3008).

Образцы среды и клеточных осадков анализировали и количественно оценивали с помощью LC–MS высокого разрешения.

Производили забор клеточных осадков и надосадочной жидкости для оценки остаточных уровней соединения из примера № 48a. Количество соединение из примера № 48a определяли с помощью LC–MS. Оценки концентраций соединения из примера № 48a в среде до промывания, среде для промывания (таблица 4) и клеточном осадке обобщены (таблица 5). Образцы среды до промывания имеют наивысшие уровни соединения из примера № 48a (примерно в диапазоне от 9830 нМ до 10837 нМ). Осадок после промывания имеет низкие, но выявляемые уровни соединения из примера № 48a (наномолярные).

Таблица 4. Оценка концентраций соединения из примера № 48a в среде до промывания и среде для промывания

Образец	**Объем (мл)**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 1 из трех повторностей**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 2 из трех повторностей**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 3 из трех повторностей**
Среда до промывания	**2**	**9829,547**	**10374,463**	**10837,706**
Среда для промывания 1	**2**	**461,271**	**401,058**	**354,547**

Среда для промывания 2	**2**	**31,933**	**38,721**	**18,400**
Среда для промывания 3	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 4	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 5	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 6	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 7	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 8	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 9	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 10	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**

BLQ=ниже предела количественного определения

Таблица 5. Оценка концентраций **соединения из примера № 48a** в клеточном осадке

Образец	**Соединение из примера № 48a (нМ)**	**Соединение из примера № 48a (пг/клетка)**	**Среднее количество соединения из примера № 48a (пг/клетка)**	**Количество клеток в осадке**	**Общее количество соединения из примера № 48a (пг)**
Осадок после промывания 1	**20,342**	**0,00068**	**0,00068**	**$0,5 \times 10^6$**	**340**
Осадок после промывания 2	**19,908**	**0,00066**			
Осадок после промывания 3	**20,787**	**0,00069**			

Количество соединения из примера № 48a в среде до промывания после инкубирования в трех повторностях находится в диапазоне 9830–10838 нМ. Концентрация соединения из примера № 48a в клеточном осадке после промывания находилась в диапазоне 19,9–20,8 нМ.

Остаточное количество других соединений из примеров после отмывания

Для соединений из примеров № 12, 261 и 5 остаточные количества в увеличившихся LSC измеряли с помощью того же способа, что и для соединения из примера № 48a.

Таблица 6. Оценка концентраций примера соединения 12 в клеточном осадке

Образец	Соединение из прим. 12 (нМ)	Соединение из прим. 12 (пг/клетка)	Среднее количество примера соединения 12 (пг/клетка)	Количество клеток в осадке	Общее количество примера соединения 12 (пг/клетка)
Осадок после промывания 1	**7,370**	**0,000136**	**0,000178**	**1×10^6**	**178**
Осадок после промывания 2	**14,443**	**0,000264**			
Осадок после промывания 3	**7,319**	**0,000134**			

Таблица 7. Оценка концентраций соединения из примера № 261 в клеточном осадке

Образец	Соединение из примера № 261 (нМ)	Соединение из примера № 261 (пг/клетка)	Среднее количество соединения из примера № 261 (пг/клетка)	Количество клеток в осадке	Общее количество соединения из примера № 261 (пг)
Осадок после промывания 1	**0,315**	**0,0000043**	**0,000083**	**1×10^6**	**83**
Осадок после промывания 2	**6,941**	**0,000095**			
Осадок после промывания 3	**11,008**	**0,00015**			

Таблица 8. Оценка концентраций соединения из примера № 5 в клеточном осадке

Образец	Соединение из примера № 5 (нМ)	Соединение из примера № 5 (пг/клетка)	Среднее количество соединения из примера № 5 (пг/клетка)	Количество клеток в осадке	Общее количество соединения из примера № 5 (пг)
Осадок после промывания	**21,733**	**0,00061**	**0,00083**	**$0,5 \times 10^6$**	**415**

1					
Осадок после промывания 2	**13,454**	**0,00038**			
Осадок после промывания 3	**46,529**	**0,0015**			

Пример C1. Выделение эндотелиальных клеток роговицы человека

Человеческие трупные роговицы с имеющимся согласием на исследование были получены из глазных банков. Слой эндотелиальных клеток роговицы (CEC) и десцеметову оболочку (DM) надрезали с помощью обратного крючка по Сински хирургического класса. Слой эндотелиальных клеток с DM аккуратно отсоединяли от стромы роговицы, и обеспечивали диссоциацию клеток от DM с помощью 1 мг/мл коллагеназы при 37^0 C, пока отделение клеток не становилось видимым при наблюдении под микроскопом (в течение от 45 минут до 3 часов). Клетки, полученные таким образом, использовали в примерах C1–C17, описанных ниже.

Пример C2. Воздействие на клетки ингибиторов LATS и измерение внутриклеточного распределения YAP

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, высевали в 24–луночные планшеты со стеклянным дном и черными стенками в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду (бессывороточную) для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или примера № 49 в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали в этих условиях в течение 24 часов при 37^0 C и 5% CO2.

Для измерения эффекта ингибиторов LATS в отношении их нижележащей мишени YAP анализировали внутриклеточное распределение YAP путем иммуногистохимического исследования. Культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4^0 C. В качестве первичного антитела использовали антитело к YAP от Santa Cruz Biotechnology. Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. В отрицательном контроле первичное антитело не использовалось (данные не показаны). Флуоресценцию наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Иммуноокрашивание YAP является более сильным в CEC, подвергнутых воздействию среды для пролиферации клеток с соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или примера 49, на что указывает иммунофлуоресцентное окрашивание YAP, показанное на фигуре 14. Таким образом, эти соединения оказывали эффект в

отношении внутриклеточной локализации нижележащей мишени YAP.

Пример C3. Воздействие на клетки ингибиторов LATS и измерение фосфорилирования YAP

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, отделяли от культуральной чашки с помощью 1 мг/мл коллагеназы в течение 15 минут при 37^0 C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и высевали в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови) в 6–луночные планшеты (Corning) и культивировали в течение 2–4 дней. Среду затем заменяли свежей средой для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–средой для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови), дополненной соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или примера № 49 (разбавленными в DMSO) в концентрации 10 микромоль/л или DMSO в отдельности без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали в этих условиях в течение 1 часа при 37^0 C и 5% CO2.

Клеточные осадки получали путем диссоциации трипсином и центрифугирования и промывали с помощью PBS. Осадки лизировали с помощью 30 микромоль/л лизирующего буфера для RIPA, содержащего коктейль ингибиторов протеаз (Life Technologies), в течение 30 минут с вихревым перемешиванием каждые 10 минут. Клеточный дебрис затем осаждали при 4^0 C в течение 15 минут при 14000 об/мин, и производили забор белкового лизата. Концентрацию белка определяли количественно с помощью набора Micro BCA (Pierce). Пятнадцать (15) микрограммов общего белка загружали в каждую лунку с 4–20% гелями TGX (BioRad), и проводили вестерн–блоттинг в соответствии с инструкциями производителя. Мембраны зондировали с помощью антитела к фосфо–YAP (ser127) (CST, 1:500) или общему YAP (Abnova, 1:500), и в качестве контроля нагрузки использовали мечение актина (Abcam). Мембраны окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с HRP, прополаскивали и визуализировали с помощью системы ChemiDoc (Biorad) в соответствии с инструкциями производителя.

Вестерн–блот–анализ показал, что как соединение из примера № 133, так и соединение из примера № 49 вызывали снижение уровней фосфорилирования YAP в CEC человека. Заметная разница наблюдалась спустя час после обработки соединением из примера № 133 и примера № 49 в CEC человека, как показывает вестерн–блоттинг на фигуре 15a. На фигуре 15b графически представлены уровни фосфорилированного YAP, нормализованные относительно бета–актина, а на фигуре 15c показаны уровни фосфорилированного YAP, нормализованные относительно общего YAP.

Эти результаты позволяют предположить, что соединения–ингибиторы LATS из примера № 133 и примера № 49 могут активировать передачу сигналов, опосредованную YAP, в CEC человека.

Пример C4. Увеличение популяции эндотелиальных клеток роговицы

человека и измерение плотности клеток

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, отделяли от культуральной чашки с помощью 100 микролитров Accutase (ThermoFisher) в течение 10 минут при 37^0 C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и высевали в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови) в 6–луночные планшеты (Corning), дополненную соединением–ингибитором LATS (разбавленными в DMSO) из примера № 133 или примера № 49 в концентрации 10 микромоль/л или DMSO в отдельности без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO2.

Для измерения пролиферации клеток использовали аппарат IncuCyte, следуя инструкциям производителя (Essen Biosciences), для проведения количественного анализа конфлюэнтности живых клеток в реальном времени каждые 3 часа в течение 10 дней.

На фигуре 16 показано процентное значение конфлюэнтности популяции клеток с течением времени после воздействия ингибитора LATS или DMSO в отдельности. Хотя CEC человека обычно не являются пролиферирующими, результаты показывают, что соединения–ингибиторы LATS как из примера № 133, так и из примера № 49 могут активировать пролиферацию в этих клетках.

Пример C5. Увеличение популяции эндотелиальных клеток роговицы человека и измерение плотности клеток

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, высевали в 48–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15, дополненную ингибиторами LATS, перечисленными в таблицах 9 и 10 (разбавленными в DMSO), в концентрации 10 микромоль/л или DMSO в отдельности без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37^0 C и 5% CO2.

Для каждого соединения были получены два набора культур. Первый набор культур фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут при комнатной температуре после того, как клетки, выделенные из роговицы, прикреплялись к чашке для культивирования клеток (обычно через 24 ч. после посева клеток). Второй набор культур фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут при комнатной температуре через 10 дней после первого.

Для измерения плотности клеток во всех фиксированных культурах подсчитывали количество ядер, окрашенных Sytox оранжевым (ThermoFisher), на единицу площади поверхности в соответствии с нижеследующим: фиксированные клеточные культуры пермеабилизировали в растворе 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich). Клетки затем метили с помощью 0,5 микромоля/л раствора Sytox оранжевого в PBS в течение 5 минут при комнатной температуре. Ядра подсчитывали под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss. Затем определяли коэффициент увеличения путем расчета соотношения увеличившейся популяции клеток и популяции высеянных клеток.

Увеличение популяции клеток, достигаемое с помощью тестируемых соединений, показано в таблицах 9 и 10 ниже.

Таблица 9. Кратность увеличения клеток

Соединение из примера №	Коэффициент увеличения	Соединение из примера №	Коэффициент увеличения
Пример 12	521	Пример 133	273
Пример 261	461	Пример 287	237
Пример 47	449	Пример 290	221
Пример 48a	446	Пример 65	203
Пример 49	426	Пример 17	187
Пример 5	408	Пример 139	107
Пример 62	402	Пример 289	84
Пример 6	391	Пример 11	79
Пример 14	337	Пример 48b	21
Пример 288	302	Пример 33	12
Пример 66	280	DMSO	7

Таблица 10. Плотность эндотелиальных клеток in vitro (клетки/мм^2 площади)

Соединение из примера номер	Плотность клеток: клетки/мм^2	Соединение из примера номер	Плотность клеток: клетки/мм^2
Пример 12	4226	Пример 133	2028
Пример 261	4308	Пример 287	1893
Пример 47	4294	Пример 290	2071
Пример 48a	4021	Пример 65	1702
Пример 49	3873	Пример 17	1628
Пример 5	3911	Пример 139	1179
Пример 62	3301	Пример 289	1421
Пример 6	3378	Пример 11	1121
Пример 14	3271	Пример 48b	869
Пример 288	2779	Пример 33	25
Пример 66	2503	DMSO	13

Пример C6. Нокдаун LATS1 и LATS2, опосредованный siRNA, в эндотелиальных клетках роговицы человека

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, высевали в 24–луночные планшеты (Corning) в среду X–VIVO 15 (Lonza). Клетки культивировали при 37^0 C и 5% CO2. Производили нокдаун LATS1 и LATS2 путем трансфекции (липофекции с использованием RNAiMax, ThermoFisher). Клетки в каждой лунке планшета для культивирования клеток трансфицировали с помощью 0,5 микрограмма пулов 4 siRNA, нацеливающихся на каждый ген. siRNA, используемые в данном исследовании, представляли собой siRNA SI00067172 для LATS1 и siRNA SI00106925 для LATS2 от Qiagen. Скремблированные siRNA использовали в качестве отрицательных контролей в соответствии с протоколом производителя (Qiagen).

Для измерения пролиферации клеток проводили окрашивание с помощью EdU через 48 часов после трансфекции с помощью siRNA для LATS1 и LATS2 или контрольных скремблированных siRNA в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies). Ядра клеток метили Sytox оранжевым. Флуоресценцию EdU и Sytox оранжевого наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 в целях

измерения процентной доли EdU–положительных ядер клеток.

На фигуре 17 показано, что процентная доля EdU–положительных CEC увеличивалась при нокдауне LATS1 и LATS2, что демонстрирует, что нокдаун LATS приводит к пролиферации CEC.

Пример C7. Увеличение популяции эндотелиальных клеток роговицы человека и иммуногистохимическое изучение морфологических характеристик клеток

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, высевали в 24–луночные планшеты (Corning) в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 49 (разбавленным в DMSO) в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37^0 C и 5% CO2 в течение 10 дней.

Для изучения того, имеет ли увеличившаяся популяция клеток морфологические характеристики клеток, необходимые для применения in vivo, измеряли способность клеток образовывать плотные контакты путем иммуногистохимического исследования в соответствии с нижеследующим. Культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичным антителом в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4^0 C. В качестве первичного антитела использовали антитело к ZO–1 от Invitrogen. Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки трижды промывали в PBS, и ядра (ДНК) окрашивали Sytox оранжевым (567 нм, Life Technologies). В отрицательном контроле первичное антитело не использовалось (данные не показаны). Флуоресценцию наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

CEC, пролиферирующие в присутствии среды и контрольного DMSO, демонстрируют признаки полимегатизма, характерного для дисфункциональных CEC (фигура 18A). CEC, подвергнутые воздействию среды для пролиферации клеток с примером № 49 ингибитора LATS, сохранили нормальные морфологические характеристики эндотелиальных клеток роговицы и способность образовывать плотные контакты, на что указывает иммунофлуоресцентное окрашивание маркера плотных контактов Zonula Occludens–1 (ZO–1), как показано на фигуре 18B. Как нормальные морфологические характеристики эндотелиальных клеток роговицы, так и способность образовывать плотные контакты имеют решающее значение для поддержания функций эндотелия роговицы.

Пример C8. Увеличение популяции эндотелиальных клеток роговицы человека и измерение уровней маркеров коллагена 8a2, AQP1, SLC4A11, RPE65, CD31 и Na/K–ATPазы

Чтобы убедиться, что увеличившаяся популяция клеток экспрессирует гены, обычно экспрессируемые эндотелиальными клетками роговицы in vivo, клетки культивировали, и затем проводили анализ методом ОТ–ПЦР для измерения уровней экспрессии коллагена 8a2, AQP1, SLC4A11, RPE65 и CD31. Также проводили иммуногистохимический анализ для анализа уровней Na/K–АТРазы и коллагена 8a2 в соответствии с нижеследующим.

Клетки, полученные согласно описанному в примере С1, высевали в 24–луночные планшеты (Corning) в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови), дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 49 (разбавленным в DMSO) в концентрации 10 микромоль/л или дополненную DMSO без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37^0 С и 5% CO2 в течение 10 дней. Для отрицательного контроля дермальные фибробласты (Lonza) культивировали в DMEM–F12 (LifeTechnologies) без ингибиторов LATS.

Для проведения анализа методом ОТ–ПЦР общую РНК экстрагировали с помощью Trizol (Invitrogen), RNeasy Mini и QIAshredder (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Качество и количество РНК измеряли с помощью Nanodrop 100 (Thermo–Fisher Scientific) и Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). кДНК получали путем обратной транскрипции, и относительную экспрессию мРНК оценивали посредством количественной ОТ–ПЦР с использованием системы 7900HT (Applied Biosystems). Использовали следующие параметры циклов:

1) 50^0 С в течение 2 минут; 2) 95^0 С в течение 10 минут; 3) 95^0 С в течение 15 секунд; 4) 60^0 С в течение 1 минуты. Стадии 3–4 повторяли 40 раз.

Уровни мРНК актина измеряли и использовали в качестве эндогенного контроля для нормализации уровней экспрессии гена и расчета значений дельта–Ct в соответствии с формулой dCt=Ct для гена, представляющего интерес – Ct для эндогенного контроля. Праймеры получали от Applied Biosystems.

Анализ методом ОТ–ПЦР, показанный на фигуре 19, указывает на то, что популяция эндотелиальных клеток роговицы, увеличившаяся в присутствии соединения–ингибитора LATS из примера № 49, экспрессирует гены, обычно экспрессируемые эндотелиальными клетками роговицы in vivo, в том числе гены коллагена 8a2, AQP1, SLC4A11. Клетки не экспрессируют маркеры других типов эпителия, присутствующих в глазу, в том числе RPE65 (маркер пигментного эпителия сетчатки) и CD31 (маркер эпителия сосудов).

Для проверки экспрессии Na/K–АТРазы и коллагена 8a2 путем иммуногистохимического исследования культуры клеток фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут, пермеабилизировали и блокировали в блокирующем растворе, содержащем 0,3% Triton X–100 (Sigma–Aldrich) и 3% сыворотку крови осла в PBS, в течение 30 минут. Затем клетки метили первичными антителами в блокирующем растворе в течение 12 часов при 4^0 С. В качестве первичных антител использовали антитела к

Na/K–ATPазе и коллагену 8a2 (Santa Cruz Biotechnology). Образцы трижды промывали в PBS, и вырабатываемое в организме осла вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 488 или 647 (Molecular Probes), в разведении 1:500 применяли в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки трижды промывали в PBS, и ядра (ДНК) окрашивали Sytox оранжевым (567 нм, Life Technologies). В отрицательных контролях не использовалось первичное антитело или использовалось антитело изотипического контроля (данные не показаны). Флуоресценцию наблюдали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Иммуногистохимический анализ, показанный на фигуре 20, указывает на то, что популяция эндотелиальных клеток роговицы, увеличившаяся в присутствии соединения–ингибитора LATS из примера № 49 , экспрессирует гены, обычно экспрессируемые эндотелиальными клетками роговицы in vivo, в том числе гены Na/K–ATPазы (фигура 20a) и коллагена 8a2 (фигура 20b).

Пример C9. Увеличение популяции эндотелиальных клеток роговицы человека и измерение уровней маркеров CD44, CD105, CD166 и CD73

Чтобы убедиться, что размножившаяся популяция клеток не подвергается эндотелиально–мезенхимальному переходу, CEC культивировали в соответствии с нижеследующим, а затем проводили анализ методом FACS для анализа уровней CD44, CD105, CD166 и CD73.

Для получения культур зрелых CEC клетки, полученные согласно описанному в примере C1, высевали в X–VIVO 15, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 48a (разбавленным в DMSO) в концентрации 3 микромоля/л. Клетки культивировали в 48–луночных планшетах (Corning) при 37^0 C и 5% CO2 в течение двух недель. Клетки пассировали дважды в течение этого времени, отделяя клетки с помощью 1 мг/мл коллагеназы в течение 15 минут при 37°C, прополаскивая суспензии клеток путем центрифугирования и высевая в свежую среду. Эти клетки затем выращивали в среде X–VIVO без ингибитора LATS в течение дополнительных 2 недель.

Для измерения уровней CD44, CD105, CD166 и CD73 посредством FACS CEC обрабатывали с помощью Accutase (ThermoFisher, номер по каталогу A1110501) в течение 20 минут в 5% CO2 при 37°C. Реакцию останавливали путем использования среды для культивирования клеток, содержащей 10% сыворотку крови, и материал переносили в пробирку Falcon для стадии центрифугирования (1000 об/мин, 5 минут). После аспирации среды клетки ресуспендировали в 200 микролитрах буфера для FACS (PBS/10% FBS).

Антитела к CD44, CD105, CD166 и CD73 (BD Biosciences) добавляли к суспензии клеток и инкубировали в течение 30 минут на льду. После мечения антителами клетки промывали 3 раза буфером для FACS и ресуспендировали в 500 микролитрах буфера для FACS. Перед FACS–сортировкой клетки фильтровали через фильтр с размером пор 70 микрометров и хранили на льду до сортировки. Клетки сортировали на приборе BD FACSAria II. Данные FACS анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

Анализ методом FACS, показанный на фигуре 21, указывает на то, что определенный с помощью FACS профиль экспрессии маркеров в популяции клеток, увеличившейся в присутствии ингибитора LATS, отличается от определенного с помощью FACS профиля экспрессии маркеров в клетках, которые подверглись эндотелиально–мезенхимальному переходу. В частности, клетки, культивируемые в присутствии ингибитора LATS, экспрессируют CD44, CD73, CD105 и CD166 на более низких уровнях по сравнению с клетками, выращиваемыми при отсутствии ингибитора LATS. Важно отметить, что CD73 является маркером эндотелиально–мезенхимального перехода, поэтому эти результаты указывают на то, что CEC, культивируемые в присутствии ингибиторов LATS, не подвергаются эндотелиально–мезенхимальному переходу.

Пример C10. Биопечать клеток: получение GelMA

Синтез GelMA

Метакрилированный желатин (GelMA) с примерно 100% метакрилированных остатков Lys синтезировали в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Nichol, JW et al. Biomaterials, **2010**, p.5536–5544). 20 г желатина свиного происхождения (номер по каталогу G2500, Sigma) растворяли в течение ночи при 50°C в 200 мл PBS без кальция и магния (DPBS, номер по каталогу 21–031, Corning). При сильном взбалтывании в раствор желатина по каплям (примерно 1 мл/мин) добавляли метакриловый ангидрид (номер по каталогу 276685, Sigma) до достижения концентрации 8% (об./об.). Смесь помешивали при 60°C на масляной бане в течение 3 часов перед добавлением 200 мл DPBS и затем тщательно перемешивали в течение еще 15 минут. Разбавленную смесь очищали путем диализа против воды Milli–Q (использовали диализные трубки с MWCO 15 кДа, Spetra/Por) в течение 1 недели при 45°C для удаления метакриловой кислоты. Очищенные образцы лиофилизировали и хранили при –80°C до дальнейшего использования.

^{1}H–ЯМР (400 МГц, D_2O, 35°C) использовали для определения степени метакрилирования 15 мг/мл раствора GelMA. Было обнаружено, что соотношение площадей пиков Phe и метакриламида составляло 1,00:0,82, путем сравнения площади мультиплета при 7,25–7,50 ppm (предположительно соответствующего протонам Phe, 5H на Phe в GelMA) с суммой площадей четырех синглетов при 5,47 ppm, 5,51 ppm, 5,71 ppm и 5,76 ppm (предположительно соответствующих протонам винила, 2H на метакриламид в GelMA). С помощью анализа аминокислот было определено, что молярное соотношение Phe:Lys в желатине, используемом в этой реакции, составляло 1,00:2,06. Следовательно, молярное соотношение Phe:Lys:метакриламид в GelMA составляет 1,00:2,06:2,05. Если исходить из предположения, что первичный сайт метакрилирования желатина находится в остатках Lys, анализ методом 1H–ЯМР указывает на то, что степень метакрилирования составляет ~100% (2,05/2,06 × 100% = 99,5%).

Исходные растворы GelMA и LAP получали в DPBS, в них регулировали pH, их подвергали стерилизующей фильтрации и хранили при 4°C до дальнейшего

использования, как описано ниже. В следующем протоколе в качестве примера приводится получение исходного раствора, содержащего 15% вес./об. GelMA и 0,15% вес./об. LAP, однако, в соответствии с идентичной процедурой получали растворы и другой крепости. Для получения 15% вес/об. исходного раствора GelMA 1,5 грамма высушенного сублимацией GelMA, полученного согласно описанному выше, растворяли в 10 мл предварительно нагретого DPBS при 37°C. После полного растворения GelMA вводили фотоинициатор путем добавления в раствор GelMA 15 мг фенил–2,4,6–триметилбензоилфосфината лития (LAP), в результате чего получали исходный раствор, содержащий 15% вес/об. GelMA и 0,15% вес/об. LAP. LAP синтезировали с использованием опубликованной процедуры (Biomaterials 2009, 30, 6702–6707). К раствору добавляли 500 микролитров 1 н. NaOH (номер по каталогу BDH–7222–1, VWR) для доведения pH до нейтрального перед фильтрацией раствора с помощью стерильных мембран с размером пор 0,22 микрометра (Millipore). Конечный фильтрат разделяли на аликвоты по 500 мкл и хранили при 4°C до дальнейшего использования.

Пример C11. Биопринтеры: конструкция и принцип работы

Для разработки метода клеточной терапии, в котором местоположение для доставки клеток точно контролируется, используется технология биопечати для точного размещения CEC на задней стороне роговицы.

Эксперименты по биопечати проводили на покровных стеклах с использованием клеток HEK293. Клетки HEK293, меченные красным флуоресцентным белком, культивировали до конфлюэнтности в 6–луночных культуральных планшетах в DMEM–F12 с 5% фетальной бычьей сывороткой крови. Затем клетки отделяли от культуральной чашки с помощью 100 микролитров TrypLE (Invitrogen) в течение 10 минут при 37°C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и ресуспендировали в DMEM–F12 в концентрации 80 миллионов клеток на мл.

Первый биопринтер был разработан на основе технологии динамического проецирования света (DLP), и схема системы проиллюстрирована на фигуре 26. Система состоит из пяти основных компонентов: 1. источника UVA–света (365 нм, S2000, EXPO); 2) цифрового устройства с микрозеркальной матрицей (DMD, DLP–07 XGA; Texas Instruments) для модуляции света для формирования картин освещения; 3) оптической системы для проецирования картины освещения на образец; 4) автоматизированной площадки для перемещения по всем трем осям синхронно с соответствующими картинами освещения, формируемыми DMD; 5) компьютера, который передает потоки изображений от микросхемы DMD и контролирует все компоненты.

Для биопечати получали смесь клеток HEK293 и биоматрицы путем смешивания 50 микролитров 15% исходного раствора GelMA, содержащего 0,15% LAP, с таким же объемом суспензии клеток HEK293 до достижения конечной плотности клеток 40 миллионов на мл. Затем смесь клеток и GelMA добавляли в центр покровного стекла и полимеризовали в форме буквы "e" путем применения фотошаблона под действием UVA–света с длиной волны 365 нм в течение 30 секунд. Затем получали изображения с

помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Результаты показали, что конструкции, заполненные клетками, могут быть нанесены посредством биопечати точно в форме буквы "e" (фактические результаты показаны в нижней левой части фигуры 26: "e"). Это указывало на то, что технология биопечати может обеспечивать точный контроль местоположения для доставки клеток.

Чтобы облегчить работу с животными in vivo, базовая технология биопринтера, описанная выше, была преобразована в компактную мобильную портативную конструкцию в соответствии с нижеследующим. Светоизлучающая головка состояла из LED–излучателя высокой мощности (365 нм, LED Engin) и асферической линзы для получения коллимированного пучка света. Светоизлучающая головка была встроена в индивидуально изготовленный алюминиевый корпус для лучшего отвода тепла. Аккумуляторная батарея, выключатель питания и другие электронные устройства были размещены в полученной посредством 3D–печати пластиковой рукоятке, которая была собрана вместе со светоизлучающей головкой с помощью шарнира для обеспечения большей свободы поворота головки. Полученные посредством 3D–печати адаптеры обеспечивали возможность прикрепления к головке световодов разных размеров, чтобы контролировать размер зоны освещения. В духе системы на основе DMD это портативное устройство может использовать шаблоны, напечатанные на прозрачном листе, прикрепленном к передней части головки, для формирования индивидуально настроенной картины освещения для контроля фотополимеризации.

Пример C12. Биопечать конструкций, заполненных клетками, на задней стороне человеческой роговицы ex vivo

Чтобы определить, будет ли мобильное портативное устройство для биопечати обеспечивать точное размещение клеток на задней стороне человеческой роговицы, проводили эксперименты по биопечати ex vivo с использованием клеток HEK293 и человеческих роговиц, полученных из глазных банков. Клетки HEK293, меченные красным флуоресцентным белком, культивировали до конфлюэнтности в 6–луночных культуральных планшетах в DMEM–F12 с 5% фетальной бычьей сывороткой крови. Затем клетки отделяли от культуральной чашки с помощью 100 микролитров TrypLE (Invitrogen) в течение 10 минут при 37°C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и ресуспендировали в DMEM–F12 в концентрации 80 миллионов клеток на мл.

Для биопечати получали смесь клеток HEK293 и биоматрицы путем смешивания 50 микролитров 15% исходного раствора GelMA, содержащего 0,15% LAP, с таким же объемом суспензии клеток HEK293 до достижения конечной плотности клеток 40 миллионов на мл.

Затем смесь клеток и GelMA добавляли в центр покровного стекла и полимеризовали в форме буквы "e" путем применения фотошаблона под действием UVA–света с длиной волны 365 нм в течение 30 секунд. Затем получали изображения с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Человеческие донорские роговицы, полученные из глазных банков, извлекали из их раствора для хранения (Optisol) и в течение непродолжительного времени прополаскивали в DPBS. Под препаровальным микроскопом десцементову оболочку аккуратно соскребали перед дополнительным прополаскиванием роговиц в DPBS. Затем одну роговицу помещали на пластиковую крышку чашки Петри диаметром 35 мм внутренней поверхностью вверх. Свежую смесь клеток и биоматрицы получали путем смешивания 50 микролитров 15% исходного раствора GelMA, содержащего 0,15% LAP, с таким же объемом суспензии клеток HEK–293–RFP до достижения конечной плотности клеток 40 миллионов на мл. Затем смесь клеток и GelMA добавляли в центр роговицы, а затем накладывали пластиковый фиксатор выпуклой формы для образования закрытой камеры, имитирующей переднюю камеру глаза. Затем всю конструкцию аккуратно переворачивали, и использовали портативное устройство для биопечати для проецирования круговой картины освещения UVA–светом с длиной волны 365 нм диаметром 5,5 мм через роговицу в течение 30 секунд. Ожидалось, что эта картина освещения UV–светом будет обеспечивать полимеризацию смеси клеток и GelMA в форме диска, прикрепленного к задней стороне роговицы. Чтобы определить, произошло ли это, авторы настоящего изобретения отделяли роговицу от крышки, смывали какой–либо неполимеризовавшийся и неприкрепившийся материал на задней стороне роговицы путем поливания DPBS из пипетки и получали изображения с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Результаты показывают, что после смывания неполимеризовавшегося и неприкрепившегося материала на задней стороне роговицы сохранялась круговая картина расположения клеток, меченных красным флуоресцентным белком (фигура 27). Это подтвердило, что клетки можно наносить на заднюю сторону роговицы посредством биопечати с помощью портативного устройства, которое проецирует UVA–свет с длиной волны 365 нм через роговицу.

Пример C13. Биопечать конструкций, заполненных клетками, на задней стороне роговицы кролика in vivo

Получение CEC

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, отделяли от культуральной чашки с помощью 100 микролитров Accutase (ThermoFisher) в течение 10 минут при 37^0 C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и высевали в X–VIVO 15, дополненную соединением–ингибитором LATS из примера № 48a (разбавленным в DMSO) в концентрации 3 микромоля/л. Клетки культивировали в 6–луночных планшетах (Corning) при 37^0 C и 5% CO2 в течение двух недель. Клетки пассировали дважды в течение этого времени, отделяя клетки с помощью 1 мг/мл коллагеназы в течение 15 минут при 37°C, прополаскивая суспензии клеток путем центрифугирования и высевая в свежую среду. Эти клетки затем выращивали в среде X–VIVO без ингибитора LATS в течение дополнительных 2 недель с образованием зрелых CEC.

Чтобы подготовить CEC для биопечати внутри глаза кролика, получали смесь клеток и биоматрицы путем смешивания 15 микролитров 15% исходного раствора GelMA, содержащего 0,15% LAP, с 30 микролитрами суспензии CEC до достижения конечной плотности клеток от 0,625 миллиона на мл до 25 миллионов на мл. Затем смесь клеток и GelMA добавляли в центр роговицы.

Кроличья модель дефицита эндотелиальных клеток роговицы

В правом глазу кроликов NZA создавали односторонний дефицит эндотелиальных клеток роговицы путем соскребания всего эндотелия роговицы с помощью иглы с силиконовым наконечником. Переднюю камеру прополаскивали с помощью аспирационной канюли для удаления плавающего дебриса. Сорок микролитров свежеприготовленной смеси клеток и GelMA инъецировали в переднюю камеру с последующим воздействием UVA–света с длиной волны 365 нм в течение 30 секунд с использованием портативного биопринтера, снабженного световодом диаметром 3 мм на расстоянии приблизительно 1 см от поверхности глаза. Проводили осторожное промывание с использованием небольшой канюли для инъекции 500 микролитров сбалансированного солевого раствора, дополненного гепарином, для удаления неполимеризовавшегося материала и плавающих клеток. Левый глаз каждого кролика оставляли нетронутым, и он служил в качестве контроля. После доставки клеток кролики получали обезболивающее лечение (трамадол – 10 мг/кг PO BID в первые 2 недели, мелоксикам – 0,3 мг/кг PO SID в первые 2 недели или до тех пор, пока у животного наблюдались признаки дискомфорта в глазах), противовоспалительное лечение (Ancef® (цефазолин) – 50 мг в субтеноновое пространство сразу после процедуры, офтальмологический раствор Tobrex® – TID в течение 1–й недели, а затем BID, ампициллин – 80 мг/кг/день (40 мг BID) SQ в течение первой недели) и иммуносупрессивное лечение (циклоспорин A (0,5%) местно в глаз TID в течение 1–й недели, а затем BID, Gentocin®–durafilm® (гентамицина сульфат и бетаметазон, MERCK) местно в глаз TID в течение 1–й недели, а затем BID, циклоспорин A (5 мг/кг/день) SQ в течение 1–й недели, а затем ½ дозы).

Кроликов умерщвляли через три недели после доставки клеток, роговицы иссекали и фиксировали в 4% PFA. Проводили иммуногистохимическое исследование для выявления присутствия человеческого ядерного антигена (Millipore), чтобы подтвердить присутствие клеток человека, и ZO–1 (Invitrogen), чтобы определить, могут ли CEC, нанесенные посредством биопечати, образовывать плотные соединения, наблюдаемые в нормальном эндотелии роговицы. Затем получали изображения с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880.

Результаты указывали на то, что у кроликов, используемых в эксперименте, структуру эндотелия роговицы можно выявить с помощью иммуногистохимического исследования ZO–1 (фигура 28, панель A). В правом глазу кролика, где эндотелий роговицы был удален хирургическим путем и не проводилась биопечать CEC, окрашивание ZO–1 отсутствует, что указывает на отсутствие нормальной структуры

эндотелия роговицы (фигура 28, панель B). В правом глазу кролика, где эндотелий роговицы был удален хирургическим путем и были нанесены CEC посредством биопечати, присутствует окрашивание ZO–1, что указывает на то, что структура эндотелия роговицы была воссоздана (фигура 28, панель C).

Окрашивание человеческого ядерного антигена использовали для подтверждения того, что клетки, которые воссоздали эндотелий роговицы на фигуре 28, панели C, представляют собой CEC человека, доставленные посредством биопечати. На фигуре 28, панелях D и E, показано, что иммуноокрашивание человеческого ядерного антигена отсутствует в глазах, которые не получали каких–либо CEC человека. В отличие от этого, клетки, положительные по человеческому ядерному антигену, покрывают поле изображения в глазах, где были нанесены CEC человека посредством биопечати (фигура 28, панель F), что указывает на то, что меченная ZO–1 структура эндотелия роговицы, показанная на фигуре 28, панели C, состоит из CEC человека, нанесенных посредством биопечати на заднюю сторону роговицы кролика.

Пример C14. Биопечать конструкций, заполненных клетками, с широкими возможностями индивидуальной настройки формы на задней стороне человеческой роговицы ex vivo

Человеческие донорские роговицы, полученные из глазных банков, извлекали из их раствора для хранения (Optisol) и в течение непродолжительного времени прополаскивали в DPBS. Под препаровальным микроскопом десцементову оболочку аккуратно соскребали перед дополнительным прополаскиванием роговиц в DPBS. Затем одну роговицу помещали на пластиковую крышку чашки Петри диаметром 35 мм внутренней поверхностью вверх.

Свежую смесь клеток и биоматрицы получали путем смешивания 50 мкл 15% исходного раствора GelMA, содержащего 0,15% LAP, с таким же объемом суспензии клеток HEK–293–RFP до достижения конечной плотности клеток 40 миллионов на мл. Затем смесь клеток и GelMA добавляли в центр роговицы, а затем накладывали пластиковый фиксатор выпуклой формы для образования закрытой камеры, имитирующей переднюю камеру глаза. Затем всю конструкцию аккуратно переворачивали, и использовали устройство для биопечати DLP, упомянутое в примере C11, для проецирования индивидуально настраиваемых картин освещения UVA–светом с длиной волны 365 нм через роговицу в течение 7,5 секунды. Любой неполимеризовавшийся и неприкрепившийся материал затем смывали на задней стороне роговицы с помощью DPBS, и получали изображения с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Zeiss.

Чтобы продемонстрировать воспроизводимость и возможность индивидуальной настройки технологии биопечати авторов настоящего изобретения, на образцы проецировали картины освещения в форме различных букв, которые можно легко распознать. Результаты (фигура 29) показывают, что индивидуально настраиваемые конструкции, заполненные клетками, можно с высокой точностью наносить посредством

биопечати на заднюю сторону роговицы так, как определяется картинами освещения, проходящего через роговицу.

Пример C15. Оценочное исследование остаточных соединений

Получение калибровочной кривой

Была получена серия разведений исходных стандартных растворов в концентрациях 30 микромоль/л, 3 микромоля/л, 300 нМ, 30 нМ, 3 нМ, 0,3 нМ и 0 микромоль/л. Исходный раствор соединения из примера 48a (10 мМ в DMSO) добавляли в смесь 50% ацетонитрила и 50% воды с получением добавляемых стандартных растворов. Добавляемые стандартные растворы использовали для добавки в образцы чистой среды. 10 микролитров добавляемого стандартного раствора добавляли к 90 микролитрам среды с получением сред с добавками стандартного раствора. Для получения калибровочной кривой соединения из примера № 48a использовали среды со стандартным раствором в концентрации 3000 нМ, 300 нМ, 30 нМ, 3 нМ, 300 пМ, 30 пМ и 0 нМ.

50 микролитров каждого образца среды обрабатывали 300 микролитрами экстракционного раствора. Экстракционный раствор состоит из смеси ацетонитрил/метанол (3:1). Образцы из калибровочной кривой экстрагировали с использованием тех же объемов и условий, что и образцы неизвестных сред. Экстрагированные образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования 200 микролитров надосадочной жидкости из каждого образца переносили в чистый 96–луночный планшет. Экстрагированные образцы анализировали с помощью LC–MS высокого разрешения. Для построения калибровочной кривой и расчета значений концентрации использовали программное обеспечение Thermo Xcalibur и Quan Browser. Для расчета концентрации соединения из примера № 48a в образцах культуральных сред использовали способ внешней калибровки с использованием линейного двойного логарифмического масштабирования.

Анализ методом LC–MS

Хроматографию высокого разрешения проводили с использованием системы Thermo UltiMate для UPLC и колонки Kinetex C18 RP 2,1 × 50 мм (частицы размером **2,6** микрона). Подвижные фазы состояли из 5 мМ ацетата аммония в H_2O в случае с буфером A и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле в случае с буфером B. Для обращенно–фазовой хроматографии использовали стандартный бинарный линейный градиент. Для этого исследования использовали масс–спектрометр Thermo Q Exactive. Эффлюент из системы для UPLC направляли в масс–спектрометр Q Exactive, который был оборудован ESI–источником ионов. Масс–спектрометр был запрограммирован для работы в режиме полного сканирования с высоким разрешением. Экстракционные ионные хроматограммы использовали для интеграции хроматографических пиков.

Тест–система

Подготовка клеток для отмывания CEC: эксперимент по отмыванию проводили в трех повторностях, где каждый образец содержал 0,5 миллиона клеток. Все образцы (только среда, среда с клетками, дополненная соединением из примера № 48a, и клетки в

среде, дополненной примером соединения № 48a) культивировали в инкубаторе при 37 градусах в течение всего эксперимента. Средой, используемой для эксперимента, была X–VIVO 15 (Lonza, номер по каталогу 04–744Q).

Клетки культивировали до пассажа 2 в среде X–VIVO 15, дополненной 3 микромоль/л соединения из примера № 48a. По достижении конфлюэнтности среду удаляли путем аспирации и заменяли свежей средой, не дополненной соединением из примера № 48a. Клетки культивировали в течение еще одной недели при отсутствии соединения из примера № 48a. Спустя неделю культивирования при отсутствии соединения среду удаляли путем аспирации, заменяли свежей средой без соединения, и культивирование клеток продолжали при отсутствии соединения в течение еще шести дней. В день 7 получали следующие образцы:

5. 2 мл "чистой" среды (не дополненной соединением)

6. 2 мл среды, культивируемой в присутствии соединения (до промывания)

7. 2 мл среды для каждого из промываемых образцов 1–10

8. Клеточные осадки (после промывания)

Забор клеток производили, используя клеточный скребок (Costar, номер по каталогу 3008).

Образцы среды и клеточных осадков анализировали и количественно оценивали с помощью LC–MS высокого разрешения.

Производили забор клеточных осадков и надосадочной жидкости для оценивания остаточных уровней соединения из примера № 48a. Количество соединения из примера № 48a определяли с помощью LC–MS. Оценки концентраций соединения из примера № 48a в среде до промывания, среде для промывания (таблица 11) и клеточном осадке обобщены (таблица 12). Образцы среды до промывания имеют наивысшие уровни соединения из примера № 48a (примерно в диапазоне от 35 нМ до 122 нМ). Осадок после промывания имеет низкие, но выявляемые уровни соединения из примера № 48a (пикомолярные).

Таблица 11. Оценка концентраций соединения из примера № 48a в среде до промывания и среде для промывания

Образец	**Объем (мл)**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 1 из трех повторностей**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 2 из трех повторностей**	**Соединение из примера № 48a (нМ), № 3 из трех повторностей**
Среда до промывания	**2**	**35,344**	**66,248**	**121,863**
Среда для промывания 1	**2**	**0,408**	**0,614**	**0,712**
Среда для промывания 2	**2**	**BLQ**	**0,003**	**0,002**
Среда для	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**

промывания 3				
Среда для промывания 4	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 5	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 6	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 7	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 8	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 9	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**
Среда для промывания 10	**2**	**BLQ**	**BLQ**	**BLQ**

Таблица 12. Оценка концентраций соединения из примера № 48a в клеточном осадке

Образец	**Соединение из примера № 48a (нМ),**	**Соединение из примера № 48a (пг/клетка)**	**Среднее количество соединения из примера № 48a (пг/клетка)**	**Количество клеток в осадке**	**Общее количество соединения из примера № 48a (пг)**
Осадок после промывания 1	**0,004**	**$0{,}13 \times 10^{-6}$**	**$1{,}5 \times 10^{-6}$**	**$0{,}5 \times 10^{6}$**	**0,75**
Осадок после промывания 2	**0,071**	**$2{,}3 \times 10^{-6}$**			
Осадок после промывания 3	**0,065**	**$2{,}1 \times 10^{-6}$**			

Количество соединения из примера № 48a в среде до промывания после инкубирования в трех повторностях находится в диапазоне 35,344–121,863 нМ. Среднее количество соединения из примера № 48a в клеточном осадке составляло 0,75 пикограмма на 500000 клеток.

Пример C16. Снижение иммунного отторжения с помощью AAV–опосредованной делеции гена бета–2–микроглобулина в LSC

Конструкция вектора AAV

На карте вектора, показанной на фигуре 30, представлена конструкция вектора AAV, используемого для экспрессии системы CRISPR в LSC. Вектор экспрессировал Cas9

Staphylococcus aureus (Ran et al., Nature. 2015 Apr 9;520(7546):186–191) и B2M–специфичную направляющую РНК, встроенную в сайт рестрикции Aar I.

Трансдукция клеток LSC, полученные согласно описанному в примере B1, культивировали в среде X–VIVO 15, дополненной соединением–ингибитором LATS из примера № 48a. LSC трансдуцировали либо в суспензии сразу после выделения из человеческих роговиц, либо после выделения, прикрепления и увеличения в присутствии соединения–ингибитора LATS до 50–60% конфлюэнтности в чашке Петри диаметром 35 мм через восемь дней после выделения LSC. LSC трансдуцировали при показателях MOI 10000, 50000, 100000 или 200000. Частицы вектора разбавляли в буфере, состоящем из 1 x PBS+0,001% Pluronic, и переливали пипеткой в культуральную чашку. Буфер для хранения вирусных частиц в отдельности представлял отрицательный контроль трансдукции. Клетки культивировали в течение 72 часов в инкубаторе с 5% CO_2 перед проведением анализа и сортировки методом FACS.

Анализ методом FACS

LSC обрабатывали с помощью Accutase (ThermoFisher, номер по каталогу A1110501) в течение 20 минут в 5% CO_2 при 37°C. После соскребания клеток реакцию 5 останавливали путем использования среды для культивирования клеток, содержащей 10% сыворотку крови, и материал переносили в пробирку Falcon для стадии центрифугирования (1000 об/мин, 5 минут). После аспирации среды клетки ресуспендировали в 200 микролитрах буфера для FACS (PBS/10% FBS).

Для анализа экспрессии B2M и HLA–ABC 5 микролитров конъюгированного с APC антитела мыши к бета–2–микроглобулину человека (Biolegend, номер по каталогу 316312) и 20 микролитров конъюгированного с PE антитела мыши к HLA–ABC человека (BD Bioscience, номер по каталогу 560168) добавляли к суспензии клеток и инкубировали в течение 30 минут на льду. После мечения антителами клетки промывали 3 раза буфером для FACS и ресуспендировали в 500 микролитрах буфера для FACS.

Перед FACS–сортировкой клетки фильтровали через фильтр с размером пор 70 микрометров и хранили на льду до сортировки. Чтобы предотвратить прилипание клеток к стенке, пробирки для сбора образцов перед сортировкой заполняли сывороткой крови на 30 минут. Клетки сортировали на приборе BD FACSAria II в 20 подготовленных пробирок для сбора образцов, используя обогащенную человеческой сывороткой крови среду для LSC. Данные FACS анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

Результаты, представленные на фигуре 31, показывают, что при показателе MOI 200000 AAV–опосредованная экспрессия системы CRISPR обеспечивала делецию B2M и последующее устранение HLA A, B и C, происходящие в 24,9% LSC в случае трансфекции прикрепленных клеток и в 20,0% LSC в случае трансдукции клеток в суспензии.

Пример C17. Снижение иммунного отторжения с помощью AAV–опосредованной делеции гена бета–2–микроглобулина в CEC

Конструкция вектора AAV

На карте вектора, показанной на фигуре 30, представлена конструкция вектора AAV, используемого для экспрессии системы CRISPR в CEC. Вектор экспрессировал Cas9 Staphylococcus aureus (Ran et al., Nature. 2015 Apr 9;520(7546):186–191) и B2M–специфичную направляющую РНК, встроенную в сайт рестрикции Aar I.

Трансдукция клеток

Клетки, полученные согласно описанному в примере C1, отделяли от культуральной чашки с помощью 100 микролитров Accutase (ThermoFisher) в течение 10 минут при 37^0 C, суспензии клеток прополаскивали путем центрифугирования и высевали в среду для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среду для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови) в 6–луночные планшеты (Corning) 10, дополненную соединением–ингибитором LATS (разбавленными в DMSO) из примера № 133 или примера № 49 в концентрации 10 микромоль/л или DMSO в отдельности без соединения в качестве отрицательного контроля. Клетки культивировали при 37°C и 5% CO_2.

CEC культивировали в среде для культивирования эндотелиальных клеток роговицы (SF–среде для эндотелиальных клеток человека (Invitrogen) с человеческой сывороткой крови) в 6–луночных планшетах (Corning), дополненной соединением–ингибитором LATS из примера № 133 или примера № 49 (разбавленными в DMSO) в концентрации 10 микромоль/л. CEC трансдуцировали после выделения, прикрепления и увеличения в присутствии соединения–ингибитора LATS до 50–60% конфлюэнтности в 6–луночном планшете через восемь дней после выделения LSC. CEC трансдуцировали при показателях MOI 100, 1000, 5000, 10000, 20000 или 40000. Частицы вектора разбавляли в буфере, состоящем из 1 x PBS+0,001% Pluronic, и переливали пипеткой в культуральную чашку. Буфер для хранения вирусных частиц в отдельности представлял отрицательный контроль трансдукции. Клетки культивировали в течение 72 часов в инкубаторе с 5% CO_2 перед проведением анализа и сортировки методом FACS.

Анализ методом FACS

CEC обрабатывали с помощью Accutase (ThermoFisher, номер по каталогу A1110501) в течение 20 минут в 5% CO_2 при 37°C. После соскребания клеток реакцию 5 останавливали путем использования среды для культивирования клеток, содержащей 10% сыворотку крови, и материал переносили в пробирку Falcon для стадии центрифугирования (1000 об/мин, 5 минут). После аспирации среды клетки ресуспендировали в 200 микролитрах буфера для FACS (PBS/10% FBS).

Для анализа экспрессии B2M и HLA–ABC 5 микролитров конъюгированного с APC антитела мыши к бета–2–микроглобулину человека (Biolegend, номер по каталогу 316312) и 20 микролитров конъюгированного с PE антитела мыши к HLA–ABC человека (BD Bioscience, номер по каталогу 560168) добавляли к суспензии клеток и инкубировали в течение 30 минут на льду. После мечения антителами клетки промывали 3 раза буфером для FACS и ресуспендировали в 500 микролитрах буфера для FACS.

Перед FACS–сортировкой клетки фильтровали через фильтр с размером пор 70

микрометров и хранили на льду до сортировки. Чтобы предотвратить прилипание клеток к стенке, пробирки для сбора образцов перед сортировкой заполняли сывороткой крови на 30 минут. Клетки сортировали на приборе BD FACSAria II в 20 подготовленных пробирок для сбора образцов, используя обогащенную человеческой сывороткой крови среду для культивирования CEC. Данные FACS анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva.

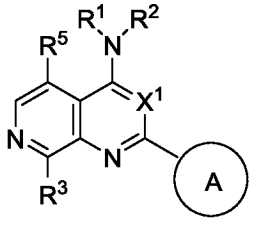
Результаты, представленные на фигуре 32, показывают, что AAV–опосредованная экспрессия системы CRISPR обеспечивала делецию B2M и последующее устранение HLA A, B и C. При показателе MOI 40000 делеция B2M происходила в 17 процентах CEC.

Если не указано иное, все способы, стадии, методики и манипуляции, которые конкретно не описаны подробно, могут выполняться и выполнялись широко известным способом, как будет ясно специалисту в данной области. Например, снова сделана ссылка на стандартные руководства и общий уровень техники, упоминаемый в данном документе, а также на дополнительные литературные источники, цитируемые в данном документе. Если не указано иное, каждый из литературных источников, цитируемых в данном документе, включен посредством ссылки во всей своей полноте.

Пункты формулы изобретения являются неограничивающими и представлены ниже. Хотя конкретные варианты осуществления и пункты формулы изобретения были подробно раскрыты в данном документе, это было выполнено в качестве примера лишь в целях иллюстрации и не предназначено для ограничений в отношении объема прилагаемой формулы изобретения или объема объекта формулы изобретения с любым соответствующим будущим применением. В частности, авторы настоящего изобретения подразумевают, что различные замены, изменения и модификации могут быть выполнены в отношении настоящего изобретения без отступления от сущности и объема настоящего изобретения, определяемого формулой изобретения. Считается, что выбор исходного материала в виде нуклеиновой кислоты, клона, представляющего интерес, или типа библиотеки является обычным делом для рядового специалиста в данной области, располагающего сведениями о вариантах осуществления, описанных в данном документе. Считается, что другие варианты осуществления, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения. Специалистам в данной области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе, или путем проведения всего лишь обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы A2, или его соль, или его стереоизомер,



A2,

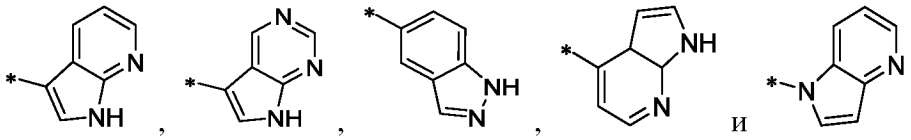
где

X^1 представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



,

где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы; и

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или $C_{1–6}$алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1–6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(xi) моноциклического $C_{3–6}$циклоалкила или полициклического $C_{7–10}$циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, гидрокси$C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $–NH_2$, $C_{1–6}$алкиламино и ди–($C_{1–6}$алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$алкиламино и ди–($C_{1–6}$алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1–6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила и R^0;

(d) $C_{3–6}$циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из $C_{1–6}$галогеналкила, R^0, $C_{1–6}$алкиламино, ди–($C_{1–6}$алкил)амино, $–C(O)R^0$ и $C_{1–6}$алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

или при условии, что если X^1 представляет собой CH, R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, $C_{1–6}$алкила, $C_{1–6}$галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и $C_{1–6}$алкила; и

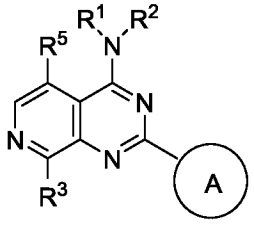
R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетеро$C_{3–8}$алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0;

при условии, что:

(1) если X^1 представляет собой N, кольцо A представляет собой 4–пиримидинил или 3–фтор–4–пиримидинил, R^1 представляет собой H или метил, R^3 представляет собой H или Cl, и R^5 представляет собой H; тогда R^2 не является C_{2-4}алкилом, который замещен заместителем, выбранным из $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино или *трет*–бутил–карбамоил–амино, и который необязательно дополнительно замещен незамещенным фенилом; и

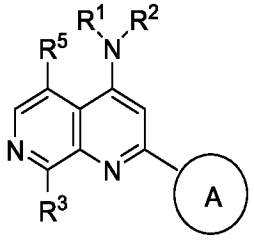
(2) если X^1 представляет собой N, кольцо A представляет собой индазол–5–ил, R^1, R^3 и R^5 представляют собой H; тогда R^2 не является C_4алкилом, который замещен $–NH_2$.

2. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой соединение формулы I:

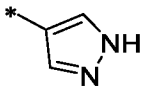


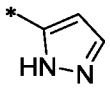
I.

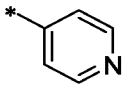
3. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой соединение формулы II:

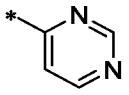


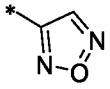
II.

4. Соединение по любому из пп. 1–3, где кольцо A выбрано из 

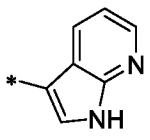
, 

, 

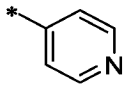
, 

и 

, каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

или представляет собой 

, которое не замещено или замещено C_{1-6}алкилом.

5. Соединение по любому из пп. 1–4, где кольцо A представляет собой 

.

6. Соединение по любому из пп. 1–5, где

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен заместителями A1 – A3, независимо выбранными из

(i) циано;

(ii) C_2алкинила;

(iii) C_{1-6}галогеналкила;

(iv) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(vi) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0;

(vii) $-S(O)_2C_{1-4}$алкила;

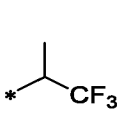
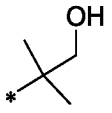
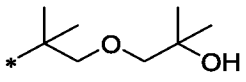
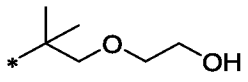
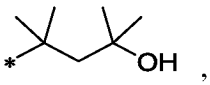
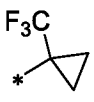
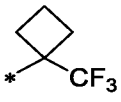
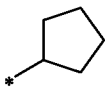
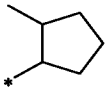
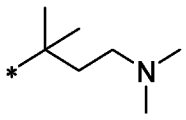
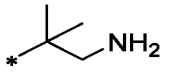
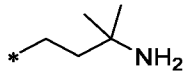
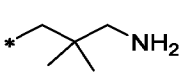
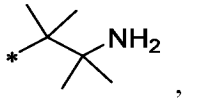
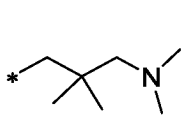
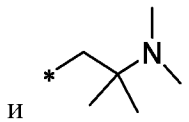
(viii) моноциклического C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен заместителем, выбранным из С1–6алкила, гидроксиC_{1-6}алкила и R^0;

(ix) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O, и где 6–членный гетероциклоалкил не замещен или замещен С1–6алкилом;

(x) фенила, который не замещен или замещен галогеном; и

(b) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-R^0$ или $-C(O)R^0$.

7. Соединение по любому из пп. 1–6, где R^2 выбран из

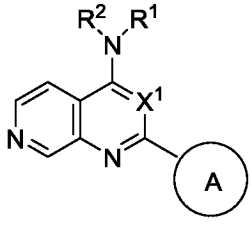
н–пропила, изопропила, *трет*–бутила,  , ,  ,  ,  ,  , ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  .

8. Соединение по п. 1 и пп. 3–5, где

X^1 представляет собой CH; и

R^1 и R^2, взятые вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве члена кольца дополнительный гетероатом, выбранный из N и O, где 6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, C_{1-6}алкила и C_{1-6}галогеналкила.

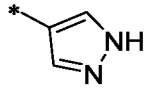
9. Соединение по п. 1, где соединение представляет собой соединение формулы A3:

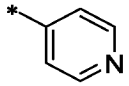


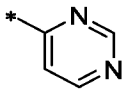
A3,

где

X^1 представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой 

, 

или 

, каждое из которых не замещено или замещено заместителем, выбранным из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и $–NH_2$;

R^1 представляет собой водород или незамещенный C_{1-6}алкил; и

R^2 представляет собой

(a) C_{1-8}алкил, который не замещен или замещен 1 заместителем, выбранным из

(i) C_{1-4}галогеналкила и

(ii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен гидроксилом; или

(b) моноциклический C_{3-6}циклоалкил, который не замещен или замещен C_{1-6}алкилом или C_{1-6}галогеналкилом и R^0.

10. Соединение формулы A2 по п. 1 или его соль, выбранные из: N–(2–циклопропилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифторпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–бутил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; N–этил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–циклогексилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилоксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; N–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метил–4–фенилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–циклопропил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)уксусной кислоты; (1R,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–(1–метансульфонил–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (2S)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–[(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)амино]уксусной кислоты; (2R)–3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; метил–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаноата; (1S,2S)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентан–1–ола; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–(2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этокси)этан–1–ола; 2–(гидроксиметил)–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1,3–диола; 3–метил–3–(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутанамидо)бутановой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–3–фенилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–{[4–(диметиламино)оксан–4–ил]метил}–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(2–метансульфонилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(адамантан–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропанамида; 4,4,4–трифтор–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]пропан–2–сульфонамида; 2–(пиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4,4,4–трифтор–2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопентил)метанола; N–(3–метоксициклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1R,2R)–1–N,2–N–диметил–1–N–[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]циклогексан–1,2–диамина; метил–(1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; этил–

1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоксилата; 1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; (1s,3s)–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–карбоновой кислоты; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклобутил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(пиридин–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропан–1–ола; N–(бутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилбут–3–ин–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1r,3s)–3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутан–1–ола; 2,3–диметил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–2–ола; 2–(пиридин–4–ил)–N–(2,4,4–триметилпентан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(пентан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(трет–бутокси)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4,4,4–трифтор–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–пентил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–[1–(1H–индол–3–ил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[1–(4–фторфенил)–2–метилпропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–фенилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–[2–(4–фторфенил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3,3,3–трифтор–2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропановой кислоты; 2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}этан–1–ола; N–метил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–({[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}метил)циклопентан–1–ола; N,N–диметил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(2–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–метоксифенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–фенил–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(3–метилфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 6–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}гексановой

кислоты; N–(3–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–фторфенил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутановой кислоты; N–(1–фенилэтил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; трет–бутил–N–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропил)карбамата; (1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; метил–2–(1–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)ацетата; N–(2–метилпропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутаннитрила; N–(6–аминогексил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(4–аминобутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропаннитрила; N–[2–метил–1–(2–метилпиперидин–1–ил)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–циклопентил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–[4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил]пиридин–2–амина; 2–[1–(бензолсульфонил)–2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил]–N–трет–бутилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метилпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пентан–2–ола; N–этил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–метил–1–[2–метил–2–({2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил}амино)пропокси]пропан–2–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–этил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–циклопентилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 1–(2–{[2–(3–хлорпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2–метилпропокси)–2–метилпропан–2–ола; N–метил–2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(пропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(4–метансульфонил–2–метилбутан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[3–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–[2–хлор–5–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–

хлорпиридин–4–ил)–N–[3–(1H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–[(2R)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–{2–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–индазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)–2–[3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(4–гидрокси–2,4–диметилпентан–2–ил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–3–карбонитрила; 2–(3,5–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2,3–дифторпиридин–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–тиазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–[2–(трифторметил)пиридин–4–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{4–[(1–метилциклопропил)амино]пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил}пиридин–2–карбонитрила; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,2–оксазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(диметил–1,2–оксазол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; н–пропил–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–(1,1,1–трифтор–2–метилпропан–2–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–{[2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}–2,4–диметилпентан–2–ола; н–пропил–2–{7H–пирроло[2,3–d]пиримидин–5–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–циклопропил–1H–пиразол–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метилпиридин–4–ил)–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–{1–метил–1H–пирроло[2,3–b]пиридин–3–ил}–N–пропилпиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2,4–диметил–4–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–[(1R)–1–фенилэтил]–2–(1H–

пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(5–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[(1R)–1–фенилэтил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридазин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1,3–оксазол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–имидазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–{1H–пирроло[3,2–b]пиридин–1–ил}пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–1,2,3–триазол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1,2–оксазол–5–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(2H–1,2,3,4–тетразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–(1–метилциклобутил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; 2–(1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(трифторметил)циклопропил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклобутил)метанола; (1–{[2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}циклопропил)метанола; 2–(1–метил–1H–пиразол–5–ил)–N–[1–(пиридин–4–ил)этил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–этил–1H–пиразол–4–ил)–N–(2–метилпропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(1–метил–1H–пиразол–4–ил)–N–(1–метилциклопропил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амин; 8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–трет–бутил–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 2–(2–{[4–(трет–бутиламино)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–5–ил]амино}этокси)этан–1–ола; N–(4–метокси–2–метилбутан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[2–метил–1–(пропан–2–илокси)пропан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–

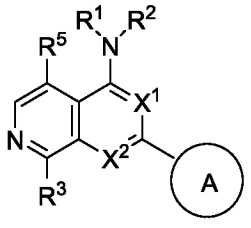
амина; N–[(2S)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–[(2R)–бутан–2–ил]–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метокси–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–метил–N–(пропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутан–1–ола; N–трет–бутил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2,2–диметил–1–[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]пиперидин–4–ола; 2,4–диметил–4–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пентан–2–ола; N–циклопентил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}бутил)амина; N, N–диэтил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола; н–пропил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–{1H–пирроло[2,3–b]пиридин–4–ил}–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(пиридазин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(2–аминопиридин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина; N, N–диэтил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; (3–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–3–метилбутил)диметиламина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–метил–N–(пропан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(пиперидин–1–ил)–1,7–нафтиридина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–4–(морфолин–4–ил)–1,7–нафтиридина; N–трет–бутил–2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–(2–метилбутан–2–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–{[2–(3–фторпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]амино}–2–метилпропан–1–ола; 1–[2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил]–2,2–диметилпиперидин–4–ола; 2–(3–фторпиридин–4–ил)–N–[2–метил–1–(морфолин–4–ил)пропан–2–ил]–1,7–нафтиридин–4–амина; N–трет–бутил–2–(3–хлорпиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–((1R,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (S)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; (R)–N–(втор–бутил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1S,2S)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; N–((1R,2R)–2–метилциклопентил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; 4–(4–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 4–(пиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 4–(2–метилпиперидин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклобутил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2–метил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамина; N–(оксетан–3–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 4–(3,3–диметилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2,2–диметил–4–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)морфолина; N–(1–

метилциклобутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; 2,2–диметил–N1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамина; N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,2–диамина; 4–(2–метилпиперазин–1–ил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридина; 2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)пропан–1,3–диамина; (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)–1,7–нафтиридина; N–(трет–бутил)–N–метил–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N–(1–метилциклобутил)–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(пиримидин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2–метил–1–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропан–2–ил)карбамата; *трет*–бутил–(2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)этил)карбамата; 2–метил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина; N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)этан–1,2–диамина; N, N,2–триметил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; N^1,3–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; *трет*–бутил–(2,2–диметил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропил)карбамата; 2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутанамида; (R)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; 2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина; (S)–2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; этил–2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропаноата; N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; 4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина; N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина; 2–метил–2–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)пропанамида; (S)–1,1,1–трифтор–2–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–ил)амино)пропан–2–ола; 2–(3–хлорпиридин–4–ил)–N, N–диэтил–1,7–нафтиридин–4–амина; н–пропил–2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина; *трет*–бутил–(3–метил–3–((2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)амино)бутил)карбамата; N^1,N^1,N^3,2,2–пентаметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина; N^1,N^1–диэтил–3–метил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–фторпиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^3–(2–(3,5–диметил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина; N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–(трифторметил)–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина; N^3–(2–(2–аминопиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)–N^1,N^1,3–триметилбутан–1,3–диамина и 3–метил–N^1–

(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1–10 в качестве активного ингредиента и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

12. Способ ингибирования LATS в популяции клеток, содержащей роговичные эндотелиальные клетки, с использованием соединения формулы A1 или его соли:



A1,

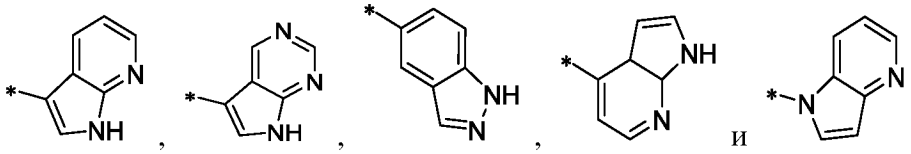
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $-OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $-C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $-C(O)R^0$;

(ix) $-C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $-NH-C_{1-6}$алкил$-C(O)R^0$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$алкил;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $-NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $-C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $-C(O)R^0$;

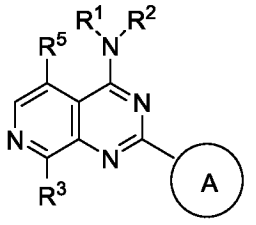
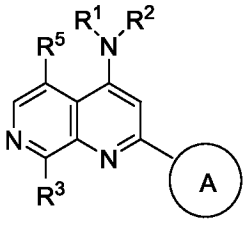
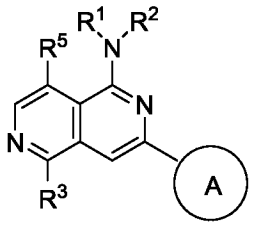
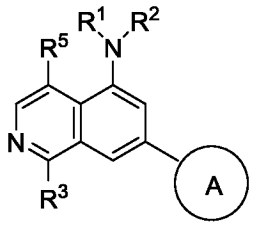
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–

членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и не замещен или замещен R^0.

13. Способ ингибирования LATS по п. 12, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:


I,

II,

III и

IV.

14. Способ ингибирования LATS по п. 12 или п. 13 в популяции клеток, где соединение или его соль выбраны из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

15. Способ ингибирования LATS по п. 12, где соединение или его соль представляют собой соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

16. Способ культивирование клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии ингибитора LATS.

17. Способ культивирования клеток по п. 16, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

18. Способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

19. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки.

20. Способ увеличения популяции клеток по п. 19, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14,

или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

21. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с увеличением популяции клеток, включающих роговичные эндотелиальные клетки.

22. Способ по любому из пп. 12–21, где указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

23. Способ по любому из пп. 12–22, где на стадии a) соединение присутствует в течение одной – двух недель, а затем осуществляют стадию b), где клетки культивируют в течение некоторого периода времени в питательной среде без дополнения указанным соединением, где предпочтительно указанный период составляет одну – две недели

24. Способ по любому из пп. 19–23, где с помощью способа достигают более чем 10–кратного увеличения количества высеянных клеток.

25. Способ по любому из пп. 19–24, где с помощью способа достигают 15–600–кратного увеличения, предпочтительно 20–550–кратного увеличения количества высеянных клеток.

26. Способ по любому из пп. 12–25, где ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

27. Способ по любому из пп. 12–26, где указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование указанных роговичных эндотелиальных клеток.

28. Способ по п. 27, где указанное генетическое модифицирование предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

29. Способ по п. 27 или п. 28, где указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически целенаправленно воздействует на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

30. Способ по п. 29, где указанная система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы редактирования генов CRISPR, системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеаз с "цинковыми пальцами", системы редактирования генов на основе мегануклеаз, технологий редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации, управляемой вектором на основе AAV, и на основе лентивирусных векторов.

31. Способ по любому из пп. 28–30, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

32. Способ по любому из пп. 12–31, который предусматривает после получения

увеличенной популяции клеток дополнительную стадию ополаскивания этих клеток, по сути для удаления соединения.

33. Популяция клеток, получаемая с помощью способа по любому из пп. 12–32.

34. Популяция клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 12–32.

35. Популяция клеток, содержащая роговичные эндотелиальные клетки, или популяция клеток по п. 33 или п. 34, где одна или несколько указанных клеток содержат не существующую в природе вставку или делецию одного или нескольких остатков нуклеиновой кислоты гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где вставка и/или делеция в результате приводят к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена.

36. Популяция клеток по п. 35, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

37. Популяция клеток по п. 35 или п. 36, где указанный ген представляет собой B2M.

38. Средство, стимулирующее рост роговичных эндотелиальных клеток, содержащее ингибитор LATS.

39. Средство, стимулирующее рост роговичных эндотелиальных клеток, по п. 38, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

40. Средство, стимулирующее рост роговичных эндотелиальных клеток, содержащее соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

41. Среда для пролиферации клеток, содержащая ингибитор LATS и питательную среду.

42. Среда для пролиферации клеток по п. 41, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

43. Среда для пролиферации клеток, содержащая соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 и питательную среду.

44. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 41–43, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками среды; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

45. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 41–44, дополнительно содержащая роговичные эндотелиальные клетки.

46. Клеточный препарат, содержащий ингибитор LATS и роговичные эндотелиальные клетки.

47. Клеточный препарат по п. 46, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

48. Клеточный препарат, содержащий соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10

и роговичные эндотелиальные клетки.

49. Клеточный препарат по любому из пп. 46–48, который дополнительно содержит питательную среду, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками среды; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

50. Фармацевтическая композиция по п. 11 или клеточный препарат по любому из пп. 46–49, дополнительно содержащие раствор для консервации или криоконсервации.

51. Фармацевтическая композиция или клеточный препарат по п. 50, где раствор для консервации или криоконсервации содержит раствор, который представляет собой Optisol или PBS, и при этом раствор для криоконсервации дополнительно содержит глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид.

52. Набор содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и ингибитор LATS.

53. Набор по п. 52, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

54. Набор, содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

55. Набор по любому из пп. 52–54, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, или глазные капли для местного применения.

56. Набор по любому из пп. 52–55, дополнительно содержащий роговичные эндотелиальные клетки.

57. Препарат для доставки клеток, содержащий популяцию клеток по любому из пп. 33–37 или клеточный препарат по любому из пп. 46–51 и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку.

58. Набор по любому из пп. 52–56 или препарат для доставки клеток по п. 57, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу.

59. Набор по любому из пп. 52–56 или п. 58 или препарат для доставки клеток по

любому из п. 57 или п. 58, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, выбранное из группы, состоящей из фибрина, коллагена, желатина, целлюлозы, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA, средств, обеспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, поливинилового спирта, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, поливинилпирролидона, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина, коллагена, фибриногена, целлюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилгуара, геллановой камеди, гуаровой камеди, ксантановой камеди и карбоксиметилцеллюлозы, а также их производных, их сополимеров и их комбинаций.

60. Набор по любому из пп. 52–56, или п. 58, или п. 59 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–59, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa.

61. Набор по любому из пп. 52–56 или пп. 58–60 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–60, где роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в комбинации со средством, обеспечивающим локальную доставку, и при этом роговичные эндотелиальные клетки находятся в монослое.

62. Набор по любому из пп. 52–56 или пп. 58–61 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–61, где роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в комбинации со средством, обеспечивающим локальную доставку, при плотности более 500 клеток на $мм^2$ (площадь).

63. Набор по любому из пп. 54–56 или пп. 58–62 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–61, где роговичные эндотелиальные клетки присутствуют в комбинации со средством, обеспечивающим локальную доставку, при плотности 1000–3500 клеток/$мм^2$ (площадь), предпочтительно от 2000 до приблизительно 3000 клеток/$мм^2$ (площадь).

64. Фармацевтический композиция, средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат или набор по любому из п. 11 или пп. 38–63, где соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

65. Популяция клеток по любому из пп. 33–37, или клеточный препарат по любому из пп. 46–51, или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–63, где соединение присутствует только при следовых уровнях концентрации.

66. Средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат или препарат для доставки клеток или набор по любому из пп. 38–65, где

ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

67. Среда для пролиферации клеток, клеточный препарат, препарат для доставки клеток или набор по любому из пп. 41–60, где роговичные эндотелиальные клетки присутствуют и находятся в суспензии.

68. Способ трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение популяции клеток по любому из пп. 33–37 или п. 65 или препарата для доставки клеток по пп. 57–63 или п. 65.

69. Способ трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает увеличение популяции роговичных эндотелиальных клеток путем культивирования указанной популяции в среде для пролиферации клеток по любому из пп. 41–44, или п. 65, или п. 66, ополаскивание увеличенной популяции клеток, по сути для удаления ингибитора LATS, и применение указанных клеток в отношении роговицы указанного субъекта.

70. Способ по п. 69, где указанные выделенные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей до указанного введения.

71. Способ по п. 70, где указанные выделенные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, до указанного введения.

72. Способ трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в глаз субъекта, предусматривающий культивирование популяции роговичных эндотелиальных клеток в среде для пролиферации клеток, которая содержит ингибитор LATS, объединение роговичных эндотелиальных клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, инъецирование смеси в глаз субъекта и осуществление биопечати клеток в глазу посредством нацеливания клеток на роговицу и фиксации на ней с использованием источника света.

73. Способ по любому из пп. 70–71, где указанные выделенные роговичные эндотелиальные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на глазную поверхность посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

74. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием ингибитора LATS.

75. Способ по п. 74, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

76. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

77. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–76, включающий способ ингибирования LATS в популяции клеток по

любому из пп. 12–15 или способ увеличения популяции клеток по любому из пп. 19–32.

78. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 12–15 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 57–63 или пп. 65–67.

79. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–78, где глазное заболевание или нарушение ассоциировано со сниженной плотностью роговичных эндотелиальных клеток.

80. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–79, где глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушение функции эндотелия роговицы.

81. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–80, где глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии), недостаточности трансплантата роговицы, задней полиморфной дистрофии роговицы, врожденной наследственной эндотелиальной дистрофии, сцепленной с X–хромосомой эндотелиальной дистрофии роговицы, аниридии и эндотелита роговицы.

82. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–81, где глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии) и недостаточности трансплантата роговицы.

83. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–82, где способ включает стадии способа по любому из пп. 68–73.

84. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 74–83, где популяцию клеток по любому из пп. 33–37 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–63, или п. 65, или п. 66 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

85. Соединение в соответствии с формулой A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения в терапии или в качестве лекарственного препарата.

86. Соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения при глазном заболевании или нарушении.

87. Ингибитор LATS для применения при глазном заболевании или нарушении, где ингибитор LATS представляет собой соединение.

88. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления

лекарственного препарата.

89. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 12–14, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения глазного заболевания или нарушения.

90. Соединение для применения по п. 85 или п. 86, или ингибитор LATS для применения по п. 87, или применение по п. 88 или п. 89, предусматривающие способ ингибирования LATS в популяции клеток по пп. 12–15, или способ увеличения популяции клеток по любому из пп. 19–32.

91. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или п. 90, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или п. 90, или применение по любому из пп. 88–90, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 33–37 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 57–63 или пп. 65–67.

92. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или п. 90, или п. 91, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87, или п. 90, или п. 91, или применение по любому из пп. 88–91, где глазное заболевание или нарушение ассоциировано со сниженной плотностью роговичных эндотелиальных клеток.

93. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или пп. 90–92, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или пп. 90–92, или применение по любому из пп. 88–92, где глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушение функции эндотелия роговицы.

94. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или пп. 90–93, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или пп. 90–93, или применение по любому из пп. 88–93, где глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии), недостаточности трансплантата роговицы, задней полиморфной дистрофии роговицы, врожденной наследственной эндотелиальной дистрофии, сцепленной с X–хромосомой эндотелиальной дистрофии роговицы, аниридии и эндотелита роговицы.

95. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или пп. 90–94, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или пп. 90–94, или применение по любому из пп. 88–94, где глазное заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из эндотелиальной дистрофии роговицы Фукса, буллезной кератопатии (в том числе псевдофакичной буллезной кератопатии и афакичной буллезной кератопатии) и недостаточности трансплантата роговицы.

96. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или пп. 90–95, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или пп. 90–95, или применение по любому из пп. 88–95, где способ включает стадии способа по любому из пп. 68–73.

97. Соединение для применения по любому из п. 85, или п. 86, или пп. 90–96, или

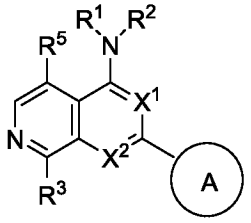
ингибитор LATS для применения по любому из п. 87 или пп. 90–96, или применение по любому из пп. 88–96, где популяцию клеток по любому из пп. 33–37, или препарат для доставки клеток по любому из пп. 57–63 или пп. 65–67 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

98. Модулятор YAP для применения в способе трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в роговицу субъекта, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 33–37 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 57–63 или пп. 65–67.

99. Модулятор YAP для применения в способе лечения нарушения функции эндотелия роговицы, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 33–37 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 57–63 или пп. 65–67.

100. Модулятор YAP по п. 98 или п. 99, где указанный модулятор представляет собой ингибитор LATS.

101. Способ ингибирования LATS в популяции клеток, содержащей лимбальные стволовые клетки, с использованием соединения формулы A1 или его соли:



A1,

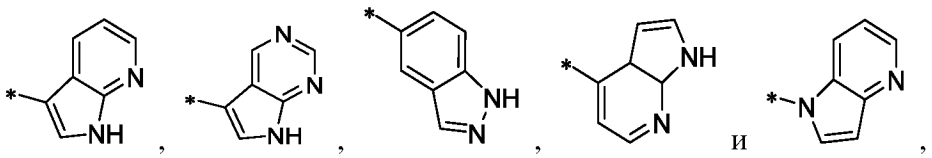
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкил;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2

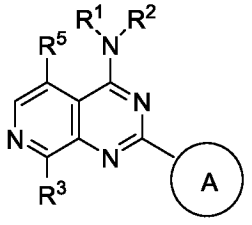
гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

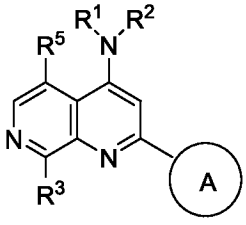
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и незамещен или замещен R^0.

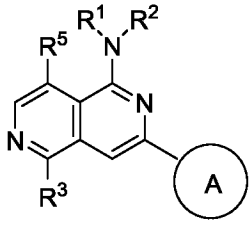
102. Способ ингибирования LATS по п. 101, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



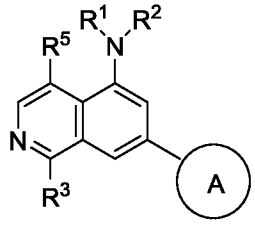
I,



II,



III и



IV.

103. Способ ингибирования LATS по п. 101 или п. 102, где соединение или его соль выбраны из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

104. Способ ингибирования LATS по п. 101, где соединение или его соль представляют собой соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

105. Способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии ингибитора LATS.

106. Способ культивирования клеток по п. 105, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или

соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

107. Способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

108. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки.

109. Способ увеличения популяции клеток по п. 108, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

110. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с увеличением популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки.

111. Способ по любому из пп. 101–110, где указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

112. Способ по любому из пп. 101–111, где соединение присутствует в течение 12–16 дней, где предпочтительно соединение присутствует в течение 14 дней.

113. Способ по любому из пп. 109–112, где с помощью способа достигают более чем 30–кратного увеличения количества высеянных клеток.

114. Способ по любому из пп. 109–113, где с помощью способа достигают 100–2200–кратного, предпочтительно 600–2200–кратного увеличения количества высеянных клеток.

115. Способ по любому из пп. 109–114, где с помощью способа получают популяцию клеток, которая содержит более 20% лимбальных стволовых клеток, где предпочтительно с помощью способа получают популяцию клеток, которая содержит более 50% лимбальных стволовых клеток.

116. Способ по любому из пп. 109–114, где с помощью способа получают популяцию клеток, которая содержит более 20% клеток, экспрессирующих p63–альфа, где предпочтительно с помощью способа получают популяцию клеток, которая содержит 50% клеток, экспрессирующих p63–альфа.

117. Способ по любому из пп. 101–116, где ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

118. Способ по любому из пп. 101–117, где указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование указанных лимбальных стволовых

клеток.

119. Способ по п. 118, где указанное генетическое модифицирование предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

120. Способ по п. 118 или п. 119, где указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически нацеливается на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

121. Способ по п. 120, где указанная система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы редактирования генов CRISPR, системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеаз с "цинковыми пальцами", системы редактирования генов на основе мегануклеаз, технологий редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации, управляемой вектором на основе AAV, и на основе лентивирусных векторов.

122. Способ по любому из пп. 119–121, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C, при этом предпочтительным является B2M.

123. Способ по любому из пп. 108–122, который дополнительно предусматривает стадию b) ополаскивания увеличенной популяции клеток, по сути для удаления соединения в соответствии с настоящим изобретением.

124. Популяция клеток, получаемая с помощью способа по любому из пп. 101–123.

125. Популяция клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 101–123.

126. Выделенная популяция клеток, где более 20% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки, где предпочтительно более 50% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки.

127. Выделенная популяция клеток, где более 70% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки, где предпочтительно более 90% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки.

128. Выделенная популяция клеток, где более 20% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки, где предпочтительно более 50% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки.

129. Выделенная популяция клеток, где более 70% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки, где предпочтительно более 90% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки.

130. Популяция клеток, содержащая лимбальные стволовые клетки, или популяция клеток по любому из пп. 124–129, где одна или несколько указанных клеток содержат не существующую в природе вставку или делецию одного или нескольких остатков нуклеиновой кислоты гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где вставка и/или делеция в результате приводят к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена.

131. Популяция клеток по п. 130, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

132. Популяция клеток по п. 130 или п. 131, где указанный ген представляет собой B2M.

133. Средство, стимулирующее рост лимбальных стволовых клеток, содержащее ингибитор LATS.

134. Средство, стимулирующее рост лимбальных стволовых клеток, по п. 133, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

135. Средство, стимулирующее рост лимбальных стволовых клеток, содержащее соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

136. Среда для пролиферации клеток, содержащая ингибитор LATS и питательную среду.

137. Среда для пролиферации клеток по п. 136, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

138. Среда для пролиферации клеток, содержащая соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 и питательную среду.

139. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 136–138, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и DMEM/F12, которая необязательно дополнена хлоридом кальция; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

140. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 136–139, дополнительно содержащая лимбальные стволовые клетки.

141. Клеточный препарат, содержащий ингибитор LATS и лимбальные стволовые клетки.

142. Клеточный препарат по п. 141, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

143. Клеточный препарат, содержащий соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 и лимбальные стволовые клетки.

144. Клеточный препарат по любому из пп. 141–143, который дополнительно содержит питательную среду, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови

человека, среды X–VIVO15 и DMEM/F12, которая необязательно дополнена хлоридом кальция; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

145. Фармацевтическая композиция по п. 11 или клеточный препарат по любому из пп. 141–144, дополнительно содержащие раствор для консервации или криоконсервации.

146. Фармацевтическая композиция или клеточный препарат по п. 145, где раствор для консервации или криоконсервации содержит раствор, который представляет собой Optisol или PBS, и при этом раствор для криоконсервации дополнительно содержит глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид.

147. Набор содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и ингибитор LATS.

148. Набор по п. 147, где ингибитор LATS представляет собой соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

149. Набор, содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

150. Набор по любому из пп. 147–149, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, или глазные капли для местного применения.

151. Набор по любому из пп. 147–150, дополнительно содержащий лимбальные стволовые клетки.

152. Препарат для доставки клеток, содержащий популяцию клеток по любому из пп. 124–131 или клеточный препарат по любому из пп. 141–146 и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку.

153. Набор по любому из пп. 147–151 или препарат для доставки клеток по п. 152, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу.

154. Набор по любому из пп. 147–151 или п. 153 или препарат для доставки клеток по любому из п. 152 или п. 153, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, выбранное из группы, состоящей из фибрина, коллагена, желатина, целлюлозы, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA, средств, обеспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, поливинилового спирта, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, поливинилпирролидона, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина, коллагена, фибриногена, целлюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилгуара, геллановой камеди, гуаровой камеди, ксантановой камеди и карбоксиметилцеллюлозы, а

также их производных, их сополимеров и их комбинаций.

155. Набор по любому из пп. 147–151, или п. 153, или п. 154 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–154, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa.

156. Набор по любому из пп. 147–155 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–155, где более 20% клеток представляют собой лимбальные стволовые клетки.

157. Набор по любому из пп. 147–155 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–155, где более 20% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки.

158. Набор по любому из пп. 147–157 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–157, где более 70% клеток представляют собой p63–альфа–положительные клетки.

159. Фармацевтическая композиция, средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат или набор по любому из п. 11 или пп. 133–158, где соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

160. Популяция клеток по любому из пп. 124–131, или клеточный препарат из пп. 141–146, или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–158, где соединение присутствует только при следовых уровнях концентрации.

161. Средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат или препарат для доставки клеток или набор по любому из пп. 133–160, где ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

162. Среда для пролиферации клеток, клеточный препарат, препарат для доставки клеток или набор по любому из пп. 136–161, где лимбальные стволовые клетки присутствуют и находятся в суспензии.

163. Способ трансплантации популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает ведение популяции клеток по любому из пп. 124–131 или п. 160 или препарата для доставки клеток по пп. 152–158 или п. 160.

164. Способ трансплантации популяции клеток, содержащих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает увеличение популяции клеток, содержащей лимбальные стволовые клетки, путем культивирования указанной популяции в среде для пролиферации клеток по любому из пп. 136–139, или п. 159, или п. 161, предпочтительно ополаскивание увеличенной популяции клеток, по сути для удаления ингибитора LATS, и применение указанной популяции клеток, содержащей лимбальные стволовые клетки, в отношении роговицы указанного субъекта.

165. Способ по п. 164, где указанную популяцию клеток, содержащую лимбальные

стволовые клетки, объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, до указанного введения.

166. Способ по п. 165, где указанную популяцию клеток, содержащую лимбальные стволовые клетки, объединяют со средством, обеспечивающим локальную доставку, которое представляет собой фибриновый клей, или со средством, обеспечивающим локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу, которая представляет собой GelMA, до указанного введения.

167. Способ по любому из пп. 164–166, где указанную популяцию клеток, содержащую лимбальные стволовые клетки, объединяют с носителем, который представляет собой контактную линзу.

168. Способ по любому из пп. 164–167, где указанную популяцию клеток, содержащую лимбальные стволовые клетки, объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и при этом GelMA полимеризуют на носителе, который представляет собой контактную линзу.

169. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием ингибитора LATS.

170. Способ по п. 169, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

171. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

172. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 169–171, включающий способ ингибирования LATS по любому из пп. 101–104 в популяции клеток или способ увеличения популяции клеток по любому из пп. 108–123.

173. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 124–131 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 152–162.

174. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 169–173, где глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток.

175. Способ профилактики или лечения глазного нарушения или заболевания по любому из пп. 169–174, где глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, термических ожогов, лучевого поражения, аниридии, склерокорнеи, множественной эндокринной неоплазии, синдрома Стивенса–Джонсона, глазного рубцующегося пемфигоида, коллагеноза; хронических неаутоиммунных воспалительных нарушений, возникающих

вследствие применения контактных линз, синдрома сухого глаза, розацеа, стафилококкового краевого кератита, кератита (в том числе бактериального кератита, грибкового и вирусного кератита), птеригиума или новообразования, дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, удаления птеригиума или новообразования, или криотерапии; и дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего вследствие токсического воздействия лекарственного препарата, выбранного из группы, состоящей из консервантов (тимеросал, бензалконий), местных анестетиков, пилокарпина, бета–блокаторов, митомицина, 5–фторурацила, нитрата серебра и лекарственных препаратов для перорального введения, вызывающих синдром Стивенса–Джонсона.

176. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 169–175, где глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, аниридии, синдрома Стивенса–Джонсона и применения контактных линз.

177. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 169–176, где способ включает стадии способа по любому из пп. 163–168.

178. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 169–177, где популяцию клеток по любому из пп. 124–131 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 152–158 или пп. 160–162 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

179. Соединение в соответствии с формулой A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения в терапии или в качестве лекарственного препарата.

180. Соединение в соответствии с формулой A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения при глазном заболевании или нарушении.

181. Ингибитор LATS для применения при глазном заболевании или нарушении, где ингибитор LATS представляет собой соединение.

182. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления лекарственного препарата.

183. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 101–103, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения глазного заболевания или нарушения.

184. Соединение для применения по п. 179 или п. 180, или ингибитор LATS для применения по п. 181, или применение по п. 182 или п. 183, включающие способ ингибирования LATS в популяции клеток по пп. 101–104, или способ увеличения

популяции клеток по любому из пп. 108–123.

185. Соединение для применения по любому из пп. 179–180 или п. 184, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181 или п. 184, или применение по любому из пп. 182–184, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 124–131 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 152–162.

186. Соединение для применения по любому из п. 180, п. 184, п. 185, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181, п. 184, п. 185, или применение по любому из пп. 183–185, где глазное заболевание или нарушение представляет собой нарушение функции эндотелия роговицы.

187. Соединение для применения по любому из п. 180, пп. 184–186, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181, пп. 184–186, или применение по любому из п. 183, пп. 184–186, где глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, термических ожогов, лучевого поражения, аниридии, склерокорнеи, множественной эндокринной неоплазии, синдрома Стивенса–Джонсона, глазного рубцующегося пемфигоида, коллагеноза; хронических неаутоиммунных воспалительных нарушений, возникающих вследствие применения контактных линз, синдрома сухого глаза, розацеа, стафилококкового краевого кератита, кератита (в том числе бактериального кератита, грибкового и вирусного кератита), птеригиума или новообразования, дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего после нескольких офтальмологических оперативных вмешательств, удаления птеригиума или новообразования, или криотерапии; и дефицита лимбальных стволовых клеток, возникающего вследствие токсического воздействия лекарственного препарата, выбранного из группы, состоящей из консервантов (тимеросал, бензалконий), местных анестетиков, пилокарпина, бета–блокаторов, митомицина, 5–фторурацила, нитрата серебра и лекарственных препаратов для перорального введения, вызывающих синдром Стивенса–Джонсона.

188. Соединение для применения по любому из п. 180, пп. 184–187, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181, пп. 184–187, или применение по любому из п. 183, пп. 184–187, где глазное заболевание или нарушение представляет собой дефицит лимбальных стволовых клеток, который возникает вследствие повреждения или нарушения, выбранного из группы, состоящей из химических ожогов, аниридии, синдрома Стивенса–Джонсона и применения контактных линз.

189. Соединение для применения по любому из п. 180, пп. 184–188, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181, пп. 184–188, или применение по любому из п. 183, пп. 184–188, где способ включает стадии способа по любому из пп. 163–168.

190. Соединение для применения по любому из п. 180, пп. 184–189, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 181, пп. 184–189, или применение по любому из п. 183, пп. 184–189, где популяцию клеток по любому из пп. 124–131, или препарат для

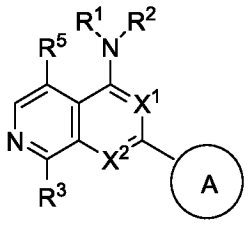
доставки клеток по любому из пп. 152–162 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

191. Модулятор YAP для применения в способе трансплантации популяции клеток, включающих лимбальные стволовые клетки, на роговицу субъекта, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 124–131 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 152–162.

192. Модулятор YAP для применения в способе лечения дефицита лимбальных стволовых клеток, предусматривающем введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 124–131 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 152–162.

193. Модулятор YAP по п. 191 или п. 192, где указанный модулятор представляет собой ингибитор LATS.

194. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли



A1,

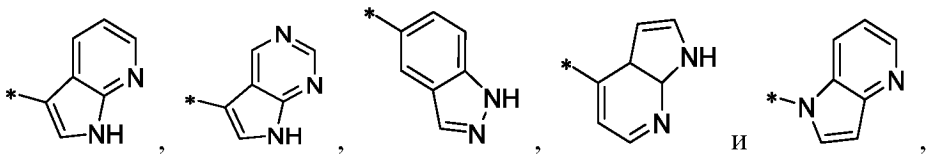
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2

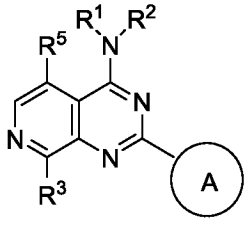
гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, –C(O)R^0 и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –C(O)R^0;

или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

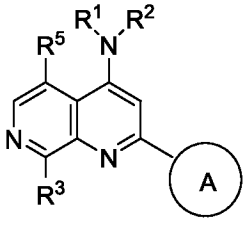
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и незамещен или замещен R^0.

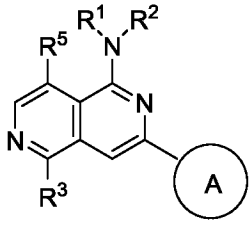
195. Способ по п. 194, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



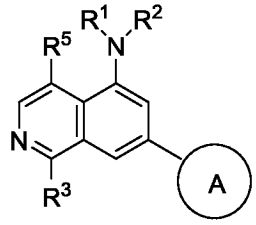
I,



II,



III и



IV.

196. Способ по п. 194, где соединение или его фармацевтически приемлемая соль выбраны из:

2–метил–1–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)пропан–2–ола;

диметил(3–метил–3–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}бутил)амина;

N–(1–амино–2–метилпропан–2–ил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

8–метил–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–(трет–бутил)–5–хлор–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

5–хлор–N–(1–метилциклопропил)–2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

N–трет–бутил–2–(пиримидин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина;

2–(2–аминопиримидин–4–ил)–N–трет–бутил–1,7–нафтиридин–4–амина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

N^1,N^1,3–триметил–N^3–(2–(3–метил–1H–пиразол–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–1,3–диамина;

2,2–диметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

2,3–диметил–N^2–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)бутан–2,3–диамина;

N^1,N^1,2,2–тетраметил–N^3–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,3–диамина;

4–(4–(трет–бутиламино)пиридо[3,4–d]пиримидин–2–ил)–1,2,5–оксадиазол–3–амина и

N^2,N^2,2–триметил–N^1–(2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил)пропан–1,2–диамина.

197. Способ по п. 194, где соединение или его фармацевтически приемлемая соль представляют собой по любому из пп. 1–10.

198. Способ по любому из пп. 194–197, где стимулирование регенерации печени и компенсаторного роста печени предусматривает лечение недостаточного компенсаторного роста печени после трансплантации маргинальных трансплантатов; поддержание усиленного компенсаторного роста остаточной массы печени после обширной гепатэктомии; регенерацию печени у пациентов после острой печеночной недостаточности, возникающей вследствие вирусного гепатита, повреждения печени, индуцированного лекарственным средством, аутоиммунного гепатита, ишемической болезни печени и застойной болезни печени; и лечение хронического повреждения печени и сопутствующего фиброза печени, возникающих вследствие неалкогольного стеатогепатита, алкогольного стеатогепатита, хронического вирусного гепатита B и C, гемохроматоза, дефицита альфа–1–антитрипсина, болезни Вильсона и фиброза, индуцированного лекарственным средством.

199. Способ стимулирования регенерации печени и компенсаторного роста печени, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток.

200. Способ по п. 199, где средство представляет собой соединение по любому из пп. 1–10.

201. Способ ex vivo увеличения популяции клеток печени, который предусматривает приведение в контакт клеток печени с соединением по любому из пп. 1–10.

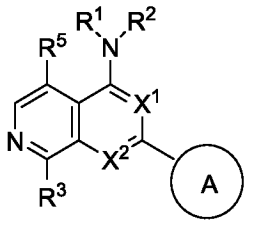
202. Способ по п. 201, где указанный дополнительно предусматривает редактирование гена в указанных клетках печени.

203. Способ по п. 201 или п. 202, где клетки печени представляют собой печеночные клетки–предшественники.

204. Клетки печени, полученные с помощью способа по п. 201 или п. 202.

205. Клетки печени по п. 204, где клетки печени представляют собой печеночные клетки–предшественники.

206. Способ стимулировании заживления ран, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы A1 или его фармацевтически приемлемой соли:



A1,

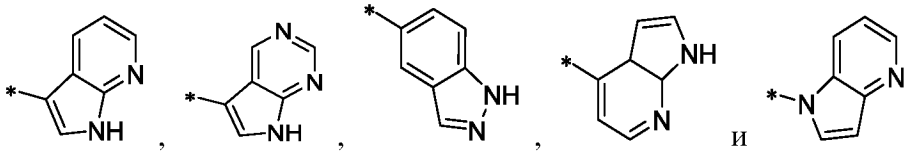
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(a) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(i) галогена;

(ii) циано;

(iii) оксо;

(iv) C_2алкенила;

(v) C_2алкинила;

(vi) C_{1-6}галогеналкила;

(vii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(viii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(ix) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(x) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xiii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xiv) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xv) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(b) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(c) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(d) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(e) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или –

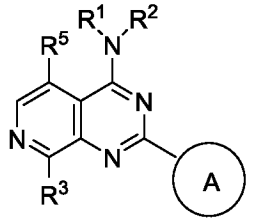
$C(O)R^0$;

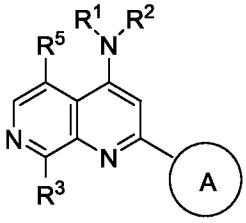
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

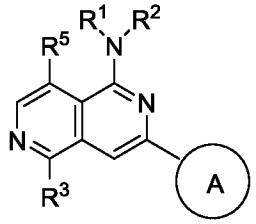
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

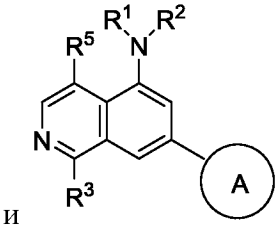
R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и незамещен или замещен R^0.

207. Способ по п. 206, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



I,


II,


III и


IV.

208. Способ по п. 206, где соединение или его фармацевтически приемлемая соль выбраны из 2–(2–метил–2–{[2–(пиридин–4–ил)пиридо[3,4–d]пиримидин–4–ил]амино}пропокси)этан–1–ола, 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

209. Способ по п. 206, где соединение или его фармацевтически приемлемая соль представляют собой по любому из пп. 1–10.

210. Способ по любому из пп. 206–209, где стимулирование заживления ран предусматривает лечение или уменьшение интенсивности симптомокомплекса при ожогах, острых кожных язвах и хронических кожных язвах.

211. Способ по п. 210, где хроническая кожная язва выбрана из диабетических язв, пролежневых язв и трофических язв.

212. Способ по п. 210, где хроническая кожная язва выбрана из варикозных язв

нижних конечностей, язв, обусловленных синдромом диабетической стопы и пролежней.

213. Способ стимулировании заживления ран, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества средства, способного к ингибированию активности киназ LATS; с индуцированием тем самым транслокации YAP и осуществлением управления экспрессией генов нисходящих сигнальных каскадов, вовлеченных в пролиферацию клеток.

214. Способ по п. 213, где средство представляет собой соединение по любому из пп. 1–10.

215. Популяция клеток, содержащая клетки с отредактированным геном, где клетки с отредактированным геном были культивированы в среде, содержащей соединение по любому из пп. 1–10.

216. Популяция клеток по п. 215, где отредактированный ген представляет собой ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где редактирование гена приводит к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена.

217. Популяция клеток по п. 216, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

218. Популяция клеток по п. 216 или п. 217, где указанный ген представляет собой B2M.

219. Популяция клеток по любому из пп. 215–218, где клетки с отредактированным геном представляют собой лимбальные стволовые клетки или роговичные эндотелиальные клетки.

220. Способ ex vivo увеличения популяции клеток, который предусматривает приведение в контакт клеток печени с соединением по любому из пп. 1–10.

221. Способ по п. 220, где указанный дополнительно предусматривает редактирование гена в указанных клетках.

222. Способ по п. 220 или п. 221, где клетки представляют собой клетки глаза, эпителиальные клетки, нервные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, базальные стволовые клетки легких, эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки взрослых, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или клетки печени.

223. Способ по любому из пп. 220–222, где клетки представляют собой клетки глаза, клетки печени или эпителиальные клетки кожи.

224. Способ по любому из пп. 220–223, где клетки представляют собой клетки глаза, предпочтительно роговичные эндотелиальные клетки или лимбальные стволовые клетки.

225. Клетки, полученные с помощью способа по любому из пп. 220–224.

226. Способ клеточной терапии ex vivo, который предусматривает приведение в контакт клеток с соединением по любому из пп. 1–10.

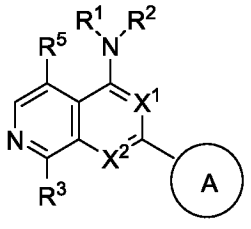
227. Способ клеточной терапии ex vivo по п. 226, при котором в клетках был отредактирован ген.

228. Способ клеточной терапии ex vivo по п. 226 или п. 227, где клеточная терапия выбрана из группы, состоящей из трансплантации стволовых клеток, регенерации ткани, клеточной иммунотерапии и генной терапии.

229. Способ клеточной терапии ex vivo по любому из пп. 226–228, где трансплантация стволовых клеток выбрана из группы, состоящей из трансплантации гематопоэтических стволовых клеток, трансплантации аутологичных стволовых клеток, трансплантации стволовых клеток пуповинной крови и трансплантации лимбальных стволовых клеток.

230. Способ клеточной терапии ex vivo по п. 228 или п. 229, где трансплантация стволовых клеток представляет собой трансплантацию лимбальных стволовых клеток.

231. Способ ингибирования LATS в популяции клеток с использованием соединения формулы A1 или его соли:



A1,

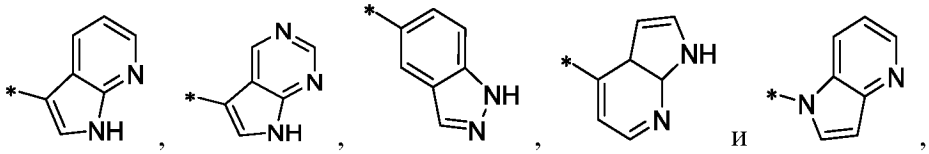
где

каждый из X^1 и X^2 независимо представляет собой CH или N;

кольцо A представляет собой

(a) 5– или 6–членный моноциклический гетероарил, который соединен с остальной частью молекулы через член углеродного кольца и содержит в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, которые независимо выбраны из N, O и S, при условии, что по меньшей мере один член гетероатомного кольца представляет собой незамещенный азот (–N=), расположенный в 3– или 4–положении относительно связывающего члена углеродного кольца 5–членного гетероарила или в пара–положении кольца 6–членного гетероарила; или

(b) 9–членный конденсированный бициклический гетероарил, который выбран из



где "*" представляет собой точку присоединения кольца A к остальной части молекулы;

где кольцо A не замещено или замещено 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, циано, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, C_{3-6}циклоалкила и фенилсульфонила;

R^0 представляет собой гидроксил или C_{1-6}алкокси;

R^1 представляет собой водород или C_{1-6}алкил;

R^2 выбран из

(f) C_{1-8}алкила, который не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из

(xvi) галогена;

(xvii) циано;

(xviii) оксо;

(xix) C_2алкенила;

(xx) C_2алкинила;

(xxi) C_{1-6}галогеналкила;

(xxii) $–OR^6$, где R^6 выбран из водорода, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

(xxiii) $–NR^{7a}R^{7b}$, где R^{7a} представляет собой водород или C_{1-6}алкил, и R^{7b} выбран из водорода, $–C(O)R^0$, C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен $–C(O)R^0$;

(xxiv) $–C(O)R^8$, где R^8 представляет собой R^0 или $–NH–C_{1-6}$алкил$–C(O)R^0$;

(xxv) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(xxvi) моноциклического C_{3-6}циклоалкила или полициклического C_{7-10}циклоалкила, каждый из которых не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, гидроксиC_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила, R^0, $–NH_2$, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xxvii) 6–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из гидроксила, галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}алкиламино и ди–(C_{1-6}алкил)амино;

(xxviii) фенила, который не замещен или замещен галогеном;

(xxix) 5– или 6–членного моноциклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–4 гетероатома, независимо выбранных из N и O; и

(xxx) 9– или 10–членного конденсированного бициклического гетероарила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, независимо выбранных из N и O;

(g) $–S(O)_2C_{1-6}$алкила;

(h) фенила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила и R^0;

(i) C_{3-6}циклоалкила, который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$; и

(j) 4–членного гетероциклоалкила, содержащего в качестве членов кольца 1–2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и который не замещен или замещен 1–2 заместителями, независимо выбранными из C_{1-6}галогеналкила, R^0, C_{1-6}алкиламино, ди–(C_{1-6}алкил)амино, $–C(O)R^0$ и C_{1-6}алкила, который не замещен или замещен R^0 или $–C(O)R^0$;

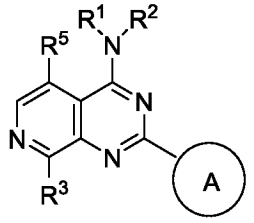
или R^1 и R^2 могут быть взяты вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, с образованием 4–6–членного гетероциклоалкила, который может содержать в качестве

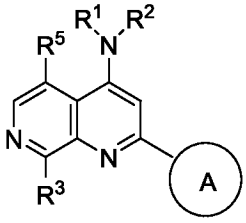
членов кольца 1–2 дополнительных гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, где 4–6–членный гетероциклоалкил, образованный за счет R^1 и R^2, взятых вместе с атомом азота, с которым они оба связаны, не замещен или замещен 1–3 заместителями, независимо выбранными из галогена, C_{1-6}алкила, C_{1-6}галогеналкила и R^0;

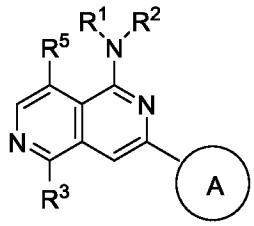
R^3 выбран из водорода, галогена и C_{1-6}алкила; и

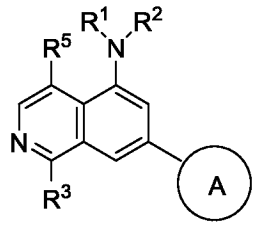
R^5 выбран из водорода, галогена и –NH–(3–8–членный гетероалкил), где 3–8–членный гетероC_{3-8}алкил в –NH–(3–8–членный гетероалкил) содержит 1–2 атома кислорода в качестве членов цепи и незамещен или замещен R^0.

232. Способ ингибирования LATS по п. 231, где соединение представляет собой соединение формулы, выбранной из формул I–IV:



I,


II,


III и


IV.

233. Способ ингибирования LATS в популяции клеток по п. 231 или п. 232, где соединение или его соль выбраны из 3–(пиридин–4–ил)–N–(1–(трифторметил)циклопропил)–2,6–нафтиридин–1–амина; N–(1–метилциклопропил)–7–(пиридин–4–ил)изохинолин–5–амина; 2–(пиридин–4–ил)–4–(3–(трифторметил)пиперазин–1–ил)пиридо[3,4–d]пиримидина; N–(трет–бутил)–2–(пиридин–4–ил)–1,7–нафтиридин–4–амина и N–метил–2–(пиридин–4–ил)–N–[(2S)–1,1,1–трифторпропан–2–ил]пиридо[3,4–d]пиримидин–4–амина.

234. Способ ингибирования LATS по п. 231, где соединение или его соль представляют собой соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

235. Способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих клетки глаза, в присутствии ингибитора LATS.

236. Способ культивирования клеток по п. 235, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

237. Способ культивирования клеток, предусматривающий культивирование популяции клеток, включающих клетки глаза, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

238. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a)

культивирования высеянной популяции клеток, включающих клетки глаза, в присутствии ингибитора LATS с увеличением популяции клеток, включающих клетки глаза.

239. Способ увеличения популяции клеток по п. 238, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

240. Способ увеличения популяции клеток, предусматривающий стадию a) культивирования высеянной популяции клеток, включающих клетки глаза, в присутствии соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с увеличением популяции клеток, включающих клетки глаза.

241. Способ по любому из пп. 231–240, где указанное соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

242. Способ по любому из пп. 231–241, где ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

243. Способ по любому из пп. 231–242, где указанный способ дополнительно предусматривает генетическое модифицирование указанных клеток глаза.

244. Способ по п. 243 где указанное генетическое модифицирование предусматривает снижение или устранение экспрессии и/или функции гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

245. Способ по п. 243 или п. 244, где указанное генетическое модифицирование предусматривает введение в указанную клетку системы редактирования генов, которая специфически целенаправленно воздействует на ген, ассоциированный с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина.

246. Способ по п. 245, где указанная система редактирования генов выбрана из группы, состоящей из системы редактирования генов CRISPR, системы редактирования генов TALEN, системы редактирования генов на основе нуклеаз с "цинковыми пальцами", системы редактирования генов на основе мегануклеаз, технологий редактирования генома посредством гомологичной рекомбинации, управляемой вектором на основе AAV, и на основе лентивирусных векторов.

247. Способ по любому из пп. 244–246, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

248. Способ по любому из пп. 231–247, который предусматривает после получения увеличенной популяции клеток дополнительную стадию ополаскивания этих клеток, по сути для удаления соединения.

249. Популяция клеток, получаемая с помощью способа по любому из пп. 231–248.

250. Популяция клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 231–248.

251. Популяция клеток, содержащая клетки глаза, или популяция клеток по п. 249 или п. 250, где одна или несколько указанных клеток содержат не существующую в

природе вставку или делецию одного или нескольких остатков нуклеиновой кислоты гена, ассоциированного с обеспечением иммунной реакции трансплантат против хозяина, где вставка и/или делеция в результате приводят к снижению или устранению экспрессии или функции указанного гена.

252. Популяция клеток по п. 251, где указанный ген выбран из группы, состоящей из B2M, HLA–A, HLA–B и HLA–C.

253. Популяция клеток по п. 251 или п. 252, где указанный ген представляет собой B2M.

254. Средство, стимулирующее рост клеток глаза, содержащее ингибитор LATS.

255. Средство, стимулирующее рост клеток глаза, по п. 254, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

256. Средство, стимулирующее рост клеток глаза, содержащее соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

257. Среда для пролиферации клеток, содержащая ингибитор LATS и питательную среду.

258. Среда для пролиферации клеток по п. 257, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

259. Среда для пролиферации клеток, содержащая соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 и питательную среду.

260. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 257–259, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками среды; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

261. Среда для пролиферации клеток по любому из пп. 257–260, дополнительно содержащая клетки глаза.

262. Клеточный препарат, содержащий ингибитор LATS и клетки глаза.

263. Клеточный препарат по п. 262, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

264. Клеточный препарат, содержащий соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10

и клетки глаза.

265. Клеточный препарат по любому из пп. 262–264, который дополнительно содержит питательную среду, где питательная среда выбрана из группы, состоящей из

среды Игла, модифицированной Дульбекко, дополненной фетальной бычьей сывороткой, бессывороточной среды для эндотелиальных клеток человека с сывороткой крови человека, среды X–VIVO15 и кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками среды; при этом предпочтительной является среда X–VIVO15.

266. Фармацевтическая композиция по п. 11 или клеточный препарат по любому из пп. 262–265, дополнительно содержащие раствор для консервации или криоконсервации.

267. Фармацевтическая композиция или клеточный препарат по п. 266, где раствор для консервации или криоконсервации содержит раствор, который представляет собой Optisol или PBS, и при этом раствор для криоконсервации дополнительно содержит глицерин, диметилсульфоксид, пропиленгликоль или ацетамид.

268. Набор содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и ингибитор LATS.

269. Набор по п. 268, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

270. Набор, содержащий композицию, подходящую для доставки в глаз, и соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

271. Набор по любому из пп. 268–270, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, или глазные капли для местного применения.

272. Набор по любому из пп. 268–271, дополнительно содержащий клетки глаза.

273. Препарат для доставки клеток, содержащий популяцию клеток по любому из пп. 249–253 или клеточный препарат по любому из пп. 262–267 и композицию, подходящую для доставки в глаз, которая представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку.

274. Набор по любому из пп. 268–272 или препарат для доставки клеток по п. 273, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой биологическую матрицу.

275. Набор по любому из пп. 268–272 или п. 274 или препарат для доставки клеток по любому из п. 273 или п. 274, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, выбранное из группы, состоящей из фибрина, коллагена, желатина, целлюлозы, амниотической мембраны, фибринового клея, полиэтилен(гликоль)диакрилата (PEGDA), GelMA, средств, обеспечивающих локальную доставку, содержащих полимер, сшитый полимер или гидрогель, содержащий одно или несколько из гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полиэтиленоксида, полипропиленоксида, полоксамера, поливинилового спирта, полиакриловой кислоты, полиметакриловой кислоты, поливинилпирролидона, сополимера лактида и гликолида, альгината, желатина,

коллагена, фибриногена, целлюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилгуара, геллановой камеди, гуаровой камеди, ксантановой камеди и карбоксиметилцеллюлозы, а также их производных, их сополимеров и их комбинаций.

276. Набор по любому из пп. 268–272, или п. 274, или п. 275 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 273–275, где композиция, подходящая для доставки в глаз, представляет собой средство, обеспечивающее локальную доставку, которое представляет собой GelMa.

277. Фармацевтическая композиция, средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат или набор по любому из п. 11 или пп. 254–276, где соединение присутствует в концентрации от 0,5 до 100 микромоль, предпочтительно от 0,5 до 25 микромоль, более предпочтительно от 1 до 20 микромоль, в частности предпочтительно от приблизительно 3 до 10 микромоль.

278. Популяция клеток по любому из пп. 249–253, или препарат на основе клеток по любому из пп. 262–267, или препарат для доставки клеток по любому из пп. 273–276, где соединение присутствует только при следовых уровнях концентрации.

279. Средство, стимулирующее рост, среда для пролиферации клеток, клеточный препарат, или препарат для доставки клеток, или набор по любому из пп. 254–278, где ингибитор LATS ингибирует LATS1 и LATS2.

280. Среда для пролиферации клеток, клеточный препарат, препарат для доставки клеток или набор по любому из пп. 257–276, где клетки глаза присутствуют и находятся в суспензии.

281. Способ трансплантации популяции роговичных эндотелиальных клеток в роговицу субъекта, при этом указанный способ предусматривает введение популяции клеток по любому из пп. 33–37 или п. 65 или препарата для доставки клеток по пп. 57–63 или п. 65.

282. Способ трансплантации популяции клеток глаза субъекту, при этом указанный способ предусматривает увеличение популяции клеток глаза путем культивирования указанной популяции в среде для пролиферации клеток по любому из пп. 257–260, или п. 278, или п. 279, ополаскивание увеличенной популяции клеток, по сути для удаления ингибитора LATS, и введение указанных клеток указанному субъекту.

283. Способ по п. 282, где указанные выделенные клетки глаза объединяют с биологической матрицей до указанного введения.

284. Способ по п. 283, где указанные выделенные клетки глаза объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, до указанного введения.

285. Способ трансплантации популяции клеток глаза в глаз субъекта, предусматривающий культивирование популяции клеток глаза в среде для пролиферации клеток, которая содержит ингибитор LATS, объединение клеток глаза с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, инъецирование смеси в глаз субъекта и осуществление биопечати клеток в глазу посредством нацеливания клеток

на роговицу и фиксации на ней с использованием источника света.

286. Способ по любому из пп. 283–284, где указанные выделенные клетки глаза объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на глазную поверхность посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

287. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием ингибитора LATS.

288. Способ по п. 287, где ингибитор LATS представляет собой соединение формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10.

289. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения с использованием соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10.

290. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 287–289, включающий способ ингибирования LATS в популяции клеток по любому из пп. 231–234 или способ увеличения популяции клеток по любому из пп. 238–248.

291. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 231–234 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 273–276 или пп. 278–280.

292. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 287–291, где способ включает стадии способа по любому из пп. 281–286.

293. Способ профилактики или лечения глазного заболевания или нарушения по любому из пп. 287–291, где популяцию клеток по любому из пп. 249–253 или препарат для доставки клеток по любому из пп. 273–276, или п. 278, или п. 279 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

294. Соединение в соответствии с формулой A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения в терапии или в качестве лекарственного препарата.

295. Соединение в соответствии с формулой A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединение или его соль по любому из пп. 1–10 для применения при глазном заболевании или нарушении.

296. Ингибитор LATS для применения при глазном заболевании или нарушении, где ингибитор LATS представляет собой соединение.

297. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп. 231–233, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления лекарственного препарата.

298. Применение соединения формулы A1, которое определено в любом из пп.

231–233, или соединения или его соли по любому из пп. 1–10 с целью изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения глазного заболевания или нарушения.

299. Соединение для применения по п. 294 или п. 295, или ингибитор LATS для применения по п. 296, или применение по п. 297 или п. 298, включающие способ ингибирования LATS в популяции клеток по пп. 231–235 или способ увеличения популяции клеток по любому из пп. 238–248.

300. Соединение для применения по любому из п. 294, или п. 295, или п. 299, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 298 или п. 299, или применение по любому из пп. 297–299, предусматривающие введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества популяции клеток по любому из пп. 249–253 или препарата для доставки клеток по любому из пп. 273–276 или пп. 278–280.

301. Соединение для применения по любому из п. 294, или п. 295, или п. 299, или п. 300, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 296 или п. 299, или применение по любому из пп. 297–300, где способ включает стадии способа по любому из пп. 281–286.

302. Соединение для применения по любому из п. 294, или п. 295, или п. 299, или п. 300, или ингибитор LATS для применения по любому из п. 296 или пп. 299–301, или применение по любому из пп. 295–301, где популяцию клеток по любому из пп. 249–253, или препарат для доставки клеток по любому из пп. 273–276 или пп. 278–280 вводят одновременно или последовательно со средством или средствами, выбранными из группы, состоящей из дексаметазона, циклоспорина, тобрамицина и цефазолина.

303. Способ трансплантации популяции выделенных клеток в глаз субъекта, предусматривающий объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, инъецирование смеси в глаз субъекта и осуществление биопечати клеток в глазу путем нацеливания клеток в глаз и их фиксации в нем с использованием источника света.

304. Способ по п. 303, где выделенные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на роговицу посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

305. Способ по п. 303 или п. 304, где источник света испускает свет с длиной волны в диапазоне от 350 нм до 700 нм.

306. Способ по любому из пп. 303–305, где длина волны составляет от 350 нм до 420 нм.

307. Способ по любому из пп. 303–306, где длина волны составляет 365 нм.

308. Способ по любому из пп. 303–307, где выделенные клетки представляют собой роговичные эндотелиальные клетки.

309. Способ трансплантации популяции выделенных клеток в глаз субъекта, предусматривающий объединение клеток с биологической матрицей с образованием смеси клетка/биологическая матрица, нанесение смеси на глаз субъекта и осуществление

биопечати клеток на глазу путем нацеливания клеток на глаз и их фиксации на нем с использованием источника света.

310. Способ по п. 309, где выделенные клетки объединяют с биологической матрицей, которая представляет собой GelMA, и наносят на глазную поверхность посредством биопечати с помощью полимеризации GelMA посредством светоинициируемой реакции.

311. Способ по п. 309 или п. 310, где источник света испускает свет с диной волны в диапазоне от 350 нм до 700 нм.

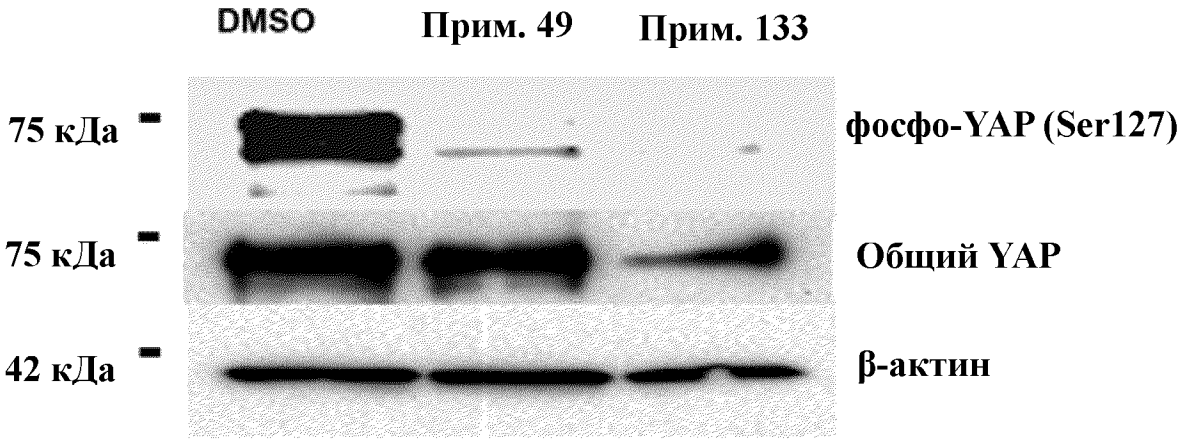
312. Способ по любому из пп. 309–311, где длина волны составляет от 350 нм до 420 нм.

313. Способ по любому из пп. 309–312, где длина волны составляет 365 нм.

314. Способ по любому из пп. 309–313, где выделенные клетки представляют лимбальные стволовые клетки.

По доверенности

Фиг. 1

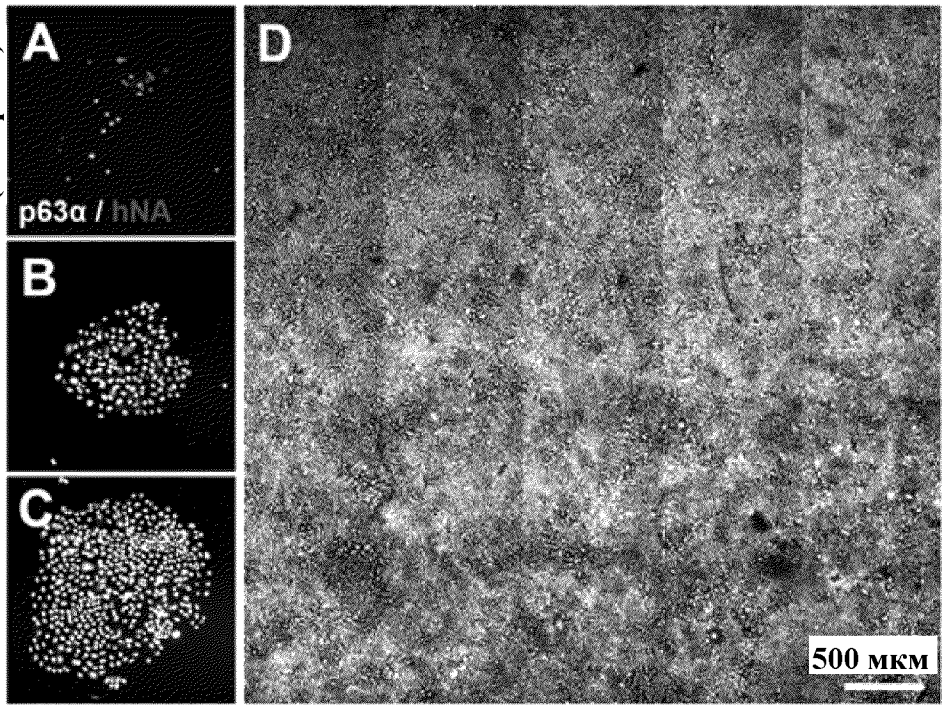

DMSO
Прим. 49
Прим. 133
75 кДа
фосфо-YAP (Ser127)
75 кДа
Общий YAP
42 кДа
β-актин

Фиг. 2A

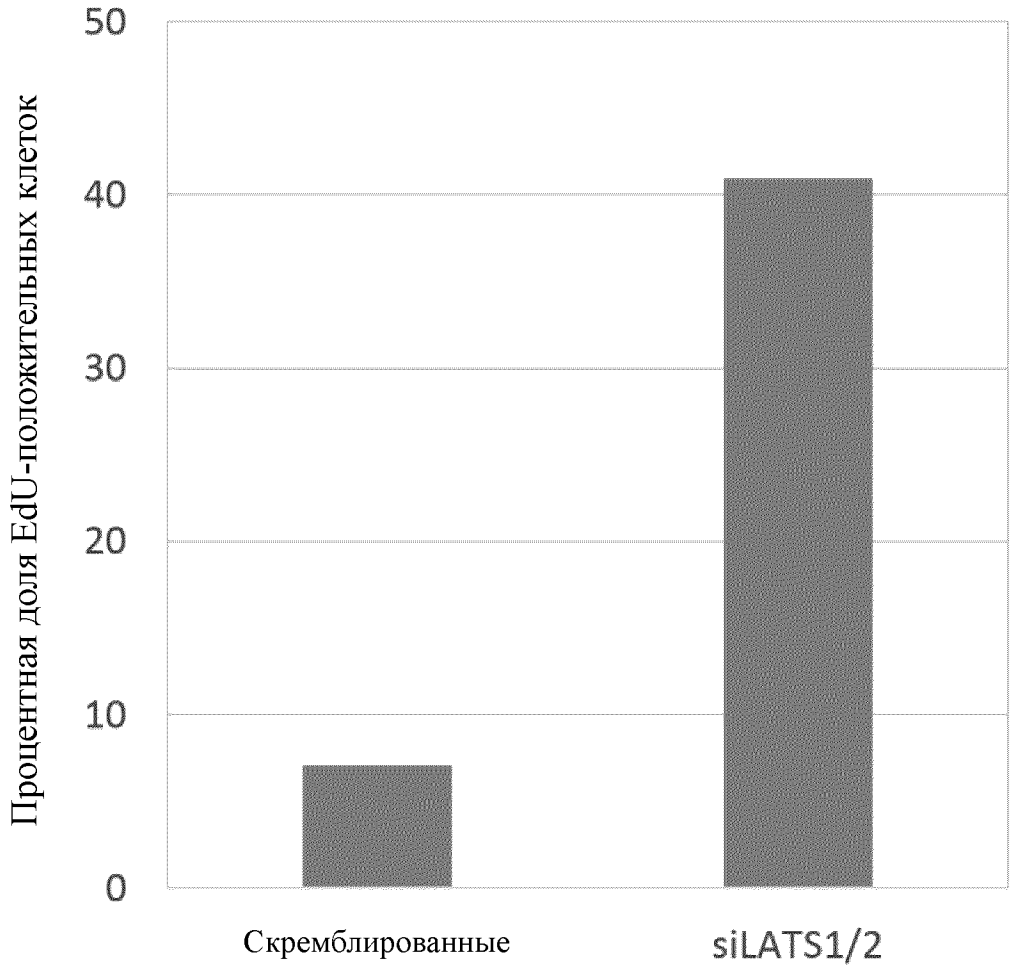
Фиг. 2B

Фиг. 2C

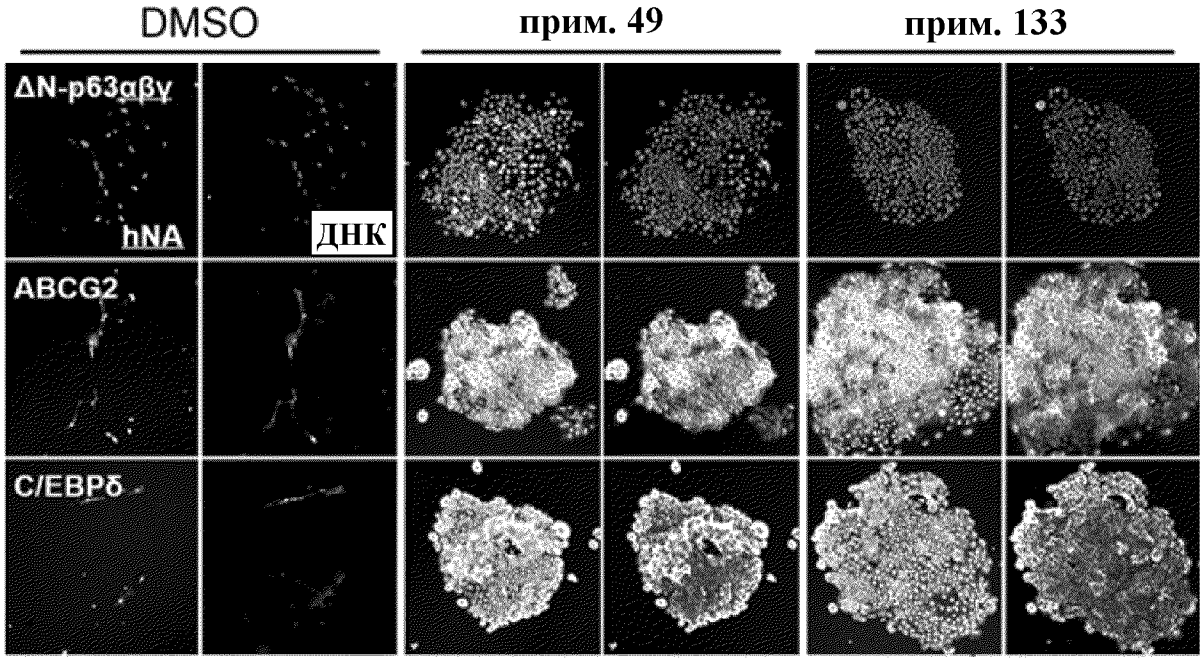
Фиг. 2D



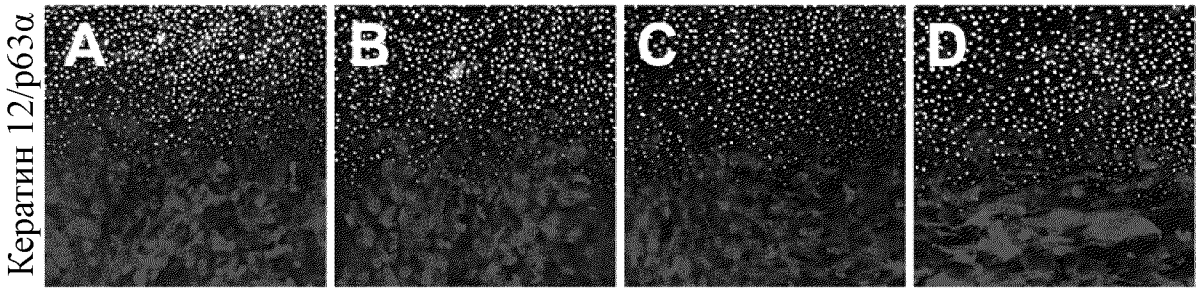
Фиг. 3


Процентная доля EdU-положительных клеток
50
40
30
20
10
0
Скремблированные
siLATS1/2

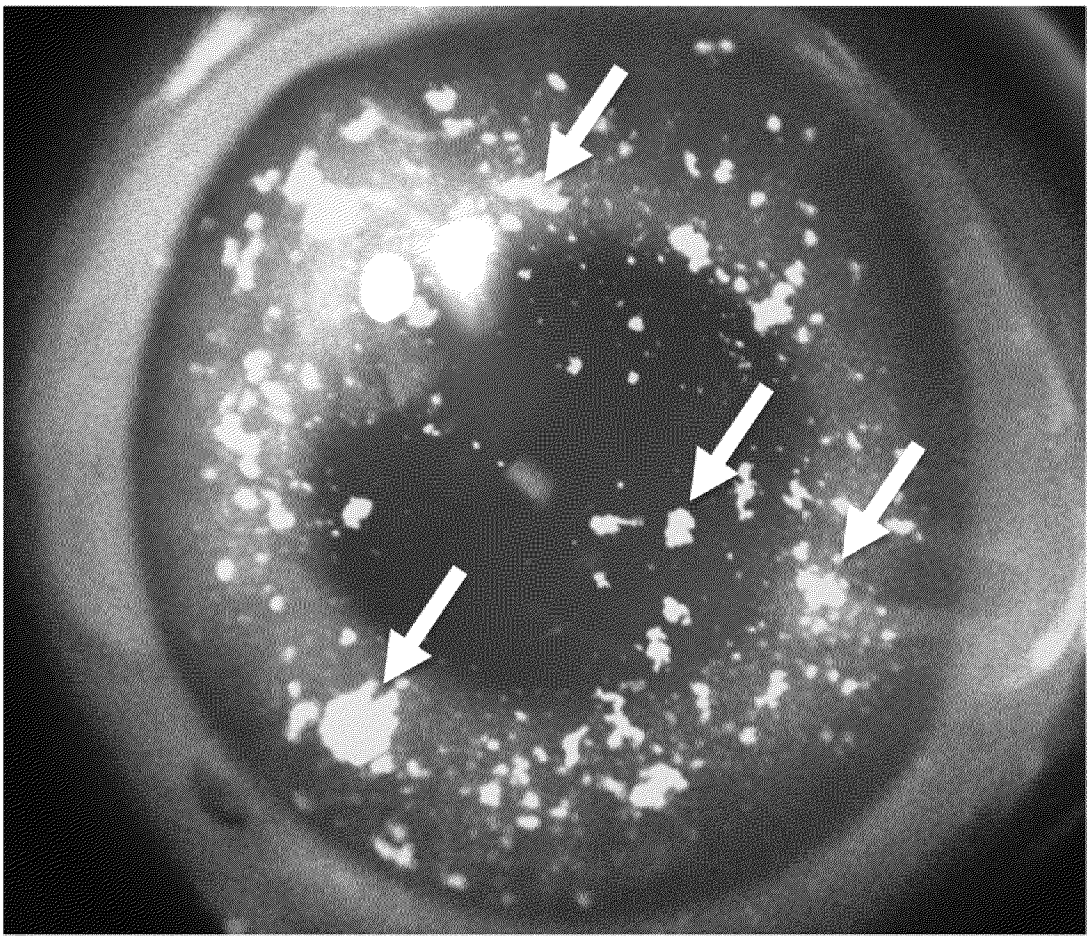
Фиг. 4



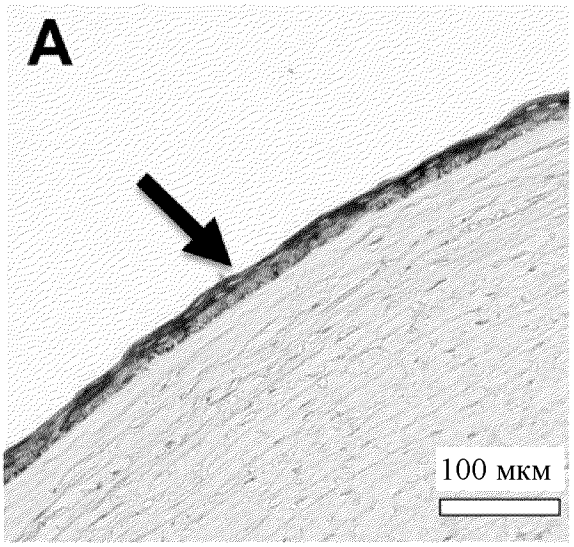
Фиг. 5A **Фиг. 5B** **Фиг. 5C** **Фиг. 5D**



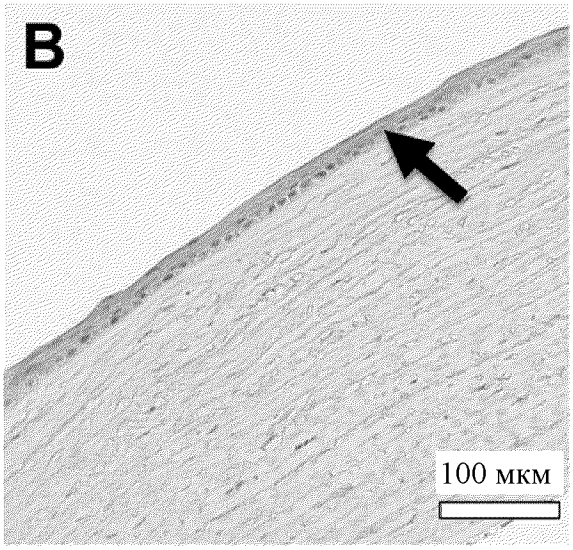
Фиг. 6

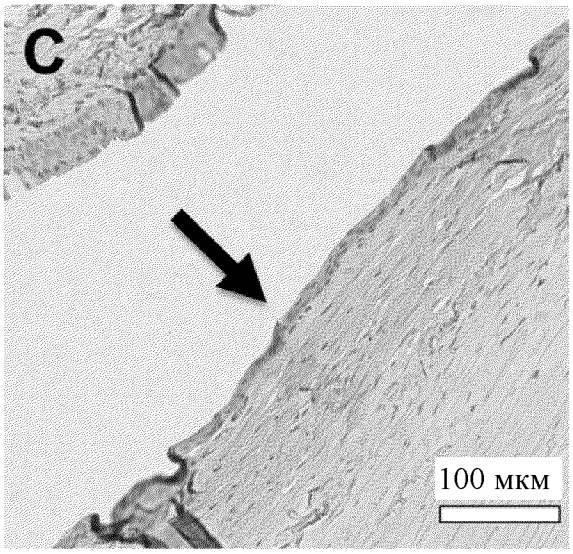


Фиг. 7A

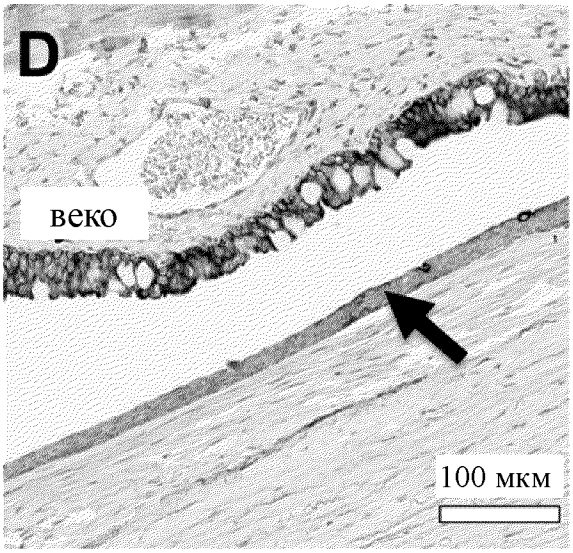


Фиг. 7B



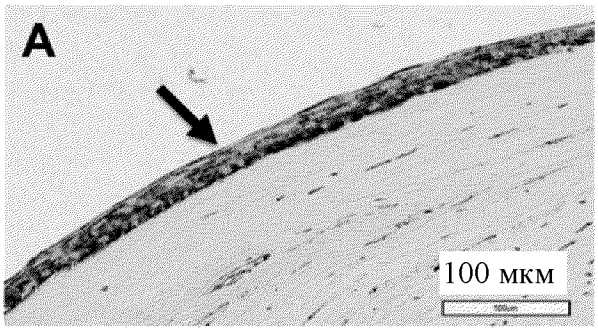


Фиг. 7C

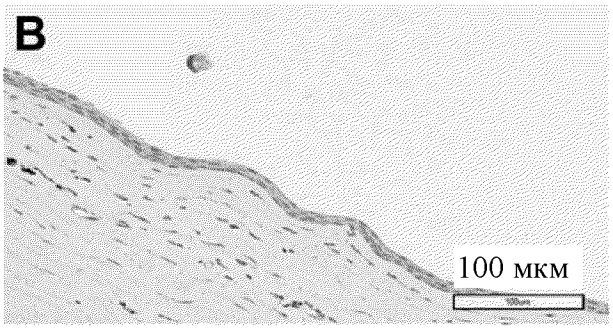


Фиг. 7D

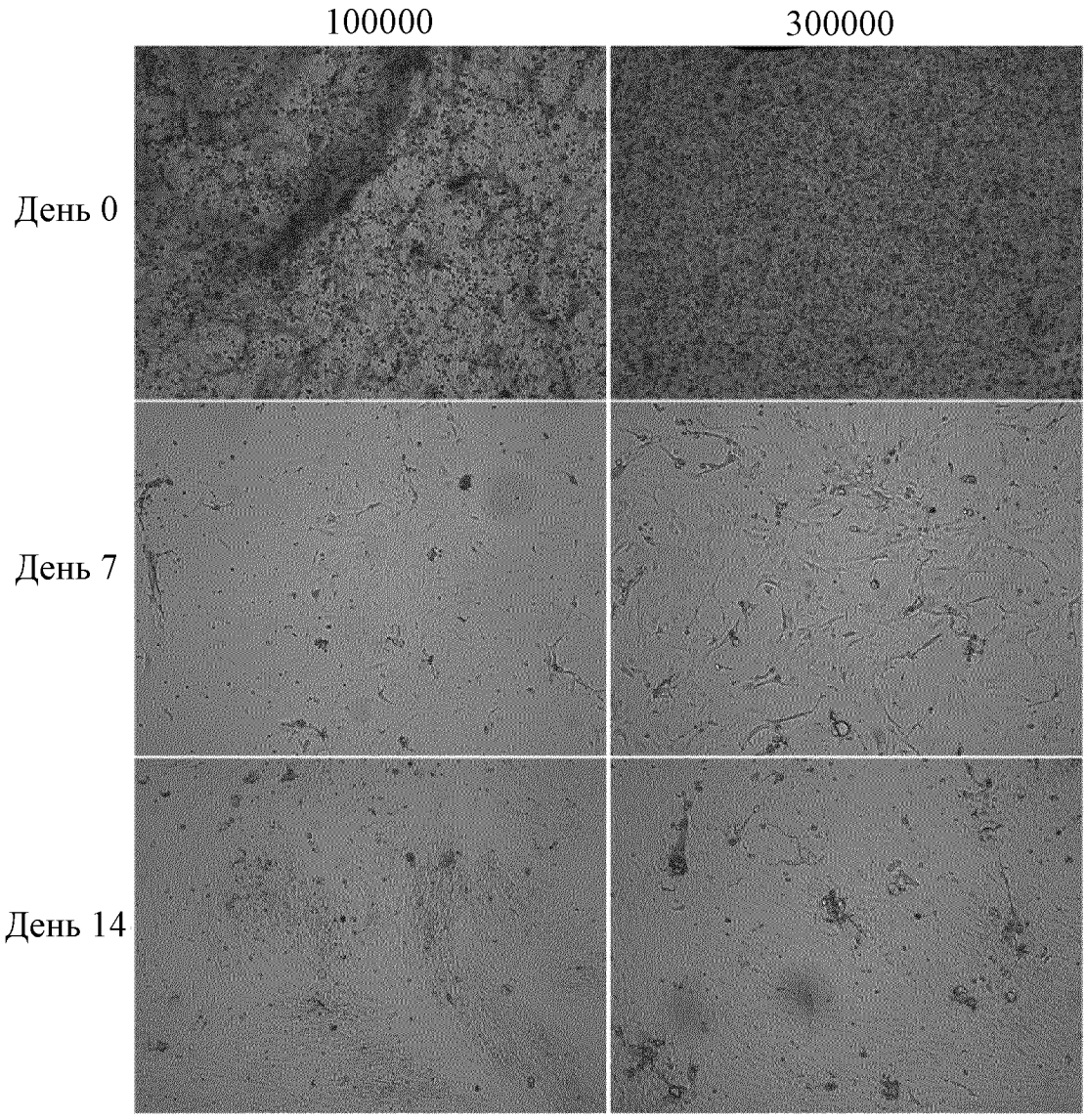
Фиг. 8A



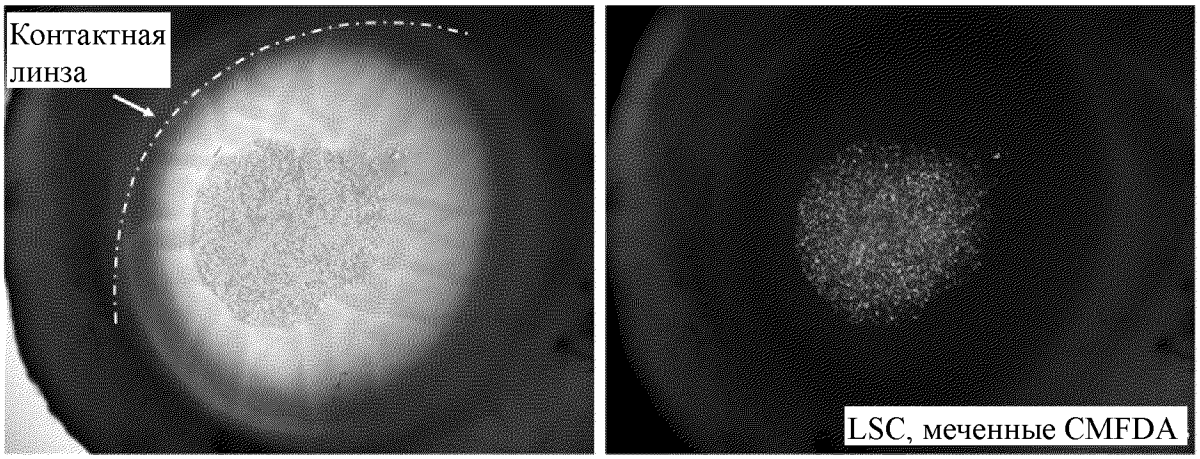
Фиг. 8B



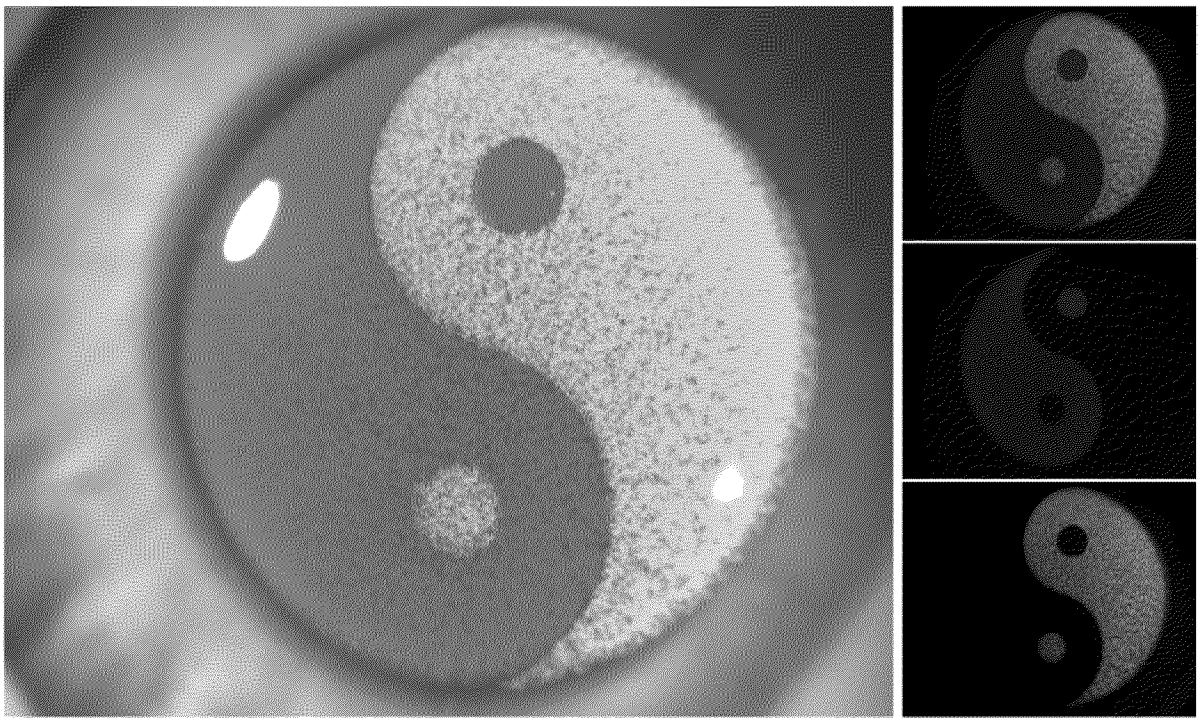
Фиг. 9



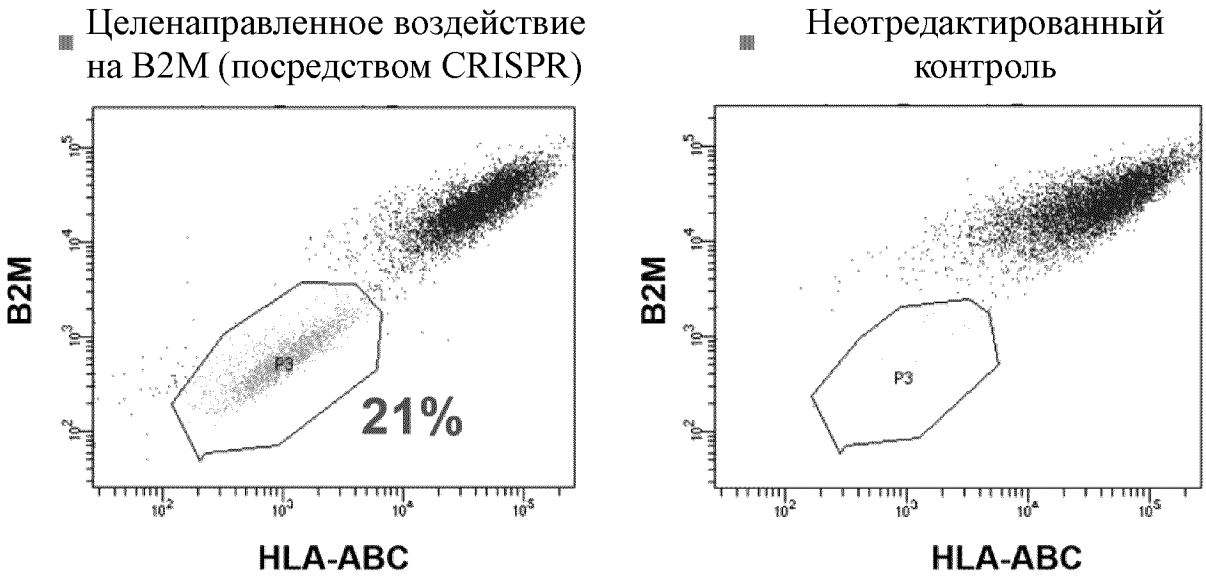
Фиг. 10



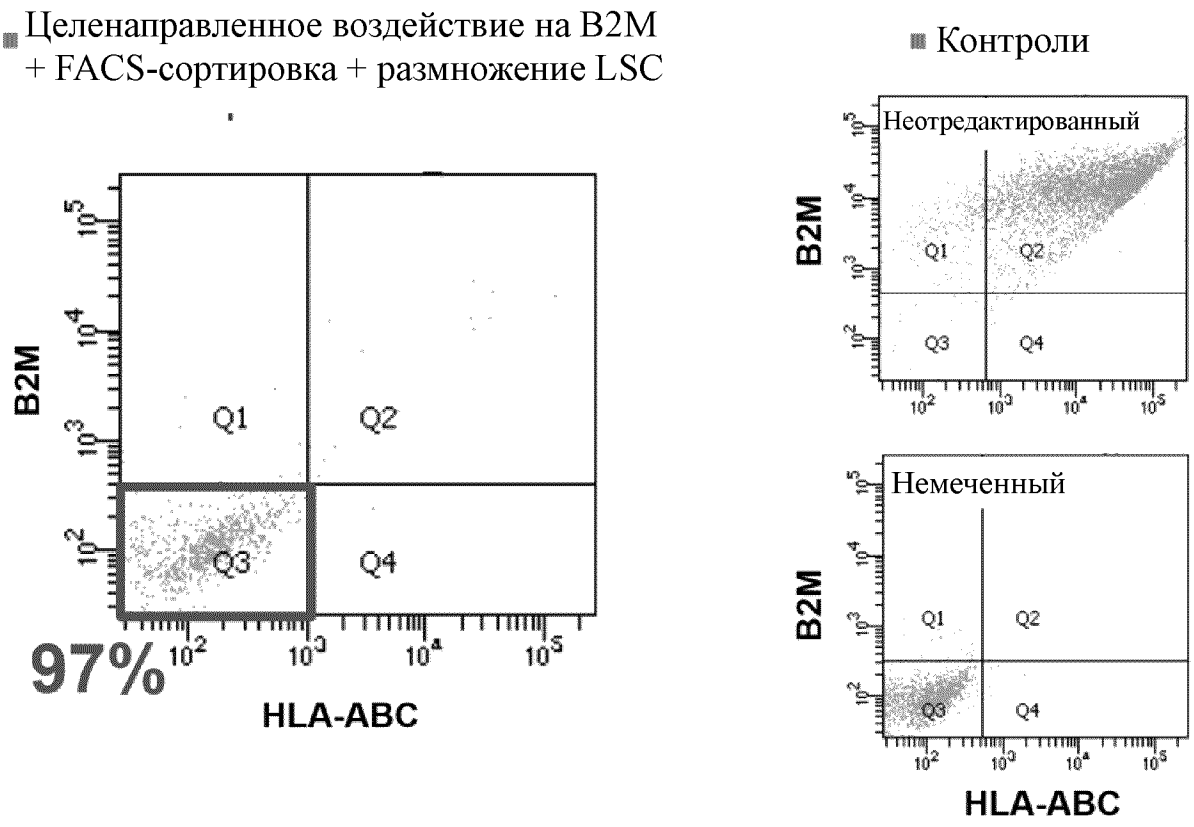
Фиг. 11



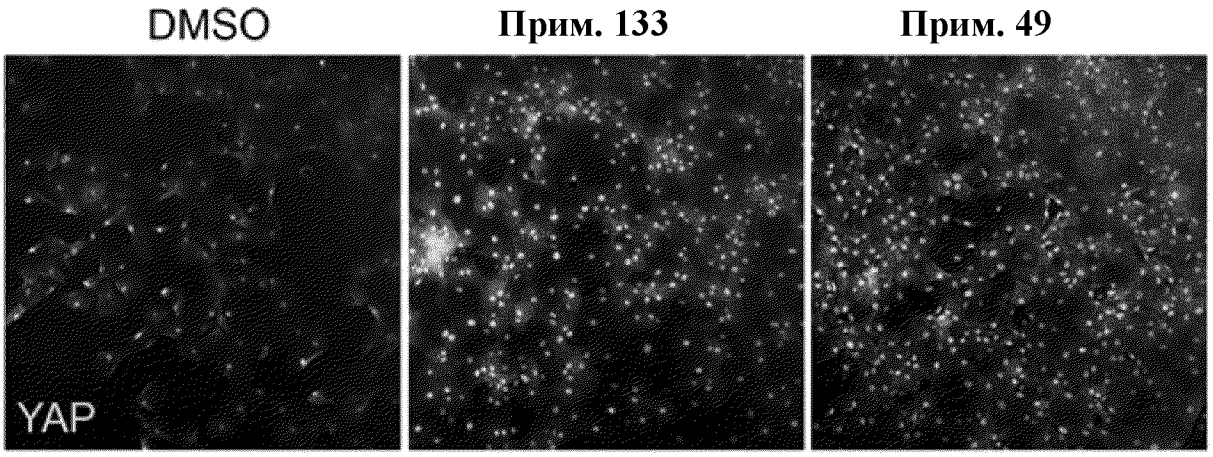
Фиг. 12


Целенаправленное воздействие на B2M (посредством CRISPR)
Неотредактированный контроль
B2M
HLA-ABC
P3
21%
B2M
HLA-ABC
P3

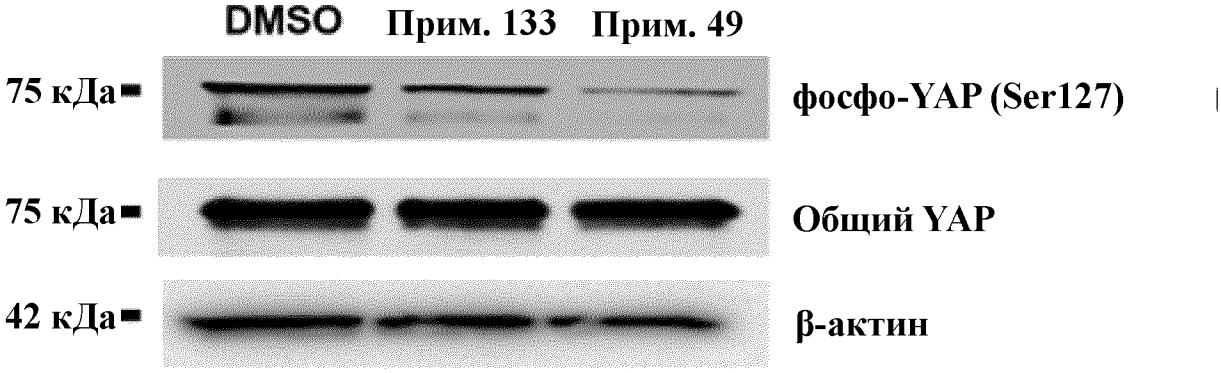
Фиг. 13


Целенаправленное воздействие на B2M
+ FACS-сортировка + размножение LSC
Контроли
Неотредактированный
Немеченный
B2M
HLA-ABC
Q1
Q2
Q3
Q4
97%

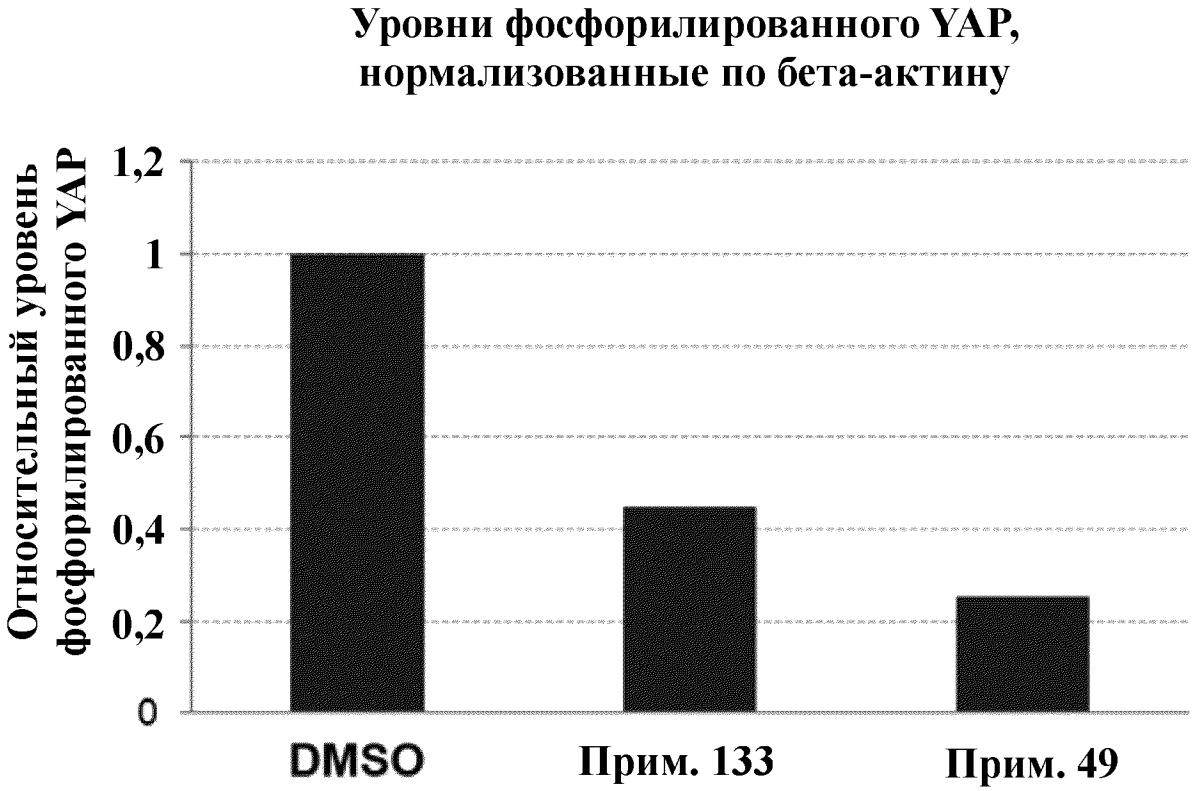
Фиг. 14



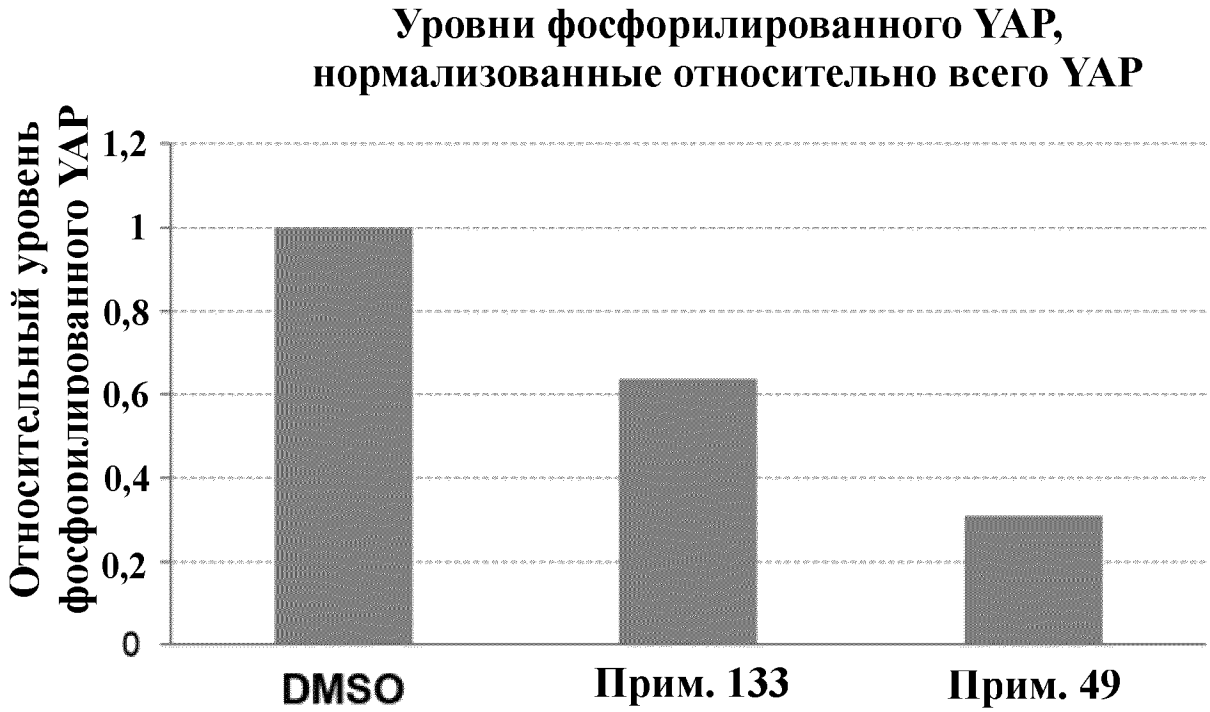
Фиг. 15A


DMSO
Прим. 133
Прим. 49
75 кДа
фосфо-YAP (Ser127)
75 кДа
Общий YAP
42 кДа
β-актин

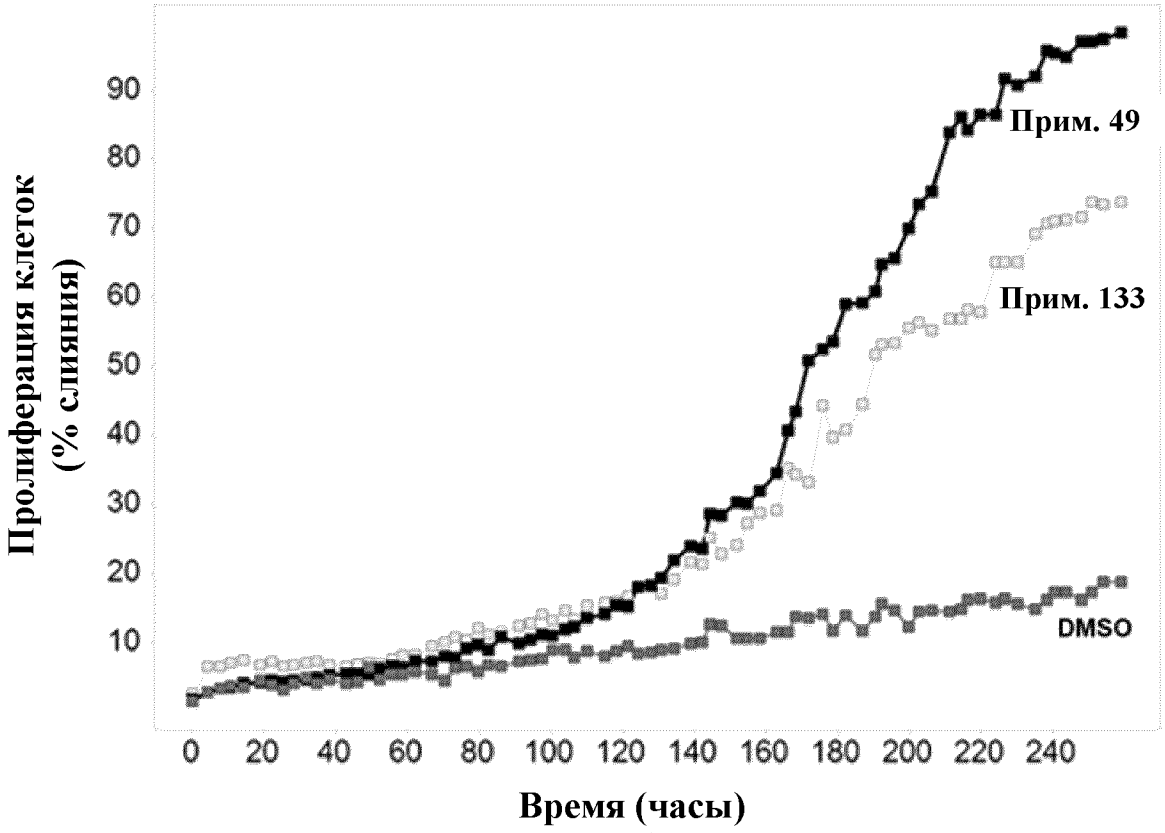
Фиг. 15B


Уровни фосфорилированного YAP, нормализованные по бета-актину
Относительный уровень фосфорилированного YAP
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
DMSO
Прим. 133
Прим. 49

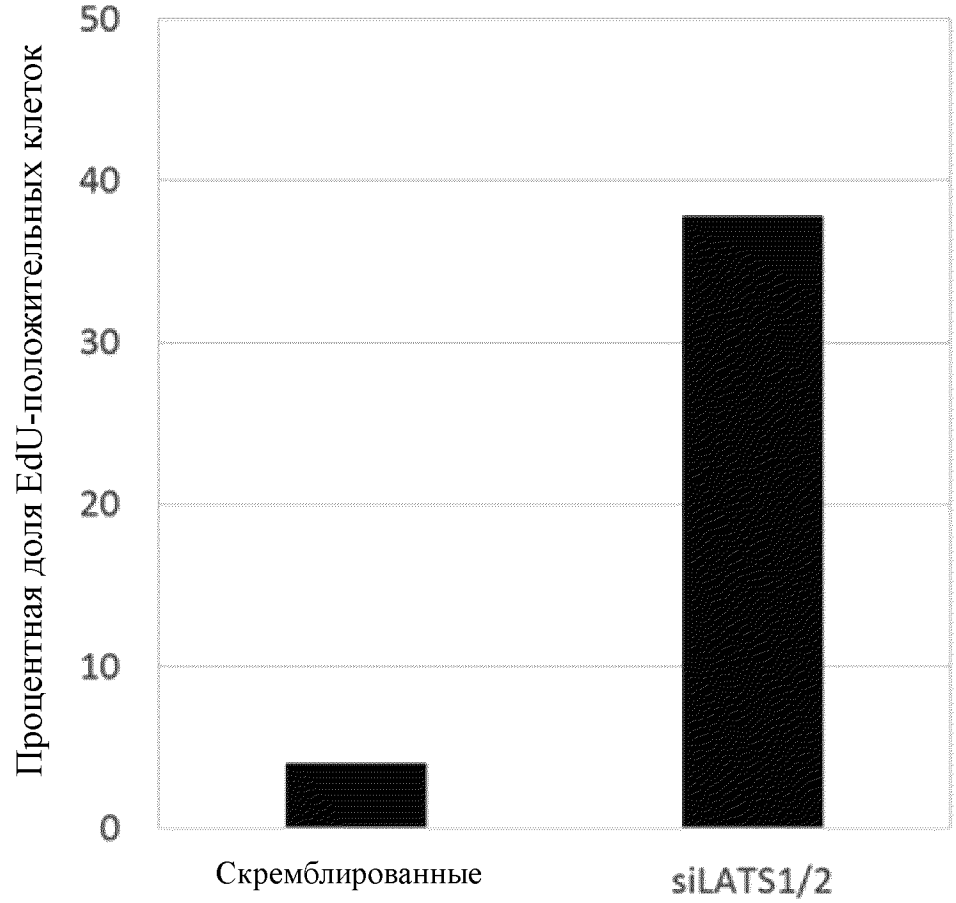
Фиг. 15C


Уровни фосфорилированного YAP,
нормализованные относительно всего YAP
Относительный уровень фосфорилированного YAP
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
DMSO
Прим. 133
Прим. 49

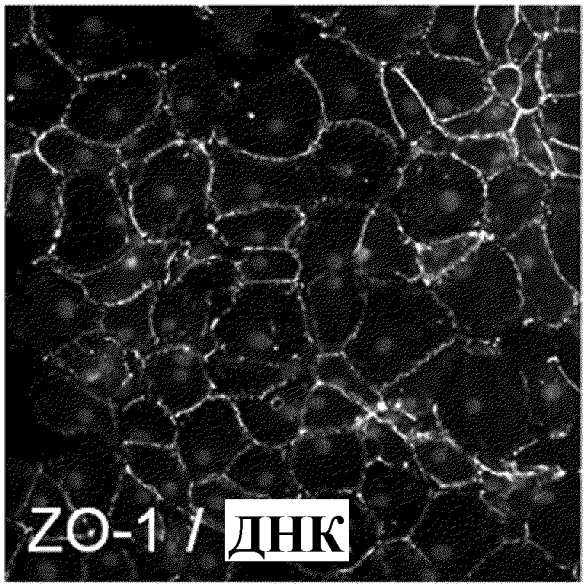
Фиг. 16


Пролиферация клеток
(% слияния)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Время (часы)
Прим. 49
Прим. 133
DMSO

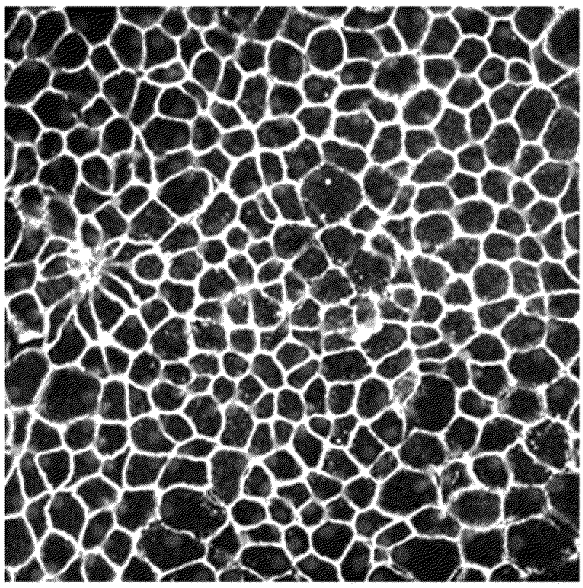
Фиг. 17


Процентная доля EdU-положительных клеток
50
40
30
20
10
0
Скремблированные
siLATS1/2

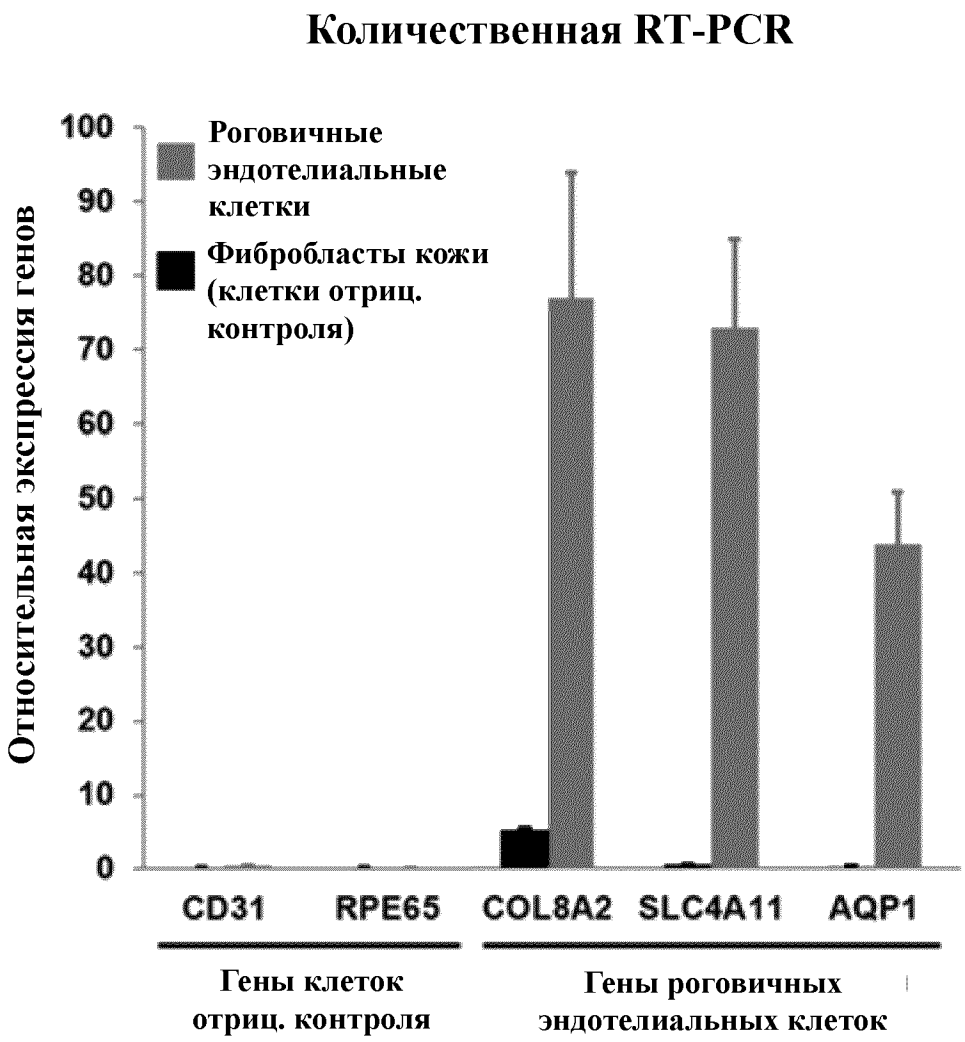
Фиг. 18A



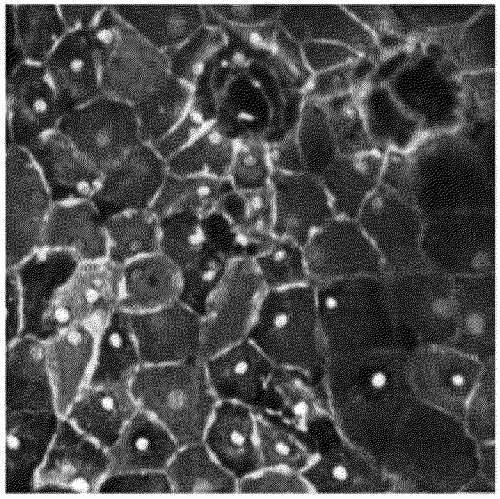
Фиг. 18B



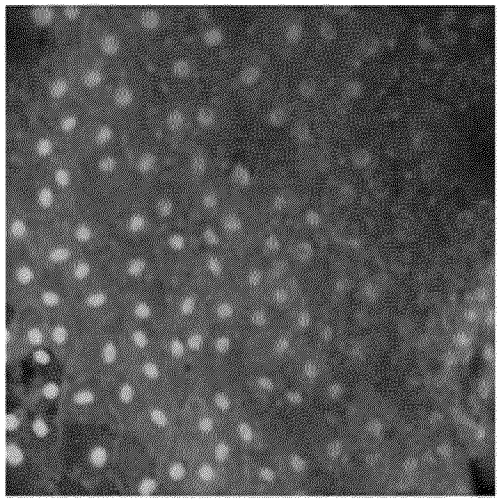
Фиг. 19


Количественная RT-PCR
Относительная экспрессия генов
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Роговичные эндотелиальные клетки
Фибробласты кожи (клетки отриц. контроля)
CD31
RPE65
COL8A2
SLC4A11
AQP1
Гены клеток отриц. контроля
Гены роговичных эндотелиальных клеток

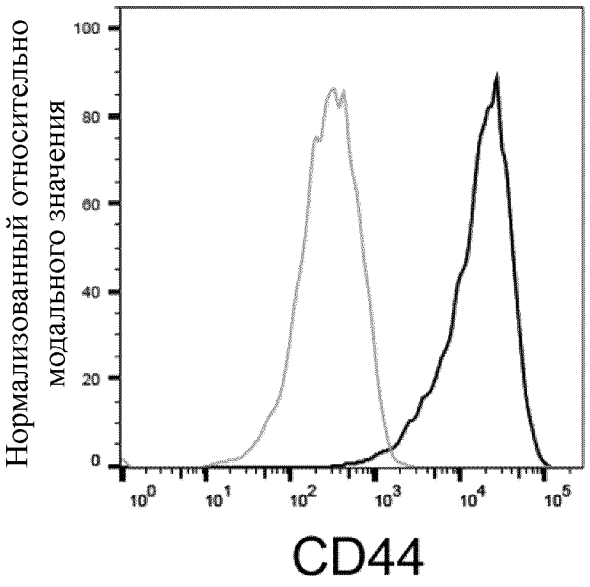
Фиг. 20A



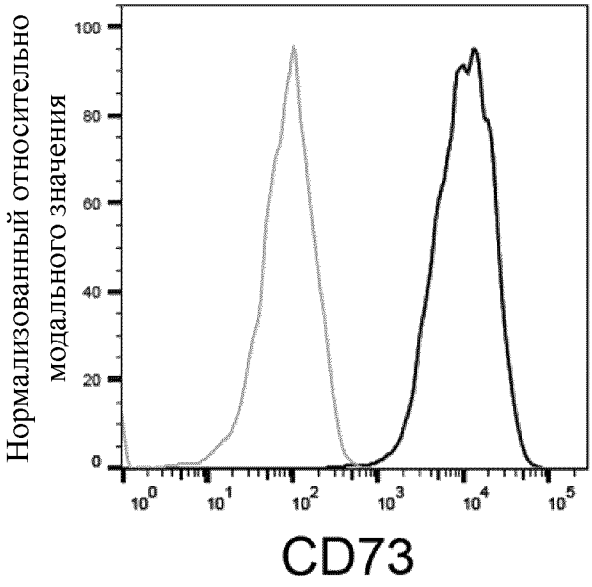
Фиг. 20B



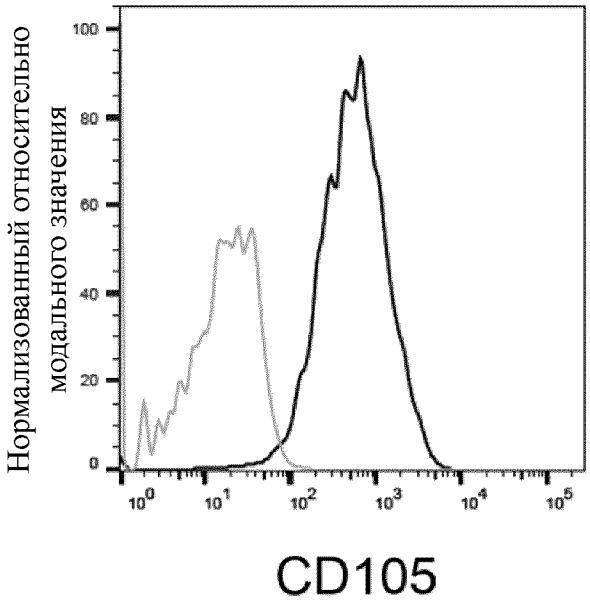
Фиг. 21A



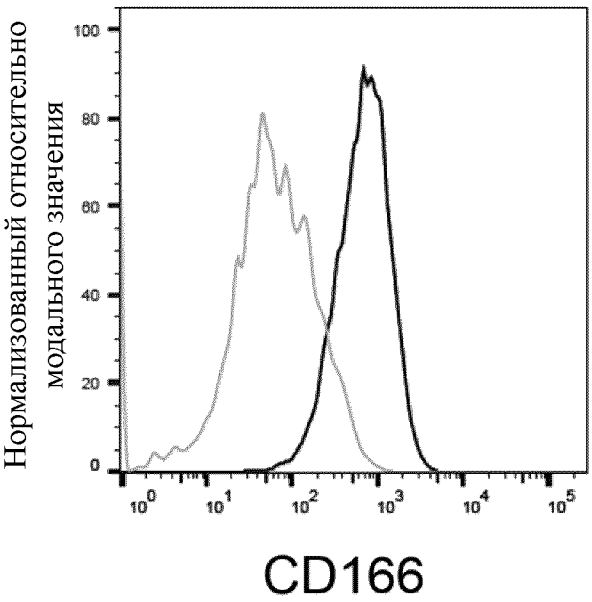
Фиг. 21B



Фиг. 21C

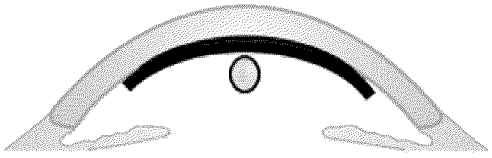


Фиг. 21D

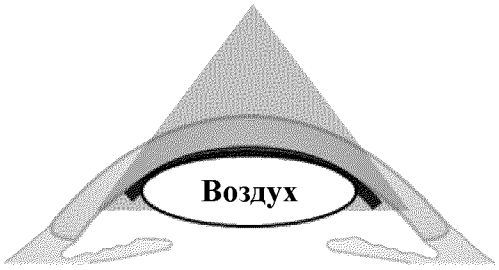


Фиг. 22A

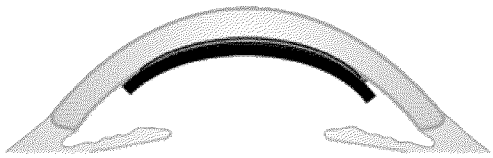
Фиг. 22B



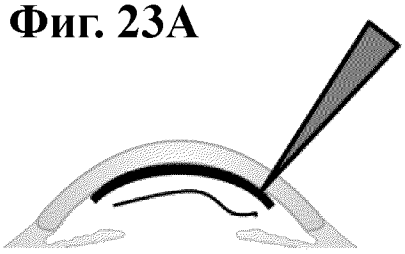
Фиг. 22C



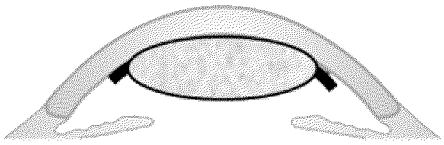
Фиг. 22D



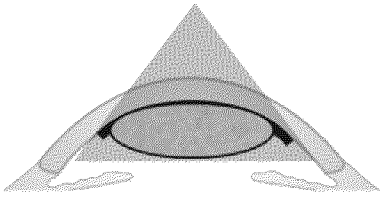
Фиг. 23A



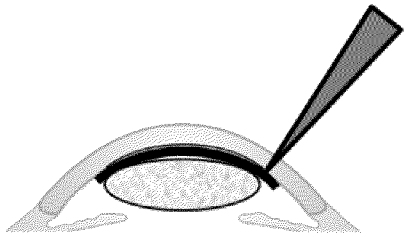
Фиг. 23B



Фиг. 23C

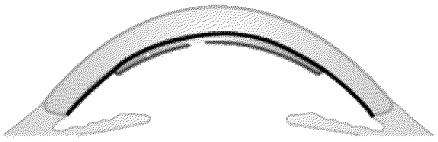


Фиг. 23D

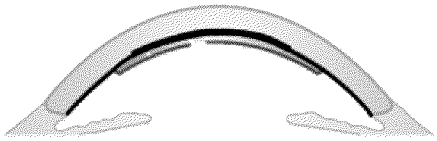


Фиг. 23E

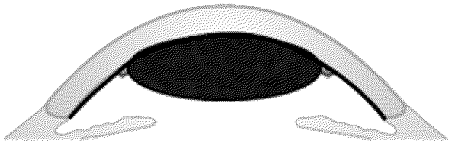
Фиг. 24A



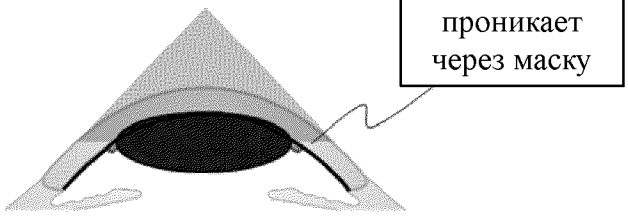
Фиг. 24B



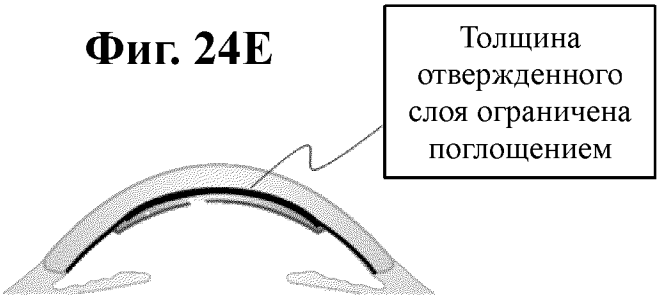
Фиг. 24C



Фиг. 24D

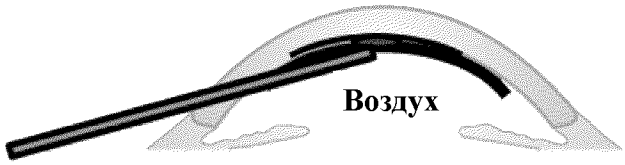


Фиг. 24E



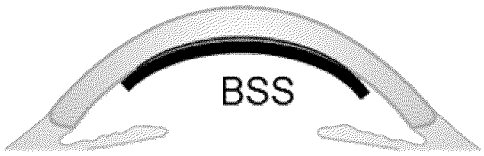
Фиг. 25A

Фиг. 25B

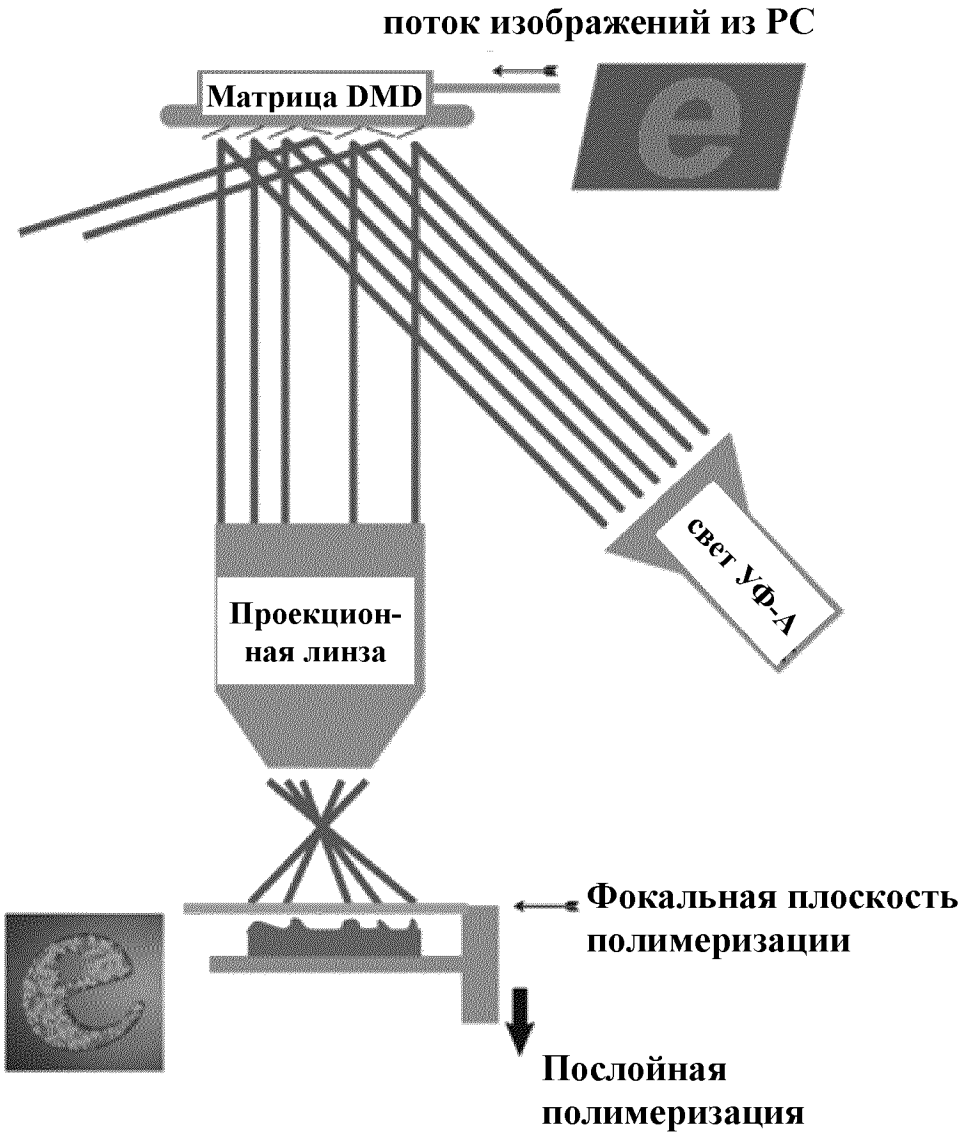


Фиг. 25C

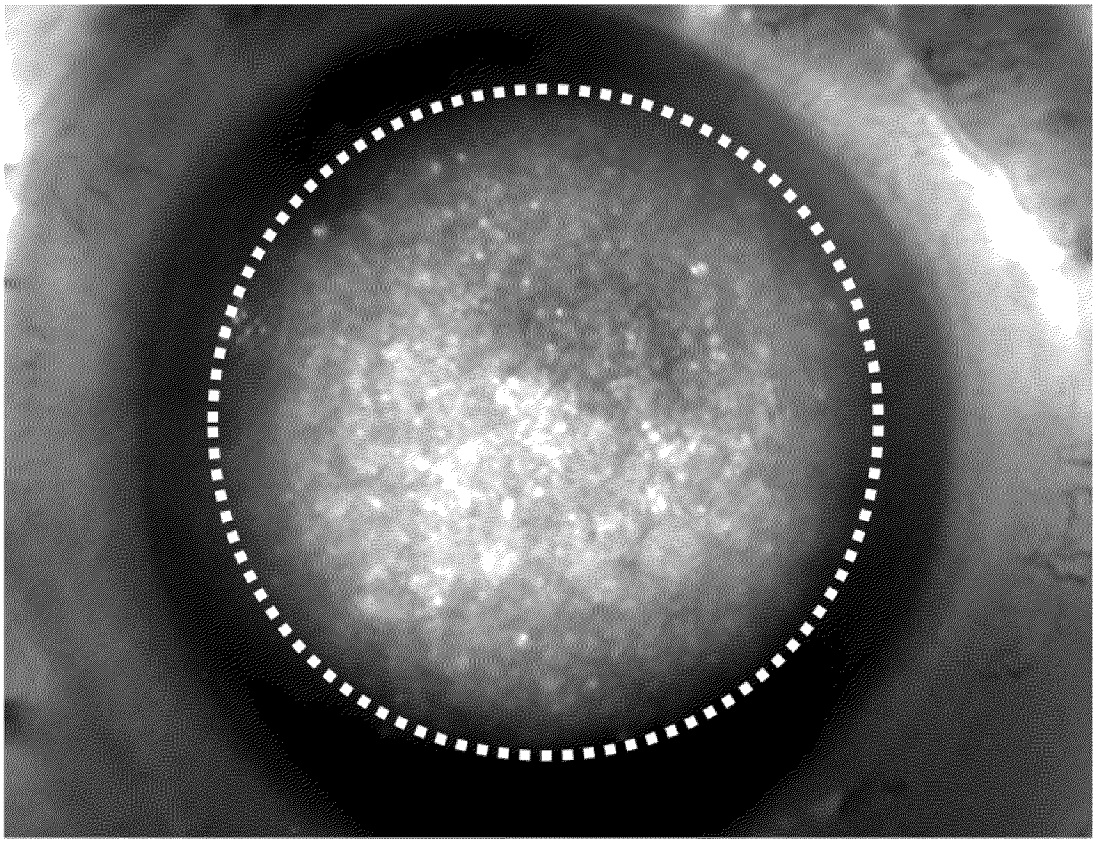
Фиг. 25D



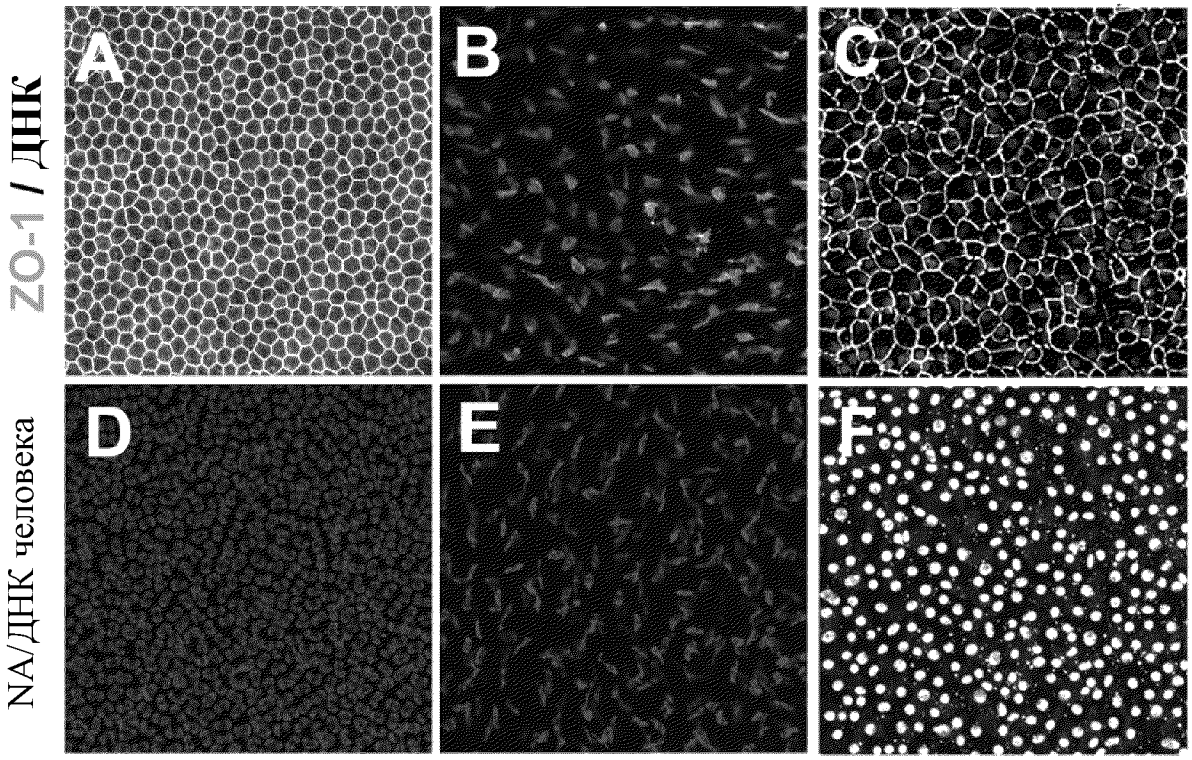
Фиг. 26


поток изображений из PC
Матрица DMD
свет УФ-А
Проекцион-
ная линза
Фокальная плоскость
полимеризации
Послойная
полимеризация

Фиг. 27

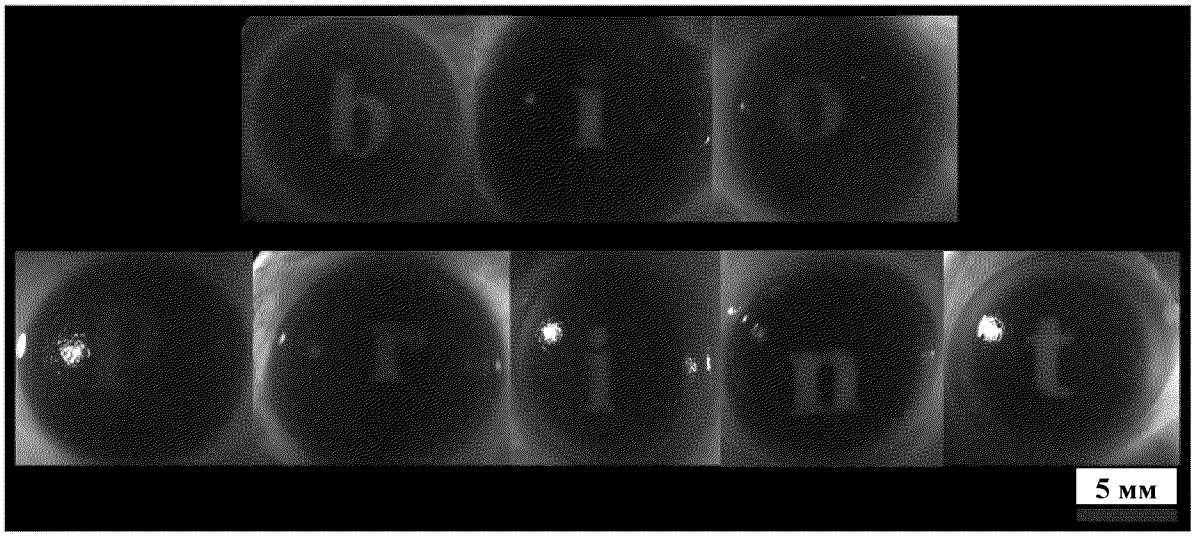


Фиг. 28A Фиг. 28B Фиг. 28C

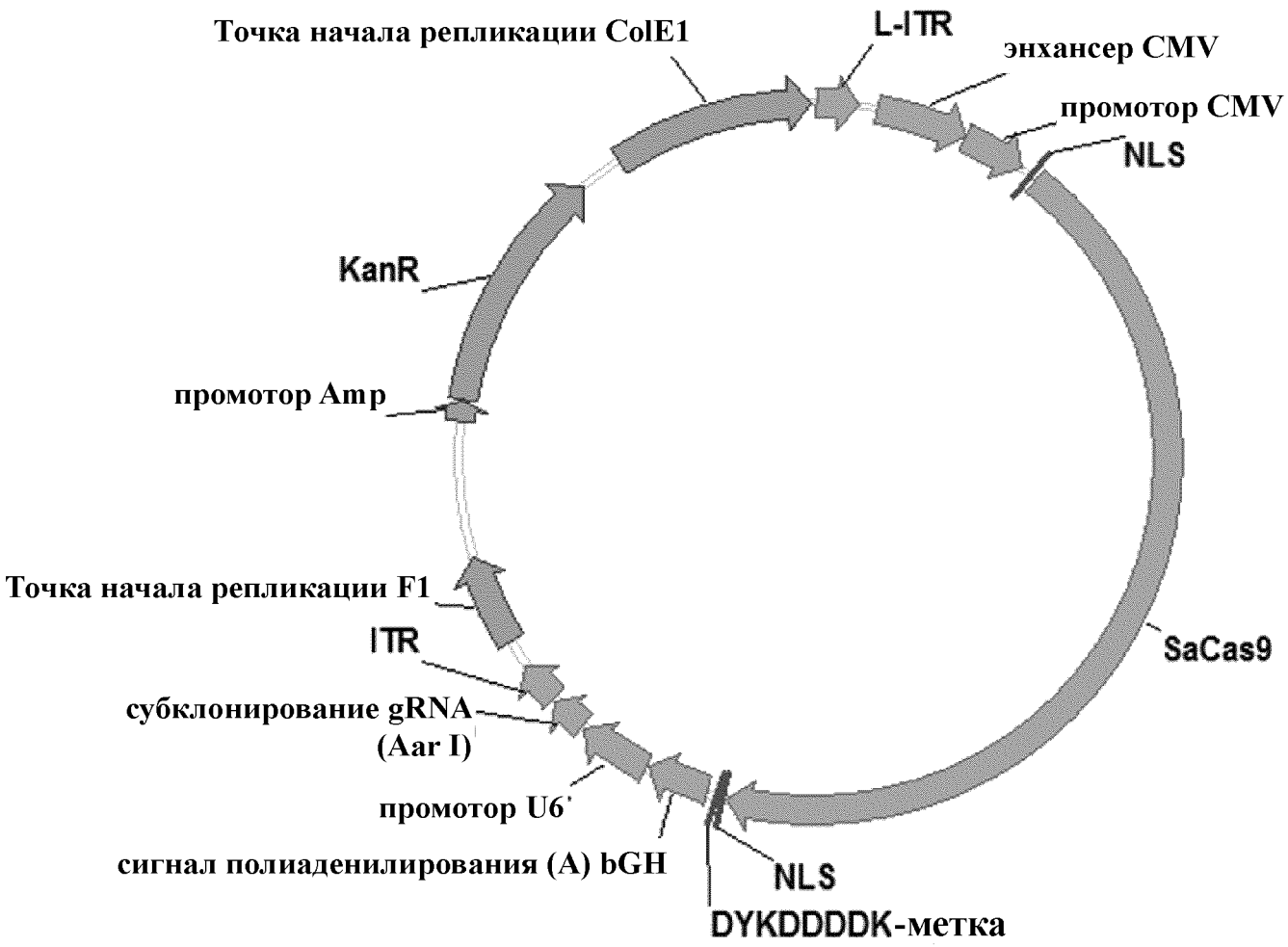


Фиг. 28D Фиг. 28E Фиг. 28F

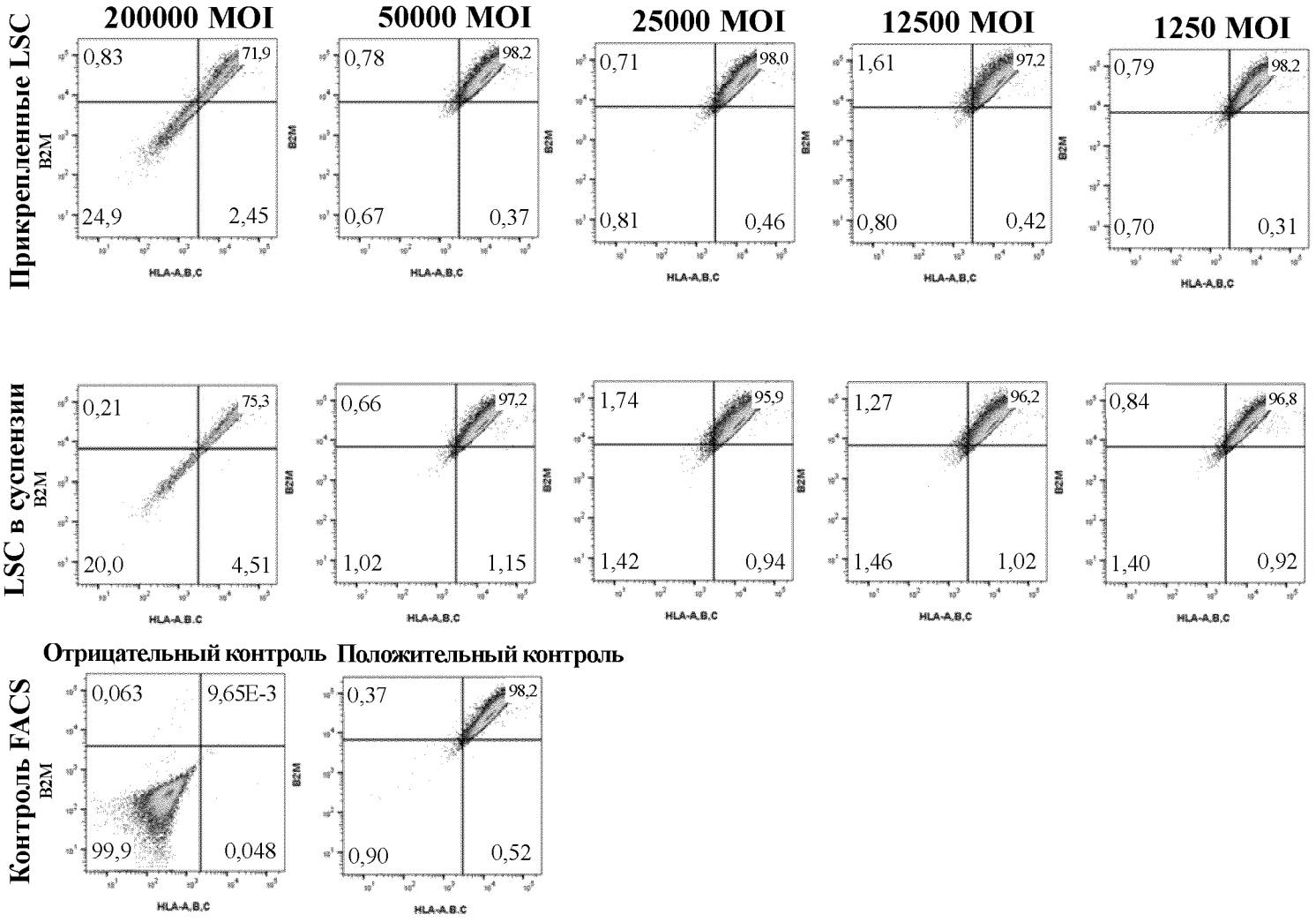
Фиг. 29



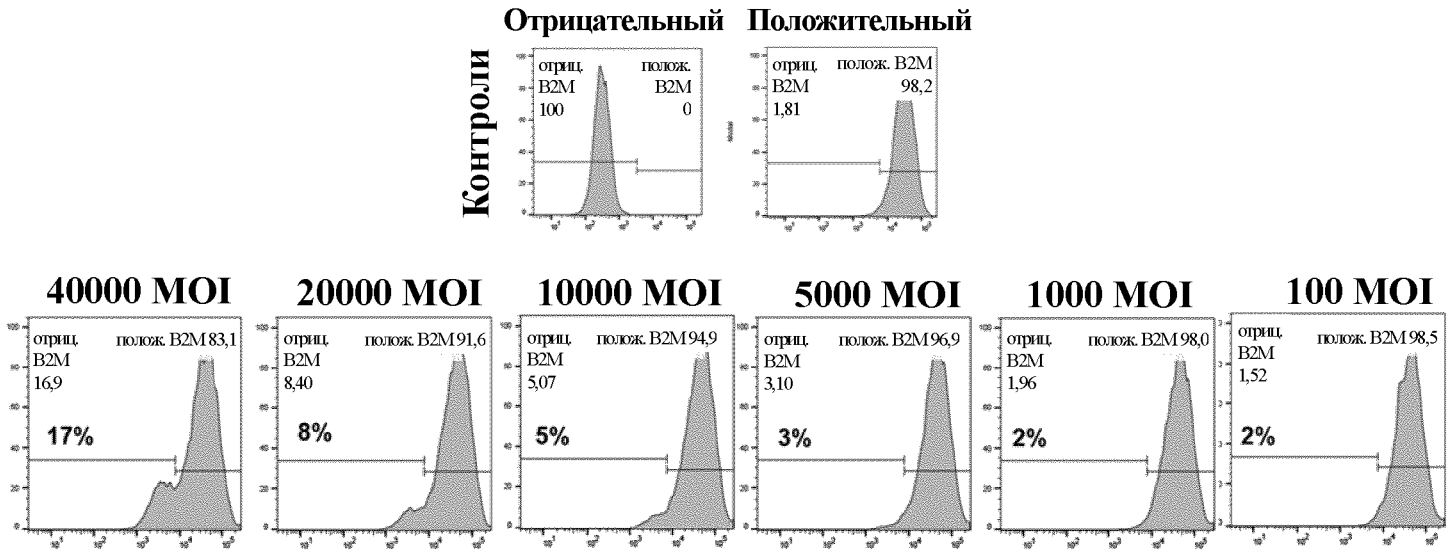
Фиг. 30


Точка начала репликации ColE1
L-ITR
энхансер CMV
промотор CMV
NLS
KanR
промотор Amp
Точка начала репликации F1
ITR
субклонирование gRNA
(Aar I)
промотор U6
сигнал полиаденилирования (A) bGH
NLS
DYKDDDDK-метка
SaCas9

Фиг. 31

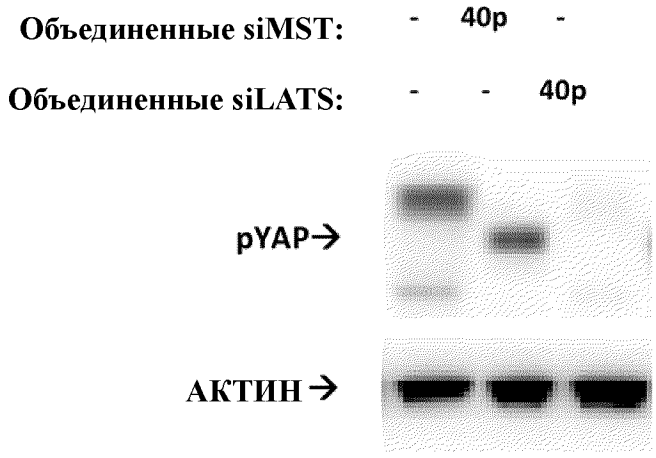

200000 MOI
50000 MOI
25000 MOI
12500 MOI
1250 MOI
Прикрепленные LSC
LSC в суспензии
Отрицательный контроль
Положительный контроль
Контроль FACS
B2M
HLA-A,B,C
0,83
71,9
24,9
2,45
0,78
98,2
0,67
0,37
0,71
98,0
0,81
0,46
1,61
97,2
0,80
0,42
0,79
98,2
0,70
0,31
0,21
75,3
20,0
4,51
0,66
97,2
1,02
1,15
1,74
95,9
1,42
0,94
1,27
96,2
1,46
1,02
0,84
96,8
1,40
0,92
0,063
9,65E-3
99,9
0,048
0,37
98,2
0,90
0,52

Фиг. 32


Отрицательный
Положительный
Контроли
отриц. B2M 100
полож. B2M 0
отриц. B2M 1,81
полож. B2M 98,2
40000 MOI
20000 MOI
10000 MOI
5000 MOI
1000 MOI
100 MOI
отриц. B2M 16,9
полож. B2M 83,1
17%
отриц. B2M 8,40
полож. B2M 91,6
8%
отриц. B2M 5,07
полож. B2M 94,9
5%
отриц. B2M 3,10
полож. B2M 96,9
3%
отриц. B2M 1,96
полож. B2M 98,0
2%
отриц. B2M 1,52
полож. B2M 98,5
2%

Фиг. 33A

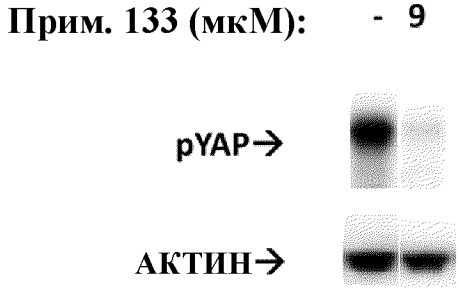
Проверка siRNA



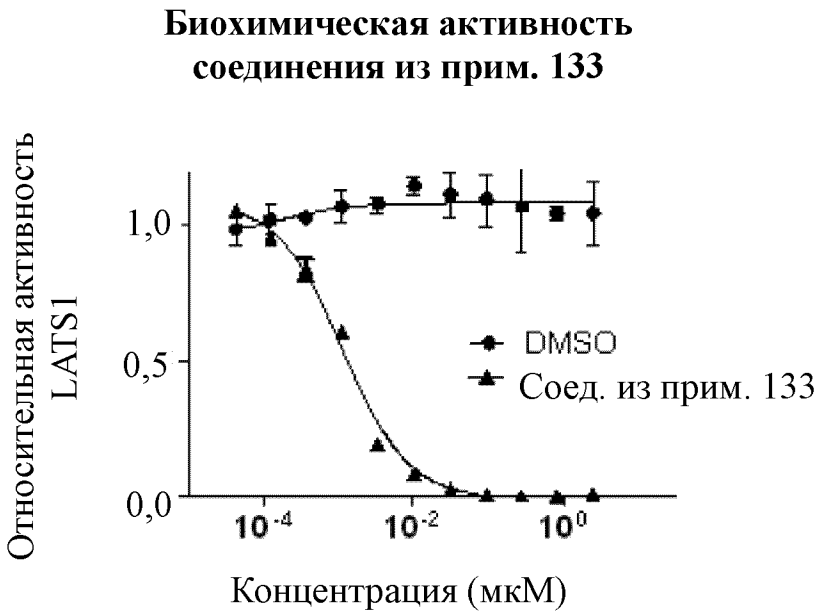
p: пикомоль

Фиг. 33B

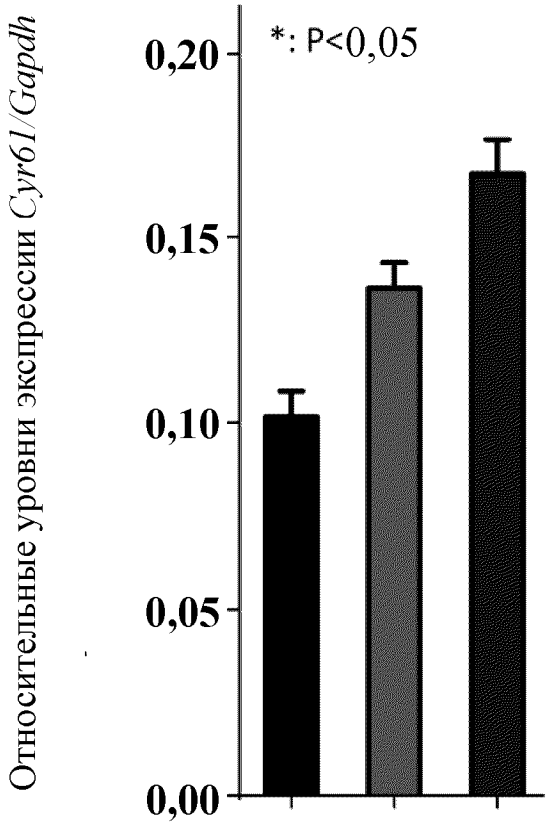
Клеточный материал, обработанный соединением из прим. 133



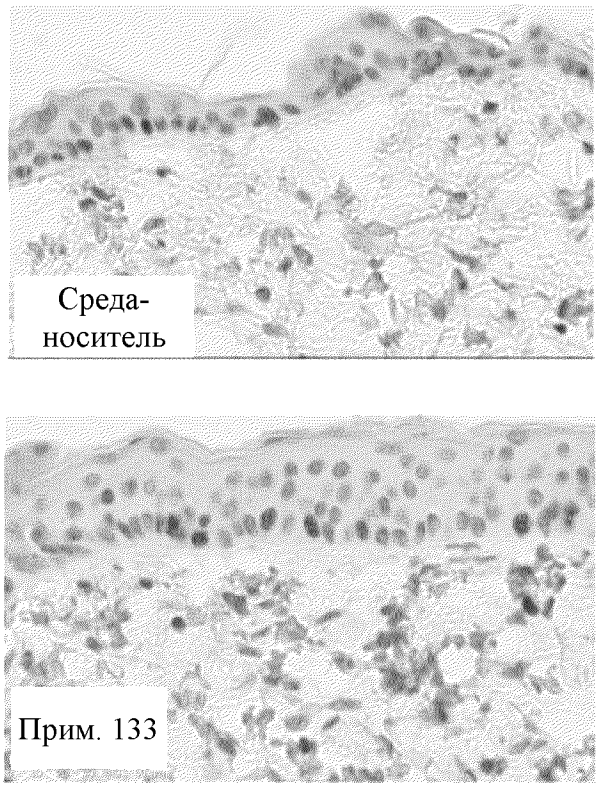
Фиг. 33C


Биохимическая активность
соединения из прим. 133
Относительная активность
LATS1
1,0
0,5
0,0
10-4
10-2
100
DMSO
Соед. из прим. 133
Концентрация (мкМ)

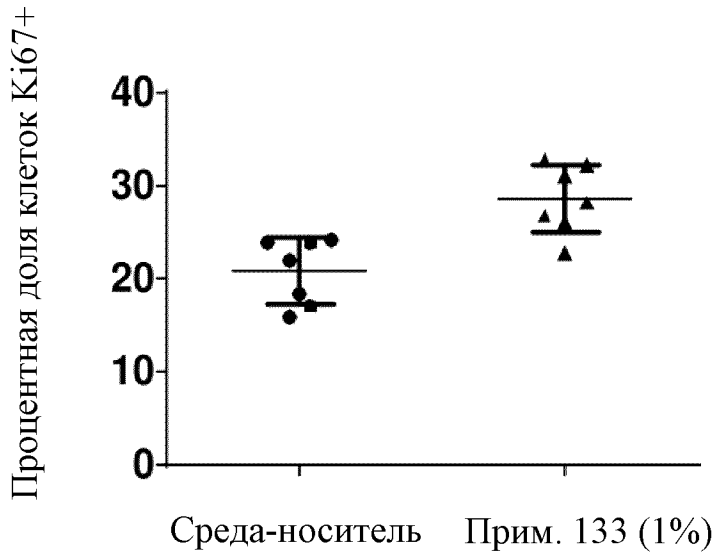
Фиг. 34


Относительные уровни экспрессии *Cyr61/Gapdh*
*: P<0,05
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Среда-носитель
0,2
2
Прим. 133
(мг/мл)

Фиг. 35A



Фиг. 35B


Процентная доля клеток Ki67+
40
30
20
10
0
Среда-носитель
Прим. 133 (1%)