

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.10

(22) Дата подачи заявки
2019.01.16

(51) Int. Cl. *C07D 403/12* (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 239/74 (2006.01)
C07D 239/86 (2006.01)
C07D 239/88 (2006.01)
C07D 239/94 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 491/048 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ ДНК-ПК

(31) 62/618,339

(32) 2018.01.17

(33) US

(86) PCT/US2019/013788

(87) WO 2019/143678 2019.07.25

(71) Заявитель:

**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**

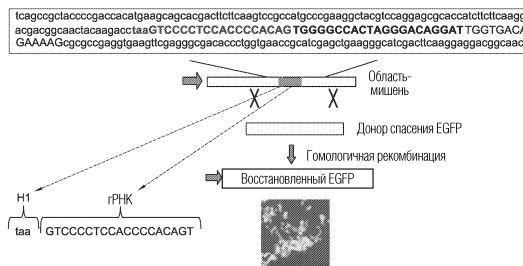
(72) Изобретатель:

**Максвелл Джон Патрик, Джексон
Катрина Ли, Тан Цин, Моррис
Марк А., Ронкин Стивен М., Сюй
Цзиньван, Коттрелл Кевин М.,
Чарифсон Пол С. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, применимым в качестве ингибиторов ДНК-ПК. Изобретение также представляет фармацевтически приемлемые композиции, содержащие указанные соединения, и способы применения композиций при лечении различных заболеваний, состояний или нарушений.



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563813ЕА/032

ИНГИБИТОРЫ ДНК-ПК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США 62/618,339, поданной 17 января 2018 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Копия ASCII, созданная 16 января 2019 года, называется 14390-688 Sequence listing_ST25.txt и имеет размер 5 КБ.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к соединениям, применимым в качестве ингибиторов ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК). Изобретение также предоставляет фармацевтически приемлемые композиции, содержащие соединения согласно изобретению и способы применения композиций при лечении рака и для повышения эффективности редактирования генома путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома в клетку(и).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Ионизирующее излучение (ИИ) вызывает различные повреждения ДНК, из которых самыми цитотоксическими являются двухцепочечные разрывы (ДЦР). Такие ДЦР могут привести к гибели клеток путем апоптоза и/или митотической катастрофы, если не будут быстро и полностью устранены. В дополнение к ИИ, некоторые химиотерапевтические средства, включая ингибиторы топоизомеразы II, блеомицин и доксорубицин, также вызывают ДЦР. Эти поражения ДНК индуцируют сложный набор сигналов через сеть ответа на повреждение ДНК, функция которой заключается в репарации поврежденной ДНК и поддержании жизнеспособности и геномную стабильности клетки. В клетках млекопитающих преобладающим путем репарации ДЦР является Негомологичное соединение концов (NHEJ). Этот путь функционирует независимо от фазы клеточного цикла и не требует матрицы для повторного лигирования концов разрушенной ДНК. NHEJ требует координации многих белков и сигнальных путей. Основной аппарат NHEJ состоит из гетеродимера Ku70/80 и каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК_{кс} или ДНК-ПК), которые вместе составляют активный комплекс фермента ДНК-ПК. ДНК-ПК_{кс} является членом семейства фосфатидилинозитол-3-киназа-родственных киназ (PIKK), в которое входят серин/треониновые протеинкиназы, также включающего мутантный при атаксии-телангиэктазии белок (ATM), атаксия-телангиэктазия и Rad3-родственный белок (ATR), mTOR, а также четыре изоформы PI3K. Впрочем, тогда как ДНК-ПК_{кс} входит в то же семейство протеинкиназ, что и ATM и ATR, функция этих последних киназ заключается в

репарации повреждения ДНК по пути Гомологичной рекомбинации (HR) и ограничивается S и G₂ фазами клеточного цикла. Хотя ATM также мобилизуется к участкам ДЦР, ATR мобилизуется к участкам одноцепочечных разрывов ДНК.

[0005] Считается, что NHEJ проходит через три ключевых этапа: распознавание ДЦР, процессинг ДНК с удалением нелигируемых концов или других форм повреждения на концах и, наконец, лигирование концов ДНК. Распознавание ДЦР осуществляется путем связывания Ku гетеродимера с разорванными концами ДНК с последующим рекрутингом двух молекул ДНК-ПКкс по обеим сторонам от ДЦР; это служит для защиты разрушенных концов, пока не будут мобилизованы дополнительные процессирующие ферменты. Последние данные подтверждают гипотезу, что ДНК-ПКкс фосфорилирует процессирующий фермент Artemis, а также себя, чтобы подготовить концы ДНК к дополнительному процессингу. В некоторых случаях для синтеза новых концов перед стадией лигирования может потребоваться ДНК-полимераза. Считается, что аутофосфорилирование ДНК-ПКкс вызывает конформационные изменения, которые раскрывают центральную связывающую полость ДНК, высвобождают ДНК-ПКкс из ДНК и способствуют окончательному повторному лигированию концов ДНК.

[0006] В течение некоторого времени было известно, что ДНК-ПК^{-/-} мыши гиперчувствительны к воздействию ИИ и что некоторые неселективные низкомолекулярные ингибиторы ДНК-ПКкс могут вызывать радиосенсибилизацию различных типов опухолевых клеток в различном генетическом окружении. Хотя ожидается, что ингибирование ДНК-ПК будет в некоторой степени радиосенсибилизировать нормальные клетки, это наблюдалось в меньшей степени, чем в случае с опухолевыми клетками, вероятно, из-за того, что опухолевые клетки обладают более высокими базальными уровнями эндогенного репликативного стресса и повреждения ДНК (онкоген-индуцированного репликативного стресса), при этом механизмы репарации ДНК в опухолевых клетках менее эффективные. Что наиболее важно, улучшенное терапевтическое окно с меньшим поражением нормальной ткани будет обусловлено ингибитором ДНК-ПК в сочетании с недавними достижениями в точной доставке сфокусированного ИИ, включая ЛТ с визуальным контролем (ЛТВК) и ЛТ с модулированной интенсивности (ЛТМИ).

[0007] Ингибирование активности ДНК-ПК вызывает эффекты как в делящихся, так и в неделящихся клетках. Это очень важно, так как большинство клеток в солидной опухоли не реплицируются активно в любой момент, что ограничивает эффективность многих средств, воздействующих на клеточный цикл. В равной степени интересны недавние сообщения, которые указывают на непосредственную взаимосвязь между ингибированием пути NHEJ и способностью убивать традиционно радиорезистентные раковые стволовые клетки (РСК). Было показано, что в некоторых опухолевых клетках ДЦР в неактивных РСК преимущественно активируют репарацию ДНК по пути NHEJ; считается, что РСК обычно находятся в неактивной фазе клеточного цикла. Это может объяснять, почему половина онкобольных может испытывать локальный или удаленный

рецидив опухоли, несмотря на лечение, поскольку современные стратегии не способны эффективно воздействовать на РСК. Ингибитор ДНК-ПК может обеспечить сенсбилизацию таких потенциальных метастатических клеток-предшественников к воздействию ИИ и подбор вызывающих образование ДЦР химиотерапевтических средств.

[0008] С учетом участия ДНК-ПК в процессах репарации ДНК, применение специфических ДНК-ПК-ингибирующих средств будет направлено на действие в качестве средств, которые будут повышать эффективность противоопухолевой химиотерапии и лучевой терапии. Таким образом, было бы желательно создать соединения, полезные в качестве ингибиторов ДНК-ПК.

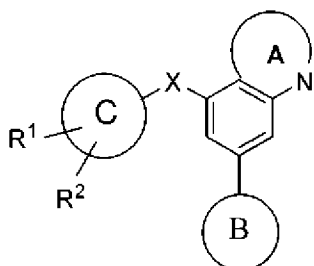
[0009] Кроме того, для обеспечения системной инженерии генетических вариаций требуются технологии точного воздействия на геном. Применение систем редактирования генома, в частности технологии редактирования генома на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами (CRISPR)-эндонуклеазы, значительно выросло за последние несколько лет. Бактериальная врожденная иммунная система CRISPR-Cas9 II типа стала эффективным инструментом редактирования генома с целью направленной модификации генома человека (Wiedenheft, B. 2012; Hsu, P.D. et al. 2014). Недавно были описаны системы редактирования генома CRISPR-Cpf. Редактирование генома на основе CRISPR-эндонуклеазы частично зависит от путей нехомологичного соединения концов (NHEJ) и репарации, направляемой гомологией (HDR), для репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Механизм клеточной репарации отдает предпочтение NHEJ по сравнению с HDR.

[0010] Тогда как вставки или делеции (инделлы) при NHEJ согласно некоторым сообщениям удается эффективно достигать в 70% случаев, эффективность HDR остается проблемной с частотой меньше 1%.

[0011] Таким образом, существует потребность в повышении эффективности редактирования генома, в частности, эффективности HDR. Другое применение специфических ДНК-ПК-ингибирующих лекарственных средств может заключаться в действии в качестве средств, которые будут повышать эффективность систем редактирования генома.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] Было обнаружено, что соединения настоящего изобретения и их фармацевтически приемлемые композиции эффективны в качестве ингибиторов ДНК-ПК. Таким образом, в одном аспекте изобретения представлены соединения, представленные Формулой (I):

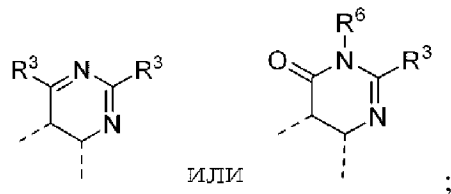


(I), или их фармацевтически приемлемые соли, где каждый

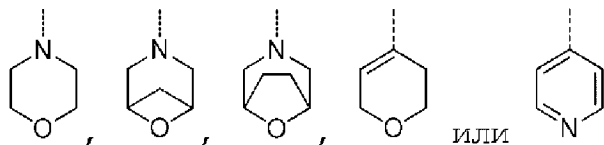
из R^1 , R^2 , X, Кольца А, Кольца В и Кольца С независимо имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

[0013] В одном варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены Формулой (I) или их фармацевтически приемлемыми солями, где:

Кольцо А является ароматической кольцевой системой, выбранной из



Кольцо В является кольцевой системой, выбранной из



, где Кольцо В обязательно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и C_{1-4} алкила, необязательно замещенного одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

Кольцо С представляет собой C_{4-6} циклоалкильную, 5-6-членную гетероарильную или фенильную группу, где Кольцо С необязательно дополнительно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-2} алкила, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

X представляет собой -NH-, -O-, - OC_{1-4} алкил-, -S- или - CH_2 -;

каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)2R⁴, -NHR⁴, - C_{1-4} алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R^7 , где R^1 и R^2 не могут быть одновременно водородом;

каждый R^3 независимо представляет собой водород, - C_{1-4} алкил, галоген, - OC_{1-2} алкил, -C(O)ОН, -C(O)OC₁₋₂алкил, -CN, -C(O)NHC₁₋₂алкил, -C(O)NH₂, C_{3-4} циклоалкил или -NRR', где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

каждый R^4 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, C_{3-10} циклоалкил, 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-10-членный гетероцикл, где каждая из указанных групп R^4 необязательно замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C_{1-4} алкил, CN, NO₂, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил-О- C_{1-4} алкила, C_{0-4} алкил-О- C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C(O)OC₁₋₄ алкила, C(O)OC₀₋₄ алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил-C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкила, C(O)N(C_{1-4} алкил)₂, C(O)NH(C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила), CH₂OR⁵, C_{0-4} алкил-C(O)R⁵, C_{0-4} алкил-C(O)N(R⁵)₂, C_{0-4} алкил-C(O)OR⁵, C_{0-4} алкил-NHC(O)R⁵, C_{0-4} алкил-N(R⁵)₂, 5-6 членного гетероцикла, -

$O(C_{1-4} \text{ алкил})OR^5$, $-OR^5$ и оксо, и где каждый из указанных необязательных заместителей R^4 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-4} алкила, $-OH$, $-OC_{1-4}$ алкила, $-SC_{1-4}$ алкила, $-C(O)C_{1-4}$ алкила, $-C(O)OC_{1-4}$ алкила и $-C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила; и

каждый R^5 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, фенил, 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, где каждый R^5 независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-2} алкила, $-CH_2OH$, $-CN$, $-OH$, $-OC_{1-2}$ алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7 членного гетероцикла, или две группы R^5 с промежуточным атомом азота необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо; и

R^6 представляет собой водород или C_{1-4} алкил, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, $-CH_2OH$, $-CN$, $-OH$ и $-OC_{1-2}$ алкила;

R^7 представляет собой 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, каждый из которых необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-2} алкила, $-CH_2OH$, $-CN$ и $-OR$; и

каждый из R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-4} алкил, или R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо.

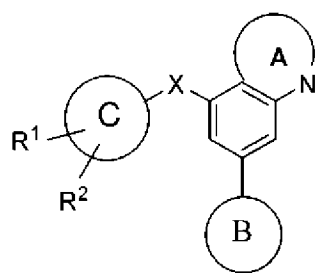
или их фармацевтически приемлемая соль, где каждый из R^1 , R^2 , X , Кольца A , Кольца B и Кольца C имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

[0014] В изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие соединение Формулы (I) и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или растворитель. Такие соединения и фармацевтические композиции могут применяться для лечения или уменьшения тяжести рака.

[0015] Соединения и композиции, предложенные в настоящем изобретении, также могут применяться для исследования ДНК-ПК в биологических и патологических процессах; исследования внутриклеточных сигнальных путей, опосредуемых такими киназами; и сравнительной оценки новых ингибиторов киназы.

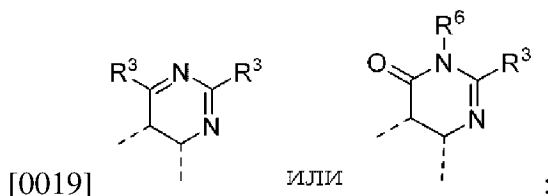
[0016] Настоящее изобретение также может повысить эффективность HDR путем супрессии ферментов NHEJ, таких как ДНК-ПК, с применением ингибиторов ДНК-ПК.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I):

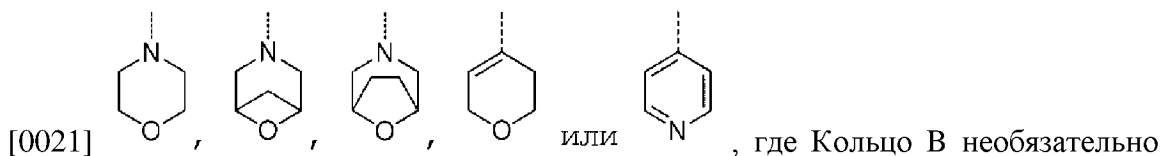


(I), или его фармацевтически приемлемых солей, где каждый из R^1 , R^2 , X, Кольца A, Кольца B и Кольца C независимо имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

[0018] Кольцо A является ароматической кольцевой системой, выбранной из



[0020] Кольцо B является кольцевой системой, выбранной из



где Кольцо B необязательно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -OH и C_{1-4} алкила, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -OH и -OC₁₋₂алкила;

[0022] Кольцо C представляет собой C_{4-6} циклоалкильную, 5-6-членную гетероарильную или фенильную группу, где Кольцо C необязательно дополнительно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-2} алкила, -OH и -OC₁₋₂алкила;

[0023] X представляет собой -NH-, -O-, -OC₁₋₄ алкил-, -S- или -CH₂-;

[0024] каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)₂R⁴, -NHR⁴, -C₁₋₄ алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷, где R^1 и R^2 не могут быть одновременно водородом;

[0025] каждый R^3 независимо представляет собой водород, -C₁₋₄алкил, галоген, -OC₁₋₂алкил, -C(O)OH, -C(O)OC₁₋₂алкил, -CN, -C(O)NHC₁₋₂алкил, -C(O)NH₂, C₃₋₄ циклоалкил или -NRR', где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, -Cl, -OH и OC₁₋₂алкила;

[0026] каждый R^4 независимо представляет собой водород, C₁₋₄алкил, C₂₋₄алкенил, C₂₋₄алкинил, C₃₋₁₀ циклоалкил, 6-10 членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-10-членный гетероцикл, где каждая из указанных групп R^4 необязательно замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C₁₋₄алкила, CN, NO₂, C₂₋₄алкенила, C₂₋₄алкинила, C₃₋₆циклоалкила, C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила, C₀₋₄

алкил-О-С₁₋₄ алкила, С₀₋₄ алкил-О-С₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила, С(О)ОС₁₋₄ алкила, С(О)ОС₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила, С₀₋₄ алкил-С(О)NH₂, С(О)NHC₁₋₄ алкила, С(О)N(С₁₋₄ алкил)₂, С(О)NH(С₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила), CH₂OR⁵, С₀₋₄ алкил-С(О)R⁵, С₀₋₄ алкил-С(О)N(R⁵)₂, С₀₋₄ алкил-С(О)OR⁵, С₀₋₄ алкил-NHC(О)R⁵, С₀₋₄ алкил-N(R⁵)₂, 5-6 членного гетероциклила, -О(С₁₋₄ алкил)OR⁵, -OR⁵ и оксо, и где каждый из указанных необязательных заместителей R⁴ необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₄алкила, -ОН, -ОС₁₋₄алкила, -SC₁₋₄алкила, -С(О)С₁₋₄алкила, -С(О)ОС₁₋₄ алкила и -С(О)ОС₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила; и

[0027] каждый R⁵ независимо представляет собой водород, С₁₋₄алкил, фенил, 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклил, где каждый R⁵ независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₂алкила, -CH₂ОН, -CN, -ОН, -ОС₁₋₂алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7 членного гетероциклила, или две R⁵ группы с промежуточным атомом азота необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо; и

[0028] R⁶ представляет собой водород или С₁₋₄алкил, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -CH₂ОН, -CN, -ОН и ОС₁₋₂алкила;

[0029] R⁷ является 6-10-членным арилом, 5-10-членным гетероарилом или 4-7-членным гетероциклилом, каждый из которых необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₂алкила, -CH₂ОН, -CN и -OR; и

[0030] каждый из R и R' независимо представляет собой водород или С₁₋₄алкил, или R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо.

[0031] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областей-мишеней по пути направленной гомологией репарации (HDR), включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемых солей.

[0032] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где репарация разрыва ДНК по пути NHEJ ингибирована или подавлена.

[0033] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий введение в одну или более клеток, включающих одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемых солей.

[0034] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где репарация разрыва ДНК по пути NHEJ ингибирована или подавлена.

[0035] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий введение в одну или более клеток, включающих одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемых солей.

[0036] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней гена(ов)-мишени, приводя к редактированию одной или более геномных областей-мишеней, и где редактирование изменяет экспрессию нижерасположенного гена(генов) и/или белка(ов), ассоциированного с геном(ами)-мишенью(ями).

[0037] В некоторых вариантах осуществления предложен набор или композиция для редактирования одной или более геномных областей-мишеней. В некоторых вариантах осуществления набор или композиция содержит систему редактирования генома; и соединение, представленное Формулой (I), или его фармацевтически приемлемые соли.

[0038] Другие признаки, объекты и преимущества изобретения очевидны из последующего подробного описания. Следует понимать, что подробное описание, в котором указаны варианты осуществления и аспекты изобретения, представлено исключительно для иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в рамках объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0039] ФИГ. 1А-1С представляют собой серию схем и последовательностей, которые относятся к применению анализа со светофорным репортером (traffic light reporter), применяемого для мониторинга эффективности HDR.

[0040] На ФИГ. 1А показана схема бицистронной конструкции, направленно воздействующей на человеческий локус AAVS1 (SBI).

[0041] На ФИГ. 1В показана линия клеток и полинуклеотидная область-мишень, используемые в анализе со светофорным репортером для мониторинга эффективности HDR.

[0042] ФИГ. 1С представляет собой схему экспериментального процесса, используемого в анализе со светофорным репортером для мониторинга эффективности HDR.

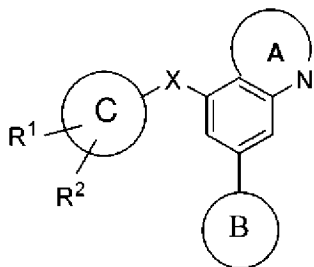
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0043] Если не определено иное, научно-технические термины, используемые в настоящем описании, должны иметь значения, обычно известные средним специалистам в данной области. Как правило, номенклатуры, используемые в отношении методов и

технологий культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии и химии и гибридизации белков и олиго- или полинуклеотидов, описанные в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области. Стандартные методики используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментные реакции и методы очистки проводят в соответствии со спецификациями производителя, или как это обычно принято в данной области или как описано в настоящем документе. Вышеуказанные методы и процедуры обычно выполняют в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в уровне техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, цитируемых и обсуждаемых в тексте настоящего описания. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатуры, используемые в отношении, а также лабораторные процедуры и методы, аналитической химии, химии органического синтеза и лекарственной и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, являются известными и обычно используемыми в данной области. Стандартные методы используются для химических синтезов, химических исследований, изготовления фармацевтических препаратов, составов и доставки, а также лечения пациентов. Обычно химические элементы химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей химических элементов, версии CAS и *Handbook of Chemistry and Physics*, 75th Ed. 1994. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Smith, M.B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. При использовании в соответствии с настоящим изобретением следует понимать, что термины, определенные в настоящем описании, если не указано иное, должны иметь значения, определенные в настоящем документе.

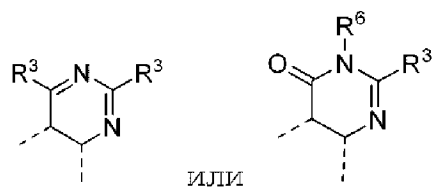
[0044] *Соединения согласно изобретению*

[0045] В одном варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены Формулой (I):

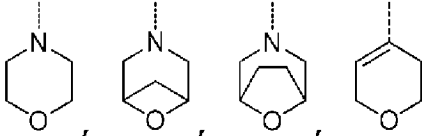
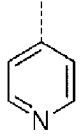


(I) или их фармацевтически приемлемыми солями, где переменные в Формуле (I) независимо имеют значение, описанное ниже. Первый набор переменных Формулы (I) является следующим:

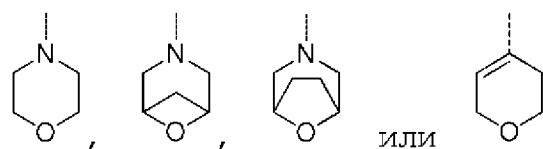
[0046] Кольцо А является ароматической кольцевой системой, выбранной из

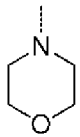


[0047] Кольцо В является кольцевой системой, необязательно замещенной и

выбранной из  или , где Кольцо В необязательно

замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и C_{1-4} алкила, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила. В одном определенном варианте осуществления Кольцо В необязательно замещено и выбрано из



Кольцом В представляет собой необязательно замещенный .

Кольцо С представляет собой C_{4-6} циклоалкил, 5-6-членный гетероарил или фенил, где Кольцо С необязательно дополнительно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-2} алкила, -ОН и - OC_{1-2} алкила. В определенном варианте осуществления Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил или необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил. В определенном варианте осуществления Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил. В определенном варианте осуществления Кольцо С представляет собой необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил или необязательно замещенный фенил.

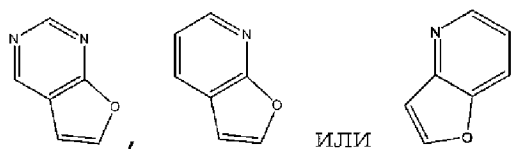
[0048] X представляет собой -NH-, -O-, - OC_{1-4} алкил-, -S- или - CH_2 -. В определенном варианте осуществления X представляет собой -NH-, -O- или - CH_2 -. В другом определенном варианте осуществления X представляет собой -NH- или -O-. В другом определенном варианте осуществления X представляет собой -O-. В другом определенном варианте осуществления X представляет собой -NH-. В другом определенном варианте осуществления X представляет собой - OC_{1-4} алкил-. В другом определенном варианте осуществления X представляет собой - CH_2 -.

[0049] Каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)₂R⁴, -NHR⁴, - C_{1-4} алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷, где R^1 и R^2 не могут быть одновременно водородом. В определенном

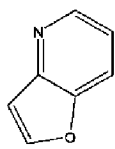
варианте осуществления по меньшей мере один из R^1 и R^2 $-NHR^4$ или $-OR^4$. В другом определенном варианте осуществления каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$, $-OR^4$ или R^7 . В другом определенном варианте осуществления R^2 представляет собой водород, а R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-NHR^4$, $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и R . В другом определенном варианте осуществления R^2 представляет собой водород, а R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$, $-OR^4$ или R^7 . В другом определенном варианте осуществления R^2 представляет собой водород, а R^1 представляет собой $-NHR^4$, $-OR^4$ или R^7 . В другом определенном варианте осуществления R^2 представляет собой водород, а R^1 представляет собой $-NHR^4$ или $-OR^4$.

[0050] Каждый R^3 независимо представляет собой водород, $-C_{1-4}$ алкил, галоген, OC_{1-2} алкил, $-C(O)OH$, $-C(O)OC_{1-2}$ алкил, $-CN$, $-C(O)NHC_{1-2}$ алкил, $-C(O)NH_2$, C_{3-4} циклоалкил или $-NRR'$, где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, $-OH$ и $-OC_{1-2}$ алкила. В определенном варианте осуществления каждый R^3 независимо представляет собой водород, $-C_{1-4}$ алкил, галоген, $-OC_{1-2}$ алкил, $-CN$, $-C_{3-4}$ циклоалкил или $-NRR'$, где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен. В другом определенном варианте осуществления каждый R^3 независимо представляет собой водород, метил, $-Cl$, $-OCH_3$, CN , циклопропил, $-NHCH_3$ или $-N(CH_3)_2$.

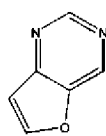
[0051] Каждый R^4 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, C_{3-10} циклоалкил, 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-10-членный гетероцикл. Каждая из групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-Br$, $-Cl$, $-F$, C_{1-4} алкила, CN , NO_2 , C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил- $O-C_{1-4}$ алкила, C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила, $C(O)OC_{1-4}$ алкила, $C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил- $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкила, $C(O)N(C_{1-4}$ алкил) $_2$, $C(O)NH(C_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила), CH_2OR^5 , C_{0-4} алкил- $C(O)R^5$, C_{0-4} алкил- $C(O)N(R^5)_2$, C_{0-4} алкил- $C(O)OR^5$, C_{0-4} алкил- $NHC(O)R^5$, C_{0-4} алкил- $N(R^5)_2$, 5-6-членного гетероцикла, $-O(C_{1-4}$ алкил) OR^5 , $-OR^5$ и оксо. Каждый из необязательных заместителей R^4 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-4} алкила, $-OH$, $-OC_{1-4}$ алкила, $-SC_{1-4}$ алкила, $-C(O)C_{1-4}$ алкила, $C(O)OC_{1-4}$ алкила и $-C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила. Определенные примеры гетероарильной группы для R^4 включают пиррол, имидазол, пиразол, триазол, тиазол, изотиазол, оксазол, пиридин, фуropyридин (например,



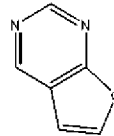
или

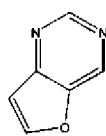
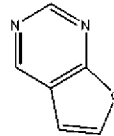


), пиримидин, пиримидинон, пиразин, пиридазин,



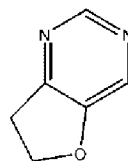
или



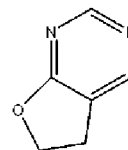
хинолон, фуropyrimидин (например,  или ) , пирролопиримидин, бензимидазол, бензотиазол и бензоксазол. В определенном варианте осуществления каждый из C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила и C_{2-4} алкинила для R^4 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -O(C_{1-4} алкила), и каждая C_{3-10} циклоалкильная, 6-10-членная арильная, 5-10-членная гетероарильная и 4-10-членная гетероциклическая группа для R^4 необязательно и независимо замещена одним или более C_{1-4} алкилом, -O(C_{1-4} алкилом), C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкилом, $C(O)NHC_{1-4}$ алкилом, $C(O)N(C_{1-4} \text{ алкил})_2$ или пиперазином, где каждый из необязательных заместителей R^4 необязательно замещен одним или более C_{1-4} алкилами.

[0052] Определенные примеры гетероциклической группы для R^4 включают тетрагидрофуран, оксетан, тетрагидропиран, дигидроизоксазол, пиримидин-2,4(1H,3H)-

дион, дигидрофуropyrimидин (например,

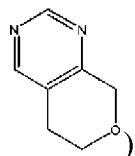


или



),

дигидропиранопиримидин (например,

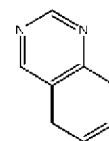


дигидропирроло-пиримидин,

тетрагидропиридопиримидин,

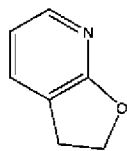
дигидропиридопиримидин

(например,



),

дигидрофуropyридин (например,



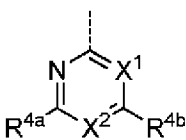
), дигидропиридопиридин, тетрагидроптеридин

и изоиндолин-1,3-дион. Определенные примеры гетероциклической группы для заместителей R^4 включают оксетан, азетидин, тетрагидрофуран, дигидропиран, тетрагидропиран, морфолин, пиперидин, пирролидин, пиперазин, фуран, оксазол, оксадиазол, пиррол, пиразол, триазол, оксадиазол и тетразол.

[0053] В определенном варианте осуществления каждый R^4 независимо представляет собой водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-}

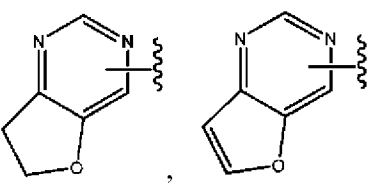
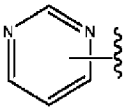
алкила, C₂₋₄алкенила, C₂₋₄алкинила, C₃₋₅циклоалкила или фенила. В другом определенном варианте осуществления каждый R⁴ независимо является необязательно замещенной группой, выбранной из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуropyримидина, дигидропирано-пиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридо-пиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидрофуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона. В другом определенном варианте осуществления каждый R⁴ независимо является необязательно замещенной группой, выбранной из имидазола, пиразола, пиримидина, фуropyримидина, оксетана или дигидрофуropyримидина.

[0054] В другом определенном варианте осуществления каждый R⁴ независимо представляет собой водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C₁₋₄

алкила,  или кольцевой группы, выбранной из C₃₋₅ циклоалкильной группы, пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола или фенила, где X¹ представляет собой N или CR^{4d}; X² представляет собой N или CR^{4c}, где X¹ и X² не могут быть одновременно N; каждый из R^{4a}, R^{4b} и R^{4c} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO₂, C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-O-C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C₂₋₄ алкенил, C₂₋₄ алкинил, C(O)OC₁₋₄ алкил, C(O)OC₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкил, C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂, C(O)NH(C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил), гетероциклическую группу, выбранную из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина или пиперазина, или гетероарильную группу, выбранную из фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола или тетразола; или R^{4c} и R^{4a}, или R^{4c} и R^{4b}, вместе с промежуточными атомами, необязательно образуют дигидрофуранильную, дигидропиранильную или тетрагидропиперидинильную гетероциклическую группу; и R^{4d} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO₂, C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкил, C₂₋₄ алкенил, C₂₋₄ алкинил, C(O)OC₁₋₄ алкил, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкил или C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂. Каждая из указанных гетероциклических и гетероарильных групп для R^{4a}, R^{4b} и R^{4c}, и для заместителей R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C₁₋₄ алкила, -OH, -C(O)C₁₋₄ алкила, -C(O)OC₁₋₄ алкила или C(O)OC₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила; и каждая алкильная и

циклоалкильная группа для R^{4a} , R^{4b} и R^{4c} , и для заместителей R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -OH. В определенном варианте осуществления R^{4d} представляет собой водород, CF, CCl или CC_{1-2} алкил, необязательно замещенный одним или более -F.

[0055] В другом определенном варианте осуществления каждый R^4 независимо является C_{1-4} алкилом или кольцевой группой, выбранной из C_{3-5} циклоалкила, пиразола,

имидазола, оксетана,  или , где R^4 C_{1-4} алкил

необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F и -O(C_{1-4} алкил), и где каждая из кольцевых групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C_{1-4} алкила, -CN, -O(C_{1-4} алкила), C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкила, C(O)NHC $_{1-4}$ алкила, C(O)N(C_{1-4} алкил) $_2$ и пиперазина, где каждый из необязательных заместителей R^4 необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C_{1-4} алкила, -OH и -OC $_{1-4}$ алкила. В определенном варианте осуществления R^4 C_{1-4} алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -O(C_{1-4} алкила), и каждая из кольцевых групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_{1-4} алкила, -O (C_{1-4} алкила), C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкила, C(O)NHC $_{1-4}$ алкила, C(O)N(C_{1-4} алкил) $_2$ и пиперазина, где каждый из необязательных заместителей R^4 необязательно замещен одним или более C_{1-4} алкилами.

[0056] Каждый R^5 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, фенил, 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, где каждый R^5 независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, C_{1-2} алкила, CH_2OH , -CN, -OH, OC $_{1-2}$ алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероцикла, или две R^5 группы с промежуточным атомом азота необязательно образуют морфолин, азетидин, пирролидин, пиперидин или пиперазин. Определенные примеры гетероарильной необязательно замещенной группы для R^5 включают имидазол, триазол, тиазол, пиридин и пиримидин. Определенные примеры гетероциклической необязательно замещенной группы для R^5 включают оксетан, тетрагидрофуран и тетрагидропиран.

[0057] R^6 представляет собой водород или C_{1-4} алкил, необязательно замещенный одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, - CH_2OH , -CN, -OH и -OC $_{1-2}$ алкила. В определенном варианте осуществления R^6 представляет собой водород или метил.

[0058] R^7 представляет собой 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, каждый из которых необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, C_{1-2} алкила, $-CH_2OH$, -CN и -OR. Определенные примеры R^7 включают пиррол, имидазол, пиразол, триазол, тиазол, изотиазол, оксазол, пиридин, фуropyридин, пиримидин, пиримидинон, пиразин, пиридазин, хинолон, фуropyримидин, пирролопиримидин, бензимидазол, бензотиазол, бензоксазол, тетрагидрофуран, оксетан, тетрагидропиран, дигидроизоксазол, пиримидин-2,4(1H,3H)-дион, дигидрофуры-пиримидин, дигидропиранопиримидин, дигидропирролопиримидин, тетрагидропиридопиримидин, дигидропиридопиримидин, дигидрофуры-пиридин, дигидропиридопиридин, тетрагидроптеридин и изоиндолин-1,3-дион. В определенном варианте осуществления R^7 необязательно замещен и выбран из пиримидина, имидазола, пиразола, тиазола, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, оксетана, дигидрофурыпиримидина или изоиндолин-1,3-диона. В другом определенном варианте осуществления R^7 необязательно замещен и выбран из пиримидина, имидазола, пиразола, тиазола, фуropyримидина, оксетана, дигидрофурыпиримидина или изоиндолин-1,3-диона. В еще одном определенном варианте осуществления R^7 необязательно замещен и выбран из пиримидина, пиразола, фуropyримидина, тиазола или изоиндолин-1,3-диона.

[0059] Каждый из R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-4} алкил, или R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо. В определенном варианте осуществления каждый из R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-4} алкил. В другом определенном варианте осуществления каждый из R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-2} алкил.

[0060] Во втором наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, C_{3-10} циклоалкил, фенил, нафталин, 5-10-членную гетероарильную группу, выбранную из группы, состоящей из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола и бензоксазола, или 4-10-членную гетероциклическую группу, выбранную из группы, состоящей из тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуры-пиримидина, дигидропиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридопиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидро-фуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина и изоиндолин-1,3-диона. Каждый из R^4 необязательно и независимо замещен. В определенном варианте осуществления гетероциклическая группа для заместителей R^4 необязательно замещена и выбрана из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина, пирролидина, пиперазина, фурана, оксазола, оксадиазола,

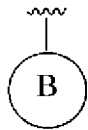
пиррола, пиразола, триазола, оксадиазола или тетразола. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом наборе переменных Формулы (I).

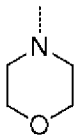
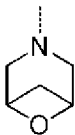
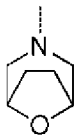
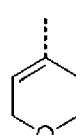
[0061] В третьем наборе переменных Формулы (I) каждый R^5 независимо представляет собой водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-4} -алкила, фенила, 5-6-членной гетероарильной группы, выбранной из имидазола, триазола, тиазола, пиридина или пиримидина, или 4-6-членной гетероциклической группы, выбранной из оксетана, тетрагидрофурана или тетрагидропирана. Каждый R^4 независимо является таким, как описано во втором наборе переменных Формулы (I). Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом или втором наборе переменных Формулы (I).

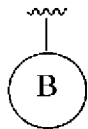
[0062] В четвертом наборе переменных Формулы (I) Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил или необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил; каждый из R^4 и R^5 независимо является таким, как описано в третьем наборе переменных Формулы (I); и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - третьего наборов переменных Формулы (I).

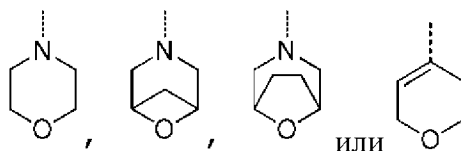
[0063] В пятом наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -O- или -NH-; Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил или необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - четвертого наборов переменных Формулы (I).

[0064] В шестом наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -O- или -NH-; Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил или необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил; каждый из R^4 и R^5 независимо является таким, как описано в третьем наборе переменных Формулы (I); и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - пятого наборов переменных Формулы (I).

[0065] В седьмом наборе переменных Формулы (I) Кольцо В  необязательно

замещено и выбрано из , ,  или ; X представляет собой -O- или -NH-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - шестого наборов переменных Формулы (I).

[0066] В восьмом наборе переменных Формулы (I) Кольцо В  необязательно



замещено и выбрано из , , или ; X представляет собой -O- или -NH-; Кольцо C представляет собой optionally замещенный C_{4-6} циклоалкил или optionally замещенный 5-6-членный гетероарил; каждый из R^4 и R^5 независимо является таким, как описано в третьем наборе переменных Формулы (I); и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - седьмого наборов переменных Формулы (I).

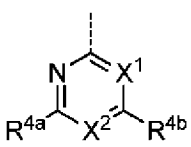
[0067] В девятом наборе переменных Формулы (I) каждый R^3 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, галоген, $-OC_{1-2}$ алкил, $-CN$, $-C_{3-4}$ циклоалкил или $-NRR'$, где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо optionally замещен; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восьмого наборов переменных Формулы (I).

[0068] В десятом наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо представляет собой водород или optionally замещенную группу, выбранную из C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-5} циклоалкила или фенила; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - девятого наборов переменных Формулы (I).

[0069] В одиннадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо является optionally замещенной группой, выбранной из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуropyримидина, дигидро-пиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридо-пиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидрофуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - десятого наборов переменных Формулы (I).

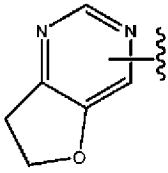
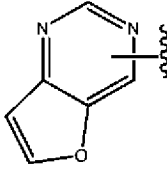
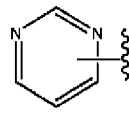
[0070] В двенадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо является optionally замещенной группой, выбранной из имидазола, пиразола, пиримидина, фуropyримидина, оксетана или дигидрофуropyримидина; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - одиннадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0071] В тринадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо представляет собой водород или optionally замещенную группу, выбранную из C_{1-4}

алкила,  или кольцевой группы, выбранной из C₃₋₅ циклоалкила, пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола или фенила, где X¹ представляет собой N или CR^{4d};

X² представляет собой N или CR^{4c}, где X¹ и X² не могут быть одновременно N; каждый из R^{4a}, R^{4b} и R^{4c} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO₂, C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-O-C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C₂₋₄ алкенил, C₂₋₄ алкинил, C(O)OC₁₋₄ алкил, C(O)OC₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкил, C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂, C(O)NH(C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкил), гетероциклическую группу, выбранную из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина или пиперазина, или гетероарильную группу, выбранную из фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола или тетразола; или R^{4c} и R^{4a}, или R^{4c} и R^{4b}, вместе с промежуточными атомами, необязательно образуют дигидрофуранильную, дигидропиранильную или тетрагидропиперидинильную гетероциклическую кольцевую группу; R^{4d} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO₂, C₁₋₄ алкил, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкил, C₂₋₄ алкенил, C₂₋₄ алкинил, C(O)OC₁₋₄ алкил, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкил или C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂; каждая из кольцевых групп R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, Cl, Br, CN, NO₂, C₁₋₄ алкила, C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкила, C₀₋₄ алкил-O-C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила, C₂₋₄ алкенила, C₂₋₄ алкинила, C(O)OC₁₋₄ алкила, C(O)OC₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила, C(O)NH₂, C(O)NHC₁₋₄ алкила, C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂, C(O)NH(C₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила), гетероциклической группы, выбранной из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина или пиперазина, и гетероарильной группы, выбранной из фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола или тетразола; каждая из указанных гетероциклических и гетероарильных групп для R^{4a}, R^{4b} и R^{4c}, и для заместителей R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C₁₋₄ алкила, -OH, -C(O)C₁₋₄ алкила, -C(O)OC₁₋₄ алкила или -C(O)OC₀₋₄ алкил-C₃₋₅ циклоалкила; и каждая из указанных алкильных и циклоалкильных групп для R^{4a}, R^{4b} и R^{4c}, и для заместителей R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -OH. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тринадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0072] В четырнадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый R⁴ независимо является C₁₋₄ алкилом или кольцевой группой, выбранной из C₃₋₅ циклоалкила, пиразола,

имидазола, оксетана, ,  или , где указанный R^4 C_{1-4} алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F и -O(C_{1-4} алкила), и где каждая из указанных кольцевых групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C_{1-4} алкила, -CN, -O(C_{1-4} алкила), C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкила, C(O)NHC $_{1-4}$ алкила, C(O)N(C_{1-4} алкил) $_2$ и пиперазина, где каждый из указанных необязательных заместителей R^4 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C_{1-4} алкила, -ОН и -OC $_{1-4}$ алкила. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тринадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0073] В пятнадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый R^4 независимо является таким, как описано в четырнадцатом наборе переменных Формулы (I), где R^4 C_{1-4} алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -O(C_{1-4} алкила), и каждая из кольцевых групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C_{1-4} алкила, -O(C_{1-4} алкила), C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкила, C(O)NHC $_{1-4}$ алкила, C(O)N(C_{1-4} алкил) $_2$ и пиперазина, и где каждый из необязательных заместителей R^4 необязательно замещен одним или более C_{1-4} алкилами. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - четырнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0074] В шестнадцатом наборе переменных Формулы (I) каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, -C(O)NHR 4 , -C(O)OR 4 , -NHC(O)R 4 , -NHC(O)OR 4 , - C_{0-4} алкил-NHR 4 , -OR 4 или R^7 . Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - пятнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0075] В семнадцатом наборе переменных Формулы (I) R^7 необязательно замещен и выбран из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуры-пиримидина, дигидропиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридопиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидро-фуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими,

как описано в любом из первого - шестнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0076] В восемнадцатом наборе переменных Формулы (I) R^7 необязательно замещен и выбран из пиримидина, имидазола, пиразола, тиазола, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, оксетана, дигидрофуropyримидина или изоиндолин-1,3-диона. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - семнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0077] В девятнадцатом наборе переменных Формулы (I) R^7 необязательно замещен и выбран из пиримидина, пиразола, фуropyримидина, тиазола или изоиндолин-1,3-диона; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восемнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0078] В двадцатом наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -O-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восемнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0079] В двадцать первом наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -NH-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восемнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0080] В двадцать втором наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -CH₂-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восемнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0081] В двадцать третьем наборе переменных Формулы (I) X представляет собой -OS₁₋₄алкил-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - восемнадцатого наборов переменных Формулы (I).

[0082] В двадцать четвертом наборе переменных Формулы (I) Кольцо C представляет собой необязательно замещенный C₄₋₆ циклоалкил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать третьего наборов переменных Формулы (I).

[0083] В двадцать пятом наборе переменных Формулы (I) Кольцо C представляет собой необязательно замещенный циклогексан; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать четвертого наборов переменных Формулы (I).

[0084] В двадцать шестом наборе переменных Формулы (I) R^1 представляет собой -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)₂R⁴, -C₀₋₄ алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷; R² представляет собой водород; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать пятого наборов переменных Формулы (I).

[0085] В двадцать седьмом наборе переменных Формулы (I) каждый R³ независимо представляет собой водород, метил, -Cl, -OCH₃, -CN, циклопропил, -NHCH₃ или -N(CH₃)₂; R⁶ представляет собой водород или метил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно

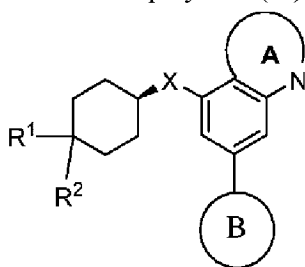
и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать шестого наборов переменных Формулы (I).

[0086] В двадцать восьмом наборе переменных Формулы (I) Кольцо С представляет собой необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0087] В двадцать девятом наборе переменных Формулы (I) Кольцо С представляет собой необязательно замещенный фенил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0088] В тридцатом наборе переменных Формулы (I) Кольцо С представляет собой необязательно замещенный фенил; X представляет собой $-OC_{1-4}$ алкил-; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0089] В другом варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены Формулой (II) или их фармацевтически приемлемыми солями:

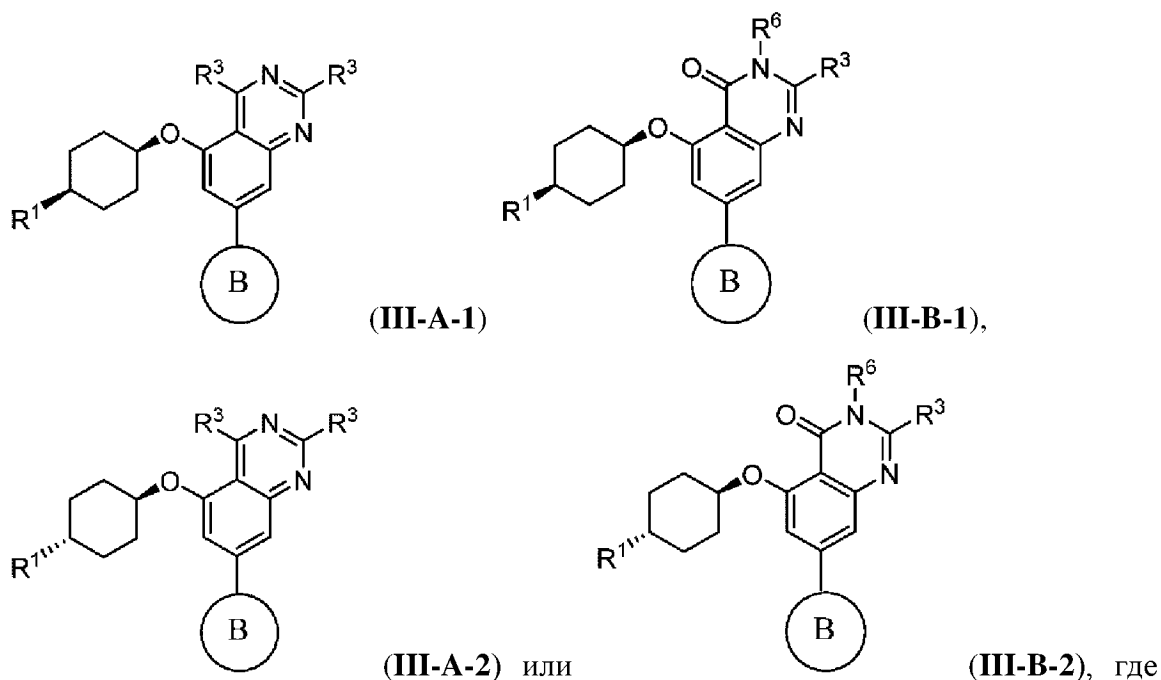


(II), где переменные Формулы (II) независимо являются такими, как описано ниже.

[0090] В первом наборе переменных Формулы (II) каждая из переменных Формулы (II) независимо является такой, как описано выше в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0091] Во втором наборе переменных Формулы (II) R¹ представляет собой -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)₂R⁴, -C₀₋₄ алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷; и R² представляет собой водород. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0092] В другом варианте осуществления соединения согласно изобретению представлено Формулой (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) или их фармацевтически приемлемыми солями:



переменные Формулы (II) независимо являются такими, как описано ниже.

[0093] В первом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), каждая из переменных (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) независимо является такой, как описано выше в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0094] Во втором наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[0095] В третьем наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^1 представляет собой $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$ или $-OR^4$; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого или второго наборов переменных (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

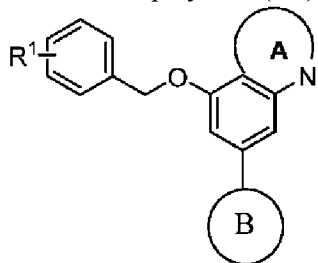
[0096] В четвертом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^1 представляет собой $-NHR^4$; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - третьего наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[0097] В пятом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^1 представляет собой $-OR^4$; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - четвертого наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[0098] В шестом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^3 независимо представляет собой водород, метил, $-Cl$, $-OCH_3$, $-CN$, циклопропил, $-NHCH_3$ или $-N(CH_3)_2$; R^6 представляет собой водород или метил; и

остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - пятого наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[0099] В еще одном варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены Формулой (IV) или их фармацевтически приемлемыми солями:



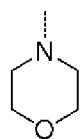
(IV), где переменные Формулы (IV) отдельно и независимо

являются такими, как описано ниже.

[00100] В первом наборе переменных Формулы (IV) каждая из переменных независимо является такой, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

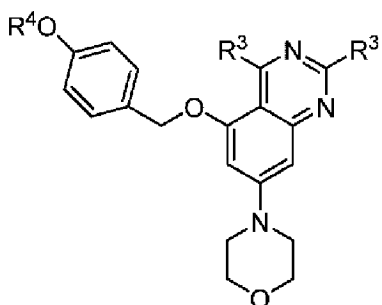
[00101] Во втором наборе переменных Формулы (IV) R^1 представляет собой водород, $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и остальные переменные Формулы (IV) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00102] В третьем наборе переменных Формулы (IV) Кольцо В представляет собой

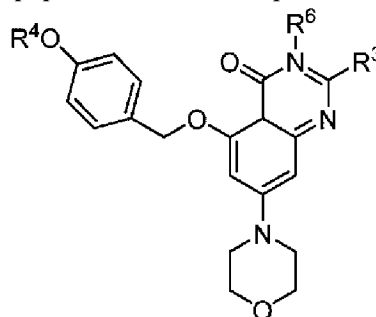


необязательно замещенный ; и остальные переменные Формулы (IV) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом или втором наборе переменных Формулы (IV).

[00103] В еще одном варианте осуществления, соединения согласно изобретению представлены Формулой (V-A) или (V-B), или их фармацевтически приемлемыми солями:



(V-A) или



(V-B), где

каждая из переменных Формулы (V-A) или (V-B) независимо является такой, как описано ниже.

[00104] В первом наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) каждая из

переменных независимо является такой, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00105] Во втором наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) R^3 представляет собой водород, метил, циклопропил, -F, -Cl, -OC₁₋₂алкил, -NRR' или -CN, где каждый указанный R^3 алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и -O(C₁₋₂ алкила); каждый R^4 независимо представляет собой необязательно замещенный C₁₋₄ алкил, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и -O(C₁₋₂ алкила); и R и R' отдельно и независимо представляют собой C₁₋₂ алкил или водород. Остальные переменные Формулы (V-A) или (V-B) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00106] В третьем наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) каждый R^3 независимо представляет собой водород, метил, -Cl, -OCH₃, -CN, циклопропил, -NHCH₃ или -N(CH₃)₂; и R^6 представляет собой водород или метил. Остальные переменные Формулы (V-A) или (V-B) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом или втором наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B).

[00107] В еще одном варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены любой из Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или их фармацевтически приемлемыми солями, где каждая из переменных в указанных Формулах независимо является такой, как показано в структурных формулах в Таблицах 1 и 2.

[00108] В еще одном варианте осуществления соединения согласно изобретению являются такими, как показано в Таблицах 1 и 2, или их фармацевтически приемлемыми солями. В одном определенном варианте осуществления изобретения представлено соединение, выбранное из группы соединений, перечисленных в Таблице 1, или их фармацевтически приемлемой соли. В другом определенном варианте осуществления изобретения представлено соединение, выбранное из группы соединений, перечисленных в Таблице 2, или их фармацевтически приемлемой соли.

[00109] При использовании в настоящем документе должны применяться следующие определения, если не указано иное. В рамках настоящего изобретения химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей химических элементов, версии CAS и Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. 1994. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Smith, M.B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00110] Как описано в настоящем документе, соединения согласно изобретению могут быть необязательно замещены одним или более заместителями, такими как проиллюстрированные в общем виде выше или представленные в качестве примеров конкретными классами, подклассами и соединениями изобретения. Следует понимать, что

фраза "необязательно замещенный" используется попеременно с фразой "замещенный или незамещенный". Как правило, термин "замещенный", независимо от того, предшествует ли ему термин "необязательно", или нет, относится к замене одного или более радикалов водорода в данной структуре радикалом указанного заместителя. Если не указано иное, необязательно замещенная группа может содержать заместитель в каждом замещаемом положении группы. Если больше одного положения в данной структуре может быть замещено больше чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместители могут быть одинаковыми или разными в каждом положении.

[00111] Как описано в настоящем документе, если термин "необязательно замещенный" предшествует некоторому перечню, указанный термин относится ко всем последующим замещаемым группам в данном перечне. Например, если X является галогеном; необязательно замещенным C₁₋₃ алкилом или фенилом; X может быть необязательно замещенным алкилом или необязательно замещенным фенилом. Аналогичным образом, если термин "необязательно замещенный" следует после некоторого перечня, указанный термин также относится ко всем замещаемым группам в предыдущем перечне, если не указано иное. Например: если X представляет собой галоген, C₁₋₃ алкил или фенил, где X необязательно замещен J^X, то C₁₋₃ алкил и фенил могут быть необязательно замещены J^X. Как очевидно для специалиста в данной области, такие группы, как H, галоген, NO₂, CN, NH₂, OH или OCF₃, не будут включены, поскольку они не являются замещаемыми группами. Как также очевидно специалисту в данной области, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, содержащее NH-группу, может быть необязательно замещено путем замены атома водорода заместителем. Если радикал или структура заместителя не определены или определены как "необязательно замещенные", радикал или структура заместителя является незамещенным.

[00112] Комбинации заместителей, предусмотренные в настоящем изобретении, предпочтительно представляют собой комбинации, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. Термин "стабильный" при использовании в настоящем документе относится к соединениям, которые практически не изменяются при воздействии условий, позволяющих их получение, обнаружение и, предпочтительно, их выделение, очистку и применение для одной или нескольких целей, раскрытых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления стабильное соединение или химически возможное соединение является соединением, которое практически не изменяется при хранении при температуре 40°C или ниже, в отсутствие влаги или других химически активных условий, по меньшей мере, в течение недели.

[00113] Термин "алкил" или "алкильная группа" при использовании в настоящем документе означает нормальную (т.е. неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая полностью насыщена. Если не определено иное, алкильные группы содержат 1-8 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкильные группы содержат 1-6 атомов углерода, и в других вариантах осуществления алкильные группы содержат 1-4 атома углерода (обозначены

как "C₁₋₄ алкил"). В других вариантах осуществления алкильные группы характеризуют как "C₀₋₄ алкил", представляющий либо ковалентную связь, либо C₁₋₄ алкильную цепь. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, бутил, изопропил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил. Термин "алкилен" при использовании в настоящем документе означает насыщенную двухвалентную углеводородную группу с нормальной или разветвленной цепью, примеры которой представлены метиленом, этиленом, изопропиленом и т.п. Термин "алкилиден" при использовании в настоящем документе означает двухвалентную связывающую алкильную группу с неразветвленной цепью. Термин "алкенил" при использовании в настоящем документе означает моновалентную углеводородную группу с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащую одну или более углерод-углеродных двойных связей. Термин "алкинил" при использовании в настоящем документе означает моновалентную углеводородную группу с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащую одну или более углерод-углеродных тройных связей.

[00114] Термин "циклоалкил" (или "карбоцикл") относится к моноциклическому C₃-C₈ углеводороду или бициклическому C₈-C₁₂ углеводороду, который является полностью насыщенным и имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы, и где любое отдельное кольцо в указанной бициклической кольцевой системе содержит 3-7 членов. Подходящие циклоалкильные группы включают, без ограничения перечисленным, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил и циклогептил.

[00115] Термин "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклоалкил" или "гетероциклический" при использовании в настоящем документе относится к моноциклической, бициклической, или трициклической кольцевой системе, в которой по меньшей мере одно кольцо в системе содержит один или несколько гетероатомов, которые являются одинаковыми или различными, и которое является полностью насыщенным или содержит одну или более единиц ненасыщенности, но которое не является ароматическим и имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклоалкил" или "гетероциклическая" группа содержит от трех до четырнадцати членов в кольце, из которых один или более членов кольца являются гетероатомом, независимо выбранным из кислорода, серы, азота или фосфора, и каждое кольцо в системе содержит 3-8 членов.

[00116] Примеры гетероциклических колец включают, без ограничения перечисленными, следующие моноциклы: 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротиофенил, 3-тетрагидротиофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино, 2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 1-тетрагидропиперазинил, 2-тетрагидропиперазинил, 3-тетрагидропиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиразолинил, 3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 5-пиразолинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил; и

следующие бициклы: 3-1Н-бензимидазол-2-он, 3-(1-алкил)-бензимидазол-2-он, индолинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, бензотиолан, бензодитиан и 1,3-дигидро-имидазол-2-он.

[00117] Термин "гетероатом" означает одно или более из кислорода, серы, азота или фосфора, включая любую окисленную форму азота, серы или фосфора; кватернизованную форму любого основного азота; или замещаемый азот гетероциклического кольца, например N (как в 3,4-дигидро-2Н-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR^+ (как в N-замещенном пирролидиниле).

[00118] Термин "ненасыщенный" при использовании в настоящем документе означает, что молекула имеет одну или более единиц ненасыщенности.

[00119] Термин "алкокси" или "тиоалкил" при использовании в настоящем документе относится к алкильной группе, как определено ранее, присоединенной к основной углеродной цепи через атом кислорода ("алкокси") или серы ("тиоалкил").

[00120] Термины "галогеналкил", "галогеналкенил" и "галогеналкокси" означают алкил, алкенил или алкокси, в зависимости от конкретного случая, замещенные одним или более атомами галогена. Термин "галоген" означает F, Cl, Br или I.

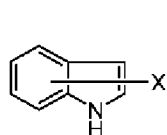
[00121] Термин "арил", используемый отдельно или как часть более крупной молекулы, как в "аралкиле", "аралкокси" или "арилоксиалкиле", относится к моноциклической, бициклической или трициклической карбоциклической кольцевой системе, содержащей в общей сложности от шести до четырнадцати членов в кольце, где указанная кольцевая система имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы, по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и где каждое кольцо в системе содержит 4-7 членов. Термин "арил" может использоваться попеременно с термином "арильное кольцо". Примеры арильных колец включают фенил, нафтил и антрацен.

[00122] Термин "гетероарил", используемый отдельно или как часть более крупной молекулы, как в "гетероаралкиле" или "гетероариалкокси", относится к моноциклической, бициклической и трициклической кольцевой системе, содержащей в общей сложности от пяти до четырнадцати членов в кольце, где указанная кольцевая система имеет одну точку присоединения к остальной части молекулы, по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, по меньшей мере одно кольцо в системе содержит один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, серы или фосфора, и где каждое кольцо в системе содержит 4-7 членов. Термин "гетероарил" может использоваться попеременно с термином "гетероарильное кольцо" или термином "гетероароматический".

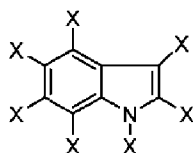
[00123] Дополнительные примеры гетероарильных колец включают следующие моноциклы: 2-фуранил, 3-фуранил, N-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил, N-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, пиридазинил (например, 3-пиридазинил),

2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, тетразолил (например, 5-тетразолил), триазолил (например, 2-триазолил и 5-триазолил), 2-тиенил, 3-тиенил, пиразолил (например, 2-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, пиразинил, 1,3,5-триазинил и следующие бициклы: бензимидазолил, бензофурил, бензотиофенил, индолил (например, 2-индолил), пуринил, хинолинил (например, 2-хинолинил, 3-хинолинил, 4-хинолинил) и изохинолинил (например, 1-изохинолинил, 3-изохинолинил или 4-изохинолинил).

[00124] Как описано в настоящем документе, связь, отходящая от заместителя к центру одного кольца в полициклической системе (как показано ниже), представляет собой замещение заместителя в любом замещаемом положении в любом из колец в полициклической системе. Например, Структура а представляет собой возможное замещение в любом из положений, показанных в Структуре b.

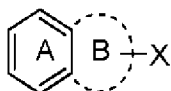


Структура а



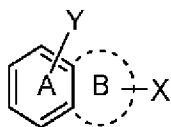
Структура b

[00125] Это также относится к полициклическим системам, конденсированным с необязательными кольцевыми системами (которые могут быть представлены пунктирными линиями). Например, в Структуре с, X является дополнительным заместителем и для кольца A, и для кольца B.



Структура с

[00126] Однако, если два кольца в полициклической системе имеют разные заместители, отходящие от центра каждого кольца, то тогда, если не указано иное, каждый заместитель представляет собой только замену в кольце, к которому он присоединен. Например, в Структуре d, Y необязательно является заместителем только для кольца A, а X является необязательным заместителем только для кольца B.



Структура d

[00127] Термин "защитная группа" при использовании в настоящем документе означает такие группы, которые предназначены для защиты функциональной группы, такой как, например, спирт, амин, карбоксил, карбонил и т.д., от нежелательных реакций во время процедур синтеза. Обычно используемые защитные группы раскрыты в издании Greene and Wuts, Protective Groups In Organic Synthesis, 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999), которое включено в настоящий документ посредством ссылки. Примеры

защитных групп азота включают ацильные, ароильные или карбамильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, т-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил, α-хлорбутирил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, 4-нитробензоил и хиральные вспомогательные соединения, такие как защищенные или незащищенные D, L или D, L-аминокислоты, такие как аланин, лейцин, фенилаланин и т.п.; сульфонильные группы, такие как бензолсульфонил, п-толуолсульфонил и т.п.; карбаматные группы, такие как бензилоксикарбонил, п-хлорбензилоксикарбонил, п-метоксибензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2 нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(п-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил, α,α-диметил-3,5-диметоксибензилокси-карбонил, бензгидрилоксикарбонил, т-бутилоксикарбонил, диизопропилметоксикарбонил, изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 2,2,2-трихлорэтоксикарбонил, феноксикарбонил, 4-нитрофеноксикарбонил, флуоренил-9-метоксикарбонил, циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил, фенилтиокарбонил и т.п., арилалкильные группы, такие как бензил, трифенилметил, бензилоксиметил и т.п. и силильные группы, такие как триметилсилил и т.п. Предпочтительными N-защитными группами является формил, ацетил, бензоил, пивалоил, т-бутилацетил, аланил, фенилсульфонил, бензил, т-бутилоксикарбонил (Boc) и бензилоксикарбонил (Cbz). Примеры защитных групп гидроксила включают простые эфиры, такие как тетрагидропиранил, трет-бутил, бензил, аллил и т.п.; силиловые эфиры, такие как триметилсилил, триэтилсилил, триизопропилсилил, трет-бутилдифенилсилил и т.п.; сложные эфиры, такие как ацетил, трифторацетил и т.п.; и карбонаты. Защитные группы гидроксила также включают защитные группы, подходящие для защиты фенолов.

[00128] Если не показано или не указано иное, структуры, приведенные в настоящем документе, подразумевают включение всех изомерных (например, энантиомерных, диастереомерных и геометрических (или конформационных)) форм структуры; например, конфигураций R и S для каждого асимметричного центра, (Z) и (E) изомеров двойной связи и (Z) и (E) конформационных изомеров. Таким образом, отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси настоящих соединений включены в объем изобретения. Соединения, которые были изображены с определенными стереохимическими центрами, обычно посредством использования штриховой (·····) или выделенной жирным (—) связи, являются стереохимически чистыми, но абсолютная стереохимия при этом все еще не определена. Такие соединения могут иметь R или S конфигурацию. В таких случаях, когда была определена абсолютная конфигурация,

хиральный центр(ы) на фигуре обозначают (R) или (S).

[00129] Если не указано иное, все таутомерные формы соединений согласно изобретению включены в объем изобретения. Кроме того, если не указано иное, структуры, показанные в настоящем документе, также должны включать соединения, которые отличаются только присутствием одного или более изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие настоящие структуры за исключением замены водорода дейтерием или тритием, или замены углерода ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, включены в объем данного изобретения. Такие соединения могут применяться, например, в качестве аналитических инструментов, зондов в биологических анализах или в качестве ингибиторов ДНК-ПК с улучшенным терапевтическим профилем.

Композиции, составы и введение соединений согласно изобретению

[00130] В еще одном варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая соединение любой из формул, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В другом варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая соединение из Таблицы 1. В другом варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая соединение из Таблицы 2. В другом варианте осуществления композиция дополнительно включает дополнительное терапевтическое средство.

[00131] Согласно другому варианту осуществления в изобретении предложена композиция, включающая соединение согласно изобретению или его фармацевтически приемлемое производное и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или растворитель. В одном варианте осуществления количество соединения в композиции согласно изобретению является таким, которое является эффективным для поддающегося измерению ингибирования ДНК-ПК в биологическом образце или у пациента. В другом варианте осуществления количество соединения в композициях согласно изобретению является таким, которое является эффективным для поддающегося измерению ингибирования ДНК-ПК. В одном варианте осуществления композиция согласно изобретению изготовлена в форме состава для введения пациенту, нуждающемуся в такой композиции. В другом варианте осуществления композиция согласно изобретению изготовлена в форме состава для перорального введения пациенту.

[00132] Термин "пациент" при использовании в настоящем документе означает животное, предпочтительно млекопитающее, и наиболее предпочтительно человека.

[00133] Термин "средство" используется в настоящем документе для обозначения химического соединения, малой молекулы, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

[00134] При использовании в настоящем документе "лечение" или "лечение", или "облегчение" или "уменьшение тяжести" используются попеременно. Эти термины относятся к подходу для получения полезных или желаемых результатов, включающих, помимо прочего, терапевтический эффект и/или профилактический эффект. Под

терапевтическим эффектом подразумевается любое терапевтически значимое улучшение или воздействие на одно или более заболеваний, состояний или симптомов, подвергаемых лечению. Для профилактического эффекта композиции могут вводить субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома или субъекту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже в том случае, если заболевание, состояние или симптом еще могли не проявиться. Такие термины также означают лечение заболевания у млекопитающего, например человека, включающее: (a) ингибирование заболевания, то есть остановку или предотвращение его развития; (b) облегчение заболевания, то есть регрессию патологического состояния; или (c) излечение заболевания.

[00135] Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству средства, которое является достаточным для достижения благоприятных или требуемых результатов. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от одного или более из: субъекта и патологического состояния, подвергаемого лечению, массы тела и возраста субъекта, тяжести патологического состояния, способа введения и т.п., которые могут быть легко определены средним специалистом в данной области. Термин также применим к дозе, которая обеспечивает изображение для обнаружения любым из способов визуализации, описанных в настоящем документе. Конкретная доза может изменяться в зависимости от одного или более из: конкретного выбранного средства, схемы применения, которой необходимо придерживаться, от введения в комбинации с другими соединениями или нет, от времени введения, ткани, подлежащей визуализации, и системы физической доставки, в которой оно содержится.

[00136] При использовании в настоящем документе "введение" относится к контакту, инъекции, дозированию, доставке или применению ингибитора ДНК-ПК субъекту, системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК в клетку или субъекту. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой контакт системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК с клеткой(ами). В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой доставку систему редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК в клетку(и). В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой применение системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК к клетке(ам). В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой инъекцию системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК в клетку(и). Введение может осуществляться *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Введение системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК в клетку(и) может быть выполнено одновременно или последовательно.

[00137] Термин "приобретенный" в отношении состояния или заболевания при использовании в настоящем документе означает нарушение или заболевание, которое развивается постэмбрионально; в отличие от врожденного нарушения, присутствующего при рождении. Врожденное нарушение может предшествовать приобретенному

нарушению.

[00138] Термины "врожденное" или "наследственное" состояние или заболевание означают генетическое нарушение, обнаруженное в геноме субъекта, которое присутствует у субъекта при рождении. "Геном" при использовании в настоящем документе включает весь генетический материал в ядре и цитоплазме, а также включает митохондриальный геном и рибосомный геном. Врожденное или наследственное может быть выражено в любое время в течение жизни субъекта, например, при рождении или во взрослом состоянии.

[00139] Термин "генетическое нарушение" или "генетическое заболевание" включает наследственные или приобретенные мутации в геноме субъекта, которые вызывают или могут вызывать заболевание.

[00140] Термины "полиморфизмы" или "наследственная изменчивость" означают различные формы гена в генетическом локусе.

[00141] Также следует понимать, что некоторые из соединений согласно настоящему изобретению могут существовать в свободной форме для лечения или, в соответствующих случаях, в виде своих фармацевтически приемлемых производных. Согласно настоящему изобретению фармацевтически приемлемое производное включает, без ограничения перечисленными, фармацевтически приемлемые пролекарства, соли, сложные эфиры, соли таких сложных эфиров или любой другой аддукт или производное, которое при введении нуждающемуся в этом пациенту способно давать, напрямую или непрямо, соединение, описанное иным способом в настоящем документе, или его метаболит или остаток. При использовании в настоящем документе термин "ингибиторно активный метаболит или его остаток" означает, что метаболит или его остаток также является ингибитором ДНК-ПК.

[00142] При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые, в рамках здравого медицинского решения, подходят для применения в контакте с тканями людей и низших животных без неспецифического токсического действия, раздражения, аллергической реакции и т.п.

[00143] Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в уровне техники. Например, фармацевтически приемлемые соли подробно описаны в публикации S. M. Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences, 66:1-19, 1977, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых солей присоединения нетоксичных кислот являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлороводородная кислота, бромоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, применяемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически

приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, роданид, п-толуолсульфонат, ундеканат, валерат и т.п. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N^+(C_{1-4} \text{ алкила})_4$. В настоящем изобретении также предусмотрена кватернизация любых содержащих основной азот групп соединений, раскрытых в настоящем документе. Растворимые или диспергируемые в воде или масле продукты могут быть получены путем такой кватернизации. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают, в соответствующих случаях, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с такими противоионами, как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, C_{1-8} сульфат и арилсульфонат.

[00144] Как описано выше, фармацевтически приемлемые композиции согласно настоящему изобретению дополнительно включают фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или растворитель, который при использовании в настоящем документе включает любые возможные растворители, разбавители или другие жидкие среды, дисперсии или суспензионные добавки, поверхностно-активные вещества, изотонические вещества, загустители или эмульгаторы, консерванты, твердые связующие вещества, смазывающие вещества и т.п., подходящие для конкретной желаемой лекарственной формы. В Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, 2005, ed. D.B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки, раскрыты различные носители, используемые в производстве фармацевтически приемлемых композиций, и известные способы их изготовления. За исключением тех случаев, когда любая обычная среда-носитель несовместима с соединениями согласно изобретению, например, в следствие возникновения какого-либо нежелательного биологического эффекта или иного неблагоприятного взаимодействия с каким-либо другим компонентом(ами) фармацевтически приемлемой композиции, предполагается, что ее применение включено в рамках настоящего изобретения.

[00145] Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают, без ограничения перечисленными, ионообменные материалы, глиозем, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты,

глицин, сорбиновую кислоту или сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блоксополимеры полиэтилена-полиоксипропилена, ланолин, сахара, такие как лактозу, глюкозу и сахарозу; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлозу, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы; порошок трагаканта; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло; сафлоровое масло; кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли; такие пропиленгликоль или полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический раствор хлорида натрия; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделительные вещества, вещества для получения покрытия, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композиции в соответствии с решением разработчика состава.

[00146] Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, в форме ингаляционного спрея, наружно, ректально, назально, буккально, вагинально или посредством имплантируемого резервуара. Используемый в настоящем документе термин "парентеральный" включает методы подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутрисуставной, внутрисиновиальной, интратеральной, интратекальной, внутриглазной, внутрипеченочной, внутриочаговой, эпидуральной, интраспинальной и внутричерепной инъекции или инфузии. Предпочтительно композиции вводят перорально, внутривенно или внутримышечно. Стерильные инъекционные формы композиций согласно изобретению могут быть водной или масляной суспензией. Такие суспензии могут быть изготовлены в соответствии с методами, известными в уровне техники, при использовании подходящих диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный препарат для инъекций также может быть стерильным раствором или суспензией для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые среды и растворители, которые могут использоваться, включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды.

[00147] Для этой цели может использоваться любое нелетучее масло без вкуса и запаха, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, пригодны для изготовления

препаратов для инъекций, как и природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в виде их полиоксиэтилированных вариантов. Такие масляные растворы или суспензии могут также содержать спиртовой длинноцепочечный разбавитель или диспергирующее вещество, такой как карбоксиметилцеллюлозу или подобные диспергирующие вещества, которые обычно используются в производстве фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как серии Tween, Span и другие эмульгаторы или вещества, повышающие биодоступность, которые обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также могут использоваться в целях изготовления состава.

[00148] Фармацевтически приемлемые композиции согласно изобретению могут вводить перорально в любой перорально приемлемой лекарственной форме, включающей, без ограничения перечисленным, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие вещества, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсул полезные разбавители включают лактозу и высушенный кукурузный крахмал. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, действующее вещество объединяют с эмульгирующими и суспендирующими веществами. При необходимости также могут быть добавлены некоторые подсластители, ароматизаторы или красители.

[00149] В альтернативе фармацевтически приемлемые композиции согласно изобретению могут вводить в форме суппозиторий для ректального введения. Они могут быть изготовлены путем смешивания средства с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, которое является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре и поэтому будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие материалы включают масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

[00150] Фармацевтически приемлемые композиции согласно изобретению также могут применять наружно, в особенности, когда мишень лечения включает области или органы, легко доступные при наружном применении, включая заболевания глаз, кожи или нижних отделов кишечника. Подходящие составы для наружного применения могут быть легко изготовлены для каждой из этих областей или органов.

[00151] Наружное применение в нижних отделах кишечного тракта может осуществляться в виде ректального суппозитория (см. выше) или в подходящем составе для промывания кишечника. Также могут использоваться трансдермальные пластыри, применяемые на поверхности кожи.

[00152] Для наружного применения фармацевтически приемлемые композиции могут быть изготовлены в виде подходящей мази, содержащей действующий компонент, суспендированный или растворенный в одном или нескольких носителях. Носители для

наружного введения соединений согласно изобретению включают, без ограничения перечисленными, минеральное масло, вазелиновое масло, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, полиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и воду. В альтернативе фармацевтически приемлемые композиции могут быть изготовлены в виде подходящего лосьона или крема, содержащего действующие компоненты, суспендированные или растворенные в одном или нескольких фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают, без ограничения перечисленными, минеральное масло, сорбитан моностеарат, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

[00153] Для глазного применения фармацевтически приемлемые композиции могут быть изготовлены, например, в виде микронизированных суспензий в изотоническом, pH-регулируемом стерильном растворе хлорида натрия или другом водном растворе, или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом, pH-регулируемом стерильном растворе хлорида натрия или другом водном растворе с или без консерванта, такого как хлорид бензилалкония. В альтернативе для глазного применения фармацевтически приемлемые композиции могут быть изготовлены в виде мази, такой как вазелин. Фармацевтически приемлемые композиции согласно изобретению также можно вводить с помощью назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции изготавливают в соответствии с методиками, хорошо известными в области производства фармацевтических составов, и они могут быть получены в виде растворов в растворе хлорида натрия с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, усилителей абсорбции для повышения биодоступности, фторуглеводородов и/или других стандартных солюбилизирующих или диспергирующих веществ.

[00154] Наиболее предпочтительно фармацевтически приемлемые композиции согласно изобретению изготавливают в форме составов для приема внутрь.

[00155] Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают, без ограничения перечисленными, фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и настойки. В дополнение к действующим соединениям жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как, например, воду или другие растворители, солюбилизирующие вещества и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, из зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей композиции для перорального введения также могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подсластители, ароматизаторы и отдушки.

[00156] Препараты для инъекций, например, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций, могут быть изготовлены в соответствии с известным уровнем техники при использовании подходящих диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный препарат для инъекций также может быть стерильным раствором, суспензией или эмульсией для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые носители и растворители, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, U.S.P. и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может использоваться любое нелетучее масло без запаха и вкуса, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при изготовлении препаратов для инъекций используются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

[00157] Составы для инъекций можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр или путем включения стерилизующих веществ в форме стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций перед применением.

[00158] Для продления действия соединения согласно настоящему изобретению, часто желательно замедлять всасывание соединения при подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто при использовании жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с плохой растворимостью в воде. Скорость всасывания соединения при этом зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. В альтернативе растворение или суспендирование соединения в масляном растворителе приводит к задержке абсорбции вводимой парентерально формы соединения. Депо-формы для инъекций получают путем формирования микроинкапсулированных матриц соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения и полимера и природы конкретного используемого полимера, скорость высвобождения соединения можно регулировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают сложные полиортоэфиры и полиангидриды. Депо-составы для инъекций также получают путем заключения соединения в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

[00159] Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно являются суппозиториями, которые могут быть изготовлены путем смешивания соединений согласно изобретению с подходящими нераздражающими вспомогательными веществами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела и поэтому плавятся в прямой кишке или полости влагалища и высвобождают действующее соединение.

[00160] Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах действующее соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, таким как цитрат натрия или фосфат дикальция, и/или а) наполнителями или сухими разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота, б) связующими веществами, такими как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик, в) увлажняющими веществами, такими как глицерин, г) разрыхлителями, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, д) замедлителями растворения, такими как парафин, е) ускорителями абсорбции, такими как четвертичные соединения аммония, ж) смачивающими веществами, такими как, например, цетиловый спирт и глицерина моностеарат, з) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина и и) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма также может включать буферные вещества.

[00161] Твердые композиции аналогичного типа также могут использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой и т.п. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть изготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области производства фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать вещества, придающие непрозрачность, а также могут иметь такой состав, что они высвобождают действующее вещество(а) только, или предпочтительно, в определенной части кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры образующих матрицу композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции подобного типа также могут использоваться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

[00162] Действующие соединения также могут находиться в микрокапсулированной форме с одним или несколькими наполнителями, как указано выше. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть изготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия, покрытия, регулирующие высвобождение, и другими покрытиями, хорошо известными в области производства фармацевтических препаратов. В таких твердых лекарственных формах действующее соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие

лекарственные формы также могут содержать, что является обычной практикой, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например, смазывающие вещества для таблетирования и другие вспомогательные вещества для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы также могут содержать буферные вещества. Они могут необязательно содержать вещества, придающие непрозрачность, а также могут иметь такой состав, что они высвобождают действующее вещество(а) только, или предпочтительно, в определенной части кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры образующих матрицу композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

[00163] Лекарственные формы для наружного или трансдермального введения соединения согласно изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, средства для ингаляции или пластыри. Действующее вещество смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, которые могут потребоваться. Глазная композиция, ушные капли и глазные капли также предусмотрены как входящие в объем настоящего изобретения. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрено применение трансдермальных пластырей, которые обладают дополнительным преимуществом обеспечения контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены путем растворения или дозирования соединения в подходящей среде. Усилители абсорбции также могут использоваться для увеличения потока соединения через кожу. Скорость можно регулировать либо предоставлением регулирующей скорости мембраны, либо путем диспергирования соединения в полимерной матрице или геле.

[00164] Соединения согласно изобретению предпочтительно включают в единичную лекарственную форму для удобства введения и однородности дозы. Используемое в настоящем документе выражение "единичная лекарственная форма" относится к физически дискретной единице средства, подходящей для пациента, подлежащего лечению. Впрочем, следует понимать, что общее суточное применение соединений и композиций согласно настоящему изобретению будет определено лечащим врачом в рамках здорового медицинского решения. Конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента или организма будет зависеть от множества факторов, включающих нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного применяемого соединения; конкретной применяемой композиции; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного применяемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением, и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

[00165] Количество соединений согласно настоящему изобретению, которое может

быть объединено с материалами-носителями с получением композиции в единичной лекарственной форме, будет изменяться в зависимости от реципиента, подвергаемого лечению, конкретного способа введения. Предпочтительно композиции должны иметь такой состав, чтобы доза от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/день ингибитора могла быть введена пациенту, получающему такие композиции.

[00166] В зависимости от конкретного пролиферативного состояния или рака, подлежащего лечению, дополнительные терапевтические средства, которые обычно применяются для лечения или предупреждения такого состояния, также могут присутствовать в композициях согласно изобретению. При использовании в настоящем документе дополнительные терапевтические средства, которые обычно применяются для лечения или предупреждения конкретного пролиферативного состояния или рака, известны как "подходящие для заболевания или состояния, подлежащего лечению". Примеры дополнительных терапевтических средств приведены ниже.

[00167] Количество дополнительного терапевтического средства, присутствующего в композициях согласно изобретению, не будет превышать количество, которое обычно вводят в композиции, содержащей такое терапевтическое средство в качестве единственного действующего вещества. Предпочтительно количество дополнительного терапевтического средства в настоящих раскрытых композициях будет изменяться от приблизительно 50% до 100% количества, которое обычно присутствует в композиции, включающей такое средство в качестве единственного терапевтически активного вещества.

Применения соединений и композиций согласно изобретению

[00168] В одном варианте осуществления изобретения предложены способ сенсibilизации клетки по отношению к терапевтическому средству или патологическому состоянию, которое вызывает повреждение ДНК, включающий этап контакта клетки с одним или более ингибиторами ДНК-ПК Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или их фармацевтически приемлемой солью. В одном определенном варианте осуществления в способах изобретения применяется один или более ингибиторов ДНК-ПК Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) и (III-B-2) или их фармацевтически приемлемые соли.

[00169] В изобретении также предложены способы потенцирования терапевтической схемы лечения рака, включающие этап введения нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества ингибитора ДНК-ПК (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B) или его фармацевтически приемлемой соли. В одном определенном варианте осуществления в способах изобретения применяется один или более ингибиторов ДНК-ПК Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) и (III-B-2) или их фармацевтически приемлемые соли. В одном аспекте терапевтическая схема лечения рака включает лучевую терапию.

[00170] Соединения согласно изобретению могут применяться в случаях, когда лучевая терапия показана для, повышения терапевтической эффективности такого

лечения. Кроме того, лучевая терапия часто показана в качестве вспомогательной процедуры с хирургией при лечении рака. Задача лучевой терапии в качестве вспомогательной процедуры состоит в снижении риска рецидива и улучшении выживаемости без рецидивов при контроле первичной опухоли. Вспомогательная лучевая терапия показана при нескольких заболеваниях, включающих рак толстой кишки, прямой кишки, легкого, гастроэзофагеального перехода и молочной железы, как описано ниже.

[00171] Изобретение также может осуществляться на практике путем включения другого противоопухолевого химиотерапевтического средства с соединением согласно изобретению в терапевтическую схему лечения рака, с лечевой терапией или без нее. Комбинация соединения ингибитора ДНК-ПК согласно изобретению с такими другими средствами может потенцировать химиотерапевтический протокол. Например, соединение-ингибитор согласно изобретению могут вводить с этопозидом или блеомицином, средствами, которые, как известно, вызывают разрыв цепи ДНК.

[00172] Изобретение также относится к радиосенсибилизации опухолевых клеток с применением соединений согласно изобретению, таких как ингибиторы ДНК-ПК Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) и (III-B-2) или их фармацевтически приемлемые соли. Предпочтительные соединения являются соединениями, описанными для фармацевтических композиций согласно изобретению. Соединение, которое может "радиосенсибилизировать" клетку, используемый в настоящем документе, определяют как молекулу, предпочтительно молекулу с низкой молекулярной массой, вводимую животным в терапевтически эффективном количестве для повышения чувствительности клеток к электромагнитному излучению и/или эффективности лечения заболеваний, которые поддаются лечению электромагнитным излучением (например, рентгеновским излучением). Заболевания, которые поддаются лечению электромагнитным излучением, включают неопластические заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли и раковые клетки.

[00173] В настоящем изобретении также предложены способы лечения рака у животного, которые включают введение животному эффективного количества ингибитора ДНК-ПК, такого как, например, соединение согласно изобретению. Изобретение также направлено на способы ингибирования роста раковых клеток, включающие процессы клеточной пролиферации, инвазивности и метастазирования в биологических системах. Способы включают применение соединения согласно изобретению в качестве ингибитора роста раковых клеток. Предпочтительно способы применяются для ингибирования или уменьшения роста раковых клеток, инвазивности, метастазирования или возникновения опухолей у живых животных, таких как млекопитающие. Соединения согласно изобретению могут применяться отдельно или в комбинации с применением ИИ или одного или более химиотерапевтических средств для лечения рака или ингибирования роста раковых клеток. Способы согласно изобретению также могут быть адаптированы для применения в аналитических системах, например, для анализа роста раковых клеток и их свойств, а также для идентификации соединений, которые влияют на рост раковых

клеток.

[00174] Опухоли или новообразования включают рост клеток ткани, в которой размножение клеток является неконтролируемым и прогрессирующим. Некоторые подобные образования являются доброкачественными, но другие называются "злокачественными" и могут привести к гибели организма. Злокачественные новообразования или "злокачественные опухоли" отличаются от доброкачественных новообразований тем, что, помимо агрессивной клеточной пролиферации, они могут проникать в окружающие ткани и давать метастазы. Кроме того, злокачественные новообразования характеризуются тем, что они демонстрируют более существенную потерю дифференцировки (более существенную "дедифференцировку") и их организации относительно друг друга и окружающих их тканей. Это свойство также называется "анаплазией".

[00175] Новообразования, поддающиеся лечению согласно настоящему изобретению, также включают солидные опухоли, то есть карциномы и саркомы. Карциномы включают злокачественные новообразования, которые образуются из эпителиальных клеток, которые инфильтрируют (проникают) в окружающие ткани и вызывают появление метастазов. Аденокарциномы представляют собой карциномы, образующиеся из железистой ткани или из тканей, которые образуют узнаваемые железистые структуры. Другая широкая категория онкологических заболеваний включает саркомы, которые представляют собой опухоли, клетки которых заключены в фибриллярное или однородное вещество, такое как эмбриональную соединительную ткань. Изобретение также обеспечивает лечение злокачественных опухолей миелоидной или лимфоидной систем, включая лейкозы, лимфомы и другие онкологические заболевания, которые обычно не присутствуют в виде опухолевой массы, а распределены в сосудистой или лимфоретикулярной системах.

[00176] Активность ДНК-ПК может быть ассоциирована с различными формами рака, например, онкологическими заболеваниями у взрослых и детей, ростом солидных опухолей/злокачественных новообразований, миксоидной и круглоклеточной карциномой, локально распространенными опухолями, метастатическим раком, саркомами мягких тканей человека, включая саркому Юинга, раковые метастазы, включая лимфатические метастазы, плоскоклеточную карциному, особенно головы и шеи, плоскоклеточную карциному пищевода, карциному полости рта, гемобластные новообразования, включая множественную миелому, лейкоз, в том числе острый лимфоцитарный лейкоз, острый нелимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз, эффузионные лимфомы (лимфомы, локализующиеся в полостях тела), лимфому тимуса, рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак коры надпочечников, АКТГ-продуцирующие опухоли, формы немелкоклеточного рака, рак молочной железы, включая мелкоклеточную карциному и протоковую карциному, формы рака желудочно-кишечного

тракта, включая рак желудка, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишки, полипы, ассоциированные с колоректальной неоплазией, рак поджелудочной железы, рак печени, злокачественные опухоли мочеполовой системы, включая рак мочевого пузыря, в том числе первичные поверхностные опухоли мочевого пузыря, инвазивную переходноклеточную карциному мочевого пузыря и мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, злокачественные новообразования женских половых путей, включая рак яичника, первичные эпителиальные новообразования брюшины, карциному шейки матки, формы рака эндометрия матки, рак влагалища, рак вульвы, рак матки и солидные опухоли овариального фолликула, злокачественные новообразования мужских половых путей, включая рак яичка и рак полового члена, рак почки, включая почечно-клеточную карциному, рак головного мозга, в том числе внутренние опухоли головного мозга, нейробластома, астроцитарные опухоли головного мозга, глиомы, инвазию метастатических опухолевых клеток в центральную нервную систему, формы рака костей, включая остеомы и остеосаркомы, формы рака кожи, включая злокачественную меланому, прогрессирование опухоли из кератиноцитов кожи человека, плоскоклеточный рак, рак щитовидной железы, ретинобластома, нейробластома, выпот в брюшной полости, злокачественный плевральный выпот, мезотелиому, опухоли Вильмса, рак желчного пузыря, трофобластические новообразования, гемангиоперицитому и саркому Капоши. Способы потенцирования лечения этих и других форм рака также охвачены изобретением.

[00177] В изобретении предложен способ ингибирования активности ДНК-ПК в биологическом образце, которые включают контакт биологического образца с соединением или композицией согласно изобретению. Термин "биологический образец" при использовании в настоящем документе означает образец вне живого организма и включает, без ограничения, культуры клеток или их экстракты; биопсийный материал, полученный у млекопитающего, или его экстракты; и кровь, слюну, мочу, кал, сперму, слезную жидкость или другие жидкости организма или их экстракты. Ингибирование активности киназы, в частности активности ДНК-ПК, в биологическом образце может применяться для различных целей, известных специалисту в данной области. Примеры таких целей включают, без ограничения перечисленным, хранение биологических образцов и биологические анализы. В одном варианте осуществления способ ингибирования активности ДНК-ПК в биологическом образце ограничен нетерапевтическими способами.

[00178] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы, композиции и наборы для редактирования генома-мишени, например, путем корректирования мутации. Такие способы, композиции и наборы могут повышать эффективность редактирования генома посредством применения ингибитора ДНК-ПК.

[00179] Система геномного редактирования может стимулировать или вызывать образование разрыва(ов) ДНК, такого как ДЦР, в требуемом локусе в геноме (или целевой

области генома). Создание расщепления ДНК побуждает клеточные ферменты производить репарацию на участке разрыва либо посредством вводящего ошибки пути NHEJ, либо посредством не вводящего ошибки пути HDR. В NHEJ повреждение ДНК восстанавливается путем соединения двух концов разрыва ДНК в серии ферментных процессов с участием ферментов гетеродимера Ku70/80 и ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК). Механизм репарации включает в себя захват и выравнивание двух концов ДНК, разрезание, элонгацию и лигирование (Rouet et al.; Dexheimer T. DNA repair pathways and mechanisms. B: Mathews L, Cabarcas S, Hurt E, editors. DNA repair of cancer stem cells. Dordrecht: Springer; 2013 p. 19-32), что приводит к образованию небольших инсерционных или делеционных мутаций (инделов) на участке разрыва. Инделы, введенные в кодирующую последовательность гена, могут вводить либо преждевременные стоп-кодоны, либо мутации со сдвигом рамки считывания, которые приводят к образованию нефункциональных, усеченных белков. Механизм пути HDR менее понятен и включает другой набор репарационных белков, таких как Rad51, которые стимулируют встраивание в цепь донорной репарационной матрицы для вставки основания или замены гена. Следовательно, HDR позволяет вводить матрицу экзогенной ДНК для получения требуемого результата редактирования ДНК в геноме и может быть мощной стратегией для моделирования трансляционных заболеваний и терапевтического редактирования генома с целью восстановления функции гена.

[00180] Из двух путей репарации ДНК, NHEJ присутствует с гораздо более высокой частотой, при этом имеются сообщения о более чем 70% эффективности, которая может быть достигнута даже в нейронах (Swiech et al., "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9", Nat Biotechnol. 2015 Jan; 33(1):102-62014). С другой стороны, коррекция гена по пути HDR происходит с очень низкой частотой и во время S и G2 фазы, когда репликация ДНК завершена, и сестринские хроматиды доступны для использования в качестве матриц репарации (Heyer et al., Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annual Review of Genetics 44:113-139, 2010). Поскольку NHEJ встречается в течение всего клеточного цикла, в конкуренции и предпочтительно в сравнении с HDR во время S и G2 фазы, направленная вставка по пути HDR остается сложной задачей и направлением для дальнейших исследований.

[00181] ДНК-протеинкиназа (ДНК-ПК) играет роль в различных процессах репарации ДНК. ДНК-ПК участвует в репарации двухцепочечных разрывов ДНК посредством активации пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Считается, что NHEJ проходит в три этапа: распознавание ДЦР, процессинг ДНК с удалением нелигатируемых концов или других форм повреждения на концах и, наконец, лигирование концов ДНК. Распознавание ДЦР осуществляется при связывании Ku гетеродимера с разорванными концами ДНК с последующим рекрутингом двух молекул каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК_{кс}) к обеим сторонам ДЦР; это служит для защиты разрушенных концов, пока не будут привлечены дополнительные процессирующие ферменты. Последние данные подтверждают предположение, что ДНК-

ПКкс фосфорилирует процессирующий фермент Artemis, а также саму себя, чтобы подготовить концы ДНК к дополнительному процессингу. В некоторых случаях для синтеза новых концов перед этапом лигирования может требоваться ДНК-полимераза. Считается, что аутофосфорилирование ДНК-ПКкс вызывает конформационные изменения, которые раскрывают центральную ДНК-связывающую полость, высвобождают ДНК-ПКкс из ДНК и облегчают окончательное повторную лигирование концов ДНК.

[00182] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы, композиции и наборы для улучшения редактирования генов, в частности, повышения эффективности репарации разрывов ДНК по пути HDR или эффективности ингибирования или подавления репарации разрывов ДНК по пути NHEJ, в системах редактирования генома, включающих репарацию HDR на основе CRISPR в клетках. Без ограничения какой-либо конкретной теорией, считается, что система редактирования генома, введенная в клетку(и), взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) гена-мишени, что приводит к разрыву ДНК или вызывает его образование; такой разрыв ДНК восстанавливается по нескольким путям репарации, например HDR, при этом ингибитор ДНК-ПК, вводимый в клетку(и), ингибирует, блокирует или подавляет путь репарации NHEJ, и частота или эффективность пути HDR репарации ДНК может быть увеличена или повышена.

[00183] Взаимодействие между системой редактирования генома и нуклеиновой кислотой(ами) гена-мишени может быть гибридизацией, по меньшей мере, части системы редактирования генома с нуклеиновой кислотой(ами) гена-мишени или любым другим распознаванием нуклеиновой кислоты (кислот) гена-мишени системой редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления такое взаимодействие представляет собой взаимодействия белка-ДНК или гибридизацию между парами оснований.

[00184] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы редактирования одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК. Редактирование может происходить одновременно или последовательно. Редактирование одной или более геномных областей-мишеней включает любой вид генетических манипуляций или инженерии генома клетки. В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или более геномных областей-мишеней может включать вставки, делеции или замены геномных областей в клетке(ах). Геномные области включают генетический материал в клетке(ах), такой как ДНК, РНК, полинуклеотиды и олигонуклеотиды. Геномные области в клетке(ах) также включают геномы митохондрий или хлоропластов, содержащихся в клетке(ах).

[00185] В некоторых вариантах осуществления вставки, делеции или замены могут быть либо в кодирующей, либо в не кодирующей геномной области, в интронных или экзонных областях, или их любых комбинациях, включая их перекрывающиеся или неперекрывающиеся сегменты. При использовании в настоящем документе

"некодирующая область" относится к геномным областям, которые не кодируют аминокислотную последовательность. Например, некодирующие области включают интроны. Кодирующие области относятся к геномным областям, которые кодируют аминокислотную последовательность. Например, кодирующие области включают экзоны.

[00186] В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или более геномных областей-мишеней может происходить в одной или более областях-мишенях в геноме клетки (клеток). В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или более геномных областей-мишеней может происходить, например, в экзоне, интроне, сайте начала транскрипции, в промоторной области, энхансерной области, области сайленсера, области инсулятора, антирепрессоре, посттрансляционном регуляторном элементе, сигнале полиаденилирования (например, минимальной поли-А), консервативной области, участке связывания фактора транскрипции или их любых комбинациях.

[00187] В некоторых вариантах осуществления введение в клетку(и) ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования приводит к повышению эффективности направленного редактирования генома по сравнению с условиями, в которых ингибитор ДНК-ПК и система геномного редактирования не вводят в клетку(и). В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность редактирования является приблизительно 1-кратной, 2-кратной, 3-кратной, 4-кратной, 5-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 40-кратной, 50-кратной или 100-кратной по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не вводят ингибитор ДНК-ПК. Эффективность геномного редактирования может быть измерена любым способом, известным в уровне техники, например, любым способом, который позволяет устанавливать частоту направленной интеграции полинуклеотида, или путем измерения частоты направленного мутагенеза. Направленная интеграция полинуклеотида также может приводить к изменению или замене последовательности в геноме, хромосоме или представляющей интерес области в клеточном хроматине. Направленная интеграция полинуклеотида может приводить к направленным мутациям, включающим, без ограничения, точечные мутации (т.е. превращение одной пары оснований в другую пару оснований), замены (т.е. превращение множества пар оснований в другую последовательность идентичной длины), вставки одной или более пар оснований, делеции одной или более пар оснований и любую комбинацию вышеуказанных изменений последовательности.

[00188] В некоторых вариантах осуществления способы редактирования одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) включают введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления клетка(и) синхронизирована в S или G2 фазе клеточного цикла. Синхронизация клетки (клеток) в S или G2 фазе клеточного цикла может быть достигнута с помощью любого способа, известного в уровне техники. В качестве неограничивающего примера, средства,

которые могут использоваться для синхронизации клетки (клеток) в S или G2 фазе клеточного цикла, включают афидиколин, гидроксикарбамид, ловастатин, мимозин, нокодазол, тимидин или их любые комбинации (см., Lin et al., "Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery", *Elife*. 2014 Dec 15; 3). В некоторых вариантах осуществления средства для синхронизации клеток могут вводить в любое время в ходе процесса редактирования гена. В некоторых вариантах осуществления клетка(и) может быть синхронизирована в S или G2 фазе клеточного цикла до, во время или после введения в клетку(и) системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК.

[00189] В некоторых вариантах осуществления способы редактирования одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводят к повышению выживания клетки по сравнению с условиями, в которых система редактирования генома и ингибитор ДНК-ПК не были введены в клетку(и), или по сравнению с условиями, в которых клетка(и) подвергается контакту с или введению только системы редактирования генов, но не ингибитора ДНК-ПК.

[00190] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути HDR. Введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводит к образованию разрыва ДНК в области-мишенях генома и затем разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, по пути HDR. Эти способы приводят к увеличению уровня HDR-опосредованной репарации (например, пути HDR) в одной или более геномных областях-мишенях, приводя к более высокой эффективности HDR-опосредованной репарации по сравнению с условиями, в которых ингибитор ДНК-ПК и геномную систему редактирования не вводят в клетку(и). В некоторых вариантах осуществления эффективность опосредованной путем HDR репарации разрыва ДНК является приблизительно 1-кратной, 2-кратной, 3-кратной, 4-кратной, 5-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 40-кратной, 50-кратной или 100-кратной по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не ингибитор ДНК-ПК. Эффективность опосредованной путем HDR репарации может быть измерена любым способом, известным в уровне техники, например, путем установления частоты направленной интеграции полинуклеотида или путем измерения частоты направленного мутагенеза.

[00191] В некоторых вариантах осуществления способы в настоящем документе предусматривают репарацию разрыва ДНК путем повышения эффективности пути HDR.

[00192] Путь HDR может быть "каноническим" или "альтернативным". "HDR" (направленная гомологией репарация) относится к специализированной форме репарации ДНК, которая происходит, например, во время репарации двухцепочечных разрывов или

ника ДНК в клетке(ах). HDR двухцепочечных разрывов обычно основана на гомологии нуклеотидных последовательностей и использует "донорную" молекулу для направленной матрицей репарации молекулы "мишени" (например, молекулы, в которой образовался двухцепочечный разрыв), и может привести к переносу генетической информации от донора к мишени. Канонический HDR двухцепочечных разрывов обычно основан на BRCA2 и RAD51 и, как правило, использует донорную молекулу дцДНК. Неканонический или "альтернативный" HDR представляет собой механизм HDR, который подавляют BRCA2, RAD51 и/или функционально близкие гены. Альтернативный HDR может использовать оцДНК или содержащую ники донорную молекулу дцДНК. См., например, WO 2014172458.

[00193] В некоторых вариантах осуществления способы репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути HDR путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводят к повышению выживания клетки по сравнению с условиями, в которых систему редактирования генома и ингибитор ДНК-ПК не вводят в клетку(и), или по сравнению с условиями, в которых в клетку(и) вводят только систему редактирования гена, но не ингибитор ДНК-ПК.

[00194] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы ингибирования или подавления NHEJ-опосредованной репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях в клетке(ах). В некоторых вариантах осуществления ингибирование или подавление NHEJ-опосредованной репарации разрыва ДНК осуществляется путем ингибирования или подавления пути NHEJ. Путь NHEJ может быть либо классическим ("каноническим"), либо альтернативным путем NHEJ (alt-NHEJ или опосредованным микрогомлогией соединением концов (MMEJ)). Путь NHEJ или путь alt-NHEJ подавляется в клетке(ах) путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК.

[00195] Классический путь репарации NHEJ представляет собой путь репарации двухцепочечных разрывов ДНК, в котором концы двухцепочечного разрыва лигируются без существенной гомологии. В классической репарации NHEJ используются несколько факторов, включающих гетеродимер KU70/80 (KU), XRCC4, Лигазу IV и каталитическую субъединицу ДНК-протеинкиназы (ДНК-ПКк). Alt-NHEJ является другим путем репарации двухцепочечных разрывов. В Alt-NHEJ микрогомлогичная последовательность длиной 5-25 пар оснований используется при выравнивании разрушенных концов перед соединением концов разрыва. Alt-NHEJ в целом не зависит от гетеродимера KU70/80 (KU), XRCC4, Лигазы IV, каталитической субъединицы ДНК-протеинкиназы (ДНК-ПКк), RAD52 и ERCC1. См. Bennardo et al., "Alternative-NHEJ is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair", *PLOS Genetics*, June 27, 2008.

[00196] В некоторых вариантах осуществления способы ингибирования или подавления NHEJ-опосредованной репарации разрыва ДНК по пути NHEJ в одной или более геномных областях-мишенях в клетке(ах) путем ингибирования или подавления

пути NHEJ при введении в клетку(и) системы геномного редактирования и ингибитора ДНК-ПК приводят к повышению эффективности ингибирования или подавления NHEJ-опосредованной репарации разрывов ДНК по сравнению с клеткой(ами), которая не получала систему геномного редактирования и ингибитор ДНК-ПК, или по сравнению с условием, в котором клетка(и) получает геномную систему редактирования, но не ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК по пути NHEJ при контакте клетки (клеток) с ингибитором ДНК-ПК и системой редактирования генома является приблизительно 1-кратной, 2-кратной, 3-кратной, 4-кратной, 5-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 40-кратной, 50-кратной или 100-кратной по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не ингибитор ДНК-ПК. Эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК по пути NHEJ может быть измерена с помощью любого способа, известного в уровне техники, например, путем установления частоты направленной интеграции полинуклеотида или путем измерения частоты направленного мутагенеза.

[00197] В некоторых вариантах осуществления способы ингибирования или подавления NHEJ-опосредованной репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) путем ингибирования или подавления пути NHEJ при введении в клетку(и) системы геномного редактирования и ингибитора ДНК-ПК приводят к повышению выживания клетки по сравнению с условиями, в которых клетку(и) не подвергают контакту или введению системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК, или по сравнению с условиями, в которых клетку(и) подвергают контакту или введению только системой редактирования гена, но не ингибитора ДНК-ПК.

[00198] Разрыв ДНК может быть двухцепочечным разрывом (ДЦР) или двумя одноцепочечными разрывами (например, двумя никами ДНК). ДЦР могут быть с тупыми концами или иметь 5' или 3' выступающие концы, и если каждая цепь будет расщеплена слишком далеко друг от друга, выступы продолжают отжигаться друг с другом и будут существовать в виде двух ников, а не одного ДЦР.

[00199] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы изменения экспрессии одного или более генов (генов-мишеней) и/или соответствующих или нижестоящих белков путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать, например, вставки, делеции, замены, модификацию или прерывание в геномной области(ях)-мишени(ях) гена(ов)-мишени(ей) клетки (клеток), приводящие к изменению экспрессии гена(ов)-мишени(ей). В некоторых вариантах осуществления вставка, делеции, замена, модификация или прерывание могут приводить к направленной экспрессии определенного белка или группы белков, или нижестоящих белков. В некоторых вариантах осуществления система редактирования

генома может создавать вставки, делеции или замены в некодирующих областях или кодирующих областях. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать вставки, делеции, замены, модификацию или прерывание в промоторной области, энхансерной области и/или любом другом регуляторном элементе гена, включая экзон, интрон, сайт начала транскрипции, область сайленсера, область инсулятора, антирепрессор, посттрансляционный регуляторный элемент, сигнал полиаденилирования (например, минимальный поли-А), консервативную область, участок связывания фактора транскрипции или их любые комбинации. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать вставки, делеции, замены, модификацию или прерывание больше чем в одной области-мишени, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК может обеспечивать направленную модифицированную экспрессию гена в клетке(ах). Такая направленная модифицированная экспрессия гена может привести к экспрессии определенных белков и соответствующих нижестоящих белков.

[00200] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижестоящего гена и/или белка увеличена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, в 1, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не ингибитор ДНК-ПК.

[00201] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижестоящего гена и/или белка уменьшена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не ингибитор ДНК-ПК.

[00202] Клетка согласно способам в настоящем документе может быть любой клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой позвоночного. В некоторых вариантах осуществления клетка позвоночного является клеткой млекопитающего. В некотором варианте осуществления клетка позвоночного является клеткой человека.

[00203] Клетка может быть любым видом клетки на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть дифференцированной клеткой, тотипотентной стволовой клеткой, плюрипотентной стволовой клеткой, эмбриональной стволовой клеткой, эмбриональной зародышевой клеткой, взрослой стволовой клеткой, клеткой-предшественником, индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой или их любыми комбинациями. Дифференцированная клетка представляет собой специализированную клетку, которая выполняет определенную функцию в ткани. Тотипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку

эмбриона, плода или зрелого организма, которая может делиться в течение длительных периодов времени и способна дифференцироваться в любой тип клеток любого из трех зародышевых слоев организма. Плюрипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку эмбриона, плода или зрелого организма, которая может делиться в течение длительных периодов времени и способна дифференцироваться в любой тип клеток организма, кроме внезародышевой ткани или плаценты. Эмбриональная стволовая клетка представляет собой недифференцированную стволовую клетку, которая находится во внутренней клеточной массе эмбриона и обладает способностью дифференцироваться в любой тип клеток любого из трех зародышевых слоев. Эмбриональная зародышевая клетка представляет собой эмбриональную клетку, из которой могут образовываться половые клетки, такие как сперматозоиды или яйцеклетки. Взрослая стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку, которая находится в дифференцированной ткани, способна к самообновлению и может дифференцироваться в любую из клеток ткани, в которой она находится. Клетка-предшественник или прогениторная клетка представляет собой частично дифференцированную клетку, которая обычно может дифференцироваться только в один тип клеток (например, унипотентную клетку). Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка представляет собой тип плюрипотентной стволовой клетки, которая образуется из взрослой дифференцированной или частично дифференцированной клетки. См., например, WO/2010/017562.

[00204] При использовании в настоящем документе форма единственного числа включает множественные ссылки, если из контекста прямо не следует иное. Например, термин "клетка" включает множество клеток, в том числе их смеси. Например, "одна или более клеток" и "клетка(и)" используются в настоящем документе попеременно. Аналогичным образом, "одна или более геномных областей-мишеней" и "геномная область(и)-мишень(и)" используются в настоящем документе попеременно.

[00205] Термины "примерно" и "приблизительно" используются в настоящем документе попеременно. Термин "примерно" или "приблизительно", применительно к одному или более представляющим интерес значениям, относится к значению, которое соответствует указанному референсному значению. В некоторых вариантах осуществления термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений, находящихся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше, в любом направлении (больше или меньше), от указанного референсного значения, если не указано иное, или иное прямо не следует из контекста (кроме случаев, когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

[00206] Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используются попеременно. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов (ДНК) или рибонуклеотидов (РНК), или их аналогов.

Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Далее представлены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенные в анализе сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, малая интерферирующая РНК (миРНК), малая шпилечная РНК (мшРНК), микроРНК (мкРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может включать один или более модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. В случае присутствия, модификации нуклеотидной структуры могут быть введены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгирования с метящим компонентом. Термин "оцДНК" означает молекулу одноцепочечной ДНК. Термин "оцОДН" означает одноцепочечные олигодезоксинуклеотиды.

[00207] Термин "природные нуклеотиды", указанный в настоящем документе, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", указанный в настоящем документе, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", указанный в настоящем документе, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротриат, фосфородитриат, фосфороселеноат, фосфородиселеноат, фосфороанилотриат, фосфораниладат, фосфороамидат и т.п. При необходимости олигонуклеотид может включать метку для обнаружения.

[00208] Термин "синтетическая РНК" относится к РНК, которая сконструирована или не встречается в природе.

[00209] При использовании в настоящем документе термин "дикий тип" является термином из уровня техники, который известен специалистам и означает типичную форму организма, штамма, гена или характеристику в том качестве, в каком они встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

[00210] Термины "не встречающийся в природе" или "сконструированный" используются попеременно и указывают на вмешательство человека. Данные термины, применительно к молекулам нуклеиновых кислот или полипептидам, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, по меньшей мере по существу, не содержит по меньшей мере один другой компонент, с которым они обычно связаны в природе и существуют в природе.

[00211] "Комплементарность" относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородную связь(и) с другой нуклеиновой кислотой либо традиционным способом по правилу Уотсона-Крика, либо другими нетрадиционными типами. Процент комплементарности указывает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты,

которые могут образовывать водородные связи (например, спаривание оснований Уотсона-Крика) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 являются на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и на 100% комплементарными). "Полностью комплементарный" означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут образовывать водородную связь с таким же количеством смежных остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. "По существу комплементарный" при использовании в настоящем документе относится к степени комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в области длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или больше нуклеотидов или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в строгих условиях.

[00212] При использовании в настоящем документе "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется с ДНК матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут в совокупности называться "продуктом гена". Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

[00213] Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе попеременно для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции, такие как конъюгирование с метящим компонентом. При использовании в настоящем документе термин "аминокислота" включает природные и/или не природные или синтетические аминокислоты, включающие глицин и D или L оптические изомеры, а также аналоги аминокислот и пептидомиметики.

[00214] "Вирусный вектор" определяют как рекомбинантно полученный вирус или вирусную частицу, которая содержит полинуклеотид для доставки в клетку-хозяина *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Примеры вирусных векторов включают ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса простого герпеса и химерные вирусные векторы и т.п. В некоторых вариантах осуществления, где перенос гена опосредован ретровирусным вектором, векторная конструкция относится к полинуклеотиду, содержащему ретровирусный геном или его часть.

[00215] Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к векторным системам, включающим один или более векторов, или векторам как таковым. Векторы могут быть разработаны для экспрессии CRISPR транскриптов (например, транскриптов

нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Например, CRISPR транскрипты могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia coli*, клетки насекомых (с использованием бакуловирусных векторов экспрессии), дрожжевые клетки или клетки млекопитающих.

[00216] Клетки могут быть первичными клетками, индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК), эмбриональными стволовыми клетками (чЭСК), взрослыми стволовыми клетками, клетками-предшественниками или клеточными линиями. "Первичные клетки" представляют собой клетки, взятые непосредственно из живой ткани и помещенные в пробирку для роста. Первичные клетки имеют небольшой уровень удвоения популяции и имеют конечную продолжительность жизни в течение удвоений популяции *in vitro*. "Стволовые клетки", "эмбриональные стволовые клетки" и "индуцированные плюрипотентные стволовые клетки" являются неспециализированными и недифференцированными клетками, способными к самообновлению и обладающими потенциалом к дифференцировке в клетки разных типов со специализированной функцией. "Клеточные линии" включают культуры клеток, полученные из клеток одного типа или набора клеток одного типа, которые могут размножаться неограниченное время. Неограничивающие примеры линий клеток млекопитающих могут включать клетки CD34, клетки 293, клетки НЕК, клетки СНО, клетки ВНК, клетки CV-1, клетки Jurkat, клетки HeLa или их любые варианты.

[00217] В некоторых вариантах осуществления вектор способен направлять экспрессию одной или более последовательностей в клетках млекопитающих при использовании вектора экспрессии млекопитающего. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают pCDM8 и pMT2PC. При использовании в клетках млекопитающих контрольные функции вектора экспрессии обычно обеспечиваются одним или несколькими регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы получают из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, вируса обезьян 40 и других, описанных в настоящем документе и известных в уровне техники. Другие промоторы могут включать, например, промотор EF1 или промотор EF1 альфа. В отношении других подходящих систем экспрессии для прокариотических и для эукариотических клеток см., например, Главы 16 и 17 в Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

[00218] При использовании в настоящем документе термины "метка" или "меченый" относятся к включению детектируемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченного авидина (например, содержащего стрептавидин флуоресцентного маркера или ферментативной активности, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических методов). В некоторых ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в уровне техники

и могут использоваться. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения перечисленными, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные, биотинильные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки прикрепляют к спейсерным группам различной длины для уменьшения потенциального стерического затруднения. Термин "фармацевтическое или лекарственное средство" при использовании в настоящем документе относится к химическому соединению или композиции, которые способны оказывать требуемое терапевтическое действие при надлежащем введении пациенту.

[00219] При использовании в настоящем документе "по существу чистый" означает, что рассматриваемое соединение является преобладающим присутствующим соединением (т.е. является в молярном отношении более представленным, чем какие-либо другие отдельные соединения в композиции). В некоторых вариантах осуществления по существу очищенная фракция является композицией, в которой рассматриваемое соединение составляет по меньшей мере приблизительно 50 процентов (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных соединений.

[00220] Как правило, по существу чистая композиция будет содержать больше чем приблизительно 80 процентов всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления по существу чистая композиция будет содержать больше чем приблизительно 85%, 90%, 95% и 99% всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемое соединение очищают до по существу гомогенного состояния (контаминирующие соединения не обнаруживаются в композиции с помощью стандартных способов обнаружения), где композиция состоит по существу из одного макромолекулярного соединения.

Система редактирования генома

[00221] Могут использоваться различные типы систем модификации генома. Термины "система редактирования генома", "система редактирования гена" и т.п. используется попеременно в настоящем документе и относятся к системе или технологии, которая позволяет редактировать ген-мишень или его функцию или экспрессию. Система редактирования генома включает: по меньшей мере один эндонуклеазный компонент, обеспечивающий возможность расщепления геномной области(ей)-мишени(ей) (или последовательности(ей)-мишени(ей)); и по меньшей мере один геном-направляющий элемент, который вводит или направляет эндонуклеазный компонент в геномную область(и)-мишень(и). Примеры геном-направляющего элемента включают ДНК-связывающий домен (например, цинк-пальцевый ДНК-связывающий белок или TALE

ДНК-связывающий домен), элементы гидовой РНК (например, гидовую РНК CRISPR) и элементы гидовой ДНК (например, гидовую ДНК NgAgo). Программируемые геном-направляющие и эндонуклеазные элементы позволяют производить точное редактирование генома путем введения разрывов ДНК, таких как двухцепочечные разрывы (ДЦР), в определенные геномные локусы. Затем ДЦР привлекают эндогенный репарационный аппарат для нехомологичного соединения концов (NHEJ) или направленной гомологией репарации (HDR) к участку ДЦР, опосредуя редактирование генома. "Эндонуклеазный компонент" включает эндонуклеазу или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую такую эндонуклеазу.

[00222] Термин "эндонуклеаза" относится к любому ферменту дикого типа, мутанту, варианту или рекомбинантному ферменту, способному катализировать гидролиз (расщепление) связи между нуклеиновыми кислотами в молекуле ДНК или РНК. Эндонуклеазы могут распознавать и расщеплять молекулу ДНК или РНК в своих геномных областях-мишенях. Примеры эндонуклеаз включают хоуминг-эндонуклеазу; фермент рестрикции, такой как FokI; химерную цинк-пальцевую нуклеазу (ZFN), полученную в результате слияния сконструированных цинк-пальцевых доменов с каталитическим доменом фермента рестрикции, такого как FokI; ферменты Cas и ферменты Cpf. Химические эндонуклеазы, в которых химический или пептидный расщепляющий фрагмент конъюгирован либо с полимером нуклеиновых кислот, либо с другой ДНК, распознающей специфическую последовательность-мишень, направляя, таким образом, расщепляющую активность на конкретную последовательность, включены в рамки термина "эндонуклеаза". Примеры химических эндонуклеаз включают синтетические нуклеазы, такие как конъюгаты ортофенантролина, расщепляющей ДНК молекулы, и триплекс-образующих олигонуклеотидов (TFO).

[00223] Под "вариантом" подразумевается рекомбинантный белок, полученный при замене по меньшей мере одного остатка в аминокислотной последовательности исходного белка другой аминокислотой.

[00224] В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазы, такие как ZFN, TALEN и/или мегануклеазы, включают расщепляющий домен и/или расщепляющий полудомен. Расщепляющий домен может быть гомологичным или гетерологичным по отношению к ДНК-связывающему домену. Например, может использоваться ДНК-связывающий цинк-пальцевый домен и расщепляющий домен из нуклеазы или ДНК-связывающий домен мегануклеазы и расщепляющий домен из другой нуклеазы. Гетерологичные расщепляющие домены могут быть получены из любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Типичные эндонуклеазы, из которых может быть получен расщепляющий домен, включают, без ограничения перечисленными, эндонуклеазы рестрикции и хоминг-эндонуклеазы. См., например, WO2013/130824. Известны дополнительные ферменты, которые расщепляют ДНК (например, нуклеаза S1; нуклеаза бобов мунг; панкреатическая ДНКаза I; микрококковая нуклеаза; дрожжевая эндонуклеаза HO; см. также Linn et al. (Eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Один

или несколько из этих ферментов (или их функциональные фрагменты) могут использоваться в качестве источника расщепляющих доменов и расщепляющих полудоменов.

[00225] Расщепляющий полудомен может быть получен из любой нуклеазы или ее части, как указано выше, которая требует димеризации для расщепляющей активности. В некоторых вариантах осуществления для расщепления требуются два слитых белка, если слитые белки включают расщепляющие полудомены. В некоторых вариантах осуществления может использоваться один белок, включающий два расщепляющих полудомена. В некоторых вариантах осуществления два расщепляющих полудомена могут быть получены из одной и той же эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов). В некоторых вариантах осуществления расщепляющие полудомены могут быть получены из разных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, сайты-мишени для двух слитых белков предпочтительно расположены друг относительно друга так, что связывание двух слитых белков с их соответствующими сайтами-мишенями помещает расщепляющие полудомены в такой пространственной ориентации по отношению друг к другу, которая позволяет расщепляющим полудоменам формировать функциональный расщепляющий домен, например, путем димеризации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления близкие края сайтов-мишеней разделены 5-50 нуклеотидами, 5-8 нуклеотидами или 15-18 нуклеотидами. Следует отметить, что между двумя сайтами-мишенями может быть расположено любое целое количество нуклеотидов или пар нуклеотидов (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или больше). В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления находится между сайтами-мишенями.

[00226] Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) присутствуют во многих видах организмов и способны к сиквенс-специфическому связыванию с ДНК (в сайте распознавания) и расщеплению ДНК в сайте связывания или вблизи от него. Некоторые рестриктазы (например, типа IIS) расщепляют ДНК на сайтах, удаленных от сайта распознавания, и имеют разделяемые связывающий и расщепляющий домены. Например, фермент IIS типа Fok I катализирует образование двухцепочечного разрыва ДНК. См., например, патенты США 5,356,802; 5,436,150 и 5,487,994; а также Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982.

[00227] В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазный компонент включает слитый белок(и), который включает расщепляющий домен (или расщепляющий полудомен) по меньшей мере из одной рестриктазы IIS и один или более связывающих цинк-пальцевых доменов, которые могут быть сконструированными или нет. Примером рестриктазы типа IIS, расщепляющий домен которой можно отделить от связывающего домена, является Fok I. Этот конкретный фермент активен в виде димера (Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575). Часть фермента Fok I, используемая в таких слитых белках, считается расщепляющим полудоменом. Таким образом, для

направленного расщепления двойной цепи и/или направленной замены клеточных последовательностей с использованием слитых цинк-пальцевых или TALE-Fok I конструкций могут использоваться два слитых белка, каждый из которых содержит расщепляющий полудомен FokI, с восстановлением каталитически активного расщепляющего домена. В альтернативе можно также использовать одну полипептидную молекулу, содержащую связывающий цинк-пальцевый домен и два расщепляющих полудомена FokI.

[00228] Примеры рестриктаз IIS типа описаны в Международной публикации WO 07/014275, включенной в настоящий документ во всей своей полноте. Дополнительные рестриктазы также содержат разделяемые связывающий и расщепляющий домены, и они предусмотрены в изобретении. См., например, Roberts et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

[00229] В некоторых вариантах осуществления расщепляющий домен включает один или более сконструированных расщепляющих полудоменов (также называемых мутантными димеризационными доменами), что сводит к минимуму или предотвращает гомодимеризацию, как описано, например, в патентных публикациях США 20050064474 и 20060188987 и в WO 2013/130824. Примерные сконструированные расщепляющие полудомены Fok I, который формируют облигатные гетеродимеры, включают пару, в которой первый расщепляющий полудомен включает мутации по аминокислотным остаткам в положениях 490 и 538 Fok I, и второй расщепляющий полудомен включает мутации по аминокислотным остаткам 486 и 499. См., например, патентные публикации США 2008/0131962 и 2011/0201055. Сконструированные расщепляющие полудомены, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым подходящим способом, например, сайт-направленным мутагенезом расщепляющих полудоменов дикого типа (Fok I), как описано в патентных публикациях США 20050064474 и 20080131962.

[00230] Термин "редактировать", "редактирует", "редактирование" и т.п. относятся к любому типу инженерии, изменения, модификации или модуляции (которые в каждом случае включают, без ограничения, посредством нокаута гена, мечения гена, прерывания гена, мутации гена, инсерции гена, делеции гена, активации гена, сайленсинга гена или нокина гена).

[00231] При использовании в настоящем документе "генетическая модификация", "редактирование генома", "модификация генома", "модификация гена" и "редактирование гена" относятся к любому добавлению гена, делеции, нокауту, нокину, мечению, мутации, активации, сайленсингу, модификации и/или прерыванию в нуклеотидах клетки. Клетка в данном контексте может находиться *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

[00232] Под "геномной областью-мишенью", "геном-мишенью", "ДНК-мишенью", "ДНК последовательностью-мишенью", "последовательностью-мишенью", "нуклеотидной последовательностью-мишенью", "сайтом-мишенью", "мишенью", "сайтом, представляющим интерес", "сайтом распознавания", "сайтом распознавания полинуклеотида", "последовательностью распознавания", "сайтом расщепления"

подразумевается полинуклеотидная последовательность, которую распознает и расщепляет система редактирования генома. Эти термины относятся к определенному положению ДНК, предпочтительно геномному положению, в котором образование разрыва (расщепление) ДНК должно быть вызвано системой редактирования генома.

[00233] Вышеуказанное редактирование, включая инженерию, изменение, модификацию и модуляцию, может происходить одновременно или последовательно. Может использоваться любая система редактирования генома, известная в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы, системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системой на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo.

[00234] Системы на основе мегануклеазы, на основе ZFN и на основе TALEN включают по меньшей мере один ДНК-связывающий домен или нуклеиновую кислоту, включающую последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую ДНК-связывающий домен, и обеспечивают специфическое направленное взаимодействие или распознавание геномной области(ей)-мишени(ей) посредством взаимодействий белок-ДНК. Система на основе CRISPR включает по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, включающую последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент гидовой РНК, и обеспечивает специфическое направленное взаимодействие или распознавание геномной области(ей)-мишени(ей) посредством образования пар оснований непосредственно с ДНК геномной области(ей)-мишени(ей). Система на основе NgAgo включает по меньшей мере один элемент гидовой ДНК или нуклеиновую кислоту, включающую последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент гидовой ДНК, и обеспечивает специфическое направленное взаимодействие или распознавание геномной области(ей)-мишени(ей) посредством образования пар оснований непосредственно с ДНК геномной области(ей)-мишени(ей).

[00235] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы. В системе на основе мегануклеазы используются мегануклеазы, которые являются эндонуклеазами с большими (>14 пн) сайтами распознавания, при этом их ДНК-связывающие домены также отвечают за расщепление последовательностей-мишеней. ДНК-связывающий домен мегануклеаз может иметь двухцепочечную ДНК последовательность-мишень длиной 12-45 пн. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза является либо димерным ферментом, в котором каждый домен мегануклеазы находится в мономере, либо мономерным ферментом, включающим эти два домена в одном полипептиде. С помощью белковой инженерии были получены не только мегануклеазы дикого типа, но и различные варианты мегануклеаз, охватывающие множество комбинаций уникальных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления также могут использоваться химерные мегануклеазы, сайт распознавания которых состоит из полусайта мегануклеазы А и полусайта белка В. Конкретные примеры таких химерных мегануклеаз включают

белковые домены I-DmoI и I-CreI. Примеры мегануклеаз включают хоуминг-эндонуклеазы от семейства LAGLIDADG.

[00236] Мегануклеазой LAGLIDADG может быть I-SceI, I-ChuI, I-CreI, I-CsmI, PI-SceI, PI-TliI, PI-MtuI, I-CeuI, I-SceII, I-SceIII, HO, PI-CivI, PI-CtrI, PI-AaeI, PI-BsuI, PI-DhaI, PI-DraI, PI-MavI, PI-MchI, PI-MfuI, PI-MflI, PI-MgaI, PI-MgoI, PI-MinI, PI-MkaI, PI-MleI, PI-MmaI, PI-MshI, PI-MsmI, PI-MthI, PI-MtuI, PI-MxeI, PI-NpuI, PI-PfuI, PI-RmaI, PI-SpbI, PI-SspI, PI-FacI, PI-MjaI, PI-PhoI, PI-TagI, PI-ThyI, PI-TkoI, PI-TspI или I-MsoI; или может быть их функциональный мутант или вариант, гомодимерный, гетеродимерный или мономерный. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG является производной I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG обладает по меньшей мере 80% подобием с природной LAGLIDADG мегануклеазой I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG обладает по меньшей мере 80% подобием с остатками 1-152 природной LAGLIDADG мегануклеазы I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG может состоять из двух мономеров, обладающих по меньшей мере 80% подобием с остатками 1-152 природной LAGLIDADG мегануклеазы I-CreI, которые соединены с или без линкерного пептида.

[00238] "Мегануклеаза LAGLIDADG" относится к хоуминг-эндонуклеазе от семейства LAGLIDADG, как определено в публикации Stoddard et al. (Stoddard, 2005), или сконструированному варианту, включающему полипептид, обладающий по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или большей идентичностью или подобием с указанной природной хоуминг-эндонуклеазой. Такие сконструированные LAGLIDADG мегануклеазы могут быть получены из мономерных или димерных мегануклеаз. При получении из димерных мегануклеаз, такие сконструированные LAGLIDADG мегануклеазы могут быть одноцепочечными или димерными эндонуклеазами.

[00239] Под "I-CreI" подразумевается природная мегануклеаза дикого типа I-CreI, имеющая последовательность с регистрационным кодом PDB 1g9y.

[00240] Функции распознавания и расщепления ДНК у мегануклеаз, как правило, объединены в одном домене. В отличие от мегануклеаз, ДНК-связывающие домены систем на основе ZFN и TALEN отличаются от эндонуклеазы функцией расщепления. Система на основе ZFN включает: по меньшей мере один цинк-пальцевый белок или его вариант или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую цинк-пальцевый белок или его вариант в качестве его ДНК-связывающего домена; и эндонуклеазный элемент, такой как расщепляющий домен цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или FokI. Цинк-пальцевый белок (ZFP) не является природным, так как он предназначен для связывания с выбранным сайтом-мишенью. См., например, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct Biol. 10:411-416; патенты США 6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054;

7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; и патентные публикации США 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061.

[00241] Сконструированный цинк-пальцевый связывающий домен может обладать новой специфичностью связывания по сравнению с природным цинк-пальцевым белком. Методы инженерии включают, без ограничения перечисленными, рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн включает, например, использование баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и отдельные аминокислотные последовательности цинковых пальцев, в которых каждая триплетная или квадруплетная нуклеотидная последовательность связана с одной или более аминокислотными последовательностями цинковых пальцев, которые связывают конкретную триплетную или квадруплетную последовательность. См., например, находящиеся в общей собственности патенты США 6,453,242 и 6,534,261, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки.

[00242] Различные типы способов отбора могут использоваться в сочетании со способами в настоящем документе. Примерные способы отбора, включая фаговый дисплей и двухгибридные системы, раскрыты в патентах США 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759 и 6,242,568; а также в WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 и GB 2,338,237. Кроме того, улучшение специфичности связывания цинк-пальцевых связывающих доменов было описано, например, в WO 02/077227. Кроме того, как раскрыто в этих и других ссылках, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть соединены друг с другом при использовании любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или больше аминокислот. См., также, патенты США 6,479,626; 6,903,185; и 7,153,949 по поводу примерных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Белки, описанные в настоящем документе, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. Выбор сайтов-мишеней; ZFP и способов дизайна и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области и подробно описаны в патентах США 6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

[00243] Кроме того, как раскрыто в этих и других ссылках, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть соединены друг с другом при использовании любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или больше аминокислот. См., также, патенты США 6,479,626; 6,903,185; и 7,153,949 по поводу примерных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Белки, описанные в настоящем документе, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

[00244] Система на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN) относится к системе редактирования генома, в которой используется один или более подобных активаторам транскрипции эффекторных (TALE) ДНК-связывающих доменов и эндонуклеазный элемент, такой как расщепляющий домен FokI. TALE-ДНК-связывающий домен включает одну или более повторяющихся единиц TALE, каждая из которых имеет длину 30-38 (например, 31, 32, 33, 34, 35 или 36) аминокислот. В TALE-ДНК-связывающем домене может использоваться полноразмерный белок TALE или его фрагмент, или его вариант. TALE-ДНК-связывающий домен может быть слит или соединен с эндонуклеазным доменом при использовании линкера.

[00245] Термины "система на основе CRISPR", "система редактирования генов на основе CRISPR", "CRISPR-редактирование генома", "CRISPR-редактирование гена", "редактирование генома на основе CRISPR-эндонуклеазы" и т.п. используются в настоящем документе попеременно и в совокупности относятся к системе редактирования генома, которая включает один или более элементов гидовой РНК; и один или более элементов РНК-направляемой эндонуклеазы. Элемент гидовой РНК включает направляющую РНК, включающую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК. РНК-направляемый эндонуклеазный элемент содержит эндонуклеазу, которая направляется или доставляется в геномную область(и)-мишень(и) элементом гидовой РНК; или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую такую эндонуклеазу. Примеры такой системы редактирования генов на основе CRISPR включают систему на основе CRISPR, систему CRISPR-Cas или систему CRISPR-Cpf.

[00246] При использовании в настоящем документе термины "элемент гидовой РНК", "гидовая РНК", "гРНК", "молекула гРНК" и "синтетическая гидовая РНК" используются попеременно и относятся к полинуклеотидной последовательности, содержащей направляющую РНК, которая гибридизуется с нуклеиновой последовательностью-мишенью, или к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК. Направляющая РНК в гРНК содержит направляющий домен, который включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в геномной области-мишени. Фраза "по существу комплементарный" означает степень комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в области длиной 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в строгих условиях.

[00247] Элемент гидовой РНК может дополнительно включать активаторную РНК, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК.

Активаторная РНК и направляющая РНК могут быть разделены или слиты в одной нуклеиновой кислоте через последовательность линкерной петли с получением одной молекулы гРНК. Молекула гРНК может содержать некоторое количество доменов. Например, такая гРНК включает, например, от 5' к 3': направляющий домен (который комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени); первый комплементарный домен; соединительный домен; второй комплементарный домен (который комплементарен первому комплементарному домену); проксимальный домен; и, необязательно, хвостовой домен. См. WO2015048557.

[00248] "Первый комплементарный домен" обладает существенной комплементарностью со вторым комплементарным доменом и может формировать дуплексную область, по меньшей мере, при некоторых физиологических условиях.

[00249] "Соединительный домен" служит для связывания первого комплементарного домена со вторым комплементарным доменом мономолекулярной гРНК. Соединительный домен может ковалентно или нековалентно соединять первый и второй комплементарные домены.

[00250] "Проксимальный домен" может иметь длину 3-25 нуклеотидов или 5-20 нуклеотидов. Проксимальный домен может обладать гомологией с природным проксимальным доменом или может быть получен из него.

[00251] "Хвостовой домен" может отсутствовать или иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Хвостовой домен может включать последовательности, комплементарные друг другу, и которые, по меньшей мере, при некоторых физиологических условиях, формируют дуплексную область.

[00252] Элемент гидовой РНК может образовывать комплекс с эндонуклеазой РНК-направляемого эндонуклеазного элемента, такого как эндонуклеаза Cas ("гРНК/нуклеазный комплекс"). Примером гРНК/нуклеазного комплекса является комплекс CRISPR, как описано ниже в отношении системы на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR включает эндонуклеазу РНК-направляемой эндонуклеазной системы в комплексе с направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR включает эндонуклеазу РНК-направляемой эндонуклеазной системы в комплексе с направляющей РНК и активаторной РНК.

[00253] Направляющий домен направляющей РНК обеспечивает специфическое направленное взаимодействие или хоуминг гРНК/нуклеазного комплекса к нуклеотидной последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления направляющий домен может включать 10-30 пн, например, 15-25 пн, 18-22 пн или 20 пн.

[00254] Способы конструирования молекул гРНК известны в уровне техники, включая способы отбора, конструирования и подтверждения домена-мишени. См., например, WO2015048577, Mali et al., 2013 SCIENCE 339(6121): 823-826; Hsu et al., 2013 NATBIOTECHNOL, 31(9): 827-32; Fu et al., 2014 NATBTOTECHNOL, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer et al., 2014 NAT METHODS 11(2):122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al., 2014 BIOTNFORMATICS

PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014 BIOINFORMATICS Pub Med PMID: 24389662.

[00255] В некоторых вариантах осуществления могут использоваться РНК-направляемые эндонуклеазы, такие как фермент или белок Cas (например, белок Cas9 II типа) или фермент или белок Cpf (например, белок Cpf1). В некоторых вариантах осуществления также может использоваться модифицированная версия такого фермента или белка Cas или Cpf.

[00256] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas. Система CRISPR-Cas включает: (а) по меньшей мере один элемент геновой РНК или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент геновой РНК, элемент геновой РНК включает направляющую РНК, включающую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, и активаторную РНК, включающую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК; и (b) элемент белка Cas, включающий белок Cas или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas. Направляющая РНК и активаторная РНК могут быть отдельными или могут быть слиты вместе в одной РНК.

[00257] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR включает системы CRISPR 1 класса и/или CRISPR 2 класса. В системах 1 класса используется несколько белков Cas вместе с CRISPR РНК (сРНК) в качестве направляющей РНК для построения функциональной эндонуклеазы. В системах CRISPR 2 класса используется один белок Cas и сРНК в качестве направляющей РНК. Системы CRISPR 2 класса, включающие систему на основе Cas9 II типа, включают один белок Cas, который опосредует расщепление, а не мультисубъединичный комплекс, используемый в системах 1 класса. Система на основе CRISPR также включает систему CRISPR II класса V типа, в которой используется белок Cpf1 и сРНК в качестве направляющей РНК.

[00258] Белок Cas представляет собой CRISPR-ассоциированную (Cas) двухцепочечную нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR-Cas включает белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A нуклеазу. Термин "белок Cas", такой как белок Cas9, включает белок Cas дикого типа или его функциональные производные (такие как усеченные версии или варианты белка Cas дикого типа с нуклеазной активностью).

[00259] В некоторых вариантах осуществления могут использоваться белки Cas9 из видов кроме *S. pyogenes* и *S. thermophiles*. Дополнительные виды белка Cas9, которые могут быть получены и могут использоваться в настоящем документе, включают: *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *cyclophilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*; *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*,

Campylobacter lari, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium dolichum*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Eubacterium dolichum*, *Gammaproteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Llyobacter 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 succinatutells*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tistrella mobilis*, *Treponema* sp. или *Verminephrobacter eiseniae*.

[00260] В некоторых вариантах осуществления один или более элементов системы на основе CRISPR получены из системы CRISPR I типа, II типа или III типа.

[00261] В некоторых вариантах осуществления один или более элементов системы на основе CRISPR получены из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Prevotella* sp., *Acidaminococcus* sp. и *Lachnospiraceae* sp. Как правило, система на основе CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в геномных областях-мишенях или сайте последовательности-мишени (также именуемые протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR "последовательность-мишень" относится к последовательности, к которой создана гидовая последовательность, обладающая с ней существенной комплементарностью, где гибридизация между последовательностью-мишенью и гидовой последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность не требуется при условии, что существует достаточная комплементарность, вызывающая гибридизацию и способствующая образованию комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, такой как ДНК или РНК полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень расположена в ядре или цитоплазме клетки(ок). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может присутствовать в органелле эукариотической клетки(ок), например, митохондрии или хлоропласте.

[00262] Последовательность или матрица, которая может использоваться для рекомбинации в целевой локус, содержащий последовательности-мишени, называется "редактирующей матрицей" или "редактирующим полинуклеотидом", или "редактирующей последовательностью". Экзогенный матричный полинуклеотид может называться редактирующей матрицей или донорной матрицей. В некоторых вариантах осуществления может использоваться одноцепочечная ДНК и двухцепочечная ДНК синтетического или биологического происхождения. В качестве неограничивающего

примера, подходящие редактирующие матрицы включают оцОДН, дцОДН, продукты ПЦР, плазмиды и вирусы, включая AAV, аденовирус, ретровирус, лентивирус и т.д. Также возможны дополнительные редактирующие матрицы. В некоторых вариантах осуществления рекомбинация является гомологичной рекомбинацией.

[00263] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas9. Направляющая РНК системы CRISPR-Cas9 включает CRISPR планирование для РНК (crРНК) и РНК активатора CRISPR-Cas, 9 систем включают трансаактивацию РНК CRISPR (tracrРНК). В элементе белка Cas системы CRISPR-Cas9 используется белок Cas9. crРНК и tracrРНК могут быть отдельными или могут быть объединены в одной конструкции РНК через последовательность линкерной петли. Такая объединенная конструкция РНК называется одиночной гидовой РНК (огРНК; или гидовой РНК).

[00264] Общую информацию о системах CRISPR-Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, в том числе способах, материалах, средствах доставки, векторах, частицах, AAV, а также их получении и применении, включая количества и составы, можно найти в: патентах США 8,999,641, 8,993,233, 8,945,839, 8,932,814, 8,906,616, 8,895,308, 8,889,418, 8,889,356, 8,871,445, 8,865,406, 8,795,965, 8,771,945 и 8,697,359; патентных публикациях США US 2014-0310830, US 2014-0287938 A1, US 2014-0273234 A1, US 2014-0273232 A1, US 2014-0273231, US 2014-0256046 A1, US 2014-0248702 A1, US 2014-0242700 A1, US 2014-0242699 A1, US 2014-0242664 A1, US 2014-0234972 A1, US 2014-0227787 A1, US 2014-0189896 A1, US 2014-0186958, US 2014-0186919 A1, US 2014-0186843 A1, US 2014-0179770 A1 и US 2014-0179006 A1, US 2014-0170753; европейских патентах EP 2 784 162 B1 и EP 2 771 468 B1; Европейских заявках на патент EP 2 771 468 (EP13818570.7), EP 2 764 103 (EP13824232.6) и EP 2 784 162 (EP14170383.5); и патентных публикациях PCT WO 2014/093661, WO 2014/093694, WO 2014/093595, WO 2014/093718, WO 2014/093709, WO 2014/093622, WO 2014/093635, WO 2014/093655, WO 2014/093712, WO2014/093701, WO2014/018423, WO 2014/204723, WO 2014/204724, WO 2014/204725, WO 2014/204726, WO 2014/204727, WO 2014/204728, WO 2014/204729 и WO2016/028682.

[00265] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf. "Система CRISPR-Cpf" включает: (а) по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент гидовой РНК, где гидовая РНК включает направляющую РНК, имеющую нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности в локусе нуклеиновой кислоты-мишени; и (b) элемент белка Cpf или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность, кодирующую элемент белка Cpf.

[00266] Пример элемента белка Cpf включает нуклеазы Cpf1, такие как Cpf1 Francisella (FnCpf1) и их любые варианты. См., например, Zetsche et al., "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system", Cell, 163(3): pages 759-71; and Fonfara et al., "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor

CRISPR RNA", Nature 532 (7600): стр. 517-21. Предпочтительным PAM для Cpf1 является 5'-TTN, отличающийся от PAM Cas9 (3'-NGG) как геномным положением, так и GC-составом. В системе CRISPR-Cpf1 может не использоваться активаторная РНК (tracrRNA). Как Cpf1, так и его гидовые РНК обычно меньше, чем их аналоги SpCas9. Локус Cpf1 содержит смешанный альфа/бета домен, RuvC-I, после которого расположена спиральная область RuvC-II и домен, подобный цинковому пальцу. Белок Cpf1 имеет RuvC-подобный эндонуклеазный домен, который аналогичен домену RuvC Cas9. Кроме того, Cpf1 не имеет HNH эндонуклеазный домен, и N-концевой Cpf1 не имеет альфа-спирального распознающего сегмента Cas9. Локусы Cpf1 кодируют белки Cas1, Cas2 и Cas4, в большей степени подобные система I и III типа, чем II типа. Белки семейства Cpf1 могут быть обнаружены во многих видах бактерий.

[00267] Без ограничения конкретной теорией, в системе CRISPR-Cpf1 используется комплекс Cpf1-crRNA, расщепляющий ДНК или РНК мишень при идентификации примыкающего к протоспейсеру мотива 5'-YTN-3' (где "Y" является пиримидином, а "N" является любым нуклеиновым основанием) или 5'-TTN-3' в отличие от G-богатого PAM, служащего мишенью для Cas9. После идентификации PAM, Cpf1 создает похожий на липкий конец двухцепочечный разрыв ДНК с 4 или 5 выступающими нуклеотидами.

[00268] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе NgAgo. Система на основе NgAgo включает по меньшей мере один элемент гидовой ДНК или нуклеиновую кислоту, включающую последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую элемент гидовой ДНК; и ДНК-направляемую эндонуклеазу. В системе на основе NgAgo в качестве гидового элемента используется ДНК. Ее принцип действия подобен технологии CRISPR-Cas9, но ее гидовый элемент представляет собой сегмент гидовой ДНК (гДНК), а не гРНК, как в технологии CRISPR-Cas9. Примером ДНК-направляемой эндонуклеазы является эндонуклеаза Argonaute (NgAgo) из *Natronobacterium gregoryi*. См., например, Feng Gao et al. "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute", Nature Biotechnology, (2016): doi:10.1038/nbt.3547.

[00269] Под "линкером", "пептидным линкером" или "пептидным спейсером" подразумевается пептидная последовательность, которая обеспечивает соединение различных мономеров в слитом белке и принятие правильной конформации для активности указанного слитого белка, и которая не изменяет активность ни одного из мономеров. Пептидные линкеры могут иметь разный размер от 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 до 50 аминокислот в качестве неограничивающего примерного диапазона или любое промежуточное значение в этом диапазоне.

[00270] Ингибиторы ДНК-ПК для увеличения эффективности геномного редактирования

[00271] Эффективность направленного редактирования генома может быть повышена путем введения в клетку(и) одного или более соединений (например, ингибиторов ДНК-ПК), описанных в настоящем документе, и системы редактирования

генома. Системы редактирования генома, подходящие для применения, включают, например, систему на основе мегануклеазы, систему на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), систему на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo. Способы, композиции и наборы согласно изобретению обеспечивают ингибиторы ДНК-ПК и/или систему редактирования генома для повышения эффективности редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления эффективность HDR редактирования генома повышается после введения в клетку(и) ингибитора ДНК-ПК.

[00272] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему редактирования генома на основе CRISPR. Система редактирования генома на основе CRISPR может представлять собой систему CRISPR-Cas или ее варианты. В системе CRISPR-Cas могут использоваться любые эндонуклеазы Cas, такие как эндонуклеазы Cas 9 и их варианты. Примеры эндонуклеаз Cas 9 включают эндонуклеазы Cas9 или их варианты, такие как SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или CasD10A. Эндонуклеаза Cas может быть дикого типа, сконструированной или мутантной нуклеазой, или их любыми вариациями.

[00273] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает последовательность CRISPR, транскрибируемую cr (tracr) последовательность, гидовую последовательность и эндонуклеазу Cas или их любые комбинации.

[00274] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает РНК, включающую последовательность CRISPR (crРНК), РНК, включающую транскрибируемую cr (tracr) последовательность (tracrРНК), и эндонуклеазу Cas или их любые комбинации.

[00275] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает последовательность CRISPR, гидовую последовательность и эндонуклеазу Cas или эндонуклеазу Cpf, или их любые комбинации.

[00276] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf. Нуклеаза Cpf является эндонуклеазой системы CRISPR-Cas 2 класса. Cpf представляет собой эндонуклеазу, направляемую одиночной РНК. Нуклеаза Cpf может быть дикого типа, сконструированной или мутантной нуклеазой, или их любыми вариациями. См., например, Zetsche et al., "CPF1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", *Cell*, 163(3):759-71. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cpf представляет собой эндонуклеазу Cpf 1.

[00277] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы. В редактировании генома на основе мегануклеазы используются сиквенс-специфические эндонуклеазы, распознающие большие сайты-мишени ДНК (например, как правило, приблизительно >12 пн). См., например, U.S. 9,365,964. Мегануклеазы могут расщеплять уникальные хромосомные

последовательности, не воздействуя на общую целостность генома. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза может быть хоуминг-эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза может быть интрон-эндонуклеазой или интеин-эндонуклеазой. Хоуминг-эндонуклеазы могут принадлежать семейству LAGLIDADG. Мегануклеазы могут быть дикого типа, сконструированными или мутантными никазами.

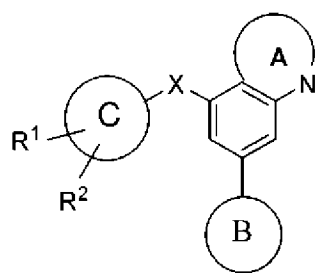
[00278] В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена является системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). ZFN представляет собой искусственную рестриктазу, сконструированную на основе слияния цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена и ДНК-расщепляющего домена. См., например, U.S. 9,145,565.

[00279] В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена представляет собой подобную активаторам транскрипции эффекторную нуклеазу (TALEN). Нуклеазы TALEN представляют собой сконструированные рестриктазы, полученные путем слияния TAL эффекторного ДНК-связывающего домена с ДНК-расщепляющим доменом. См., например, U.S. 9,181,535.

[00280] В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена является системой на основе Argonaute. Системы редактирования генов на основе Argonaute включают полученную на основе Argonaute эндонуклеазу и 5'-фосфорилированную оцДНК. В некоторых вариантах осуществления фосфорилированная оцДНК может иметь длину 10-40 нуклеотидов, 15-30 нуклеотидов или 18-30 нуклеотидов (например, приблизительно 24 нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Argonaute может быть любой эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Argonaute получена из *Thermus thermophilus* (TtAgo), *Pyrococcus furiosus* (PfAgo) или *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo). В некоторых вариантах осуществления *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo) является штаммом 2 (т.е. *N. gregoryi* SP2). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Argonaute представляет собой NgAgo. См., например, Gao et al., "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute", *Nature Biotechnology*, May 2016.

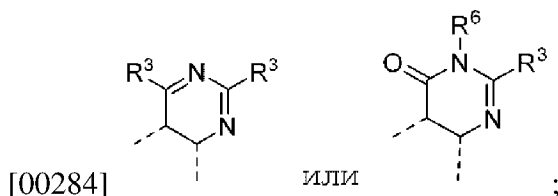
[00281] Ингибиторы ДНК-ПК могут быть любым ингибитором ДНК-ПК. Ингибитор ДНК-ПК может быть любым соединением или веществом, которое вызывает ингибирование ДНК-ПК. Ингибитор ДНК-ПК может быть соединением, малой молекулой, антителом или нуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК являются соединениями, представленными Формулой (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B).

[00282] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I):

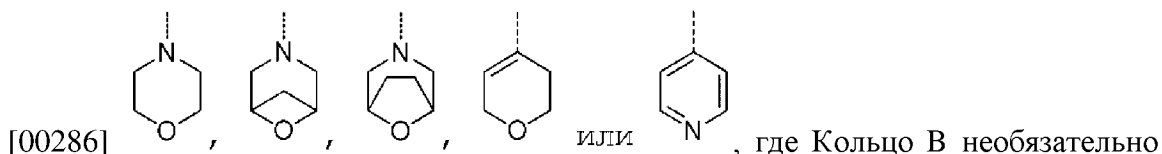


(I), или его фармацевтически приемлемых солей, где каждый из R^1 , R^2 , X, Кольца A, Кольца B и Кольца C независимо имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

[00283] Кольцо A является ароматической кольцевой системой, выбранной из



[00285] Кольцо B является кольцевой системой, выбранной из



замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и C_{1-4} алкила, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

[00287] Кольцо C представляет собой C_{4-6} циклоалкильную, 5-6-членную гетероарильную или фенильную группу, где Кольцо C необязательно дополнительно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-2} алкила, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

[00288] X представляет собой -NH-, -O-, - OC_{1-4} алкил-, -S- или - CH_2 -;

[00289] каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водородом, - $C(O)NHR^4$, - $C(O)OR^4$, - $NHC(O)R^4$, - $NHC(O)OR^4$, - $NHC(O)NHR^4$, - $NHS(O)_2R^4$, - NHR^4 , - C_{1-4} алкил- NHR^4 , - OR^4 или R^7 , где R^1 и R^2 не могут быть одновременно водородом;

[00290] каждый R^3 независимо представляет собой водород, - C_{1-4} алкил, галоген, - OC_{1-2} алкил, - $C(O)OH$, - $C(O)OC_{1-2}$ алкил, -CN, $C(O)NHC_{1-2}$ алкил, - $C(O)NH_2$, C_{3-4} циклоалкил или - NRR' , где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и OC_{1-2} алкила;

[00291] каждый R^4 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, C_{3-10} циклоалкил, 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-10-членный гетероцикл, где каждая из указанных групп R^4 необязательно замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C_{1-4} алкила, CN, NO_2 , C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4}

алкил-О-С₁₋₄ алкила, С₀₋₄ алкил-О-С₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила, С(О)ОС₁₋₄ алкила, С(О)ОС₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила, С₀₋₄ алкил-С(О)NH₂, С(О)NHC₁₋₄ алкила, С(О)N(С₁₋₄ алкил)₂, С(О)NH(С₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила), CH₂OR⁵, С₀₋₄ алкил-С(О)R⁵, С₀₋₄ алкил-С(О)N(R⁵)₂, С₀₋₄ алкил-С(О)OR⁵, С₀₋₄ алкил-NHC(О)R⁵, С₀₋₄ алкил-N(R⁵)₂, 5-6-членного гетероцикла, -О(С₁₋₄ алкил)OR⁵, -OR⁵ и оксо, и где каждый из указанных необязательных заместителей R⁴ необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₄алкила, -ОН, -ОС₁₋₄алкила, -SC₁₋₄алкила, -С(О)С₁₋₄ алкила, С(О)ОС₁₋₄ алкила и -С(О)ОС₀₋₄ алкил-С₃₋₅ циклоалкила; и

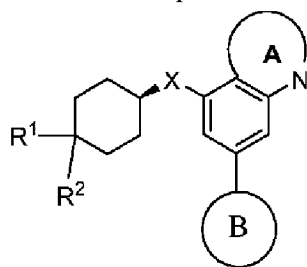
[00292] каждый R⁵ независимо представляет собой водород, С₁₋₄алкил, фенил, 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, где каждый R⁵ независимо необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₂алкила, -CH₂ОН, -CN, -ОН, -ОС₁₋₂алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероцикла, или две R⁵ группы вместе с промежуточным атомом азота необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо; и

[00293] R⁶ представляет собой водород или С₁₋₄алкил, необязательно замещенный одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -CH₂ОН, -CN, -ОН и -ОС₁₋₂алкила;

[00294] R⁷ представляет собой 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-7-членный гетероцикл, каждый из которых необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, С₁₋₂алкила, -CH₂ОН, -CN и -OR; и

[00295] каждый из R и R' независимо представляет собой водород или С₁₋₄алкил, или R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо.

[00296] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (II), или его фармацевтически приемлемых солей:



(II), где каждая переменная Формулы (II) независимо

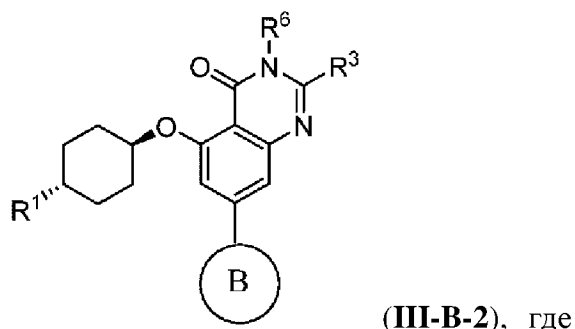
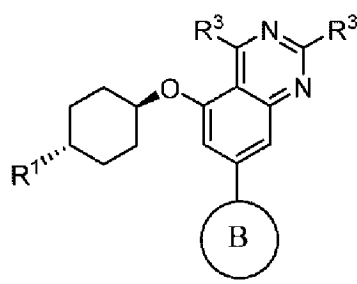
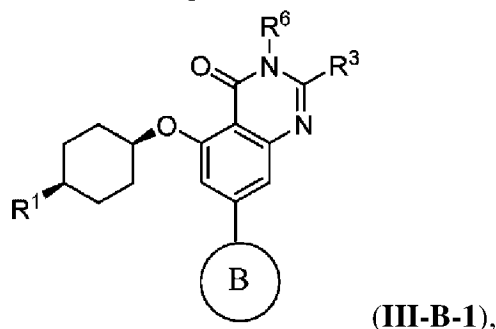
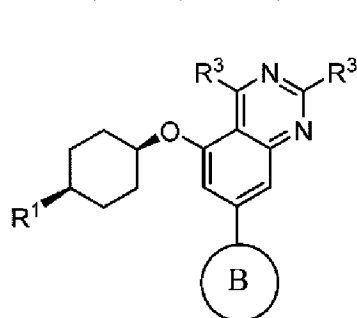
является такой, как описано ниже.

[00297] В первом наборе переменных Формулы (II) каждая из переменных Формулы (II) независимо является такой, как описано выше в любом из первого -

двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[00298] Во втором наборе переменных Формулы (II) R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и R^2 представляет собой водород. Остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[00299] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), или его фармацевтически приемлемых солей:



каждая переменная Формулы (II) независимо является такой, как описано ниже.

[00300] В первом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) каждая из переменных (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) независимо является такой, как описано выше в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

[00301] Во втором наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - двадцать седьмого наборов переменных Формулы (I).

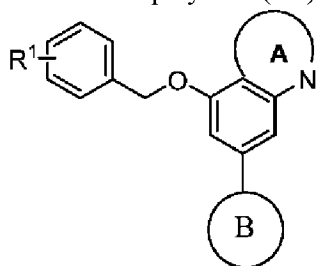
[00302] В третьем наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) R^1 представляет собой $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$ или $-OR^4$; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом первом или втором наборе переменных (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[00303] В четвертом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) R^1 представляет собой $-NHR^4$, и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - третьего наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[00304] В пятом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2) R^1 представляет собой $-OR^4$, и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - четвертого наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[00305] В шестом наборе переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2), R^3 независимо представляет собой водород, метил, $-Cl$, $-OCH_3$, $-CN$, циклопропил, $-NHCH_3$ или $-N(CH_3)_2$; R^6 представляет собой водород или метил; и остальные переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - пятого наборов переменных Формулы (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1) или (III-B-2).

[00306] В еще одном варианте осуществления, соединения согласно изобретению представлены Формулой (IV) или их фармацевтически приемлемыми солями:



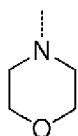
(IV), где переменные Формулы (IV) отдельно и независимо

являются такими, как описано ниже.

[00307] В первом наборе переменных Формулы (IV) каждая из переменных независимо является такой, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00308] Во втором наборе переменных Формулы (IV) R^1 представляет собой водород, $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и остальные переменные Формулы (IV) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

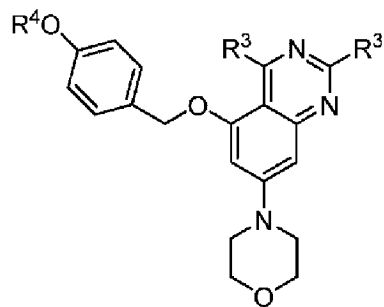
[00309] В третьем наборе переменных Формулы (IV) Кольцо В является



необязательно замещенным ; и остальные переменные Формулы (IV) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом или втором наборе переменных Формулы (IV).

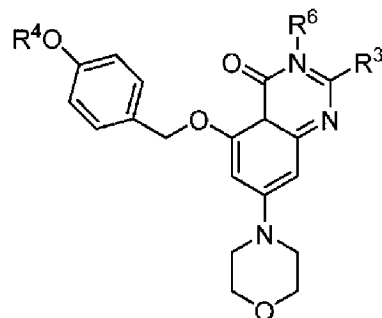
[00310] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в

одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (V-A) или (V-



(V-A) или

B), или его фармацевтически приемлемых солей:



(V-B), где каждая из переменных Формулы (V-A) или (V-B)

независимо является такой, как описано ниже.

[00311] В первом наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) каждая из переменных независимо является такой, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00312] Во втором наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) R^3 представляет собой водород, метил, циклопропил, -F, -Cl, -OC₁₋₂алкил, -NRR' или -CN, где каждый указанный R^3 алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -OH и -O(C₁₋₂ алкила); каждый R^4 независимо является необязательно замещенным C₁₋₄ алкилом, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -OH и -O(C₁₋₂ алкила); и R и R' отдельно и независимо представляют собой водород или C₁₋₂ алкил. Остальные переменные Формулы (V-A) или (V-B) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из первого - тридцатого наборов переменных Формулы (I).

[00313] В третьем наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B) каждый R^3 независимо представляет собой водород, метил, -Cl, -OCH₃, -CN, циклопропил, -NHCH₃ или -N(CH₃)₂; и R^6 представляет собой водород или метил. Остальные переменные Формулы (V-A) или (V-B) отдельно и независимо являются такими, как описано в первом или втором наборе переменных Формулы (V-A) или (V-B).

[00314] В еще одном варианте осуществления соединения согласно изобретению представлены любой из Формул (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или их фармацевтически приемлемыми солями, где каждая из переменных в этих Формулах независимо является такой, как показано в структурных формулах в Таблицах 1 и 2.

[00315] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути направленной гомологией репарации (HDR), включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или его фармацевтически приемлемых солей.

[00316] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, по пути HDR.

[00317] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути NHEJ, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или его фармацевтически приемлемых солей.

[00318] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где репарация разрыва ДНК по пути NHEJ ингибирована или подавлена.

[00319] В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного Формулой (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или его фармацевтически приемлемых солей.

[00320] Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней гена(ов)-мишени(ей), что приводит к редактированию одной или более геномных областей-мишеней, и где редактирование изменяет экспрессию нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями).

[00321] В некоторых вариантах осуществления разрыв ДНК включает двухцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК.

[00322] В некоторых вариантах осуществления соединение является сокристаллом, включающим соединение, имеющее структуру Формулы (I), и вещество для образования сокристалла, выбранное из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты.

[00323] В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования геномных областей-мишеней в одной или более клеток повышена по сравнению с эффективностью редактирования в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

[00324] В некоторых вариантах осуществления эффективность репарации разрыва

ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути HDR повышена по сравнению с эффективностью репарации в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

[00325] В некоторых вариантах осуществления эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути NHEJ повышена по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

[00326] В некоторых вариантах осуществления эффективность повышена по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

[00327] В некоторых вариантах осуществления эффективность измеряется частотой направленной интеграции полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления эффективность измеряется частотой направленного мутагенеза. В некоторых вариантах осуществления направленный мутагенез включает точечные мутации, делеции и/или вставки.

[00328] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), повышена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клеток до введения. Например, указанная экспрессия повышена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, в 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клеток до введения.

[00329] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), снижена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клеток до введения. Например, экспрессия гена снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клеток до введения.

[00330] В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), по существу устранена в одной или более клеток.

[00331] В некоторых вариантах осуществления клетка синхронизирована в S или G2 фазе клеточного цикла.

[00332] В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток, которые подвергают введению или контакту с указанным соединением, имеют повышенное выживание по сравнению с одной или более клетками, которые не подвергали введению или контакту с указанным соединением.

[00333] В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток одновременно. В некоторых вариантах

осуществления систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток последовательно. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома вводят в одну или более клеток до соединения. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят в одну или более клеток до системы редактирования генома.

[00334] В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток являются культивируемыми клетками. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток являются клетками *in vivo* в организме. В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток являются клетками *ex vivo* из организма.

[00335] В некоторых вариантах осуществления организмом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления организмом является человек.

[00336] В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят одним путем. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят разными путями. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома вводят внутривенно, а соединение вводят перорально.

[00337] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системы на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo.

[00338] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf.

[00339] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas, и где система CRISPR-Cas содержит: (a) по меньшей мере один элемент геновой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (ii) активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas.

[00340] В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и активаторная РНК слиты в одной молекуле.

[00341] В некоторых вариантах осуществления белок Cas является белком Cas9 II типа. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 является SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазой или их любыми комбинациями.

[00342] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и система CRISPR-Cpf содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент гидовой РНК, где гидовая РНК содержит направляющую РНК, которая содержит нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

[00343] В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляет один или более векторов.

[00344] В некоторых вариантах осуществления один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК.

[00345] В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы выбраны из ретровирусного, лентивирусного, аденовирусного векторов, вектора на основе аденоассоциированного вируса и вектора на основе вируса простого герпеса.

[00346] В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляет синтетическая РНК.

[00347] В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляют наносоставом.

[00348] В некоторых вариантах осуществления предложен набор или композиция для редактирования одной или более геномных областей-мишеней. В некоторых вариантах осуществления набор или композиция содержит систему редактирования генома; и

[00349] соединение, представленное Формулой (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B), или его фармацевтически приемлемые соли.

[00350] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома набора или композиции является системой на основе мегануклеазы, системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системой на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома набора или композиции является системой на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR набора или композиции является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf.

[00351] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR набора или композиции является системой CRISPR-Cas, и где система CRISPR-Cas содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; (ii) и активаторную РНК, содержащую нуклеотидную

последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas.

[00352] В некоторых вариантах осуществления белок Cas набора или композиции является белком Cas9 II типа. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 набора или композиции является SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A приказой или их любой комбинацией.

[00353] В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR набора или композиции является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит: (a) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cpf.

[00354] В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома набора или композиции включена или упакована в одном или более векторах. В некоторых вариантах осуществления один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, вектора на основе аденоассоциированного вируса и вектора на основе вируса простого герпеса.

[00355] В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность редактирования генома является приблизительно 1-кратной, 2-кратной, 3-кратной, 4-кратной, 5-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 25-кратной, 30-кратной, 40-кратной, 50-кратной или 100-кратной по сравнению с условием, в котором ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку(и), или по сравнению с условием, в котором в клетку(и) вводят только систему редактирования генома, но не ингибитор ДНК-ПК.

[00356] Применение ингибиторов ДНК-ПК и систем редактирования генома, наборов и композиций

[00357] Редактирование генома, в котором конкретные геномные области подвергаются точному изменению, обладает большим терапевтическим потенциалом.

[00358] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования одной или более геномных областей-мишеней, репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути HDR, ингибирования или подавления NHEJ-опосредованной репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях и изменения экспрессии одного или более генов или белков путем введения в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора

ДНК-ПК.

[00359] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающие введение в одну или более клеток, включающих одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК, описанных в настоящем документе, где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней гена(ов)-мишени(ей), приводя к редактированию одной или более геномных областей-мишеней, и где редактирование изменяет экспрессию нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями).

[00360] Система редактирования генома может быть любой системой редактирования генома, которая может редактировать геномную область-мишень в клетке(ах). Примерные системы редактирования генома подробно описаны выше и могут содержать, например, систему на основе мегануклеазы, систему на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), систему на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo.

[00361] Редактирование одной или более геномных областей-мишеней включает любой вид генетических манипуляций или инженерии генома клетки. Редактирование одной или более геномных областей-мишеней может включать вставки, делеции или замены геномных областей в клетке(ах), выполняемые одной или более эндонуклеазами. Геномные области включают генетический материал в клетке(ах), такой как ДНК, РНК, полинуклеотиды и олигонуклеотиды. Геномные области в клетке(ах) также включают геномы митохондрий или хлоропластов, содержащихся в клетке(ах).

[00362] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы лечения субъекта, имеющего заболевание или состояние, нуждающееся в редактировании одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) субъекта, включающие введение в одну или более клеток системы геномного редактирования и ингибитора ДНК-ПК.

[00363] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются для изменения экспрессии гена, молекулы РНК, белка, группы белков или нижестоящих белков в пути. Такая модификация может применяться для лечения заболевания, дисфункции, нарушения гомеостаза в организме, приобретенных или наследственных, или вызванных процессом старения. При использовании в настоящем документе термин "изменять" или "изменение" включает модуляцию, улучшение, уменьшение, увеличение, инсерцию, делецию, нокаут, нокин и т.п.

[00364] Специалисту в данной области будет известно, что заболевания, приобретенные или наследственные, или полученные иным образом, включают нарушение регуляции гомеостатических механизмов, включая участие функции гена или белка. С этой целью специалист может применить способы, предложенные в настоящем

документе, для модуляции, модификации, повышения, снижения или обеспечения иным образом функции гена у субъекта.

[00365] Изменение экспрессии гена и последующей экспрессии белка в клетке(ах) может быть достигнуто с помощью предложенных в настоящем документе способов, например, специфичного редактирования (например, замены, вставки или делеции, их любых комбинаций) последовательности нуклеиновой кислоты в любом экзоне, интроне, сайте начала транскрипции, промоторной области, энхансерной области, области сайленсера, области инсулятора, антирепрессоре, посттрансляционном регуляторном элементе, сигнале полиаденилирования (например, минимальном поли-А), консервативной области, сайте связывания фактора транскрипции или их любых комбинациях.

[00366] В некоторых вариантах осуществления способы, наборы и композиции, предложенные в настоящем документе, применяются для лечения субъекта, имеющего рак. Способ лечения субъекта, имеющего рак или связанное с раком состояние, включает введение в клетку(и) субъекта ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома. Введение ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома может проходить *in vivo* или *ex vivo*.

[00367] Рак может быть любого типа. Рак включает солидные опухоли, например, молочной железы, яичников, предстательной железы, легкого, почки, желудка, толстой кишки, яичка, головы и шеи, поджелудочной железы, головного мозга, меланому и другие опухоли паренхиматозных органов, а также злокачественные опухоли из клеток крови, такие как лимфомы и лейкозы, включая острый миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лимфоцитарный лейкоз и В-клеточные лимфомы. Рак может включать меланому, лейкоз, астроцитому, глиобластому, лимфому, глиому, лимфому Ходжкина, хронический лимфоцитарный лейкоз и рак поджелудочной железы, молочной железы, щитовидной железы, яичника, матки, яичка, гипофиза, почки, желудка, пищевода и прямой кишки.

[00368] В некоторых вариантах осуществления способы, наборы и композиции, предложенные в настоящем документе, применяются для лечения субъекта, имеющего любую одну или более из следующих форм рака: острый лимфообластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз, аденокарциному, СПИД-ассоциированные злокачественные опухоли, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому мозжечка у детей или мозга у взрослых, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, внепеченочный (см. холангиокарциному), рак мочевого пузыря, опухоль кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга, астроцитому мозжечка, опухоль головного мозга, астроцитому мозга/злокачественную глиому, опухоль головного мозга, эпендимому, опухоль головного мозга, медуллобластому, опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и

гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциноиды, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль у детей, карциноидную опухоль, желудочно-кишечного тракта, карциному без выявленного первичного очага, лимфому центральной нервной системы, первичную, астроцитому мозжечка у детей, астроцитому мозга/злокачественную глиому у детей, рак шейки матки, детский рак, хондросаркому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, эпителиоидную гемангиоэндотелиому (ЕНЕ), рак пищевода, саркому Юинга семейства опухолей Юинга, опухоль экстракраниальных половых клеток, опухоль экстрагонадальных половых клеток, рак внепеченочных желчных протоков, рак глаза, внутриглазную меланому, рак глаза, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), опухоль из зародышевых клеток: экстракраниальную, экстрагонадальную или овариальную, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, астроцитому мозга у детей, глиому, зрительных путей и гипоталамуса у детей, карциноид желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути у детей, внутриглазную меланому, карциному из островковых клеток (эндокринной ткани поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (почечноклеточный рак), рак гортани, лейкозы, лейкоз, острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, острый миелоидный (также называемый острым миелогенным лейкозом), лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый хроническим лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, хронический миелогенный (также называемый хроническим миелоидным лейкозом), лейкоз, волосатоклеточный, рак губы и полости рта, липосаркому, рак печени (первичный), рак легкого, немелкоклеточный, рак легкого, мелкоклеточный, лимфомы, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфому Беркитта, Т-клеточную лимфому кожи, лимфомы Ходжкина, неходжкинскую (старая классификация всех лимфом кроме лимфомы Ходжкина) лимфому, первичную центральную нервную систему, макроглобулинемию, Вальденстрема, рак молочной железы у мужчин, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланому у детей, меланому, интраокулярную (глаза), рак из клеток Меркеля, мезотелиому, злокачественную мезотелиому взрослых, детский метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмноклеточную неоплазию, грибovidный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз взрослых, детскую острую миелому, множественную (рак костного мозга), миелопролиферативные нарушения, хроническую миксому, рак

полости носа и околоносовых пазух, карциному носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, олигодендроглиому, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичника, эпителиальный рак яичника (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль), опухоль яичника из зародышевых клеток, опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы из островковых клеток, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, фарингальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидной железы, герминому шишковидной железы, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмоклеточную неоплазию/множественную миелому, плевроролечную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному (рак почки), рак почечной лоханки и мочеточника, переходно-клеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, семейства опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (не меланому), рак кожи (меланому), карциному кожи, из клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному - рак кожи (не меланому), плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом, метастатический, рак желудка, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, Т-клеточную лимфому, кожную (грибовидный микоз и синдром Сезари), рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, карциному без выявленного первичного очага взрослых, рака без выявленного первичного очага, детский, мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак, рак уретры, рак матки, рак эндометрия, саркому матки, рак влагалища, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема или опухоль Вильмса (рак почки).

[00369] В некоторых вариантах осуществления примеры генов-мишеней, ассоциированных с раком, включают: ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, AT1, AKT2, ALDH2, AL, AL017, APC, ARHGEF12, ARHH, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, AXIN1, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPRIA, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIPI, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, C2orf44, CAMTA1, CANT1, CARD11, CARS, CBFA2T1, CBFA2T3, C.BFB, CBL, CBLB, CBLC, CCDC6, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CD N2A, CD N2a(pl4), CD N2C, CDX2, CEBPA, CEPI, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, Cin A, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, CNOT3, COL1A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC3, CTNNB1, CYLD, D10S170, DAXX, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, D1CER1, DNM2, DNMT3A, DUX4, EBFI, ECT2L, EGFR,

E1F4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS 15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, EZR, FACL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, 1ANCA, EANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO1 1, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FTL, FIIT, FIP1L1, FLU, FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, H3F3A, HICMOGT-1, HIEAB, HERPUD1, HIEY1, HIIPI, HIST1H3B, HIST1H4I, HLF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH, IGK, IGL, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIF5B, KIT, KLF4, KLK2, KRAS, KTN1, LAF4, LASP1, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LMO2, LPP, LRIG3, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MTF, MKL1, MLF1, MLL, MLL2, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYST4, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NSD1, NT5C2, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PIIF6, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNUTL1, POT1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1A, PRO1073, PSIP2, PTCH, PTEN, PTPN11, RAB5EP, RAC1, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAPIGDSI, RARA, RBI, RBM15, RECQL4, REL, RET, RNF43, ROS1, RPL10, RPL22, RPL5, RPN1, RUNDC2A, RUNX1, RUNXBP2, SBDS, SDC4, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, SEPT6, SET, SETBP1, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH2B3, SH3GL1, SIL, SLC34A2, SLC45A3, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMO, SOCS1, SOX2, SRGAP3, SRSF2, SSI8, SS18L1, SSH3BP1, SSX1, SSX2, SSX4, STAT3, STK11, STL, SUFU, SIJZ12, SYK, TAF15, TALI, TAL2, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TERT, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TFPT, TFRC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX 3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF6, TOPI, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA, TRAF7, TRB, TRD, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, USP6, VHL, VTUA, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WTX, WWTR1, XPA, XPC, XPO1, YWHAE, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2 или их любые комбинации.

[00370] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, применяются для лечения субъекта, имеющего наследственное нарушение. Способ лечения субъекта, имеющего генетическое заболевание или состояние или наследственное нарушение, включает введение в клетку(и) субъекта ингибитора

ДНК-ПК и системы редактирования генома. Введение ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома может проходить *in vivo* или *ex vivo*.

[00371] Наследственное нарушение может быть вызвано мутациями или дупликациями в хромосомных областях (например, в результате точечных мутаций, делеций, вставок, сдвига рамки считывания, хромосомных дупликаций или делеций). Наследственное нарушение может быть любым наследственным нарушением.

[00372] В некоторых вариантах осуществления наследственным нарушением является синдром делеции 22q11.2, синдром Ангельмана, болезнь Канавана, болезнь Шарко-Мари-Тута, дальтонизм, синдром кошачьего крика, синдром Дауна, мышечная дистрофия Дюшенна, гемохроматоз, гемофилия, синдром Клайнфельтера, нейрофиброматоз, фенилкетонурия, поликистоз почек, синдром Прадера-Вилли, серповидноклеточная анемия, спинальная мышечная атрофия, болезнь Тея-Сакса, синдром Тернера, гемоглобинопатия или их любые комбинации.

[00373] В некоторых вариантах осуществления наследственным нарушением является синдром делеции 1p36, синдром делеции 18p, дефицит 21-гидроксилазы, 47 XXX (синдром трисомии по X-хромосоме), 47 XXY (синдром Клайнфельтера), 5-АЛК-дегидратаза-дефицитная порфирия, дефицит АЛК-дегидратазы, порфирия, вызванная дефицитом дегидратазы 5-аминолавулиновой кислоты, синдром делеции 5p, синдром кошачьего крика (или 5p-синдром), атаксия телеангиэктазия (или АТ), дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ), ацерулоплазминемиа, ахондрогенез II типа (ACG2), ахондроплазия (АСН), дефицит кислой бета-глюкозидазы, болезнь Гоше (любого типа, например, 1 типа, 2 типа, 3 типа), акроцефалосиндактилия (Апера), синдром Апера, акроцефалосиндактилия (любого типа, например, 1 типа, 2 типа, 3 типа, 5 типа), синдром Пфайффера, АКРОЦЕФАЛИЯ, острая церебральная болезнь Гоше, острая перемежающаяся порфирия, дефицит АСУ2 (АИР), болезнь Альцгеймера (БА), краниосиностоз типа Аделаида, синдром Мюнке, аденоматозный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, аденоматозный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз (САП), дефицит аденилосукцинатлиазы, нарушения надпочечников, адреногенитальный синдром, адренолейкодистрофия, синдром нечувствительности к андрогенам (СНА), алкаптонурия (АКУ), порфирия АЛК-дегидратазы, АЛК-D порфирия, дефицит АЛК-дегидратазы, синдром Алажиля, альбинизм, алкаптонурия, алкаптонурия, болезнь Александера, алкаптонурия, алкаптонурический охроноз, алкаптонурия, болезнь ингибитора альфа-1-протеиназы, альфа-1 связанная эмфизема, дефицит альфа-галактозидазы, болезнь Фабри, синдром Альстрема, болезнь Александера (ALX), несовершенный амелогенез, дефицит дегидратазы аминокислоты, дефицит аминокислоты 2, болезнь Канавана, болезнь Андерсона-Фабри, синдром нечувствительности к андрогенам, анемия, наследственная сидеробластная, X-сцепленная сидеробластная анемия селезеночная и/или семейная анемия, ангиокератома туловища диффузная, диффузная ангиокератома, ангиоматоз сетчатки, болезнь фон Гиппеля-Линдау, резистентность к АПС, Лейденского типа, тромбофилия при Лейденской мутации фактора V, синдром Апера, дефицит AR,

синдром нечувствительности к андрогенам, болезнь Шарко-Мари-Тута (любого типа, например, CMT1, CMTX, CMT2, CMT4, тяжелая ШМТ с ранним началом), арахнодактилия, синдром Марфана, ARNSHL, внесиндромная глухота (аутосомно-рецессивная, аутосомно-доминантная, X-сцепленная или митохондриальная), артроофтальмопатия, наследственная прогрессирующая, синдром Стиклера (например, COL2A1, COL11A1, COL11A2, COL9A1), артрохалазия множественная врожденная, синдром Элерса-Данлоса (например, тип гиперподвижности, тип артрохалазии, классический тип, сосудистый тип, тип кифосколиоза, тип дерматоспараксиса) дефицит Asp, дефицит Aspa, дефицит аспартоацилазы, атаксия телеангиэктазия, синдром аутизма-деменции-атаксии-потери целевого использования рук, синдром Ретта, аутосомно-доминантный ювенильный АБС, аутосомно-доминантный синдром Опица G/BBB, аутосомно-рецессивная форма ювенильного АБС 3 типа, амиотрофический боковой склероз (любого типа; например, ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS5, ALS6, ALS7, ALS8, ALS9, ALS10, ALS11, ALS12, ALS13, ALS14, ALS15, ALS16, ALS17, ALS18, ALS19, ALS20, ALS21, ALS22, FTDALS1, FTDALS2, FTDALS3, FTDALS4, FTDALS4, IBMPFD2), аутосомно-рецессивная внесиндромная потеря слуха, аутосомно-рецессивная сенсоневральная тугоухость и зоб, синдром Пендреда, болезнь Александера (AxD), синдром Айерсы, семейная легочная артериальная гипертензия, В вариант гексозаминидаза GM2 ганглиозидоза, болезнь Сандхоффа, BANF-связанное нарушение, нейрофиброматоз (любого типа, например, NF1, NF2, шванноматоз), синдром складчатой кожи Бира-Стивенсона, доброкачественный пароксизмальный перитонит, синдром Бенджамина, бета-талассемия, дефицит BN4, дефицит тетрагидробиоптерина, двусторонний нейрофиброматоз слухового нерва, дефицит биотинидазы, рак мочевого пузыря, нарушения свертываемости крови, тромбофилия с Лейденской мутацией фактора V, синдром Блоха-Сульцбергера, недержание пигмента, синдром Блума, заболевания костей, болезнь Бурневилля, туберозный склероз, Болезни мозга, прионная болезнь, рак молочной железы, синдром Бирта-Хогга-Дюба, болезнь хрустального человека, несовершенный остеогенез, синдром широкого большого пальца кистей и стоп, синдром Рубинштейна-Тэйби, бронзовый диабет, гемохроматоз, пигментный цирроз, бульбоспинальная мышечная атрофия, X-сцепленная бульбоспинальная мышечная атрофия, синдром Бюргера-Грютца, липопротеиновый дефицит липазы, семейный CADASIL синдром, CGD хроническое гранулематозное нарушение, кампомелическая дисплазия, семейный синдром рака, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, дефицит карбоксилазы, множественный биотинидазный дефицит с поздним началом, синдром кошачьего крика, кардиофациальный синдром Caylor, тригексоидазцерамидная недостаточность, цереброретинальный ангиоматоз, семейная болезнь фон Гиппеля-Линдау, церебральная артериопатия, синдром CADASIL, церебральная аутосомно доминантная артериопатия, синдром CADASIL, цереброатрофическая гипераммониемия, синдром Ретта, церебродизоз, болезнь Шарко, синдром CHARGE, хондродистрофия, синдром

хондродистрофии, хондродистрофия с нейросенсорной глухотой, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, недостаточность хондрогенеза, синдром гиперурикемии членовредительства хореоатетоза, синдром Леша-Нихена, классическая галактоземия, галактоземия, врожденная расщелина губы и неба, синдром Стиклера, Трилистниковидный череп с танатофорной карликовостью, танатофорной дисплазией (например, типа 1 или типа 2), синдром Коффина-Лоури (CLS), синдром Коккейна, синдром Коффина-Лоури, коллагенопатия типы II и XI, семейный неполипоз, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, семейный рак толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, рак толстой и прямой кишки, полная ГФРТ недостаточность, синдром Леша-Нихена, полная недостаточность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы, компрессионная невропатия, наследственная невропатия со склонностью к параличам от сдавления, коллагеноз, кардиофациальный синдром, анемия Кули, бета-талассемия, болезнь накопления меди, болезнь Вильсона, болезнь транспорта меди, болезнь Менкеса, копропорфирия, наследственная копропорфирия, дефицит оксидазы копропорфириногена, синдром Каудена, дефицит CPX, черепно-лицевой дизартроз, синдром Крузона, черепно-лицевой дизостоз, синдром Крузона, болезнь Крона, фиброstenоз, синдром Крузона, синдром Крузона с черным акантозом, синдром Крузона черепно-лицевой, синдром Коккейн (CS), синдром Каудена, синдром Куршманна-Баттена-Штейнерта, синдром пахидермии складчатой Бира-Стивенсона, Бира-Стивенсона пахидермии складчатой синдром, дефицит D-глицерат дегидрогеназы, первичная гипероксалурия, синдром пятнистых метафизов, спондилоэпиметафизарная дисплазия, тип Струдвика, деменция альцгеймеровского типа (DAT), генетическая гиперкальциурия, болезнь Дента, мышечная дистрофия (например, Дюшена и Беккера типа), тугоухость и зоб, синдромом Пендреда, синдром пигментного ретинита и глухоты, синдром Ушера, авитаминоз, фенилаланин-гидроксилаза, дегенеративные заболевания нервной системы, синдром де Груши 1, синдром де Груши, синдром Дежерина-Сотта, порфирия при дефиците дельта-аминолевулинат дегидратазы, деменция, синдром CADASIL, демиелогенная лейкодистрофия, болезнь Александра, дерматоспарактический тип синдрома Эйлерса-Данлоса, дерматоспараксис, наследственное нарушение развития, дистальная наследственная двигательная невропатия (dHMN), дистальная наследственная двигательная невропатия (например, DHMN-V), дефицит DHTR, синдром резистентности к андрогену, диффузный склероз глобоидного тела, болезнь Краббе, синдром Ди Джорджа, дефицит рецептора дигидротестерона, синдром нечувствительности к андрогена, дистальная наследственная моторная невропатия, Миотоническая дистрофия (тип 1 или тип 2), дистальная спинальная мышечная атрофия (любой тип, включая, например, тип 1, тип 2, тип 3, тип 4, тип 5, тип 6), мышечная дистрофия Дюшена и Беккера типа, карликовость (любой вид, например, ахондроплазийный, танатотропная дисплазия), синдром карликовости-атрофии сетчатки и тугоухости, синдром Коккейна, дисмиелиногенная лейкодистрофия, болезнь Александра, миотоническая дистрофия, пигментный ретинит и дизостозный дистрофийный синдром,

синдром Ушера, семейная болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD), болезнь Альцгеймера (включая, например, тип 1, тип 2, тип 3 или тип 4), болезнь Экман-Лобштейна, незавершенный остеогенез, компрессионная нейропатия, наследственная компрессионная нейропатия, эритропоэтическая протопорфирия (EPP), эритробластическая анемия, бета-талассемия, эритрогепатитная протопорфирия, дефицит эритроид 5-аминолевулинат синтетазы, X-сцепленная сидеробластная анемия, рак глаза, ретинобластома, наследственная атаксия Фридрейха, FA, анемия Фанкони, лицевые повреждения и болезни, Лейденовская тромбофилия фактор V, FALS, амиотрофический боковой склероз, семейная нейрома слухового нерва, семейный аденоматозный полипоз, семейная болезнь Альцгеймера (FAD), семейный амиотрофический боковой склероз, амиотрофический боковой склероз, семейная вегетососудистая дистония, семейная вызванная жиром гипертриглицеридемия, липопротеин липазная недостаточность, семейный, семейный гемохроматоз, гемохроматоз, семейный дефицит LPL, липопротеиновый дефицит липазы, семейный, семейный неполипозный рак толстой кишки, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, семейный хронический полисерозит, семейный PCT, гемохроматоз, компрессионная нейропатия, наследственная компрессионная нейропатия, семейная первичная легочная гипертензия (FPPH), семейная сосудистая лейкоэнцефалопатия, синдром CADASIL, FAP, семейный аденоматозный полипоз, FD, семейная вегетососудистая дистония, дефицит феррохелатазы, ферропортиновая болезнь, гематохроматоз (любой тип, например, тип 1, тип 2A, тип 2B, тип 3, тип 4, неонатальный гематохроматоз, ацерулоплазминеми, врожденная атрансферринемия, gracile синдром) синдром периодической лихорадки, семейная средиземноморская лихорадка (FMF), синдром FG, FGFR³-связанный коронковый синостоз, фибриноидная дегенерация астроцитов, болезнь Александра, кистозно-фиброзного заболевание поджелудочной железы, болезнь Феллинга, fra (X) синдром, синдром ломкой X-хромосомы, несовершенный остеогенез, незавершенный остеогенез, синдром FRAXA, наследственная атаксия Фридрейха (FRDA), дефицит G6PD, заболевание, вызванное дефицитом галактокиназы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом галактозофосфат-уридилтрансферазы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом галактозилцерамидазы, болезнь Краббе, галактозилцерамидный липидоз, болезнь Краббе, дефицит галактозилцереброзидазы, галактозилсфингозинный липидоз, дефицит GALC, дефицит GALT, галактоземия, гошеподобная болезнь, псевдобольше Гоше, дефицит GBA, Генетические мозговые нарушения, генетическая эмфизема, генетический гемохроматоз, гемохроматоз, Гигантоклеточный гепатит, новорожденный, Новорожденный гемохроматоз, дефицит GLA, Глиобластома, ретинальная, ретинобластома, Глиома, ретинальная, ретинобластома, глобоидная клетка лейкоцистрофия (GCL, GLD), болезнь Краббе, глобоидноклеточная лейкоэнцефалопатия, дефицит глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидоз, глюкозилцереброзидный липидоз, дефицит глюкозилцерамидазы, дефицит бета-глюкозилцерамид глюкозидазы, глюкозилцерамидный липидоз, глицериновая ацидурия, гипероксалурия, первичная,

глициновая энцефалопатия, некототическая гиперглицинемия, гликолевая ацидурия, гипероксалурия, основной, GM2 ганглиозидоз, болезнь Тея-Сакса, синдром зобатугоухости, синдром Пендреда, синдром Грефе-Ушера, синдром Ушера, синдром Гренблада-Страндберга, эластическая псевдоксантома, гемохроматоз, синдром Хальгрена, синдром Ушера, ихтиоз арлекина, болезнь Нб S, гипохондроплазия (HCH), наследственная копропорфирия (HCP), пороки развития головы и мозга, слуховые нарушения и тугоухость, нарушения слуха у детей, HEF2A, HEF2B, гематопорфирия, порфирия, дефицит гемсинтетазы, гемохроматоз, болезнь гемоглобина M, метгемоглобинемия бета-глобинового типа, болезнь гемоглобина S, гемофилия, гепатозритропозическая порфирия (HEP), дефицит печеночной AGT, гипероксалурия, основной, синдром гепатолентикулярной дегенерации, болезнь Вилсона, наследственная артро-офтальмопатия, синдром Стиклера, наследственный дистопический липидоз, наследственный гемохроматоз (HHC), гемохроматоз, наследственная геморрагическая телеангиэктазия (HHT), Наследственная миопатия с тельцами включения, регенерация скелетных мышц, Наследственная железонасыщенная анемия, X-сцепленная сидеробластная анемия, Наследственная моторная и сенсорная нейропатия, Наследственная моторная нейропатия, тип V, дистальная наследственная моторная невропатия, Наследственные множественные экзостозы, Наследственный рак толстой и прямой кишки неполипозный, Наследственный периодический синдром лихорадки, Наследственный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, Наследственная легочная эмфизема, Наследственная устойчивость к активированному протеину C, тромбофилия с Лейденской мутацией фактора V, Наследственная сенсорная и автономная нейропатия III типа, семейная вегетососудистая дистония, наследственная спастическая параплегия, детский восходящий наследственный спастический паралич, Наследственная спинальная атаксия, атаксия Фридрейха, Наследственный спинальный склероз, атаксия Фридрейха, анемия Херрика, гетерозиготный OSMED, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, гетерозиготная отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, дефицит НехА, болезнь Тея-Сакса, дефицит гексозаминидазы, болезнь Тея-Сакса, дефицит альфа-субъединицы гексозаминидазы (любой вариант, например, вариант А, вариант В), болезнь Тея-Сакса, HFE-связанный гемохроматоз, гемохроматоз, HGPS, Прогерия, болезнь Гиппеля-Линдау, болезнь фон Гиппеля-Линдау, гемохроматоз (HLAH), дистальная наследственная моторная нейропатия (HNM V), наследственный рак толстой и прямой кишки неполипозный (HNPCC), наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления (HNСПС), гомоцистинурия, дефицит оксидазы гомогентизиновой кислоты, алкаптонурия, гомогентизиновая ацидурия, алкаптонурия, Гомозиготная поздняя кожная порфирия, гепатозритропозическая порфирия, гипероксалурия, первичная (HP1), гипероксалурия (HP2), гиперфенилаланинемия (ГФА), ГФРТ - дефицит гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы, синдром Леша-Нихена, HSAN III типа, семейная вегетососудистая дистония, семейная вегетососудистая дистония (HSAN3),

Наследственная Сенсорная Нейропатия (любого типа, например. HSN-1, HSN-II, HSN-III), семейная вегетососудистая дистония, дерматоспараксис, болезнь Хантингтона, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда, прогерия, Гиперандрогенизм, неклассического типа вследствие дефицита 21-гидроксилазы, гиперхиломикронемия, семейный дефицит липопротеинлипазы, семейная, гиперглицинемия с кетоацидозом и лейкопенией, пропионовая ацидемия, гиперлиппротеинемия 1 типа, дефицит липопротеинлипазы, семейная гипероксалурия, первичная гиперфенилаланинемия, гиперфенилаланинемия, гиперфенил-аланинемия, гипохондродисплазия, гипохондроплазия, гипохондрогенез, гипохондроплазия, гипохромная анемия, X-сцепленная сидеробластная анемия, дефицит гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), синдром Леша-Нихена, детский восходящий наследственный спастический паралич (IAHSP), синдром ICF, синдром иммунодефицита, нестабильности центромер и лицевых аномалий, идиопатический гемохроматоз, гемохроматоз, 3 типа, идиопатический гемохроматоз новорожденных, гемохроматоз, новорожденных, идиопатическая легочная гипертензия, нарушения иммунной системы, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, недержание пигмента, детская мозговая болезнь Гоше, детская болезнь Гоше, детский восходящий наследственный спастический паралич, бесплодие, наследственная эмфизема, наследственная склонность к параличам от сдавления нерва, наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления, синдром Инсли-Астли, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром перемежающейся острой порфирии, острая перемежающаяся порфирия, синдром кишечного полипоза-пигментации кожи, синдром Пейтца-Егерса, недержание пигмента (IP), болезнь накопления железа, гемохроматоз, изодицентрический 15, изодицентрическая 15, изолированная тугоухость, внесиндромная глухота, синдром Джексона-Вайса, синдром Жубера, ювенильный первичный боковой склероз (JPLS), ювенильный амиотрофический боковой склероз, ювенильная подагра, хореоатетоз, синдром умственной отсталости, синдром Леша-Нихена, синдром ювенильной гиперурикемии, синдром Леша-Нихена, синдром Джексона-Вайса (JWS), спинальная и бульбарная мышечная атрофия, болезнь Кеннеди, спинально-бульбарная мышечная атрофия, спинальная и бульбарная мышечная атрофия Кеннеди, керазиновый гистиоцитоз, керазиновый липоидоз, керазиновый тезауризмоз, кетотическая глицинемия, пропионовая ацидемия, кетотическая гиперглицинемия, пропионовая ацидемия, Болезни почек, гипероксалурия, первичная, дисплазия Книста, болезнь Краббе, болезнь Кугельберга-Веландера, спинальная мышечная атрофия, лакунарная деменция, синдром CADASIL, ахондрогенез Лангера-Салдино, дисплазия Лангера-Салдино, болезнь Альцгеймера с поздним началом, болезнь Краббе с поздним началом (LOKD), болезнь Краббе, нарушение способности к обучению, неспособность к обучению, лентигиноз, околоротовой, синдром Пейтца-Егерса, синдром Леша-Нихена, Лейкодистрофии, лейкодистрофия с волокнами Розенталя, болезнь Александера, лейкодистрофия, губковидная, синдром Ли-Фраумени (LFS), синдром Ли-Фраумени, дефицит липазы D, дефицит липопротеинлипазы, семейный дефицит LIPD, дефицит липопротеинлипазы,

семейный липидоз, цереброзид, липидоз, ганглиозид, детский, болезнь Тея-Сакса, липоидный гистиоцитоз (керазинового типа), дефицит липопротеинлипазы, семейные заболевания печени, галактоземия, болезнь Лу Герига, синдром Луи-Бар, атаксия телеангиэктазия, синдром Линча, наследственный рак толстой и прямой кишки неполипоза, дефицит лизилгидроксилазы, болезнь Мачадо-Джозефа, спиноцеребеллярная атаксия (любого типа, например, SCA1, SCA2, SCA3, SCA 18, SCA20, SCA21, SCA23, SCA26, SCA28, SCA29), рак молочной железы у мужчин, рак молочной железы, мужские половые нарушения, злокачественная неоплазия молочной железы, рак молочной железы, злокачественная опухоль молочной железы, рак молочной железы, злокачественная опухоль мочевого пузыря, рак мочевого пузыря, рак груди, рак молочной железы, синдром Марфана, синдром маркера X, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Мартина-Белла, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Маккьюна-Олбрайта, синдром Маклеода, синдром MEDNIK, средиземноморская анемия, бета-талассемия, мегаэпифизарная карликовость, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром Менкеса, болезнь Менкеса, умственная отсталость с костно-хрящевыми патологиями, синдром Коффина-Лоури, нарушения обмена веществ, метатропная карликовость, II типа, дисплазия Книста, метатропная дисплазия II типа, дисплазия Книста, метгемоглобинемия (любого типа, например, врожденная, бета-глобинового типа, врожденная метгемоглобинемия II типа), метилмалоновая ацидемия, синдром Марфана (MFS), МНАМ, синдром Каудена, Микро-синдром, микроцефалия, ММА, метилмалоновая ацидемия, болезнь Менкеса (также МК или MNK), синдром моносомии 1p36, болезнь двигательного нейрона, амиотрофический боковой склероз, амиотрофический боковой склероз, двигательные нарушения, синдром Моуэта-Уилсона, Мукополисахаридоз (MPS I), Муковисцидоз, Мультиинфарктная деменция, синдром CADASIL, Множественный дефицит карбоксилазы, с поздним началом, дефицит биотинидазы, синдром множественной гамартомы, синдром Каудена, множественный нейрофиброматоз, мышечная дистрофия (любого типа, включая, например, тип Дюшена и Беккера), атрофическая миотония, миотоническая дистрофия, дистрофическая миотония, синдром Нэнси-Инсли, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, хондродисплазия Нэнси-Суини, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, NBIA1, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, синдром Нилл-Дингуолл, синдром Коккейна, Нейробластома, ретиная, ретинобластома, Нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге, I типа, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, Неврологические болезни, Нервно-мышечные нарушения, дистальная наследственная моторная нейронопатия, Ниманн-Пик, болезнь Ниманна-Пика, синдром Ноак, некотитическая гиперглицинемия, Глициновая энцефалопатия, ненейронопатическая болезнь Гоше, нефенилкетонурическая гиперфенилаланинемия, дефицит тетрагидробиоптерина, внесиндромная глухота, синдром Нунан, болезнь Гоше норрботтенского типа, Охроноз, алкаптонурия, Охронотический артрит, алкаптонурия, Огденский синдром, несовершенный остеогенез (OI), болезнь Ослера-Вебера-Рандю, наследственная геморрагическая телеангиэктазия, OSMED, отоспондиломегаэпифизарная

дисплазия, несовершенный остеогенез, Остеопситироз, незавершенный остеогенез, врожденный остеосклероз, ото-спондило-мегаэпифизарная дисплазия, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, Оксалоз, гипероксалурия, первичная, Оксалурия, первичная, гипероксалурия, первичная, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, синдром Патау (трисомия 13), дефицит PBGD, острая перемежающаяся порфирия, дефицит PCC, пропионовая ацидемия, поздняя кожная порфирия (PCT), болезнь PDM, синдром Пендреда, Периодическая болезнь, Средиземноморская лихорадка, Семейный периодический перитонит, синдром периорифициального лентигиноза, синдром Пейтца-Егерса, нарушения периферических нервов, семейная вегетососудистая дистония, периферический нейрофиброматоз, перонеальная мышечная атрофия, дефицит пероксисомальной аланин:глиоксилат аминотрансферазы, гипероксалурия, первичный синдром Пейтца-Егерса, заболевание, вызванное дефицитом фенилаланингидроксилазы, Феохромоцитома, болезнь фон Гиппеля-Линдау, синдром Пьера Робена с хондродисплазией плода, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, Пигментный цирроз, гемохроматоз, синдром Пейтца-Егерса (PJS), пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация (PKAN), PKU, фенилкетонурия, Плюмбопорфирия, АЛК-дефицитная порфирия, PMA, Поликистозная болезнь почек, полиоссальная фиброзная дисплазия, синдром Маккьюна-Олбрайта, семейный аденоматозный полипоз, гамартоматозный полипоз кишечника, синдром полипов и пятен, синдром Пейтца-Егерса, дефицит порфобилиногенсинтазы, АЛК-дефицитная порфирия, порфириновая болезнь, дефицит PPOX, смешанная порфирия, синдром Прадера-Лабхарта-Вилли, синдром Прадера-Вилли, пресенильная и сенильная деменция, Первичная цилиарная дискинезия (PCD), первичный гемохроматоз, гемохроматоз, синдром первичной гиперурикемии, синдром Леша-Нихена, первичная сенильная дегенеративная деменция, EDS проколлагенового типа VII, мутантная, прогерия, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда, прогерия-подобный синдром, синдром Коккейна, прогероидный нанизм, синдром Коккейна, прогрессирующая хорей, хроническая наследственная (Хантингтона), болезнь Хантингтона, прогрессивно деформирующий несовершенный остеогенез с нормальными склерами, Несовершенный остеогенез (любого типа, например, I типа, II типа, III типа, IV типа, V типа, VI типа, VII типа, VIII типа), проксимальная миотоническая дистрофия (PROMM), пропионовая ацидемия, дефицит пропионил-КоА-карбоксилазы, дефицит протеина C, дефицит протеина S, протопорфирия, дефицит протопорфириногенаоксидазы, смешанная порфирия, проксимальная миотоническая дистрофия, миотоническая дистрофия II типа, проксимальная миотоническая миопатия, псевдобольше Гоше, эластическая псевдоксантома, психозиновый липидоз, болезнь Краббе, легочная артериальная гипертензия, легочная гипертензия, псевдоксантома эластическая (PXE), псевдоксантома эластическая, ретинобластома (Rb), болезнь Реклингхаузена, рецидивирующий полисерозит, поражения сетчатки, синдром пигментного ретинита-глухоты, синдром Ушера, Ретинобластома, синдром Ретта, 3 типа RFALS, синдром Рикера, синдром Райли-

Дея, семейная вегетососудистая дистония, синдром Русси-Леви, синдром Рубинштейна-Тейби (RSTS), синдром Ретта (RTS), синдром Рубинштейна-Тейби, синдром Рубинштейна-Тейби, синдром Сака-Барабаса, болезнь SADDAN, семейный синдром саркомы Ли и Фраумени, синдром Ли-Фраумени, синдром SBLA (синдром саркомы, опухолей молочной железы, лейкоза и надпочечников), синдром Ли-Фраумени, спинальная и бульбарная мышечная атрофия (SBMA), Шваннома, слухового нерва, двусторонняя, нейрофиброматоз II тип, синдром Шварца-Джампела, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCIDX1), врожденный SED, врожденная спондилоэпифизарная дисплазия, SED Струдвика, спондилоэпиметафизарная дисплазия, типа Струдвика, спондилоэпифизарная дисплазия, врожденная (SEDC), дисплазия спондилоэпиметафизарная (SEMD), типа Струдвика SEMD, сенильная деменция, тяжелая ахондроплазия с задержкой развития и черным акантозом, болезнь SADDAN, синдром Шпрингера, синдром X-сцепленной умственной отсталости Сидериуса, вызванный мутациями в гене PHF8, скелетно-кожно-мозговой синдром, нарушения пигментации кожи, спинально-мышечная атрофия (SMA), спондило-метаэпифизарная дисплазия (SMED) (любого типа, например, типа Струдвика, I типа), синдром Смита-Лемли-Опитца, синдром Смит-Магенис, южноафриканская генетическая порфирия, детский восходящий спастический паралич, детский восходящий наследственный спастический паралич, речевые и коммуникативные нарушения, сфинголипидоз, Тей-Сакс, болезнь Тей-Сакса, спинальная и бульбарная мышечная атрофия, спинальная мышечная атрофия, спинальная мышечная атрофия, дистального типа V, дистальная наследственная моторная нейропатия, спинальная мышечная атрофия, дистальная с преобладанием верхних конечностей, дистальная наследственная моторная нейропатия, спиноцеребеллярная атаксия, спондилоэпифизарная врожденная дисплазия, спондилоэпифизарная дисплазия, коллагенопатия (любого типа, например, II и XI типов), спондилоэпиметафизарная дисплазия, спондилометафизарная дисплазия (SMD), спондилоэпиметафизарная дисплазия, губчатая дегенерация центральной нервной системы, губчатая дегенерация мозга, губчатая дегенерация белого вещества в грудном возрасте, спорадическая первичная легочная гипертензия, синдром SSB, синдром стальных волос, болезнь Менкеса, болезнь Штейнерта, миотоническая дистрофия, синдром миотонической дистрофии Штейнерта, миотоническая дистрофия, синдром Стиклера, инсульт, CADASIL синдром, синдром Струдвика, подострая нейропатическая болезнь Гоше, шведская генетическая порфирия, острая перемежающаяся порфирия, острая перемежающаяся порфирия, дисплазия хряща по типу швейцарского сыра, дисплазия Книста, болезнь Тей-Сакса, TD - танатофорная карликовость, танатофорная дисплазия, TD с прямыми бедренными костями и черепом в форме трилистника, танатофорная дисплазия 2 типа, Телеангиэктазия, мозжечково-окулокутанная, атаксия телеангиэктазия, синдром тестикулярной феминизации, синдром нечувствительности к андрогенам, дефицит тетрагидробиоптерина, синдром тестикулярной феминизации (TFM), синдром нечувствительности к андрогенам, талассемия промежуточная, бета-

талассемия, Большая талассемия, бета-талассемия, танатофорная дисплазия, тромбофилия вследствие дефицита кофактора активированного протеина С, Лейденского типа, тромбофилий с Лейденской мутацией фактора V, заболевание щитовидной железы, Томакулезная нейропатия, наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления, полный дефицит ГФРТ, синдрому Леша-Нихена, полный дефицит гипоксантингуанин-фосфорибозилтрансферазы, синдром Леша-Нихена, синдром Тричера Коллинза, триада хрупких костей, синдром тройной X, синдром тройной X хромосомы, Трисомия 21 Трисомия X, синдром Труаэ-Ано-Шоффара, гемохроматоз, болезнь Тея-Сакса (TSD), комплекс туберозного склероза (TSC), Туберозный склероз, подобная форма синдрома Тернера, синдром Нунан, заболевание, вызванное дефицитом УДФ-галактозо-4-эпимеразы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом УДФ-глюкозо-4-эпимеразы, галактоземия, дефицит УДФ-глюкоза-гексозо-1-фосфат-уридилитрансферазы, галактоземия, Недифференцированная глухота, внесиндромная глухота, дефицит UPS, острая перемежающаяся порфирия, рак мочевого пузыря, дефицит UROD, дефицит уропорфириногендекарбоксилазы, дефицит уропорфириногенсинтазы, острая перемежающаяся порфирия, синдром Ушера, дефицит УТФ-гексозо-1-фосфатуридилитрансферазы, галактоземия, синдром Ван Богарта-Бертрана, синдром Ван дер Хуве, велокардиофасциальный синдром, синдром VHL, болезнь фон Гиппеля-Линдау, нарушение зрения и слепота, синдром Альстрема, болезнь ван Богарта-Бертрана, болезнь фон Гиппеля-Линдау, болезнь фон Реклингхаузена-Аппельбаума, гемохроматоз, болезнь фон Реклингхаузена, нейрофиброматоз 1 типа, болезнь Вролика, несовершенный остеогенез, синдром Ваарденбурга, синдром Варбурга-Сью-Фледелиуса, Микро-синдром, болезнь Вилсона (WD), синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, болезнь Верднига-Хоффмана, спинальная мышечная атрофия, синдром Уильямса, болезнь Вилсона, болезнь Вильсона, болезнь Уилсона, синдром Вольфа-Хиршхорна, периодическая болезнь Вольфа, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера (WZS), пигментная ксеродерма, X-сцепленная умственная отсталость и макроорхидизм, синдромов ломкой X-хромосомы, X-сцепленная первичная гиперурикемия, синдром Леша-Нихена, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия, X-сцепленная спинальная бульбарная мышечная атрофия, спинальная и бульбарная мышечная атрофия, X-сцепленная энзимопатия с гиперурикемией, синдром Леша-Нихена, X-ТКИД, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия (XLSA), X-ТКИД, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия (XLSA), XSCID, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, XXX синдром, синдромов тройной X, XXXX синдром, XXXXX синдром, XXXXX, синдром XXY, трисомия XXY, синдром Клайнфельтера, синдром XYY, нарушения триплетных повторов или их любые комбинации.

[00374] В вариантах осуществления специфические модуляции пост-транскрипционного контроля служат в качестве мишени для модуляции, модификации,

повышения или снижения активности путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома. Например, модуляторы посттранскрипционного контроля могут включать PARN, PAN, CPSF, CstF, PAP, PABP, PAB2, CFI, CFII, РНК-трифосфатазу, РНК-гуанилтрансферазу, РНК-метилтрансферазу, SAM-синтазу, убиквитин-конъюгирующий фермент E2R, SR-белки SFRS1-SFR11, белки hnRNP (например, HNRNPA0, HNRNPA1, HNRNPA1L1, HNRNPA1L2, HNRNPA2, HNRNPA2B1, HNRNPAB, HNRNPB1, HNRNPC, HNRNPCL1, HNRNPD, HNRPDL, HNRNPF, HNRNHP1, HNRNPH2, HNRNPH3, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPLL, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HNRNPUL1, HNRNPUL2, HNRNPUL3, ADAR, Mex 67, Mtr2, Nab2, Dead-бокс геликазу, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, GEF, GCN2, PKR, HRI, PERK, eEF1, eEF2, GCN, eRF3, ARE-специфические связывающие белки, EXRN1, DCP1, DCP2, RCK/p54, CPEB, eIF4E, микроRNA и миРНК, DICER, Ago белки, белки нонсен-опосредованного расщепления мРНК, UPF3A, UPF3BeIF4A3, MLN51, Y14/MAGOH, MG-1, SMG-5, SMG-6, SMG-7 или их любые комбинации.

[00375] В некоторых вариантах осуществления активность генетических путей, связанных с клеточным циклом, модулируют, повышают или снижают введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования. Примеры путей и генов, связанных с клеточным циклом, включают ATM, PMS2, FAS-L, MRE11, MLH1, FasR, NBS1, MSH6, Trail-L, RAD50, MSH2, Trail-R, 53BP1, RFC, TNF-Ct, P53, PCNA, TNF-R1, CHKE, MSH3, FADD, E2F1, MutS, гомолог, TRADD, PML, MutL, гомолог, R1P1, FANCD2, экзонуклеазу, MyD88, SMC1, ДНК, полимеразу, дельта, IRAK, BLM1, (POLDI, POLD2, POLD3, NIL, BRCA1 и POLD4, гены, IKK, H2AX, кодирующие, субъединицы), NFκβ, ATR, топоизомеразу, 1, Iκβα, RPA, топоизомеразу, 2, IAP, ATRIP, РНКазу H1, каспазу, 3, RAD9, лигазу, 1, каспазу, 6, RAD1, DNA, полимеразу, 1, каспазу, 7, HUS, ДНК, полимеразу, 3, каспазу, 8, RAD17, примазу, каспазу, 10, RFC, хеликазу, HDAC1, CHK1, одиночную цепь, связывающую, HDAC2, TLK1, белки, Цитохром, C, CDC25, Bxl-xL, STAT3, STAT5, DFF45, Vcl-2, ENDO-G, PI3K, Akt, Calpain, Bad, Bax, убиквитин-опосредуемый протеолиз, гипоксия, пролиферация клеток, HIF-1α, MAPK, E1, HERC1, TRAF6, HIF-1β, MAPKK, E2, UBE2Q, MEKK1, Ref1, MAPKKK, E3, UBE2R, COP1, HSP90, c-Met, UBE1A, UBE2S, PIFH2, VEGF, HGF, UBE1B, UBE2U, cIAP, PAS, ER, S1/2, UBE1C, UBE2W, PIAS, ARNT, ATK, UBE2A, UBE2Z, SYVN, VHL, PKCs, UBE2B, AFC, LLC, N, NHLRC1, HLF, паксиллин, UBE2C, UBE1, AIRE, EPF, FAK, UBE2A, E6AP, MGRN1, VDU2, аддуцин, UBE2E, UBE3B, BRCA1, SUMORESUME, PYK1, UBE2F, Smurf, FANCL, SENP1, RB, UBE2G1, Itch, MIDI, кальциневрин, A, RBI, UBE2G2, HERC2, Cdc20, RACK1, Raf-1, UBE2I, HERC3, Cdh1, PTB, A-Raf, UBE2J1, HERC4, Apcl, Hur, B-raf, UBE2J2, UBE4A, Apc2, PHD2, MEK1/2, UBE2L3, UBE4B, Apc3, SSAT2, ERK1/2, UBE2L6, CHIP, Apc4, SSAT1, Ets, UBE2M, CYC4, Apc5, GSK3, Elk1, UBE2N, PPR19, Apc6, CBP, SAP1, UBE20, UIP5, Apc7, FOXO4, cPLA2, WWPI, Mdm2, Apc8, F1H-1, WWP2, паркин, Apc9, TRIP, 12, Trim32, Ape, 10, NEED4, Trim37, Ape, 11, ARF-BP1, SIAH-1, Ape, 12, EDD1, PML, выживание, клеток, цикл, остановка, SMADI, P21, SMAD5, BAX, SAMD8, MDR, LEF1, DRAIL, IGFBP3, TCF3, GADD45, TCF4, P300, HAT1, PI3, Akt, GF1 или их

любые комбинации.

[00376] В некоторых вариантах осуществления активность генов, связанных с ангиогенезом, модулируют, повышают или снижают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку(и). Примерные гены и генетические пути, связанные с ангиогенезом и подобными ангиогенезу состояниями, включают VEGF, VEGFR2, SHC, E2F7, VEGFB, VEGFR3, PI3, VEGFC, Nrp 1, PIP3, EGFDIP3, DAG, GRB2, SOS, Akt, PB, PKC, Ras, RAF1, DAG, eNOS, NO, ERK1, ER2, cPLA2, ME1, MEK2 или их любые комбинации.

[00377] В некоторых вариантах осуществления активность генетических путей и/или генов, связанных с митохондриальной функцией, модулируют, повышают или снижают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку(и). Примерные гены и генетические пути, связанные с митохондриальной функцией, включают аминотрансферазу малатдегидрогеназы, гидратазу, деацилазу, дегидрогеназу, карбоксилазу, мутазу, нарушения окисления жирных кислот окисления лейцина изолейцина (дефицит ферментов пути окисления) аминотрансферазы, OCTN2 разветвленной цепи, FATP1-6 аминотрансферазу 2, аминотрансферазу 2, митохондриальную CPT-1, CACT изобутирил-КоА 2-метилбутирил-КоА, дегидрогеназу CPT-II, SCAD (кетокислот с разветвленной цепью, MCAD, кетокислот MCAD, комплекс VLCAD дегидрогеназы), альфа-ETF гидратазу, бета-ETF ГМГ-КоА-лиаза 2-метил-3-ОН-SHAD бутирил-КоА, LCHAD дегидрогеназу, MTP 3-оксотиолазу, LKAT, DECR 1, HMGCS2, HMGCL или их любые комбинации.

[00378] В некоторых вариантах осуществления модулируют, повышают или снижают активность генетических путей и/или генов, связанных с повреждением ДНК или геномной нестабильностью. Примерные гены и генетические пути, связанные с путями и/или генами, ассоциированными с повреждением ДНК и геномной нестабильностью, включают 53BP1, BLM, MBD2, ДНК, лигазу, 4, MDC1, H2AX, XLF, SMC1, 53BP1, Rad50, P53, P53, Artemis, Rad27, TdT, APE1, PMS2, APE2, UvrA, RecA, MLH1, NEIL1, UvrB, SSB, MSH6, NEIL2, UvrC, Mrell, MSH2, NEIL3, XPC, Rad50, RFC, XRCC1, Rad23B, Nbsl, PCNA, PNKP, CEN2, CtIP, MSH3, Tdpl, DDB1, RPA, MutS, APTX, XPE, Rad51, MutL, ДНК, полимеразу β CSA, Rad52, ДНК полимеразу δ , CSB, Rad54, Топоизомеразу, 1, ДНК, TFT1H, BRCA1, Топоизомеразу, 2, PCNA, XPB, BRCA2, PHКаду H1, FEN1, XPD, Exol, лигазу 1, RFC, XPA, BLM, ДНК, полимеразу, 1, PAR, 1, RPA, Topllla, ДНК, Lig1, XPG, GEN1, примазу, Lig3, ERCC1 Yenl геликазу, UNG, XPF, Slx1, SSBs, MUTY ДНК полимеразу δ , Slx4, SMUG ДНК полимеразу ϵ , Mus8, MBD4, Emel, Dssl, ASH1L, SETD4, DQT1L, SETD5, EHMT1, SETD6, EHMT2, SETD7, EZH1, SETD8, EZH2, SETD9, MLL, SETDB1, MLL2, SETDB2, MLL3, SETMAR, MLL4, SMYD, 1, MLL5, SMYD2, NSD, 1, SMYD3, PRDM2, SMYD4, SET, SMYD5, SETBP1, SUV39H1, SETD 1A, SUV39H2, SETD 1B, SUV420H1, SETD2, SUV420 H2, SETD3 или их любые комбинации.

[00379] В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие факторы транскрипции млекопитающих, модулируют, повышают, снижают или вводят в клетку.

Примерные факторы транскрипции человека включают AFF4, AFF3, AFF2, AFF1, AR, TFAP2B, TFAP2D, TFAP2C, TFAP2E, TFAP2A, JARID2, KDM5D, ARID4A, ARID4B, KDM5A, ARID3A, KDM5B, KDM5C, ARID5B, ARID3B, ARID2, ARID5A, ARID3C, ARID1A, ARID1B, HIF1A, NPAS1, NPAS3, NPAS4, MLXIPL, ARNTL2, MXD1, AHRR, TFE3, HES2, MNT, TCF3, SREBF1, TFAP4, TCFL5, LYL1, USF2, TFEC, AHR, MLX, MYF6, MYF5, SIM1, TFEB, HAND1, HES1, ID2, MYCL1, ID3, TCF21, MXI1, SOHLH2, MYOG, TWIST1, NEUROG3, BHLHE41, NEUROD4, MXD4, BHLHE23, TCF15, MAX, ID1, MYOD1, ARNTL, BHLHE40, MYCN, CLOCK, HEY2, MYC, ASCL1, TCF12, ARNT, HES6, FERD3L, MSGN1, USF1, TAL1, NEUROD1, TCF23, HEYL, HAND2, NEUROD6, HEY1, SOHLH1, MESP1, PTF1A, ATOH8, NPAS2, NEUROD2, NHLH1, ID4, ATOH1, ARNT2, HES3, MLXIP, ASCL3, KIAA2018, OLIG3, NHLH2, NEUROG2, MSC, HES7, ATOH7, BHLHA15, BHLHE22, NEUROG1, FIGLA, ASCL2, OLIG1, TAL2, MTF, SCXB, HELT, ASCL4, MESP2, HES4, SCXA, TCF4, HES5, SREBF2, BHLHA9, OLIG2, MXD3, TWIST2, LOC388553, C13orf38-SOHLH2, CEBPE, XBP1, BATF3, CREB5, CEBPG, ATF3, ATF7, CEBPB, CEBPD, CEBPA, CBFB, CAMTA2, CAMTA1, EBF4, EBF3, EBF1, EBF2, NR2F6, NR2F1, NR2F2, GRHL2, TFCP2L1, GRHL1, TFCP2, UBP1, GRHL3, YBX2, CSDE1, CSDA, YBX1, LIN28A, CARHSP1, CSDC2, LIN28B, NFIX, NFIC, NFIB, NFIA, CUX2, ONECUT2, CUX1, ONECUT1, SATB1, ONECUT3, SATB2, DMRT3, DMRT1, DMRTC2, DMRTA2, DMRTB1, DMRT2, DMRTA1, E2F2, E2F1, E2F3, TFDP2, E2F8, E2F5, E2F7, E2F6, TFDP3, TFDP1, E2F4, NR1H3, NR1H2, ETV1, ETV7, SPI1, ELF4, ETV2, ERF, ELF2, ELK3, ETV3, ELF1, SPDEF, ELK1, ETS1, EHF, ELF5, ETV6, SPIB, FLI1, GABPA, ERG, ETS2, ELK4, ELF3, FEV, SPIC, ETV4, ETV5, FOXN3, FOXC1, FOXJ2, FOXF1, FOXN1, FOXM1, FOXP1, FOXO3, FOXA2, FOXP2, FOXJ1, FOXP4, FOXF2, FOXN4, FOXK2, FOXO1, FOXH1, FOXQ1, FOXK1, FOXI1, FOXD4, FOXA3, FOXN2, FOXB1, FOXG1, FOXR1, FOXL1, FOXC2, FOXE1, FOXS1, FOXL2, FOXO4, FOXD4L1, FOXD4L4, FOXD2, FOXI2, FOXE3, FOXD3, FOXD4L3, FOXR2, FOXJ3, FOXO6, FOXB2, FOXD4L5, FOXD4L6, FOXD4L2, KIAA0415, FOXA1, FOXP3, GCM2, GCM1, NR3C1, GTF2IRD1, GTF2I, GTF2IRD2B, GTF2IRD2, SOX8, SOX30, PMS1, CIC, TCF7, TOX4, SOX10, HMGXB4, HBP1, TFAM, UBTF, WHSC1, SOX6, HMGXB3, BBX, TOX2, SOX4, SOX21, SOX9, SOX15, SOX5, SOX3, LEF1, HMG20A, SOX13, TCF7L2, SSRP1, TCF7L1, SOX17, SOX14, PINX1, SOX7, SOX11, SOX12, SOX2, SOX1, SRY, SOX18, UBTFL1, UBTFL2, TOX, HMGB1, HMGB2, PBRM1, TOX3, SMARCE1, HMG20B, HMGB3, HMGA2, HMGA1, ARX, HOXA11, MEOX1, DLX6, ISL1, HOXC8, BARX2, ALX4, GSC2, DLX3, PITX1, HOXA9, HOXA10, LHX5, LASS4, ZFH4, SIX4, VSX1, ADNP, RHOF1, MEIS3, PBX4, DLX5, HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA6, HOXA13, EVX1, NOBOX, MEOX2, LHX2, LHX6, LHX3, TLX1, PITX3, HOXB6, HNF1B, DLX4, SEBOX, VTN, PHOX2B, NKX3-2, DBX1, NANOG, IRX4, CDX1, TLX2, DLX2, VAX2, PRRX1, TGIF2, VSX2, NKX2-3, HOXB8, HOXB5, HOXB7, HOXB3, HOXB1, MSX2, LHX4, HOXA7, HOXC13, HOXC11, HOXC12, ESX1, BARHL1, NKX2-4, NKX2-2, SIX1, HOXD1, HOXD3, HOXD9, HOXD10, HOXD11, HOXD13, MNX1, CDX4, BARX1, RHOF2, LHX1, GSC, MEIS2, RAX, EMX1, NKX2-8,

NKX2-1, HLX, LMX1B, SIX3, LBX1, PDX1, LASS5, ZFHX3, BARHL2, LHX9, LASS2, MEIS1, DLX1, HMBOX1, ZEB1, VAX1, NKX6-2, VENTX, HHEX, TGIF2LX, LASS3, ALX3, HOXB13, IRX6, ISL2, PKNOX1, LHX8, LMX1A, EN1, MSX1, NKX6-1, HESX1, PITX2, TLX3, EN2, UNCX, GBX1, NKX6-3, ZHX1, HDX, PHOX2A, PKNOX2, CDX2, DRGX, NKX3-1, PBX3, PRRX2, GBX2, SHOX2, GSX1, HOXD4, HOXD12, EMX2, IRX1, IRX2, SIX2, HOXB9, HOPX, OTP, LASS6, HOXC5, HOXB2, RAX2, EVX2, ZHX3, PROP1, ISX, HOXD8, TGIF2LY, IRX5, SIX5, TGIF1, IRX3, ZHX2, LBX2, NKX2-6, ALX1, GSX2, HOXC9, HOXC10, HOXB4, NKX2-5, SIX6, MIXL1, DBX2, PBX1, SHOX, ARGFX, HMX3, HMX2, BSX, HOXA4, DMBX1, HOXC6, HOXC4, RHOXF2B, PBX2, DUXA, DPRX, LEUTX., NOTO, HOMEZ, HMX1, DUX4L5, DUX4L2, DUX4L3, DUX4L6, NKX1-1, HNF1A, HSF4, HSFY2, HSFY1, HSF1, LCORL, LCOR, IRF6, IRF1, IRF3, IRF5, IRF4, IRF8, IRF2, IRF7, IRF9, MBD3, BAZ2B, MBD4, SETDB2, MBD1, MECP2, SETDB1, MBD2, BAZ2A, SMAD7, SMAD5, SMAD9, SMAD6, SMAD4, SMAD3, SMAD1, SMAD2, ZZZ3, RCOR1, CDC5L, MYBL2, DNAJC2, TADA2A, RCOR3, MYB, TERF2, DMTF1, DNAJC1, NCOR1, TERF1, MIER3, MYSM1, SNAPC4, RCOR2, TADA2B, MYBL1, TERF1P2, NCOR2, CCDC79, SMARCC1, SMARCC2, TTF1, C11orf9, NFYA, NFYC, NFYB, NRF1, NR4A3, NR4A1, NR4A2, ESR1, NR0B2, NR0B1, PREB, EAF2, SPZ1, TP63, TP73, TP53, PAX6, PAX7, PAX2, PAX4, PAX8, PAX1, PAX3, PAX5, PAX9, SUB1, POU2F2, POU1F1, POU4F3, POU6F2, POU2F3, POU2F1, POU4F2, POU4F1, POU6F1, POU3F2, POU3F1, POU3F4, POU3F3, POU5F1, POU5F1B, PPARD, PPARG, PPARA, PGR, PROX1, PROX2, NR2E1, NR5A2, NR2C1, NR5A1, NR6A1, ESRRA, NR2C2, RFX3, RFX2, RFX4, RFX1, RFX5, RFX7, RFX6, RFX8, NFATC3, NFKB2, NFATC4, NFATC2, NFAT5, RELB, NFKB1, NFATC1, REL, RELA, RORA, RORC, NR1D2, RORB, RUNX3, RUNX1, SP100, SP140, GMEB2, SP110, AIRE, GMEB1, DEAF1, SP140L, LOC729991-MEF2B, MEF2A, SRF, MEF2D, MEF2B, STAT1, STAT5A, STAT4, STAT6, STAT3, STAT2, STAT5B, TBX21, TBX5, TBX15, TBX18, TBX2, TBX4, TBX22, TBX3, TBR1, TBX19, TBX6, EOMES, T, TBX20, TBX10, MGA, TBX1, TEAD3, TEAD2, TEAD1, TEAD4, CREBL2, NFE2L3, CREB3L3, FOSL2, NFE2L1, CREM, DBP, CREB3, HLF, BACH2, ATF2, NFE2L2, ATF6, CREB1, ATF1, NFE2, FOSB, ATF4, NRL, JUND, JDP2, CREB3L4, BATF, BACH1, CREB3L1, NFIL3, TEF, BATF2, ATF5, FOS, JUNB, DDIT3, FOSL1, JUN, MAF, CREB3L2, MAFA, MAFF, MAFG, MAFK, MAFB, ATF6B, CRX, OTX1, OTX2, THAP3, THAP10, THAP1, PRKRIR, THAP8, THAP9, THAP11, THAP2, THAP6, THAP4, THAP5, THAP7, NR1H4, NR2E3, RARB, HNF4A, VDR, ESRRB, THRA, NR1D1, RARA, ESR2, NR1I3, NR1I2, THRB, NR3C2, HNF4G, RARG, RXRA, ESRRG, RXRB, TSC22D1, TSC22D3, TSC22D4, TSC22D2, TULP3, TULP2, TULP1, TULP4, TUB, ZBTB33, ZBTB32, ZBTB11, MYNN, ZBTB25, PATZ1, ZBTB16, ZBTB24, BCL6, ZBTB47, ZBTB17, ZBTB45, GZF1, ZBTB1, ZBTB46, ZBTB8A, ZBTB7B, BCL6B, ZBTB49, ZBTB43, HIC2, ZBTB26, ZNF131, ZNF295, ZBTB4, ZBTB34, ZBTB38, HIC1, ZBTB41, ZBTB7A, ZNF238, ZBTB42, ZBTB2, ZBTB20, ZBTB40, ZBTB7C, ZBTB37, ZBTB3, ZBTB6, ZBTB44, ZFP161, ZBTB12, ZBTB48, ZBTB10, ZBED4, ZBED3, ZBED2, C11orf95, ZBED1, IKZF5, ZNF821, ZNF451,

ZNF195, ZFX, ZNF263, ZNF200, HIVEP2, WIZ, ZNF582, SNAI2, ZFP64, IKZF2, ZIC2, ZNF800, PRDM1, PRDM6, ZFP112, ZNF275, ZNF76, ZFAT, KLF6, ZFY, ZXDC, GLI2, ZNF532, ZNF37A, ZNF510, ZNF506, ZNF324, ZNF671, ZNF416, ZNF586, ZNF446, ZNF8, ZNF264, REST, MECOM, ZNF213, ZNF343, ZNF302, ZNF268, ZNF10, HIVEP1, ZNF184, MZF1, SALL4, ZNF516, KLF8, KLF5, ZNF629, ZNF423, CTCF, ZNF500, ZNF174, SALL1, MAZ, ZNF419, OVOL3, ZNF175, ZNF14, ZNF574, ZNF85, SP4, ZKSCAN1, GLI3, GLIS3, KLF3, PRDM4, GLI1, PRDM13, ZNF142, PRDM2, ZNF684, ZNF541, KLF7, PLAGL1, ZNF430, KLF12, KLF9, ZNF410, BCL11A, EGR1, ZFP30, TSHZ3, ZNF549, ZSCAN18, ZNF211, ZNF639, ZSCAN20, GTF3A, ZNF205, ZNF644, EGR2, IKZF4, CTCFL, ZNF831, SNAI1, ZNF576, ZNF45, TRERF1, ZNF391, RREB1, ZNF133, OVOL2, ZNF436, PLAGL2, GLIS2, ZNF384, ZNF484, HIVEP3, BCL11B, KLF2, ZNF780B, FEZF1, KLF16, ZSCAN10, ZNF557, ZNF337, PRDM12, ZNF317, ZNF426, ZNF331, ZNF236, ZNF341, ZNF227, ZNF141, ZNF304, ZSCAN5A, ZNF132, ZNF20, EGR4, ZNF670, VEZF1, KLF4, ZFP37, ZNF189, ZNF193, ZNF280D, PRDM5, ZNF740, ZIC5, ZSCAN29, ZNF710, ZNF434, ZNF287, ZIM3, PRDM15, ZFP14, ZNF787, ZNF473, ZNF614, PRDM16, ZNF697, ZNF687, OSR1, ZNF514, ZNF660, ZNF300, RBAK, ZNF92, ZNF157, ZNF182, ZNF41, ZNF711, PRDM14, ZNF7, ZNF214, ZNF215, SALL3, ZNF827, ZNF547, ZNF773, ZNF776, ZNF256, ZSCAN1, ZNF837, PRDM8, ZNF117, ZIC1, FEZF2, ZNF599, ZNF18, KLF10, ZKSCAN2, ZNF689, ZIC3, ZNF19, ZSCAN12, ZNF276, ZNF283, ZNF221, ZNF225, ZNF230, ZNF222, ZNF234, ZNF233, ZNF235, ZNF362, ZNF208, ZNF714, ZNF394, ZNF333, ZNF382, IKZF3, ZNF577, ZNF653, ZNF75A, GFI1, ZNF281, ZNF496, ZNF2, ZNF513, ZNF148, KLF15, ZNF691, ZNF589, PRDM9, ZNF12, SP8, OSR2, ZNF367, ZNF22, GFI1B, ZNF219, SALL2, ZNF319, ZNF202, ZNF143, ZNF3, ZSCAN21, ZNF606, SP2, ZNF91, ZNF23, ZNF226, ZNF229, ZNF180, ZNF668, ZNF646, ZNF641, ZNF610, ZNF528, ZNF701, ZNF526, ZNF146, ZNF444, ZNF83, ZNF558, ZNF232, E4F1, ZNF597, INSM2, ZNF30, ZNF507, ZNF354A, ZEB2, ZNF32, KLF13, ZFPM2, ZNF764, ZNF768, ZNF35, ZNF778, ZNF212, ZNF282, PRDM10, SP7, SCRT1, ZNF16, ZNF296, ZNF160, ZNF415, ZNF672, ZNF692, ZNF439, ZNF440, ZNF581, ZNF524, ZNF562, ZNF561, ZNF584, ZNF274, ZIK1, ZNF540, ZNF570, KLF17, ZNF217, ZNF57, ZNF556, ZNF554, KLF11, HINFP, ZNF24, ZNF596, OVOL1, SP3, ZNF621, ZNF680, BNC2, ZNF483, ZNF449, INSM1, ZNF417, ZNF791, ZNF80, GLIS1, ZNF497, KLF14, ZNF266, ZIC4, ZNF408, ZNF519, ZNF25, ZNF77, ZNF169, ZNF613, ZNF683, ZNF135, ZSCAN2, ZNF575, ZNF491, ZNF620, ZNF619, ZNF354C, ZNF114, ZNF366, ZNF454, ZNF543, ZNF354B, ZNF223, ZNF713, ZNF852, ZNF552, ZFP42, ZNF664, EGR3, ZFPM1, ZNF784, ZNF648, FIZ1, ZNF771, TSHZ1, ZNF48, ZNF816, ZNF571, ZSCAN4, ZNF594, ZFP3, ZNF443, ZNF792, ZNF572, ZNF707, ZNF746, ZNF322A, ZNF467, ZNF678, ZFP41, HKR1, PLAG1, ZNF329, ZNF101, ZNF716, ZNF708, ZSCAN22, ZNF662, ZNF320, ZNF623, ZNF530, ZNF285, ZFP1, WT1, ZFP90, ZNF479, ZNF445, ZNF74, SP1, SNAI3, ZNF696, IKZF1, ZNF267, ZNF566, ZNF224, ZNF529, ZNF284, ZNF749, ZNF17, ZNF555, ZNF75D, ZNF501, ZNF197, ZNF396, ZFP91, ZNF732, ZNF397, ZSCAN30, ZNF546, ZNF286A, ZKSCAN4, ZNF70, ZNF643, ZNF642, ZSCAN23, ZNF490, ZNF626, ZNF793,

ZNF383, ZNF669, ZNF559, ZNF177, ZNF548, MTF1, ZNF322B, ZNF563, ZNF292, ZNF567, SP6, ZNF573, ZNF527, ZNF33A, ZNF600, ZKSCAN3, ZNF676, ZNF699, ZNF250, ZNF79, ZNF681, ZNF766, ZNF107, ZNF471, ZNF836, ZNF493, ZNF167, ZNF565, ZNF34, ZNF781, ZNF140, ZNF774, ZNF658, ZNF765, ZNF124, ZNF569, ZNF777, ZNF775, ZNF799, ZNF782, ZNF846, ZNF136, ZKSCAN5, ZNF502, ZFP62, ZNF33B, ZNF512B, ZNF431, ZNF418, ZNF700, ZNF239, ZSCAN16, ZFP28, ZNF705A, ZNF585A, ZNF138, ZNF429, ZNF470, ZNF100, ZNF398, ZNF498, ZNF441, ZNF420, ZNF763, ZNF679, ZNF682, ZNF772, ZNF257, ZNF785, ZSCAN5B, ZNF165, ZNF655, ZNF98, ZNF786, ZNF517, ZNF675, ZNF860, ZNF628, ZNF665, ZNF624, ZNF841, ZNF615, ZNF350, ZNF432, ZNF433, ZNF460, ZNF81, ZNF780A, ZNF461, ZNF181, LOC100287841, ZNF44, ZNF790, ZNF677, ZNF823, ZNF311, ZNF347, ZNF71, ZNF121, ZNF335, ZNF560, ZNF273, ZNF84, ZNF667, ZNF649, ZNF248, ZNF544, ZNF770, ZNF737, ZNF251, ZNF607, ZNF334, ZXDA, ZNF485, ZIM2, PEG3, ZNF192, ZNF442, ZNF813, ZNF26, ZNF69, ZNF583, ZNF568, ZXDB, ZNF480, ZNF587, ZNF808, ZNF43, ZNF28, ZNF627, ZNF789, ZNF536, ZNF534, ZNF652, ZNF521, ZNF358, ZFP2, SP5, ZNF814, ZNF551, ZNF805, ZSCAN5C, ZNF468, ZNF616, ZFP57, ZNF155, ZNF783, ZNF425, ZNF580, ZNF611, ZNF254, ZNF625, ZNF134, ZNF845, ZNF99, ZNF253, ZNF90, ZNF93, ZNF486, REPIN1, LOC100131539, ZNF705D, LOC100132396, ZNF705G, SCRT2, ZNF407, SP9, ZNF579, ZNF880, ZNF630, ZNF844, ZNF469, ZNF717, ZNF865, ZNF492, ZNF688, YY2, ZNF878, ZNF879, ZNF736, ZNF323, ZNF709, ZNF512, ZNF585B, ZNF154, ZNF324B, ZNF564, ZFP82, GLI4, ZNF674, ZNF345, ZNF550, KLF1, YY1, MYST2, ST18, L3MBTL4, MYT1L, MYT1, L3MBTL1, MTA3, GATA1, TRPS1, GATA3, GATA5, GATA4, GATA6, GATAD2B, GATAD1, GATA2, MTA1, ZGLP1, MTA2, RERE, C16orf5, LITAF, PIAS1, PIAS2, PIAS4, ZMIZ1, ZMIZ2, PIAS3, RNF138, NFX1, NFXL1 или их любые комбинации.

[00380] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляции (например, превращению или дифференцировке) из одного типа клетки в другой. В некоторых вариантах осуществления клетку поджелудочной железы подвергают превращению в островковую бета-клетку. В некоторых вариантах осуществления фибробласт подвергают превращению в иПС клетку. В некоторых вариантах осуществления преадипоцит подвергают превращению в бурый адипоцит. Другие примеры клеток включают, например, мышечные клетки, нервные клетки, лейкоциты и лимфоциты.

[00381] В некоторых вариантах осуществления клетка является больной или несущей мутацию клеткой. Такие клетки могут подвергать манипуляции с целью лечения заболевания, например, коррекции мутации или изменения фенотипа клетки, например, для ингибирования роста раковой клетки. Например, клетка ассоциирована с одним или более заболеваниями или состояниями, описанными в настоящем документе.

[00382] В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергаемая манипуляции, является нормальной клеткой.

[00383] В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергаемая манипуляции,

является стволовой клеткой или клеткой-предшественником (например, иПС, эмбриональной, гемопоэтический, жировой, зародышевой, легочными или нейральными стволовыми клетками или клетками-предшественниками). В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергаемая манипуляции, может быть клеткой из любого из трех зародышевых слоев (т.е. мезодермального, эндодермального или эктодермального). В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергаемая манипуляции, может происходить из внезародышевой ткани, например, из плаценты.

[00384] В некоторых вариантах осуществления подвергаемая манипуляции клетка выбрана из фибробластов, моноцитарных клеток-предшественников, В-клеток, экзокринных клеток, панкреатических клеток-предшественников, эндокринных клеток-предшественников, гепатобластов, миобластов или преадипоцитов. В некоторых вариантах осуществления клетку подвергают манипуляции (например, превращению или дифференцировке) в мышечные клетки, эритроидно-мегакариоцитарные клетки, эозинофилы, иПС клетки, макрофаги, Т-клетки, островковые бета-клетки, нейроны, кардиомиоциты, клетки крови, эндокринные клетки-предшественники, экзокринные клетки-предшественники, протоковые клетки, ацинарные клетки, альфа-клетки, бета-клетки, дельта-клетки, ПП клетки, гепатоциты, холангиоциты, ангиобласты, мезоангиобласты или бурые адипоциты.

[00385] В некоторых вариантах осуществления клетка является мышечной клеткой, эритроидно-мегакариоцитарной клеткой,

[00386] эозинофилом, иПС клеткой, макрофагом, Т-клеткой, островковой бета-клеткой, нейрональной, кардиомиоцитом, клеткой крови, эндокринной клеткой-предшественником, экзокринной клеткой-предшественником, протоковой клеткой, ацинарной клеткой, альфа-клеткой, бета-клеткой, дельта-клеткой, ПП клеткой, гепатоцитом, холангиоцитом или белым или бурым адипоцитом.

[00387] В некоторых вариантах осуществления клетка является клеткой-предшественником, плюрипотентной клеткой, тотипотентной клеткой, взрослой стволовой клеткой, клеткой внутренней клеточной массы, эмбриональной стволовой клеткой или иПС клеткой.

[00388] В некоторых вариантах осуществления клетка, подвергаемая манипуляции, является раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может быть клеткой рака легкого, клеткой рака молочной железы, клеткой рака кожи, клеткой рака головного мозга, клеткой рака поджелудочной железы, гемопоэтической раковой клеткой, клеткой рака печени, клеткой рака почки, клеткой рака яичника, клеткой рака предстательной железы, клеткой рака кожи.

[00389] В некоторых вариантах осуществления клетка является мышечной клеткой, эритроидно-мегакариоцитарной клеткой, эозинофилом, иПС клеткой, макрофагом, Т-клеткой, островковой бета-клеткой, нейрональной, кардиомиоцитом, клеткой крови, эндокринной клеткой-предшественником, экзокринной клеткой-предшественником, протоковой клеткой, ацинарной клеткой, альфа-клеткой, бета-клеткой, дельта-клеткой,

ПП клеткой, гепатоцитом, холангиоцитом или белым или бурым адипоцитом.

[00390] Введение ингибиторов ДНК-ПК и системы редактирования гена в клетку(и)

[00391] Введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК может быть выполнено любым способом, известным в уровне техники. Введение может проходить *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК может происходить одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к проникновению ингибитора ДНК-ПК и компонентов системы редактирования генома через клеточную мембрану. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к проникновению ингибитора ДНК-ПК и компонентов системы редактирования генома в ядро клетки. В некоторых вариантах осуществления введение включает инкубирование клетки в присутствии ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома.

[00392] Систему редактирования гена могут вводить в клетку(и) любым способом, известным в уровне техники. Например, могут использоваться любые способы доставки нуклеиновых кислот или белков, известные в уровне техники. Систему редактирования гена вводят (например, доставляют) в клетку посредством нуклеиновой кислоты, кодирующей компоненты системы редактирования гена. Систему редактирования гена могут вводить в клетку с помощью вирусных или невирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления используют вирусные векторы. Вирусные векторы могут быть ретровирусными (например, на основе вируса лейкоза мышей, ВИЧ или лентивирусными) или ДНК-вирусными (например, на основе аденовируса, вируса простого герпеса и аденоассоциированного вируса). В некоторых вариантах осуществления способы трансфекции (например, способы невирусной доставки) используют для введения системы редактирования генома в клетку. Способы трансфекции включают контакт клетки с DEAE-декстраном, фосфатом кальция, липосомами или электропорацию плазмиды в клетку. Дополнительные способы невирусной доставки включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или липид: нуклеиновая кислота конъюгаты, голую ДНК, голую РНК, искусственные вирионы и улучшенный средствами захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может использоваться для доставки нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления одну или более нуклеиновых кислот доставляют в виде мРНК. В некоторых вариантах осуществления для повышения эффективности трансляции и/или стабильности мРНК используются кэпированные мРНК. В некоторых вариантах осуществления используются кэпы ARCA (антиреверсный аналог кэпа) или их варианты. См. патенты США US7074596 и US8153773.

[00393] В вариантах осуществления, эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) и гРНК транскрибируются с ДНК.

[00394] В вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.)

транскрибируется с ДНК, а гРНК представлена в виде РНК.

[00395] В вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) и гРНК представлены в виде РНК.

[00396] В вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) представлена в виде белка, а гРНК представлена в виде ДНК.

[00397] В вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) представлена в виде белка, а гРНК представлена в виде РНК.

[00398] Дополнительные системы доставки нуклеиновых кислот включают системы, предложенные компаниями Amaxa Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) и Copernicus Therapeutics Inc. (см., например, US6008336). Липофекция описана, например, в патентах США 5,049,386; 4,946,787; и 4,897,355), реактивы для липофекции доступны в продаже (например, TransfectamTM, LipofectinTM и LipofectamineTM RNAiMAX). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной, опосредованной распознаванием рецептора липофекции полинуклеотидов, включают описанные в Feigner, WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (введение *ex vivo*) или ткани-мишени (введение *in vivo*).

[00399] Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, в том числе направленных липосом, таких как иммунолипидные комплексы, известно специалисту в данной области (см., например, Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995));

[00400] Дополнительные методы доставки включают использование упаковки подлежащих доставке нуклеиновых кислот в носители для доставки EnGeneIC (EDV). Такие EDV специфично доставляют в ткани-мишени при использовании биспецифических антител, где одно плечо антитела обладает специфичностью к ткани-мишени, а другое обладает специфичностью к EDV. Антитело переносит EDV к поверхности клетки-мишени, после чего EDV переносится в клетку посредством эндоцитоза. После проникновения в клетку содержимое высвобождается (см. MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology 27(7):643) Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); патенты США 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 и 4,946,787).

[00401] В некоторых вариантах осуществления трансфекция может быть транзientной, при этом трансфицированная плазмида, содержащая систему редактирования генома, проникает в ядро, но не интегрируется в геном клетки во время репликации. Трансфекция может быть стабильной, при этом трансфицированная плазмида интегрируется в геномную область клетки.

[00402] В некоторых вариантах осуществления, в которых используется транзientная экспрессия, могут использоваться системы на основе аденовирусов. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов могут обеспечивать очень высокую

эффективность трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С такими векторами получены высокие титры и высокие уровни экспрессии. Этот вектор можно получать в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов ("AAV") также используют для трансдукции клеток нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, для получения *in vitro* нуклеиновых кислот и пептидов, и для способов генотерапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West et al., *Virology* 160:38-47 (1987); патент США 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. *Clin. Invest.* 94:1351 (1994)). Конструирование рекомбинантных векторов AAV описаны в ряде публикаций, включая патент США 5,173,414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); и Samulski et al., *J. Virol* 63:03822-3828 (1989).

[00403] В некоторых вариантах осуществления введение в клетку(и) ингибитора ДНК-ПК осуществляют путем культивирования выделенной клетки(ок) в присутствии ингибитора ДНК-ПК и любой подходящей среды, которая позволяет проникать ингибитору ДНК-ПК в клеточную мембрану и/или ядро клетки.

[00404] В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК вводят в клетку(и) *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некотором варианте осуществления ингибитор ДНК-ПК подвергают контакту с клеткой(ами) в течение приблизительно 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 21 часа, 22 часов, 23 часов, 24 часов, 25 часов, 30 часов, 35 часов, 40 часов, 45 часов, 50 часов, 55 часов, 60 часов, 65 часов, 70 часов, 85 часов, 90 часов, 100 часов, 125 часов, 150 часов, 200 часов или в течение любого промежуточного периода времени. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК подвергают контакту с клеткой(ами) в течение приблизительно 1,5 недель, 2,0 недель, 2,5 недель, 3,0 недель, 3,5 недель, 4 недель или любого промежуточного периода времени. Ингибитор ДНК-ПК могут вводить повторно при замене среды культивирования клеток. Ингибитор ДНК-ПК можно подвергать контакту с клеткой до, во время или после введения компонентов системы редактирования генома.

[00405] В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК вводят в клетку(и) в концентрации приблизительно 0,1 мкМ, 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 0,75 мкМ, 1,0 мкМ, 1,25 мкМ, 1,50 мкМ, 1,75 мкМ, 2,0 мкМ, 2,5 мкМ, 3,0 мкМ, 3,5 мкМ, 4,0 мкМ, 4,5 мкМ, 5,0 мкМ, 5,5 мкМ, 6,0 мкМ, 6,5 мкМ, 7,0 мкМ, 7,5 мкМ, 8,0 мкМ, 8,5 мкМ, 9,0 мкМ, 9,5 мкМ, 10 мкМ, 10,5 мкМ, 11,0 мкМ, 11,5 мкМ, 12 мкМ или любых промежуточных концентрациях. Концентрация ингибитора ДНК-ПК может быть изменена в течение введения.

[00406] В некоторых вариантах осуществления редактирующие ген компоненты доставляют в клетку(и) с помощью одного или более векторов или в форме РНК, мРНК или, в случае компонента эндонуклеазы, в виде очищенного белка или мРНК (например, белка Cas9). Один или более векторов могут включать вирусные векторы, плазмиды или оцДНК. Вирусные векторы могут включать ретровирусные, лентивирусные,

аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса или их любые комбинации. В некоторых вариантах осуществления редактирующие ген компоненты доставляют посредством РНК или синтетической РНК.

[00407] В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку вместе с системой редактирования гена приводит к повышению уровня эффективного редактирования гена путем направленной гомологией репарации по сравнению с исходным состоянием, в котором в клетку не вводят ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к супрессии инделов (после NHEJ) в мишени или вне мишени. В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к повышению или снижению экспрессии гена, представляющего интерес. Введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена может привести к экспрессии гена, не эндогенного для клетки. В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификации гена из клетки(ок). В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификации интрона и/или экзона в клетке(ах). В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификации некодирующей области в клетке(ах). В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к одновременному или последовательному, полному или частичному удалению или модификации кодирующей и/или некодирующей генетической области в клетке(ах). В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку(и) вместе с системой редактирования гена приводит к одновременному или последовательному, полному или частичному удалению или модификации кодирующей и/или некодирующей генетической области в клетке(ах), включая внехромосомную ДНК или РНК. Внехромосомная ДНК может быть митохондриальной ДНК, хлоропластной ДНК, внехромосомной кольцевой ДНК или вирусной внехромосомной ДНК.

[00408] В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку вместе с системой редактирования генома приводит к повышению экспрессии или снижению экспрессии представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления повышение или снижение экспрессии представляющего интерес гена может составлять приблизительно или в пределах 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% по сравнению с исходным состоянием, в котором в клетку не вводят ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления повышение или снижение представляющего интерес гена может составлять приблизительно или в пределах 0,5 раза, 1,0 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4 раз, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии, при котором в клетку не вводят ингибитор

ДНК-ПК.

[00409] В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку вместе с системой редактирования генома приводит к увеличению редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления увеличение редактирования генома может составлять приблизительно или в пределах 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% по сравнению с исходным состоянием, в котором в клетку не вводят ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления увеличение редактирования генома может составлять приблизительно или в пределах 0,5 раза, 1,0 раза, 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4 раз, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии, при котором в клетку не вводят ингибитор ДНК-ПК.

[00410] В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования гена в популяцию клеток приводит к большему выживанию клетки по сравнению с исходным состоянием, в котором в популяцию клеток вводят только систему редактирования гена, но не вводят ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК, приводящий к большему выживанию клеток, представляет собой соединение Формулы (I), (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) и (V-B).

[00411] В некоторых вариантах осуществления клетку синхронизируют в S или G2 фазе клеточного цикла до, после или во время введения ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления клетку синхронизируют в S или G2 фазе клеточного цикла до, после или во время введения редактирующих ген компонентов. Синхронизация клетки в S или G2 фазе клеточного цикла может быть выполнена любым способом, известным в уровне техники. В качестве неограничивающего примера средства, которые могут использоваться для синхронизации клетки в S или G2 фазе клеточного цикла, включают афидиколин, гидроксикарбамид, ловастатин, мимозин, нокодазол, тимидин или их любые комбинации (см., Lin et al. Elife. 2014 Dec 15; 3:2014). В некоторых вариантах осуществления средства для синхронизации клеток могут вводить в любое время во время процесса редактирования гена.

[00412] В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК и/или система редактирования генома могут быть включены в контейнер, пакет или дозатор вместе с инструкциями по применению. В некоторых вариантах осуществления средство-ингибитор ДНК-ПК и/или система редактирования генома, включенные в контейнер, пакет или дозатор вместе с инструкциями по применению, представляют собой набор.

[00413] В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК и/или система редактирования генома включены в набор с инструкциями по применению. Набор может содержать любую систему редактирования генома и/или ингибитор ДНК-ПК и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК является любым из соединений, представленных Структурной Формулой (I). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системы на основе

подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo. Система редактирования генома может быть предоставлена в наборе в любой форме, например в виде плазмиды, вектора, ДНК или РНК конструкции.

[00414] В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК и/или систему редактирования генома вводят *in vivo*. Ингибитор ДНК-ПК и система редактирования гена включают в состав, совместимый с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения описаны выше.

[00415] В некоторых вариантах осуществления состав также может содержать больше одного действующего соединения, при необходимости, для лечения конкретного показания, например, соединений с дополнительными активностями, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. В альтернативе или дополнительно композиция может содержать средство, улучшающее ее функцию, такое как, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или средство, подавляющее рост. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

[00416] В некоторых вариантах осуществления средство-ингибитор ДНК-ПК и/или систему редактирования генома вводят в комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими средствами, например терапевтическими средствами, которые могут применяться для лечения патологических состояний или нарушений, таких как различные формы рака и воспалительных заболеваний. Термин "в комбинации" в данном контексте означает, что средства вводят по существу в одно время, одновременно или последовательно. В случае последовательного введения, в начале назначения второго соединения, первое из двух соединений предпочтительно все еще поддается обнаружению в эффективных концентрациях в участке лечения.

Способы скрининга редактирования генома

[00417] Любой способ, известный в уровне техники, может применяться для скрининга клеток на эффективность редактирования генома, включая эффективность NHEJ и/или HDR. Например, способы скрининга могут включать амплификацию областей-мишеней на основе ПЦР с последующим секвенированием или глубоким секвенированием амплифицированных областей для подтверждения редактирования генома. ПЦР-генотипирование позволяет количественно определять и ранжировать соединения по стимуляции HDR. Другие способы скрининга могут включать секвенирование следующего поколения. См., Например, Bell et al., "A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing", *BMC Genomics*, 15:1002 (2014).

[00418] ПЦР-праймеры могут быть сконструированы для селективной амплификации немодифицированных и модифицированных генетических областей, с получением ампликонов разной длины в зависимости от статуса генетической модификации. Затем ампликоны могут быть разделены в геле, и эффективность HDR

оценена с помощью денситометрии при использовании Bio-Imager. В альтернативе, новая ПЦР-технология, быстрая цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), может использоваться для одновременного измерения событий HDR и NHEJ в образцах после редактирования генома. См., например, Miyaoka et al., "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing", *Scientific Reports*, 6, 2016. Другие способы, которые могут использоваться для скрининга клеток на геномные модификации, включают секвенирование по Сангеру, глубокое секвенирование и ОТ-ПЦР.

[00419] В некоторых вариантах осуществления конструкция со световым репортером (TLR) используется для скрининга клеток. TLR скрининг включает репортерную-клетку, которая модифицирована для экспрессии флуоресцентного маркера после направленного редактирования генома. После соответствующего направленного воздействия флуоресцентный маркер экспрессируется клеткой. Количественное определение клеток, успешно подвергнутых направленному воздействию, может быть выполнено с помощью любого метода, известного в уровне техники, например, с помощью проточного цитометрического анализа. См., например, Certo et al. 2011, "Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints", *Nature Methods*, 8, стр. 671-676 (2011).

Получение соединений согласно изобретению

[00420] При использовании в настоящем документе все сокращения, символы и соглашения соответствуют используемым в современной научной литературе. См., например, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997. Следующие определения описывают термины и сокращения, используемые в настоящем документе:

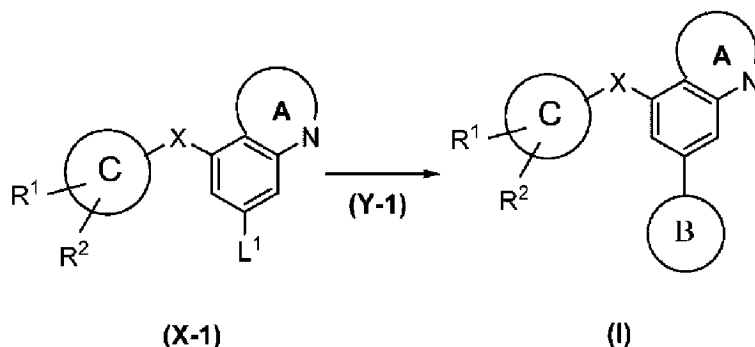
BPin	пинаколборонат
Солевой раствор	насыщенный раствор NaCl в воде
ДХМ	Дихлорметан
DIAD	диизопропилазодикарбоксилат
DIEA	диизопропилэтиламин
DMA	диметилацетамид
ДМФА	диметилформамид
ДМСО	диметилсульфоксид
DTT	дитиотреитол
ЭРИ-МС	Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией
Et ₂ O	этиловый эфир
EtOAc	этилацетат
EtOH	этиловый спирт
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	Изопропанол
ЛАН	алюмогидрид лития
ЖХ-МС	жидкостной хроматография/масс-спектрометрия

LDA	диизопропилэтиламин лития
Me	метил
MeOH	метанол
MsCl	метансульфонилхлорид
MTБЭ	метил-трет-бутиловый эфир
NMP	N-метилпирролидин
Pd ₂ (dba) ₃	трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0)
Pd(dppf)Cl ₂	1,1'-бис(дифенилфосфино)-ферроцен-дихлорпалладий
PG	защитная группа
Ph	фенил
(рац)-BINAP	рацемический 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил
RockPhos	ди-трет-бутил(2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-[1,1'-бифенил]-2-ил)фосфин
КТ или кт	комнатная температура
СФХ	сверхкритическая флюидная хроматография
SPhos	2-дициклогексилфосфино-2',6'-диметоксибифенил
TBAI	иодид тетрабутиламмония
tBu	трет-бутил
ТГФ	тетрагидрофуран
ТЭА	триэтиламин
TMEDA	тетраметилэтилендиамин
VPhos	[3-(2-дициклогексилфосфанилфенил)-2,4-диметокси-фенил]сульфиноксинатрий

Общие методики синтеза

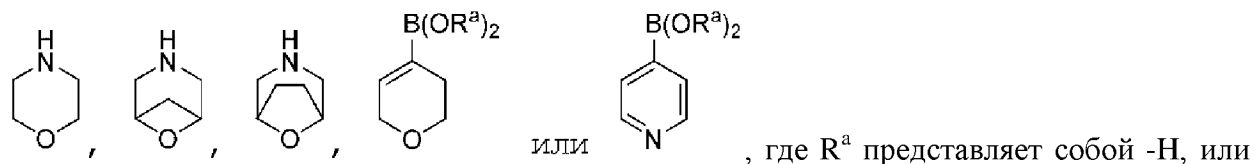
[00421] В большинстве случаев соединения согласно изобретению могут быть получены способами, описанными в настоящем документе, или другими способами, известными специалистам в данной области, например, US2013/0281431 и РСТ/US2014/024767, поданные 12 марта 2014 года. Конкретные примеры получения соединений согласно изобретению описаны ниже в разделе Примеры.

[00422] В одном варианте осуществления в способах получения соединений, представленных Формулой (I), или их фармацевтически приемлемых солей используют стадию реакции Соединения (X-1) с Соединением (Y-1) при подходящих условиях, с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



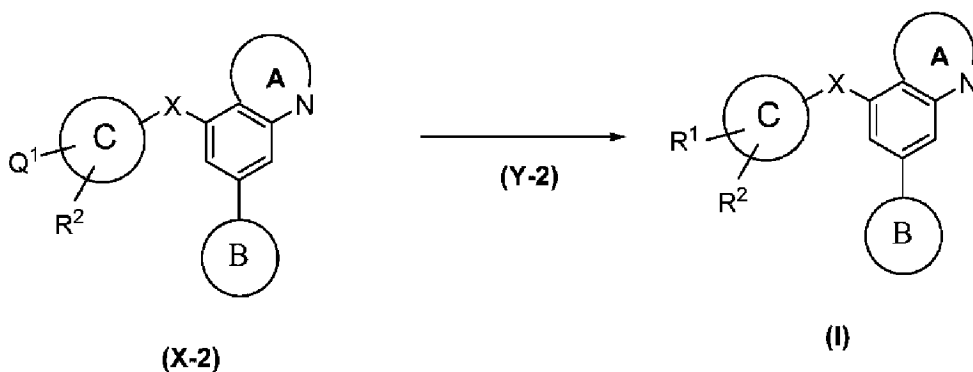
Переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано

выше для Соединений изобретения. В Соединении (X-1) L^1 является уходящей группой, такой как галоген (например, -F, -Cl, -Br или -I), толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат, а другие переменные Соединения (X-1) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I). В определенном варианте осуществления L^1 представляет собой -Br, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат. Соединение (Y-1) представляет собой



где R^a представляет собой -H, или два R^a вместе с атомом кислорода, к которому они присоединены, образуют диоксолановое кольцо, необязательно замещенное одним или более C_{1-2} алкилами. В определенном варианте осуществления два R^a вместе с атомом кислорода, к которому они присоединены, и с атомом бора образуют 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан. Могут использоваться любые подходящие условия для проведения реакций кросс-сочетания, таких как Csp^2-Csp^2 сочетания, известные в уровне техники. Конкретные примерные условия описаны ниже в Примерах.

[00423] В другом варианте осуществления соединения Формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, в которых R^1 представляет собой $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-NHR^4$ или $-OR^4$, а другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано выше, получают путем применения стадии реакции Соединения (X-2) с Соединением (Y-2) при подходящих условиях:

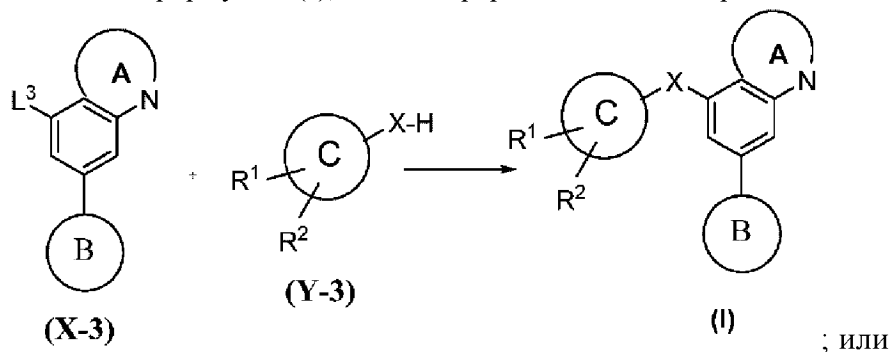


В Соединении (X-2) Q^1 представляет собой $-NH_2$ или $-OH$, а другие переменные Соединения (X-2) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I). Соединение (Y-2) представляет собой $R^4-C(O)-L^2$, $R^4-O-C(O)-L^2$, $NHR^4-C(O)-L^2$, $R^4S(O)_2-L^2$, R^4-L^2 , $R^{4c}(O)OR^b$ или $R^4-N=C=O$, где каждый R^4 независимо является таким, как описано для Формулы (I); L^2 представляет собой галоген (например, -F, -Cl, -Br или -I), толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат; и R^b представляет собой C_{1-4} алкил, такой как метил или этил. В определенном варианте осуществления L^2

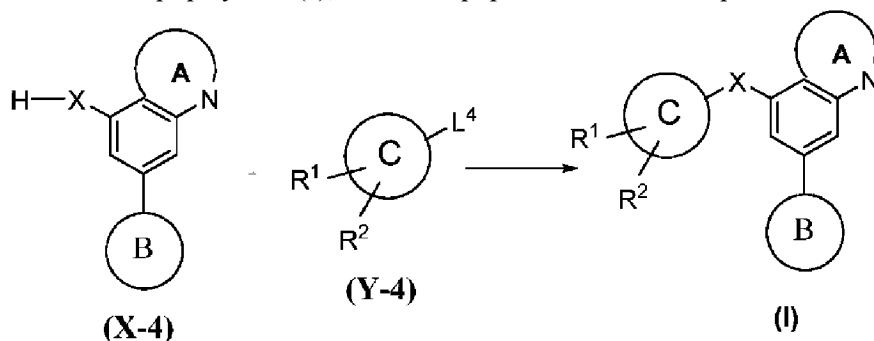
представляет собой -Br, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат. Могут использоваться любые подходящие условия проведения реакции, известные в уровне техники. Конкретные примерные условия описаны ниже в Примерах.

[00424] В другом варианте осуществления соединения Формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, в которых X представляет собой -NH- или -O-, а другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано выше, получают способами, в которых используют следующее:

(i) реакция Соединения (X-3) с Соединением (Y-3), с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



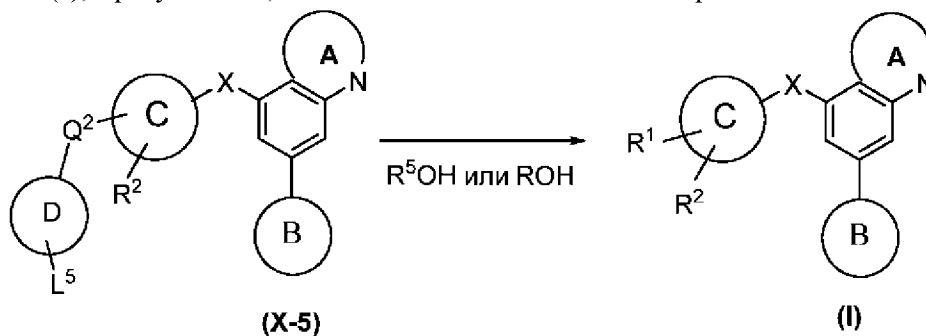
(ii) реакция Соединения (X-4) с Соединением (Y-4), с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



В Соединении (X-3) L^3 представляет собой галоген (например, -Br, -Cl или -I). В Соединении (Y-4) L^4 представляет собой галоген (например, -Br, -Cl или -I), толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат. Каждый X для Соединений (Y-3) и (X-4) независимо представляет собой -NH- или -O-. Остальные переменные каждого из Соединений (X-3), (X-4), (Y-3) и (Y-4) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I). В определенном варианте осуществления L^3 в Соединении (X-3) представляет собой -Br. В другом определенном варианте осуществления L^4 в Соединении (Y-4) представляет собой -Br, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат. Могут использоваться любые подходящие условия для нуклеофильного замещения, известные в уровне техники. Конкретные примерные условия описаны ниже в Примерах.

[00425] В другом варианте осуществления в способах изобретения используют стадию реакции Соединения (X-5) с R^5OH или ROH , с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли, где R^1

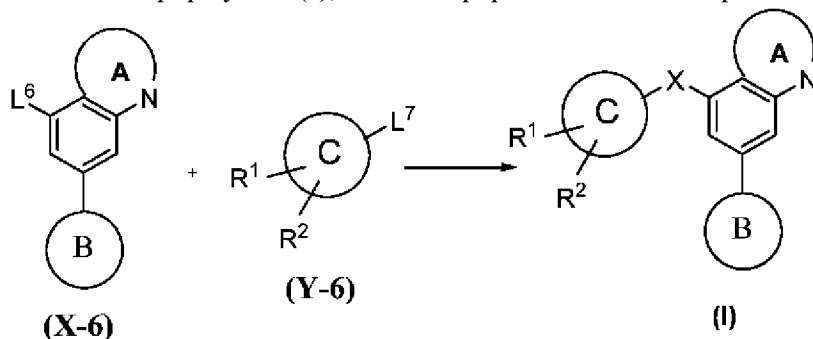
представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, NHR^4 , $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 или $-OR^4$ или R^7 ; R^4 представляет собой 5-10-членный гетероарил, замещенный по меньшей мере одним OR^5 ; R^7 представляет собой 5-10-членный гетероарил, замещенный по меньшей мере одним $-OR$; а R , R^5 и другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I), при условии, что и R и R^5 не являются водородом:



В Соединении (A-5) Q^2 представляет собой связь, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-NHC(O)-$, $-NHC(O)O-$, $-NHC(O)NH-$, $-NHS(O)_2-$, $-NH-$, $-C_{1-4}$ алкил- $NH-$ или $-O-$. Кольцо D в Соединении (A-5) представляет собой 5-10-членный гетероарил. L^5 представляет собой галоген (например, $-Br$, $-Cl$, $-F$ или $-I$). R в ROH, R^5 в R^5OH и остальные переменные в Соединении (X-5) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I). В определенном варианте осуществления L^5 представляет собой $-Br$. Могут использоваться любые подходящие условия для нуклеофильных ароматических замещений, известные в уровне техники. Конкретные примерные условия описаны ниже в Примерах.

[00426] В другом варианте осуществления соединения Формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, в которых X представляет собой $-O-$, а другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано выше, получают способами, в которых используют:

реакцию Соединения (X-6) с Соединением (Y-6), с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



[00427] В Соединении (X-6) L^6 представляет собой $-OH$. В L^7 Соединения (Y-6) L^7 представляет собой $-OH$. Остальные переменные в каждом из Соединений (X-6) и (Y-6) отдельно и независимо являются такими, как описано выше для Формулы (I). Могут использоваться любые подходящие условия для нуклеофильного замещения, такие как

реакции Мицунобу, известные в уровне техники. Конкретные примерные условия описаны ниже в Примерах.

[00428] В одном конкретном примере Соединения Формулы (I), в которых X представляет собой -NH-, могут быть получены, как показано в общем виде на Схеме 1 ниже. Таким образом, как показано в стадии 1-i Схемы 1, гетероарильные соединения Формулы A могут реагировать с морфолином или аналогом морфолина при нагревании смеси в полярном апротонном растворителе с получением соединения Формулы B. При использовании катализируемого палладием (например, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) сочетания типа Бухвальда-Хартвига с фосфиновым лигандом, как показано в стадии 1-ii Схемы 1, соединение Формулы B может реагировать с аминциклогексанами формулы C с получением соединения Формулы D, где R^1 и R^2 имеют значение, описанное в другой части настоящего документа. В одном примере, при получении монозащищенных мезо-циклогексан-1,4-диаминов формулы E, удаление защитной группы приводит к соединениям формулы F, как показано в стадии 1-iii Схемы 1. Полученный свободный амин может затем реагировать с различными соединениями, имеющими группы, способные реагировать с аминами (например, $\text{R}^{1a}\text{-L}$, где L является уходящей группой, такой как хлор, бром, иод, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат; или где L является реакционноспособной карбонилсодержащей группой, такой как активная сложноэфирная или изоцианатная группа), с получением соединения формулы G, как показано в стадии 1-iv Схемы 1. Соединения Формулы (I), где X представляет собой -S-, могут быть получены аналогичным образом, как показано в общем виде на Схеме 1, с использованием тиольного аналога Соединения (C), в подходящих условиях.

Пример 1. Общее получение соединений формулы G

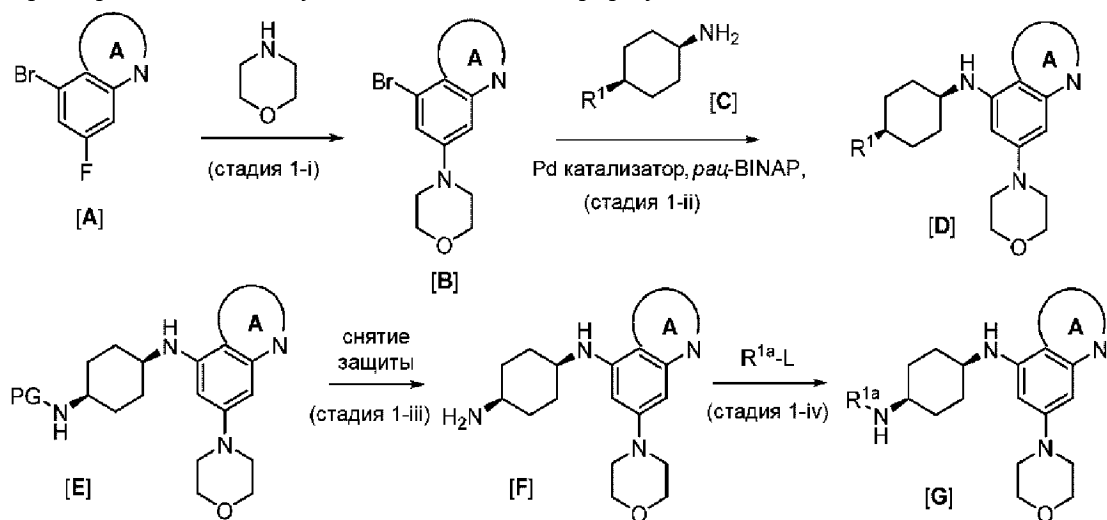


Схема 1

В другом примере Соединения Формулы (I), в которых X представляет собой -O-, могут быть получены, как показано в общем виде на Схемах 2a и 2b ниже. Таким образом, как показано в стадии 2-i Схемы 2a, гидроксильная группа гетероарильных соединений

Формулы **H** может быть защищена с получением соединения Формулы **J**, которое может затем реагировать с морфолином или аналогом морфолина при нагревании смеси в полярном апротонном растворителе, с получением соединения Формулы **K** после удаления защитной группы, как показано в стадиях 2-ii и 2-iii Схемы 2а. Затем, как показано в стадии 2-iv Схемы 2а, соединение Формулы **K** может реагировать с соединением Формулы **L** при условиях, достаточных, чтобы вызвать SN2 вытеснение его уходящей группы (например, где L является уходящей группой, такой как хлор, бром, иод, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат), с получением соединения Формулы **M** или Формулы **N**, в зависимости от того, является ли водородом R¹ или R². В тех случаях, когда R¹ или R² являются защищенными атомами азота или кислорода, соединения согласно изобретению могут быть получены при удалении защитной группы и последующей синтетической манипуляции с образовавшимся свободным амином/спиртом.

Пример 2. Общее получение соединений формулы M, N, R и S

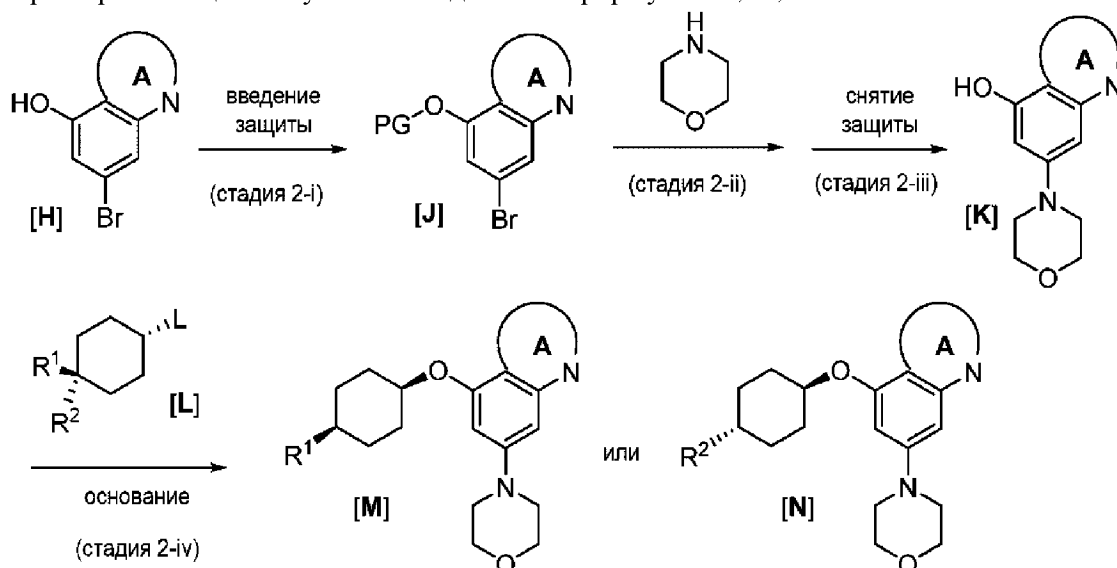


Схема 2а

[00429] В альтернативе, как показано на Схеме 2b, гидроксильная группа соединения Формулы **O** может реагировать с соединением Формулы **L**, с получением конденсированного бициклогетероарилбромида Формулы **P**, который может затем реагировать с морфолином или аналогом морфолина с получением соединения Формулы **M** или Формулы **N**.

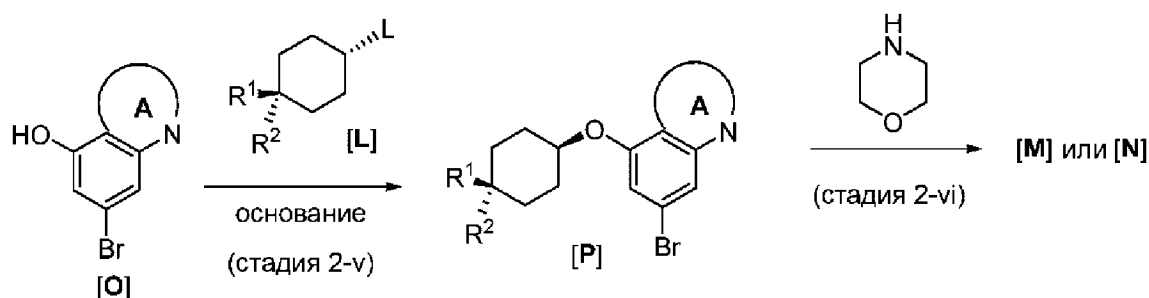


Схема 2b

[00430] В альтернативе, как показано на Схеме 2с, соединения согласно изобретению, в которых Кольцо **B** является дигидропирановым кольцом, могут быть получены в реакции соединений Формулы **Q** с диалкил-(3,6-дигидро-2H-пиран-4-ил)боронатами, с получением соединений Формулы **R**. Реакция может быть проведена в присутствии Pd катализатора, такого как Pd(dppf), в основных условиях (например, в присутствии карбонат металла, такого как Na₂CO₃). На Схеме 2с R^a представляет собой -H, или два R^a вместе с атомом кислорода, к которому они присоединены, образуют диоксолановое кольцо, необязательно замещенное одним или более C₁₋₂ алкилами. В конкретном варианте осуществления два R^a вместе с атомом кислорода, к которому они присоединены и с атомом бора, образуют 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан.

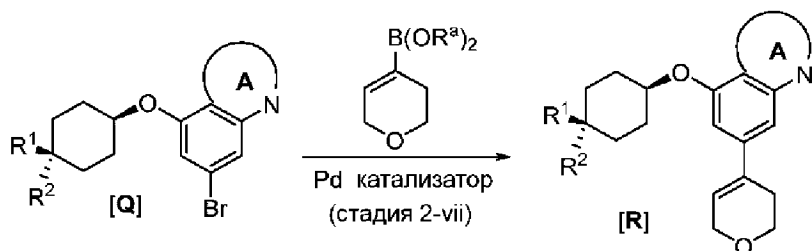


Схема 2с

[00431] В другом примере, Соединения Формулы (I), в которых X представляет собой -CH₂-, могут быть получены, как показано в общем виде на Схемах 3А и 3В ниже. Например, Соединение (3А-10), в котором Кольцо С представляет собой C₄₋₆ циклоалкил, а X представляет собой -CH₂-, может быть получено, как показано на Схеме 3А. В стадии (i) нуклеофильное ароматическое замещение группы F Соединения (3А-1) цианидной группой Соединения (3А-2) дает Соединение (3А-2). Обработка Соединения (3А-2) метанольной HCl приводит к образованию сложноэфирного Соединения (3А-3), которое реагирует в Стадии (iii) с морфолином в условиях сочетания Бухвальда с образованием Соединения (3А-4). Восстановление сложноэфирного Соединения (3А-4) подходящим восстановителем, таким как алюмогидрид лития, дает первичный спирт Соединение (3А-5). Хлорирование спиртового Соединения (3А-5) подходящим хлорирующим агентом, таким как POCl₃, с последующим взаимодействием с трифенилфосфином, дает соль Виттига, Соединение (3А-7). Депротонирование Соединения (3А-7) основанием, таким как KO^tBu, дает Соединение (3А-8). Реакция Соединения (3А-8) с подходящим замещенным циклогексанолом, дает алкеновое Соединение (3А-9). Затем алкеновое Соединение (3А-9) восстанавливается в подходящих условиях гидрирования, например, Pd/C с газообразным H₂.

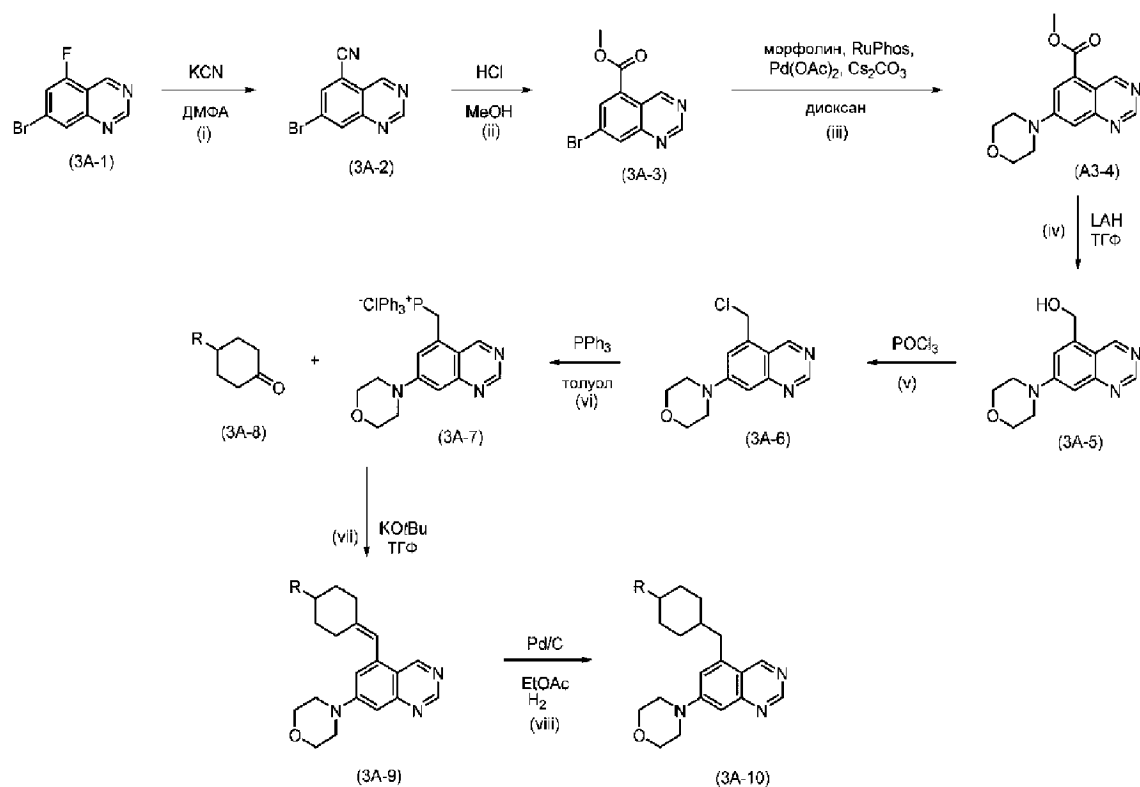


Схема 3А

[00432] В другом примере Соединение (**3В-4**), в котором Кольцо С является ароматической кольцевой системой (фенильной или гетероарильной), и Х представляет собой $-\text{CH}_2-$, может быть получено, как показано на Схеме 3В. Конкретные условия для Схемы 3В можно найти в предшествующем уровне техники, например, в J. Org. Chem. 2014, 79, 4285-4292.

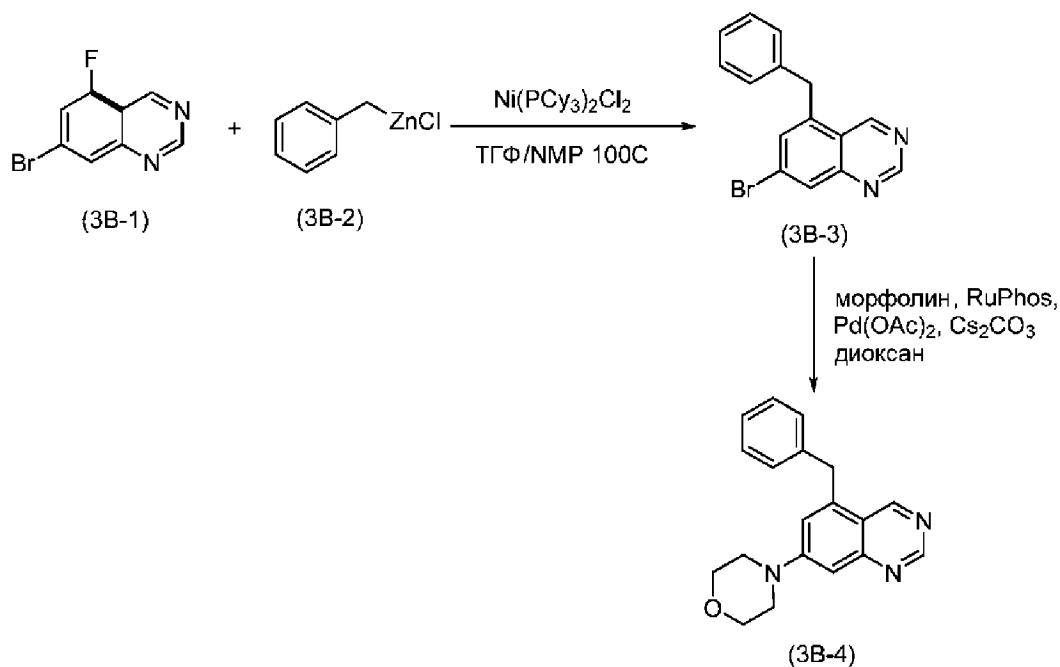


Схема 3В

[00433] В альтернативе соединения Таблицы 2 могут также использоваться для получения других соединений Формулы (I), как показано ниже в Примерах.

ПРИМЕРЫ

Аналитические исследования

[00434] При использовании в настоящем документе термин "Rt(мин)" относится к времени удерживания соединения при ВЭЖХ, в минутах. Если не указано иное, методы ВЭЖХ, используемые для получения приведенных значений времени удерживания, являются такими, как описано ниже:

Метод ВЭЖХ А

Прибор: Waters Acquity СВЭЖХ, Waters 3100 масс-спек

Колонка: Waters CSH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм

Темп.: 25°C

Растворитель А: вода+0,1% ТФУ

Растворитель В: ацетонитрил+0,1% ТФУ

Детектирование: DAD 220-400 нм

Градиент:

0 мин 95% А, 5% В

0,6 мин 5% А, 95% В

0,7 мин 5% А, 95% В

1,4 мин 95% А, 5% В

Скорость потока: 0,600 мл/мин

Метод ВЭЖХ В

Прибор: Waters Autopure

Колонка: Waters Sunfire C18 5 мкм, 4.6×100 мм

Темп.: Температура окружающей среды

Растворитель А: вода+0,1% ТФУ

Растворитель В: ацетонитрил+0,1% ТФУ

Детектирование: масс-спек - Waters 3100, DAD (220-400 нм)

Градиент:

0 мин - 98% А, 2% В

3,8 мин - 2% А, 98% В

4,9 мин - 2% А, 98% В

5,0 мин - 98% А, 2% В

Скорость потока: 1,50 мл/мин

Метод ВЭЖХ С

Прибор: Waters Acquity СВЭЖХ, Waters 3100 масс-спек

Колонка: Waters CSH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм

Темп.: 25°C

Растворитель А: вода+0,1% ТФУ

Растворитель В: ацетонитрил+0,1% ТФУ

Детектирование: DAD 220-400 нм

Градиент:

0 мин 90% А, 10% В

0,6 мин 40% А, 60% В

0,7 мин 90% А, 10% В

1,4 мин 90% А, 10% В

Скорость потока: 0,600 мл/мин

Метод ВЭЖХ D

Прибор: Waters Acquity СВЭЖХ, Waters 3100 масс-спек

Колонка: Waters СВЭЖХ ВЕН C8 1,7 мкм 2,1×50 мм

Темп.: 25°C

Растворитель А: 95/5 вода (50 mM формиата аммония, pH 9)/ацетонитрил

Растворитель В: ацетонитрил

Детектирование: DAD 220-400 нм

Градиент:

0 мин 95% А, 5% В

0,6 мин 5% А, 95% В

0,7 мин 5% А, 95% В

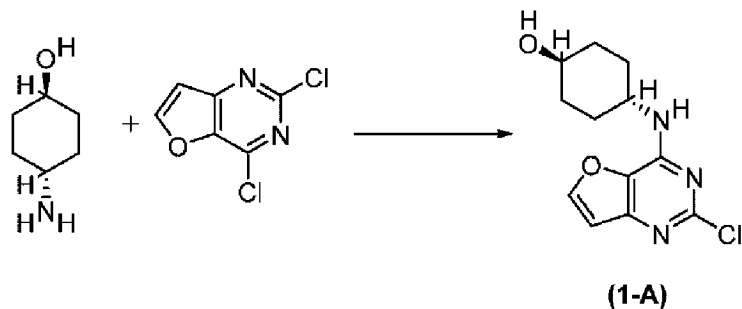
1,4 мин 95% А, 5% В

Скорость потока: 0,600 мл/мин.

Пример 1: Получение соединений

[00435] **Получение Соединения 1: 2-метил-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-амин**

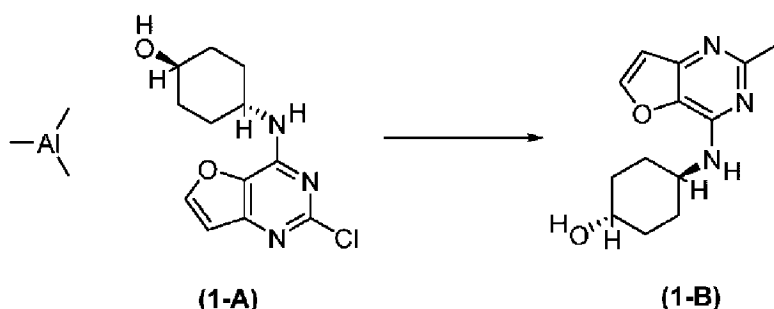
4-[(2-хлорфуоро[3,2-d]тиримидин-4-ил)амино]циклогексанол (**1-A**)



В круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, смесь 4-аминоциклогексан-1-ола (1,219 г, 10,58 ммоль), 2,4-дихлорфуоро[3,2-d]пиримидина (2000 г, 10,58 ммоль), основания Хюнига (2,735 г, 3,686 мл, 21,16 ммоль) и iPrOH (26,38 мл) нагревали до 100°C в течение 16 ч. Растворитель удаляли, и неочищенный остаток делили между EtOAc и насыщенным водным NH₄Cl. Слои разделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали с получением оранжевого твердого вещества. ¹H-ЯМР (CDCl₃) показала чистый требуемый 4-[(2-хлорфуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексанол (2,659 г, 9,932 ммоль, 93,89%) с присутствием остаточного EtOAc. Сушили в вакууме в течение ночи и затем использовали в таком виде. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,73 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,09 (с, 1H), 4,20-4,08 (м,

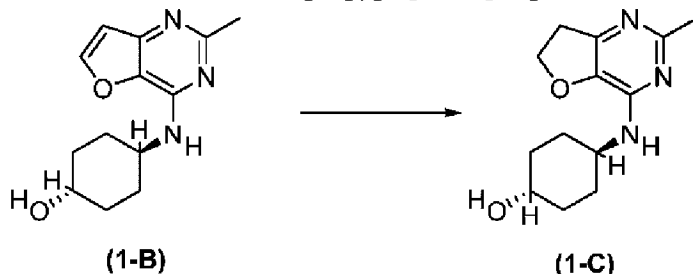
1H), 3,78-3,61 (м, 1H), 2,19 (д, J=11,5 Гц, 2H), 2,05 (д, J=10,8 Гц, 2H), 1,66-1,45 (м, 4H), 1,45-1,30 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 267,07745, найдено 268,15 (M+1)⁺; время удерживания: 0,56 минуты.

4-[(2-метилфуоро[3,2-d]тиримидин-4-ил)амино]циклогексанол (**1-B**)



В высушенной в термостате пробирке для микроволнового синтеза, под N₂ растворяли смесь (1-A) в безводном ТГФ (8,0 мл). Реакцию дегазировали, пропуская ток N₂ через раствор в течение 5 минут. Добавляли Pd(PPh₃)₄ (215,9 мг, 0,1868 ммоль) и дегазировали еще в течение двух минут. Осторожно добавляли триметилалюминий (2,107 г, 2,802 мл 2 М, 5,603 ммоль) и нагревали реакционную смесь при 125°C в бане с алюминиевыми бусами в течение 16 ч. Реакционную смесь осторожно вливали в насыщенный водный NH₄Cl. Слои разделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали EtOAc (2×) и CH₂Cl₂ (2×). Объединенную органическую фазу промывали соевым раствором, сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали до полутвердого оранжевого вещества. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→30% MeOH/CH₂Cl₂) с получением требуемого продукта (180,75 мг, 0,7309 ммоль, 78,27%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,67 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,75 (д, J=2,2 Гц, 1H), 4,91 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,15 (тдт, J=12,2, 8,1, 4,0 Гц, 1H), 3,70 (ддд, J=14,7, 10,3, 4,1 Гц, 1H), 2,57 (с, 3H), 2,19 (д, J=12,7 Гц, 2H), 2,11-1,98 (м, 2H), 1,67 (с, 1H), 1,52 (ддд, J=23,4, 13,0, 3,4 Гц, 2H), 1,35 (ддд, J=24,1, 12,9, 3,3 Гц, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 247,13208, найдено 248,25 (M+1)⁺; время удерживания: 0,46 минуты.

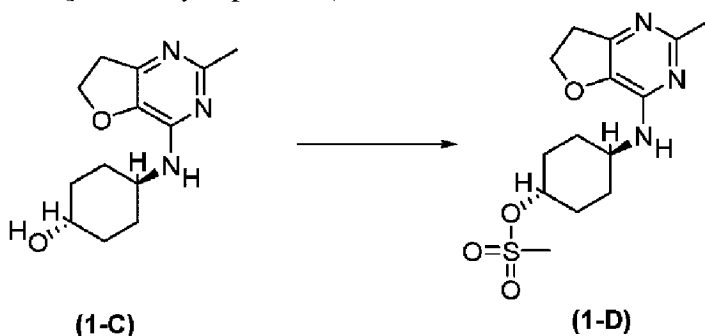
4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]тиримидин-4-ил)амино]-циклогексанол (**1-C**)



В колбу, содержащую Pd(OH)₂ (3,424 г, 4,877 ммоль), добавляли Соединение (1-B) (2,68 г, 9,754 ммоль) в EtOH (270,9 мл) и HCl (11 мл 2 М, 22,00 ммоль). Полученную реакционную смесь встряхивали под давлением H₂ 50 фунтов на кв. дюйм (3,45 МПа) в шейкере Рагг в течение 2 ч 10 мин. Реакционную смесь фильтровали через целит и выпаривали. Материал в сухом виде наносили на целит и очищали с помощью

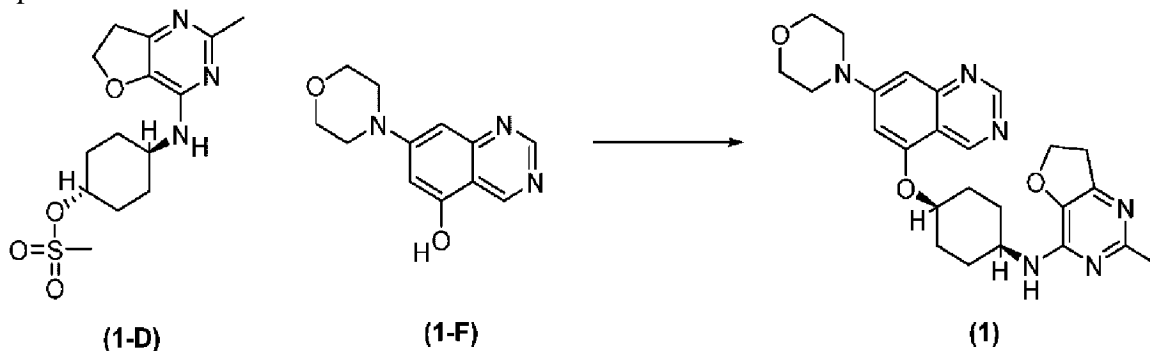
хроматографии на силикагеле (80 г колонка Isco gold, линейный градиент 0% гексанов $\rightarrow$ 30% MeOH/CH₂Cl₂). Целевые фракции объединяли и выпаривали с получением 4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексанола (2,15 г, 8,624 ммоль, 88,40%). ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOH-D₄) δ 4,85-4,79 (т, J=9,2 Гц, 2H), 4,24-4,12 (м, 1H), 3,63-3,51 (м, 1H), 3,42 (т, J=9,2 Гц, 2H), 2,56 (с, 3H), 2,11-1,85 (м, 4H), 1,44 (дк, J=22,9, 10,4 Гц, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 249,14772, найдено 250,19 (M+1)⁺; время удерживания: 0,46 минуты.

4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]-
циклогексил]метансульфонат (1-D)



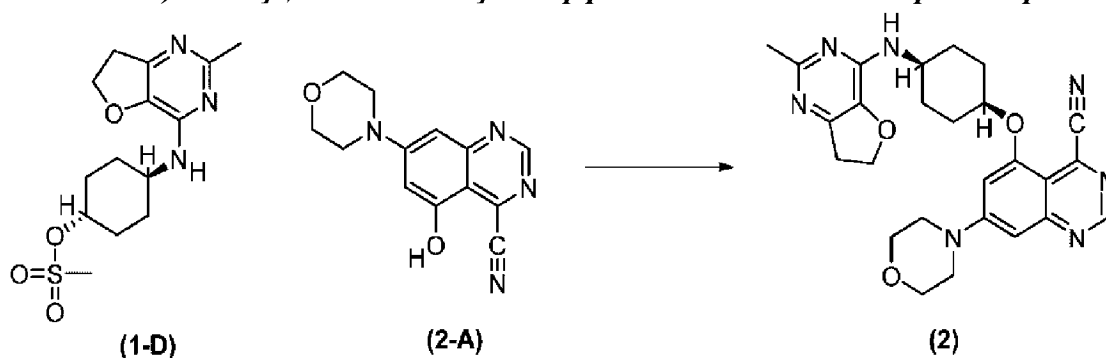
К суспензии комнатной температуры 4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексанола (2,15 г, 8,624 ммоль) и Et₃N (2,793 г, 3,847 мл, 27,60 ммоль) в CH₂Cl₂ (223,6 мл) добавляли MsCl (1,087 г, 734,5 мкл, 9,486 ммоль). Продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакцию вливали в насыщ. NaHCO₃. Слои разделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали CH₂Cl₂ (2 $\times$ 150 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (120 г колонка Isco gold, линейный градиент 0% $\rightarrow$ 10% MeOH/CH₂Cl₂). Получали 4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфонат (2,3269 г, 7,107 ммоль, 82,43%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 4,74-4,62 (м, 1H), 4,57 (т, J=9,1 Гц, 2H), 4,34 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,11-3,95 (м, 1H), 3,18 (т, J=9,0 Гц, 2H), 3,03 (с, 3H), 2,46 (с, 3H), 2,20 (д, J=10,4 Гц, 4H), 1,78 (дд, J=22,4, 10,3 Гц, 2H), 1,34 (дд, J=22,4, 10,8 Гц, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 327,12527, найдено 328,16 (M+1)⁺; время удерживания: 0,52 минуты.

2-метил-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-амин



Суспензию 7-морфолинохиназолин-5-ола (17,4 мг, 0,07524 ммоль, Соединение **(1-F)**): пожалуйста, см. получение Соединения **7** ниже), [4-[(2-метил-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]-циклогексил]метансульфоната (49,3 мг, 0,1506 ммоль) и Cs_2CO_3 (73,6 мг, 0,2259 ммоль) в безводном диоксане (1,0 мл) нагревали до 110°C в течение 72 ч. Реакционную смесь вливали в H_2O и экстрагировали CH_2Cl_2 . Объединенную органическую фазу сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г колонка Isco gold, линейный градиент $0 \rightarrow 10\%$ $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением требуемого продукта, хотя он содержал остаточные примеси. Затем материал очищали на обращено-фазовой Isco [50 г колонка C18 Aq; $0 \rightarrow 50\%$ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли и выпаривали. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 и пропускали через картридж Stratospheres SPE с получением 2-метил-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-аминf (12,2 мг, 0,02374 ммоль, 31,55%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (с, 1H), 6,58 (д, $J=1,5$ Гц, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,59 (т, $J=9,0$ Гц, 2H), 4,52 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 4,24-4,11 (м, 1H), 3,94-3,83 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 3,19 (т, $J=9,0$ Гц, 2H), 2,48 (с, 3H), 2,21 (д, $J=13,1$ Гц, 2H), 1,99 (дд, $J=12,6, 3,6$ Гц, 2H), 1,90-1,72 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 462,23795, найдено 463,26 ($M+1$)+; время удерживания: 0,5 минуты.

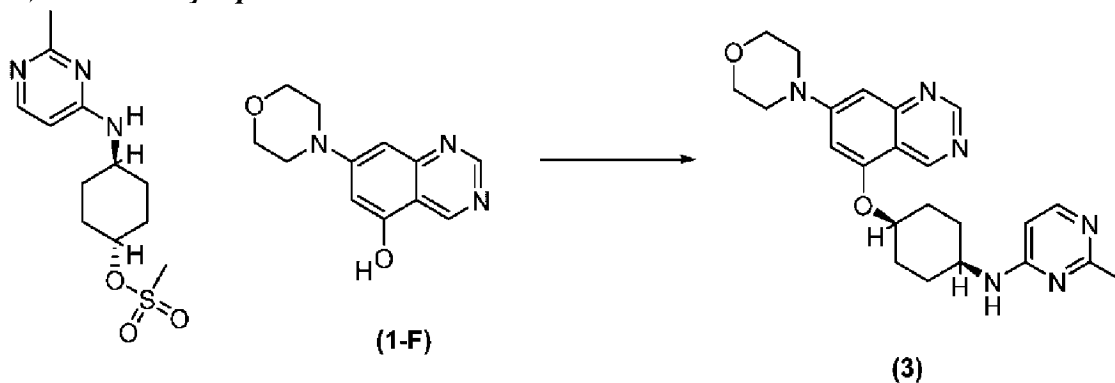
[00436] **Получение Соединения 2: 5-[4-[(2-метил-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрил**



Суспензию 5-гидроксид-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (31 мг, 0,1210 ммоль, Соединение **(2-A)**): см. получение Соединения **11** ниже), [4-[(2-метил-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-ил)-амино]циклогексил]метансульфоната (80 мг, 0,2444 ммоль) и Cs_2CO_3 (160 мг, 0,4911 ммоль) в безводном диоксане (1,5 мл) нагревали до 115°C в течение 72 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит и выпаривали фильтрат. Неочищенный остаток растворяли в минимальном количестве ДМСО и очищали с помощью обращено-фазовой Isco [150 г колонка C18 Aq; $0 \rightarrow 50\%$ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли и выпаривали. Остаток растворяли в CH_2Cl_2 и пропускали через картридж Stratospheres SPE с получением продукта, чистота которого составляла только $\sim 75\%$. Повторно очищали с помощью нормально-фазовой Isco (40 г колонка Isco gold, линейный градиент $0\% \rightarrow 10\%$ $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 5-[4-[(2-метил-6,7-дигидрофуро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]-циклогексокси]-7-морфолино-

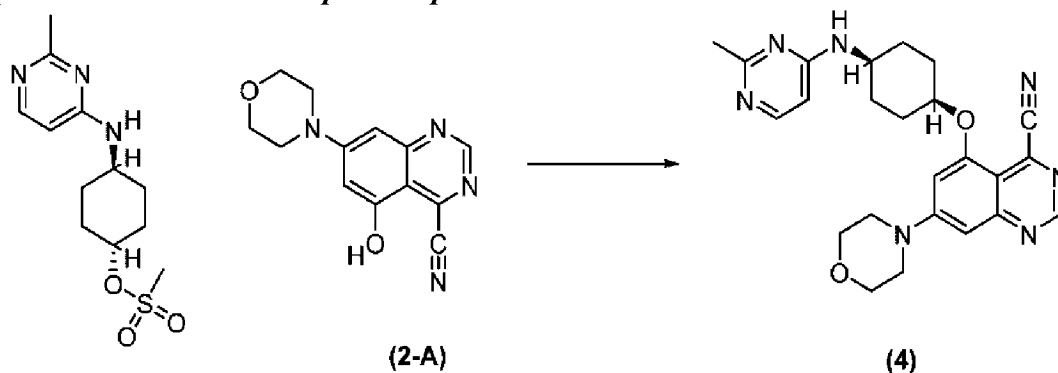
хиназолин-4-карбонитрила (3,1 мг, 0,005881 ммоль, 4,861%) с чистотой 92,5% по весу. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,08 (с, 1H), 6,83 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,67 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,84 (с, 1H), 4,64 (дд, $J=8,6, 4,2$ Гц, 1H), 4,62-4,52 (м, 2H), 4,27-4,17 (м, 1H), 3,94-3,85 (м, 4H), 3,51-3,40 (м, 4H), 3,18 (т, $J=9,1$ Гц, 2H), 2,49 (с, 3H), 2,33-2,22 (м, 2H), 2,07-1,86 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 487,2332, найдено 488,34 ($M+1$)+; время удерживания: 0,63 минуты.

[00437] **Получение Соединения 3: 2-метил-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амин**



Суспензию 7-морфолинохиназолин-5-ола (трифторуксусная кислота (1)) (68,78 мг, 0,1992 ммоль), [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфоната (142,1 мг, 0,4980 ммоль) и Cs_2CO_3 (324,5 мг, 0,9960 ммоль) в безводном диоксане (3,3 мл) нагревали до 110°C в течение 24 ч. Реакционную смесь вливали в H_2O и экстрагировали CH_2Cl_2 . Объединенную органическую фазу сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент $0 \rightarrow 100\%$ CH_2Cl_2 до 20% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением продукта (11,5 мг, 0,02653 ммоль, 13,32%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 9,45 (с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,12 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 6,86-6,77 (м, 1H), 6,60 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,18 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,79 (д, $J=3,5$ Гц, 1H), 4,02-3,80 (м, 5H), 3,48-3,30 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,32-2,20 (м, 2H), 2,07-1,95 (м, 2H), 1,94-1,76 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 420,2274, найдено 421,42 ($M+1$)+; время удерживания: 0,55 минуты.

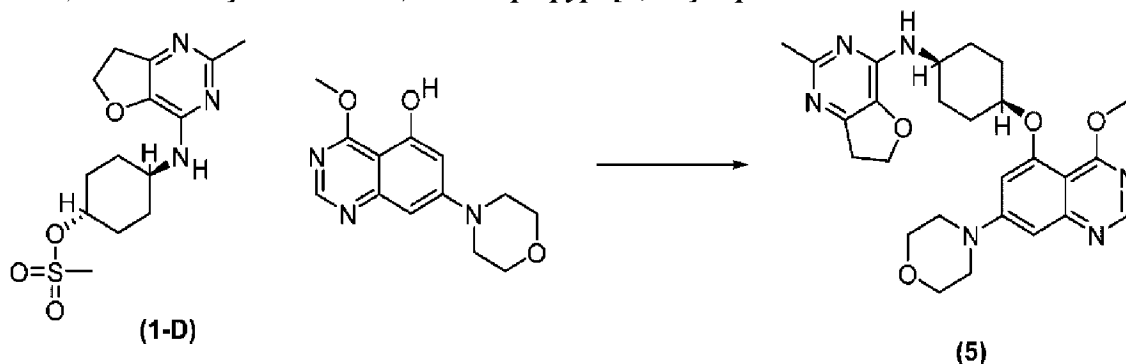
Получение Соединения 4: 5-[4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрил



Суспензию 5-гидрокси-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (соли трифторуксусной кислоты) (95,42 мг, 0,2577 ммоль), [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфоната (220,6 мг, 0,7731 ммоль) и Cs_2CO_3 (420 мг, 1,289

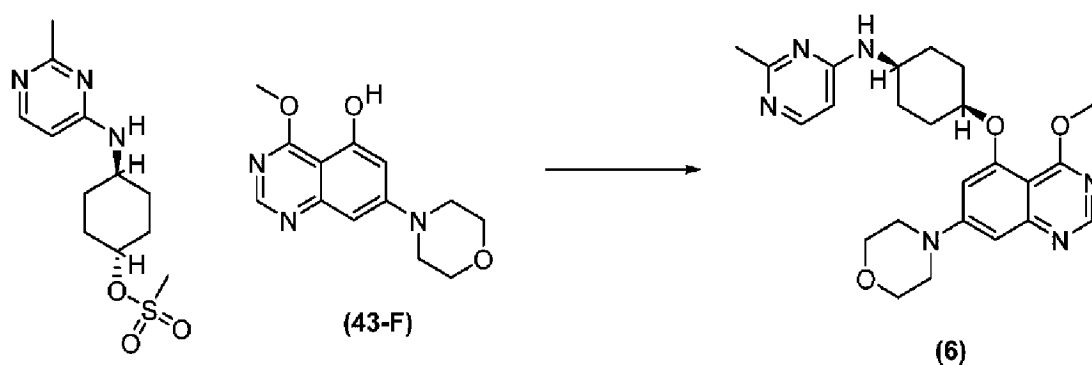
ммоль) в безводном ДМФА (2,6 мл) нагревали до 80°C в течение 112 ч. Реакционную смесь фильтровали через стеклянный фильтр и промывали CH₂Cl₂. Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→100% CH₂Cl₂ до 20% MeOH/CH₂Cl₂) с получением продукта (41,8 мг, 0,09101 ммоль, 35,32%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,08 (с, 1H), 8,06 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,71-6,63 (м, 1H), 6,14 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,93 (с, 1H), 4,85 (с, 1H), 4,06-3,79 (м, 5H), 3,49 (с, 3H), 3,48-3,40 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,34-2,21 (м, 2H), 2,13-1,85 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 445,22263, найдено 446,35 (M+1)+; время удерживания: 0,61 минуты.

[00438] **Получение Соединения 5:** N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-амин



Суспензию 4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ола (Трифторуксусная кислота (1)) (73,78 мг, 0,1966 ммоль), [4-[(2-метил-6,7-дигидрофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)амино]циклогексил]-метансульфоната (161 мг, 0,4918 ммоль) и Cs₂CO₃ (321 мг, 0,9852 ммоль) в безводном ДМФА (1,3 мл) нагревали до 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали через ватный тампон, промывая CH₂Cl₂. Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→100% CH₂Cl₂ до 20% MeOH/CH₂Cl₂) с получением продукта (39,9 мг, 0,07938 ммоль, 40,38%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,58 (с, 1H), 6,80 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,68 (с, 1H), 4,58 (т, J=9,1 Гц, 2H), 4,46 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,13 (с, 3H), 3,93-3,82 (м, 4H), 3,38-3,27 (м, 4H), 3,19 (т, J=9,1 Гц, 2H), 2,49 (с, 3H), 2,25-2,13 (м, 2H), 1,99-1,74 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 492,2485, найдено 493,34 (M+1)+; время удерживания: 0,58 минуты

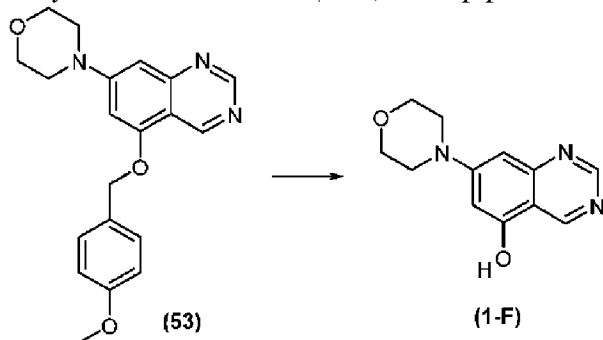
[00439] **Получение Соединения 6:** N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-2-метил-пиримидин-4-амин



Суспензию 4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ола (Трифторуксусная кислота (1)) (73,78 мг, 0,1966 ммоль), [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфоната (140 мг, 0,4906 ммоль) и Cs_2CO_3 (330 мг, 1,013 ммоль) в безводном ДМФА (1,3 мл) нагревали до 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали через ватный тампон, промывая CH_2Cl_2 . Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент $0 \rightarrow 100\%$ CH_2Cl_2 до 20% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением продукта (20,3 мг, 0,04416 ммоль, 22,46%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,58 (с, 1H), 8,12 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 6,81 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,55 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,17 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,69 (с, 1H), 4,12 (с, 3H), 3,94-3,84 (м, 4H), 3,70 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,21 (д, $J=11,0$ Гц, 2H), 1,98-1,73 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 450,23795, найдено 451,35 ($\text{M}+1$)+; время удерживания: 0,57 минуты.

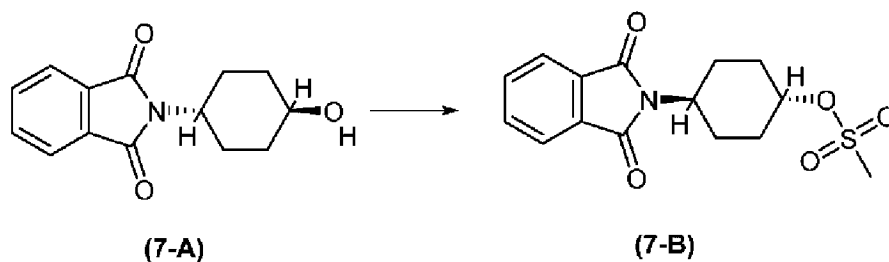
[00440] **Получение Соединения 7: 4-[5-[(4-метоксифенил)-метокси]хиназолин-7-ил]морфолин**

Получение соединения (1-F): 7-морфолинохиназолин-5-ол



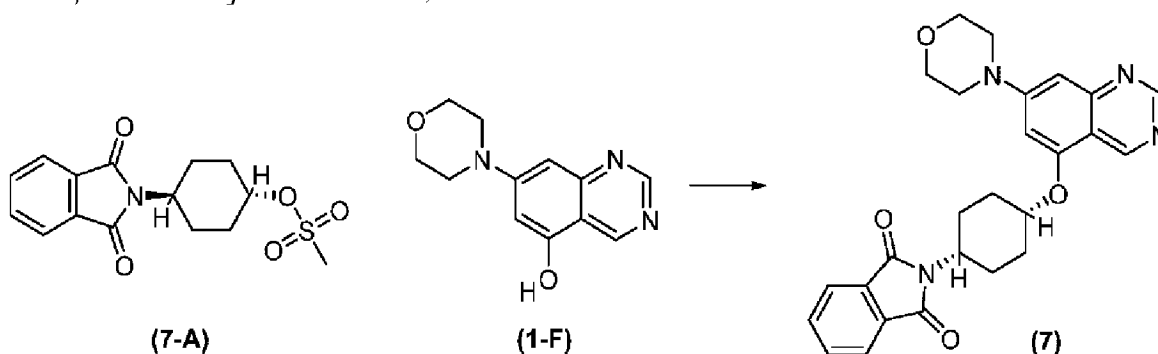
К раствору 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (1,38 г, 3,927 ммоль) в CH_2Cl_2 (40 мл) добавляли ТФУ (12,36 г, 8,351 мл, 108,4 ммоль). Полученную темную красно-оранжевую смесь перемешивали при 50°C в течение 4 ч, затем при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель выпаривали при умеренном нагреве/токе N_2 . Неочищенный остаток использовали непосредственно в следующей стадии. $\text{M}+1$: 232,32. Время удерживания: 0,5

Получение [4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)циклогексил]-метансульфоната



При 0°C суспензию 2-(4-гидроxicиклогексил)изоиндолин-1,3-диона (1,0 г, 4,077 ммоль) в Et₃N (1,238 г, 1,705 мл, 12,23 ммоль) и CH₂Cl₂ (6,683 мл) обрабатывали MsCl (607,1 мг, 410,2 мкл, 5300 ммоль) (экзотермическая реакция, смесь нагревается - помещали в водяную баню при КТ). Продолжали перемешивание при подогреве до КТ в течение ночи. Реакцию разбавляли EtOAc и вливали в H₂O. Слои разделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали EtOAc (2× 50 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали до рыхлого белого твердого вещества. ¹H-ЯМР показала чистый требуемый продукт, не требующий очистки; вес продукта составил 1,277 г.

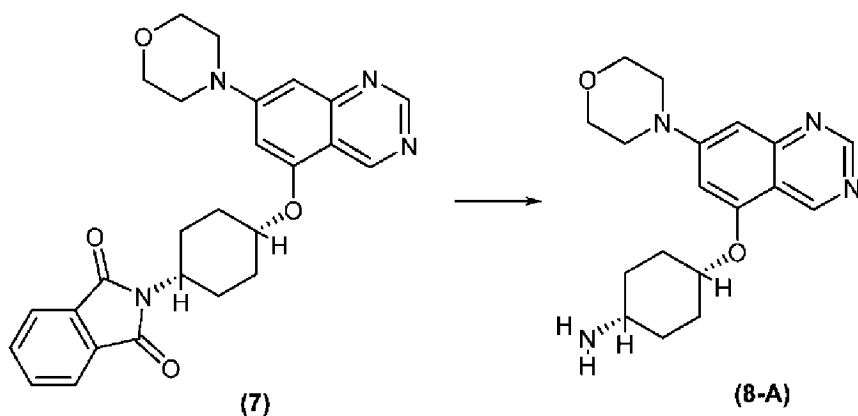
Получение Соединения 7: 2-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-дион



Суспензию 7-морфолинохиназолин-5-ола (Трифторуксусная кислота (1)) (324,7 мг, 0,9405 ммоль), [4-(1,3 диоксоизоиндолин 2-ил)циклогексил]метансульфоната (760,2 мг, 2,351 ммоль) и Cs₂CO₃ (1,535 г, 4,712 ммоль) в безводном ДМФА (5,705 мл) нагревали до 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита, промывая CH₂Cl₂. Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток в сухом виде наносили на Целит и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→30% MeOH/CH₂Cl₂) с получением продукта (206,5 мг, 0,4414 ммоль, 46,93%) в виде бурого твердого вещества. ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,80 (д, J=0,6 Гц, 1H), 9,15 (с, 1H), 7,89-7,78 (м, 2H), 7,78-7,65 (м, 2H), 6,80 (дд, J=2,3, 0,6 Гц, 1H), 6,61 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,30 (тт, J=12,5, 4,1 Гц, 1H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,47-3,30 (м, 4H), 2,83 (кд, J=12,8, 3,4 Гц, 2H), 2,35 (д, J=15,0 Гц, 2H), 1,84-1,62 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 458,1954, найдено 459,31 (M+1)⁺; время удерживания: 0,66 минуты.

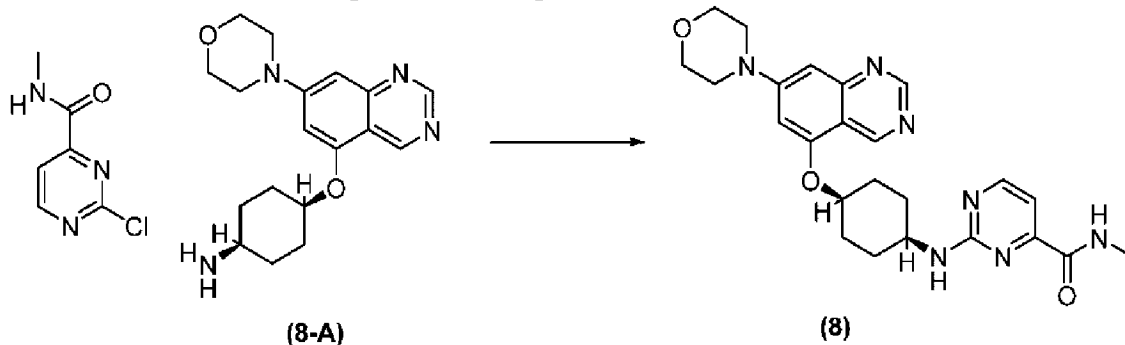
[00441] **Получение Соединения 8: N-метил-2-[[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамид**

Получение 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина: Соединение (8-A)



К перемешиваемому раствору 2-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (1,477 г, 3,221 ммоль) в MeOH (110 мл) добавляли гидразин (2,0 мл, 63,72 ммоль). Полученную реакцию герметично закрывали и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Реакционную смесь выпаривали. К неочищенному остатку добавляли CH_2Cl_2 и суспензию фильтровали через стеклянный фильтр средней пористости (твердое вещество несколько раз промывали CH_2Cl_2 и собирали в ту же колбу). Фильтрат выпаривали с получением 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (1,0133 г, 3,085 ммоль, 95,78%). Всю партию сушили в вакууме при 50°C в течение 4 дней. Получали 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамин (1,0133 г, 3,085 ммоль, 95,78%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 9,47 (с, 1H), 9,11 (с, 1H), 6,86-6,72 (м, 1H), 6,58 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 4,72 (с, 1H), 4,02-3,83 (м, 4H), 3,47-3,29 (м, 4H), 2,95-2,79 (м, 1H), 2,21 (д, $J=14,0$ Гц, 2H), 1,90-1,69 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 328,1899, найдено 0,52 ($M+1$) $^+$; время удерживания: 329,39 минут.

Получение N-метил-2-[[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамида (Соединение 8)

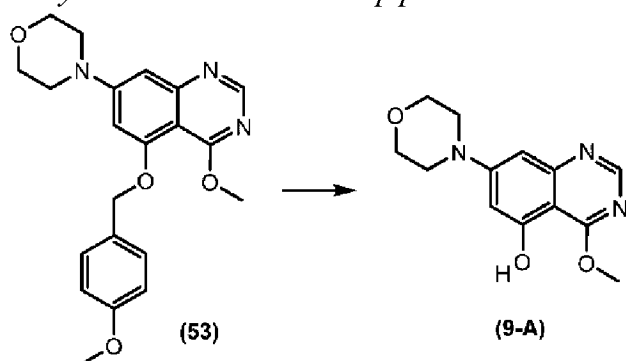


Смесь 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (33,2 мг, 0,09503 ммоль), 2-хлор-N-метил-4-пиримидин-карбоксамида (18,8 мг, 0,1096 ммоль) и Na_2CO_3 (190 мкл 2 М, 0,3800 ммоль) в воде (156 мкл) нагревали с обратным холодильником (100°C) в закрытой пробирке для микроволнового синтеза. Полученную смесь оставляли на ночь с перемешиванием. Неочищенную суспензию охлаждали, замораживали и сушили в лиофилизаторе. Остаток в сухом виде наносили на целит и очищали с помощью обращено-фазовой Isco [150 г колонка C18 Aq; 0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)].

Целевые фракции объединяли и выпаривали. Пробу растворяли в минимальном количестве CH_2Cl_2 и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL-HCO3 MP. Фильтрат выпаривали и сушили в вакууме с получением N-метил-2-[[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамида (32,4 мг, 0,06920 ммоль, 72,82%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,49 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,76 (д, J=4,5 Гц, 1H), 7,32 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,79 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,59 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,18 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,86-4,70 (м, 1H), 4,15-3,96 (м, 1H), 3,96-3,78 (м, 4H), 3,49-3,33 (м, 4H), 3,00 (д, J=5,2 Гц, 3H), 2,32-2,14 (м, 2H), 2,10-1,96 (м, 2H), 1,96-1,74 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 463,2332, найдено 464,35 (M+1)⁺; время удерживания: 0,58 минуты.

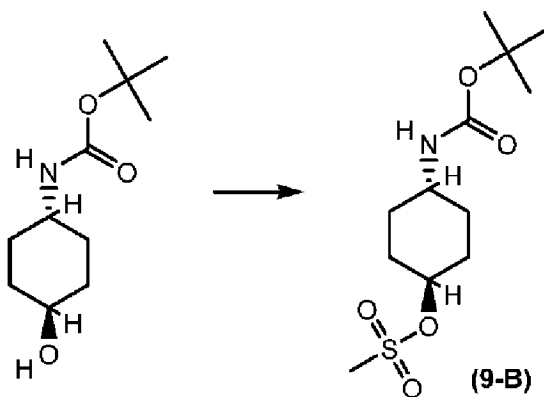
[00442] **Получение Соединения (9): 2-[[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида**

Получение 4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ола: соединение (9-A)



К раствору 4-[4-метокси-5-[(4-метоксифенил)метокси]-хиназолин-7-ил]морфолина (100 мг, 0,2622 ммоль) в CH_2Cl_2 (2,667 мл) добавляли ТФУ (1,794 г, 1,212 мл, 15,73 ммоль). Реакцию герметично закрывали и нагревали термически до 50°C в течение 16 ч. Растворитель удаляли в токе N_2 /умеренном нагреве. Неочищенный остаток использовали непосредственно в следующей реакции. Масса +1: 262,34. Время удерживания: 0,55

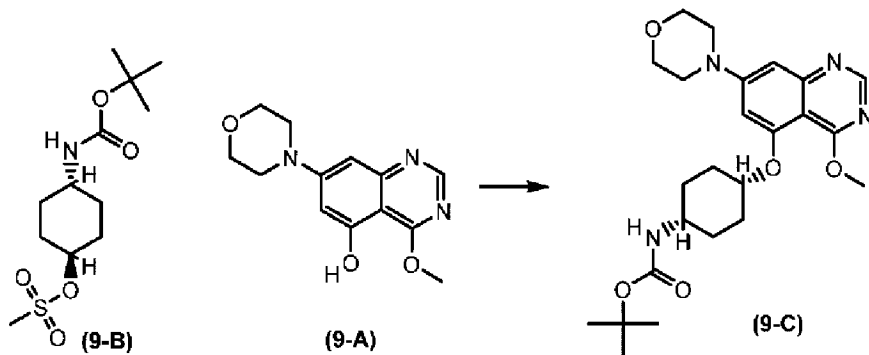
Получение [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексил]-метансульфонат: Соединение (9-B)



Раствор трет-бутил-N-(4-гидроксициклогексил)карбамата (8,2 г, 38,09 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли DIEA (14 мл, 80,38 ммоль) и MsCl (3,2 мл, 41,34 ммоль). Смесь перемешивали в течение 0,5 ч и разбавляли ДХМ, промывали H_2O , сушили над Na_2SO_4 ,

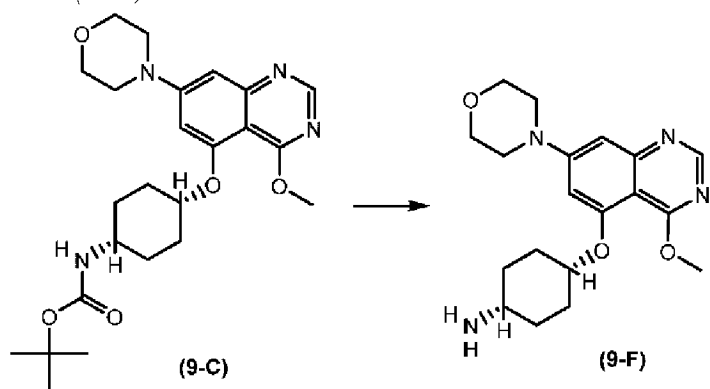
фильтровали через слой силикагеля и выпаривали. Получали почти белое твердое вещество. ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 4,64 (тт, $J=10,8, 4,1$ Гц, 1H), 4,40 (с, 1H), 3,48 (с, 1H), 3,02 (с, 3H), 2,25 1,99 (м, 4H), 1,80-1,59 (м, 2H), 1,45 (с, 9H), 1,36-1,13 (м, 2H).

Получение *трет-бутил-N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамата: Соединение (9-С)*



Суспензию 4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ола (Трифторуксусная кислота (1)) (98,4 мг, 0,2622 ммоль), [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексила]метансульфоната (154 мг, 0,5249 ммоль) и Cs_2CO_3 (427 мг, 1,311 ммоль) в безводном ДМФА (1,75 мл) нагревали до 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали через ватный тампон, промывая CH_2Cl_2 . Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент $0 \rightarrow 20\%$ $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением трет-бутил-N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамата. Неочищенный материал без дополнительно обработки подвергали снятию Вос защиты. ЭРИ-МС m/z вычисл. 458,25293, найдено 459,45 ($M+1$)+; время удерживания: 0,67 минуты.

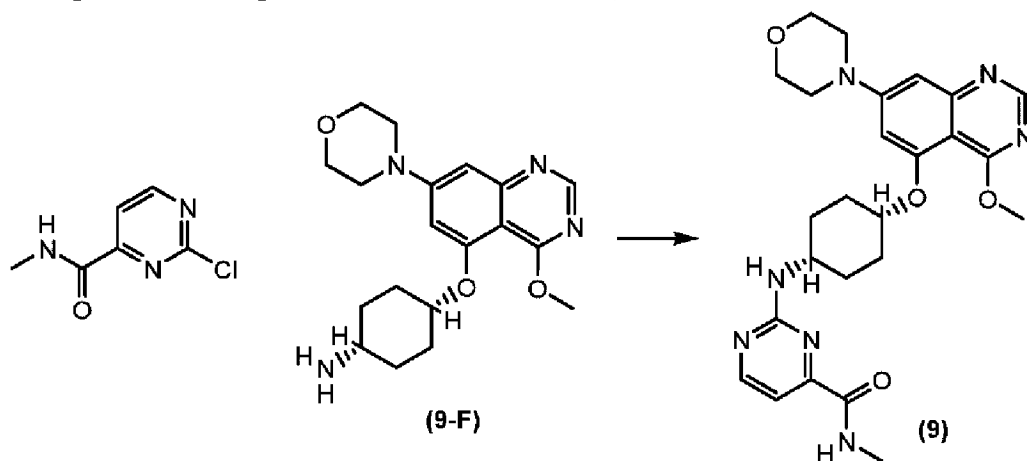
Получение *4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)окси-циклогексанамина: Соединение (9-F)*



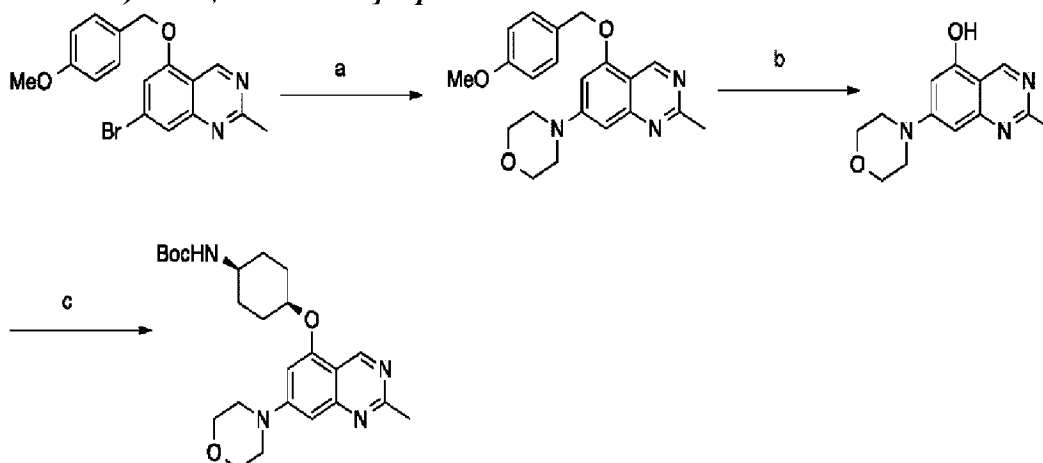
К раствору трет-бутил-N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамата (120,2 мг, 0,2622 ммоль) в CH_2Cl_2 (2,622 мл) добавляли ТФУ (896,9 мг, 606,0 мкл, 7,866 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью обращено-фазовой Isco [50 г колонка C18 Aq; $0 \rightarrow 40\%$ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли, выпаривали и сушили

путем азеотропной перегонки с толуолом (2×) и в вакууме с получением 4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (Трифторуксусная кислота (1)) (50 мг, 0,1058 ммоль, 40,36%) (выход в 3 стадиях). ЭРИ-МС m/z вычисл. 358,2005, найдено 359,36 ($M+1$)+; время удерживания: 0,53 минуты.

Получение 2-[[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида: Соединение (9)



[00443] *Получение Соединения (10): трет-бутил-N-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамат*



Реагенты и условия: (а) морфолин, DIEA, $iPrOH$; (b) ТФУ, ДХМ; (с) [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексил]-метансульфонат, $CsCO_3$, ДМФА

Стадия а

Смесь 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-хиназолина (80 мг, 0,22 ммоль), морфолина (23 мг, 0,27 ммоль), карбоната цезия (145 мг, 0,45 ммоль), $Pd(OAc)_2$ (5,0 мг, 0,023 ммоль) и рац-BINAP (28 мг, 0,045 ммоль) в 1,4-диоксане (2 мл) барботировали N_2 и перемешивали при $90^\circ C$ в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целлита и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании в градиенте 0-5% $MeOH/ДХМ$. В результате получали 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-хиназолин-7-ил]морфолин (50 мг, 61%). ЭРИ-МС m/z вычисл. 365,1, найдено 366,14 ($M+1$)+; время удерживания: 0,58 минуты.

Стадия b

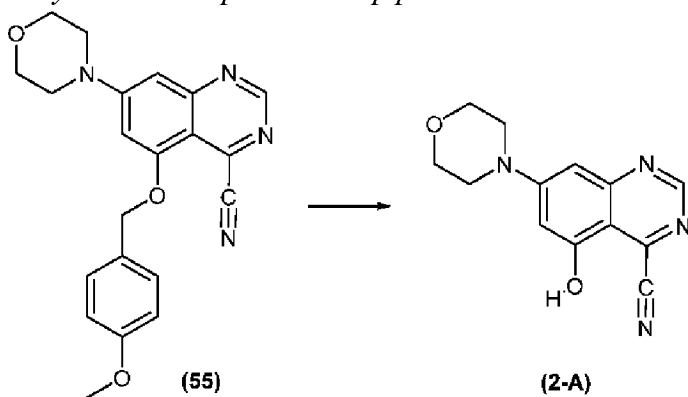
К раствору 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-хиназолин-7-ил]морфолина (180 мг, 0,49 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли ТФУ (1 мл, 12,9 ммоль) и перемешивали полученную реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали на 12 г картриджа с силикагелем при элюировании в градиенте 0-4% MeOH/ДХМ с получением 2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (85 мг, 70%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,37 (с, 1H), 6,67 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,52 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 3,82 (дд, $J=5,8, 4,0$ Гц, 4H), 3,35-3,23 (м, 4H), 2,80 (с, 3H).

Стадия c

К смеси 2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (30 мг, 0,12 ммоль), карбоната цезия (200 мг, 0,62 ммоль) в ДМФА (1 мл) при 70°C добавляли [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексил]-метансульфонат (100 мг, 0,34 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 70°C. К смеси добавляли еще одну порцию [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексил]-метансульфоната (100 мг, 0,34 ммоль) и продолжали перемешивание при 70°C в течение 18 ч. Смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целлита и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании в градиенте 0-10% MeOH/ДХМ с получением трет-бутил-N-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамата (2,0 мг, 3,6%) (Соединения **10**). ^1H -ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 9,32 (с, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,50 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,71 (с, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,89 (т, $J=4,9$ Гц, 4H), 3,63 (с, 1H), 3,42 (т, $J=4,9$ Гц, 4H), 2,84 (с, 3H), 2,17 (д, $J=13,4$ Гц, 2H), 1,97-1,60 (м, 6H), 1,47 (с, 9H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 442,26, найдено 443,2 ($M+1$)+; время удерживания: 0,6 минуты.

[00444] *Получение Соединения 11: N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]циклогексил]амино]-пиримидин-4-карбоксамид*

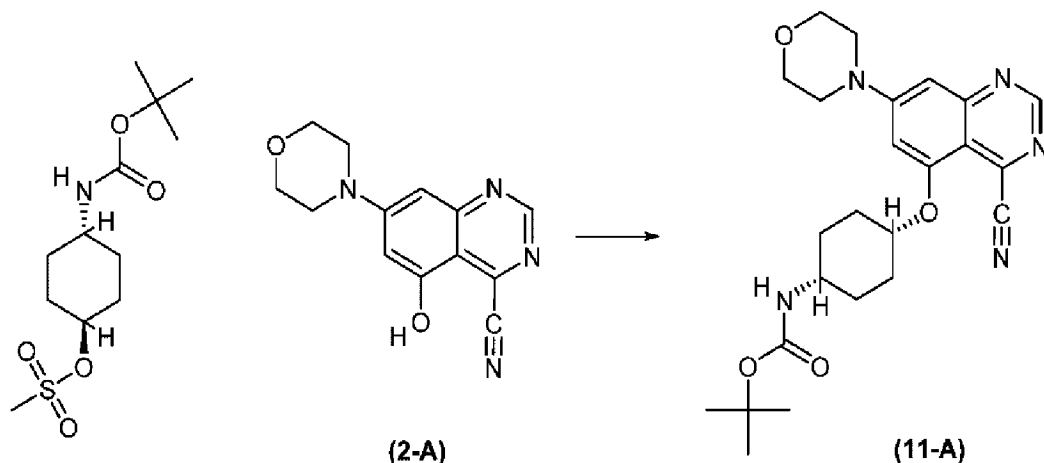
Получение 5-гидрокси-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (Соединения (2-A))



К раствору 5-[4-(метоксифенил)метокси]-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (160 мг, 0,4251 ммоль) в CH_2Cl_2 (4,25 мл) добавляли ТФУ (1800 г, 1,216 мл, 15,79 ммоль) (цвет раствора менялся с желтого на красный). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего ЖХМС показала только основной пик, соответствующий $[M+1]$ целевого продукта. Растворитель удаляли при умеренном

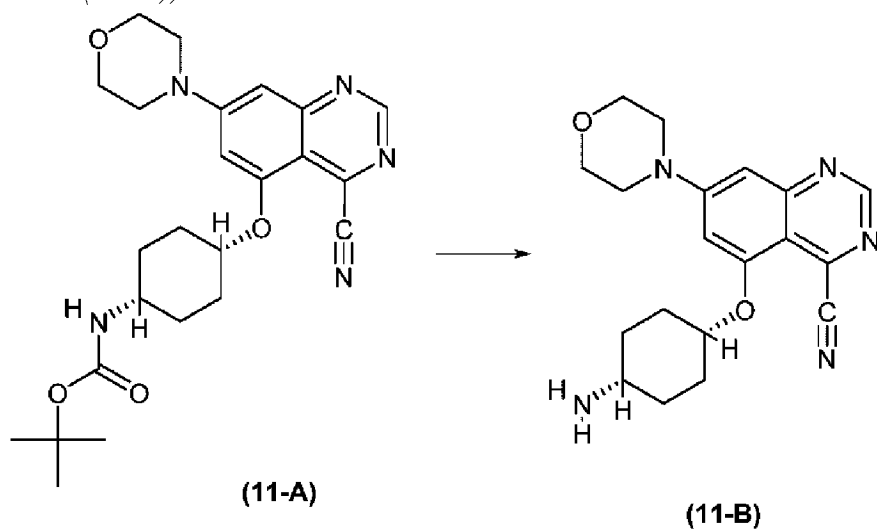
нагреве/токе N₂ и неочищенный остаток использовали непосредственно в следующей стадии без дополнительной обработки. ЭРИ-МС *m/z* вычисл. 256,09604, найдено 257,3 (M+1)⁺; время удерживания: 0,62 минуты.

Получение *трет-бутил-N-[4-(4-циано-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]карбамата (Соединения (11-A))*



Суспензию 5-гидрокси-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (Трифторуксусная кислота (1)) (157,4 мг, 0,4251 ммоль), [4-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексил]метансульфоната (312 мг, 1,063 ммоль) и Cs₂CO₃ (694 мг, 2,130 ммоль) в безводном ДМФА (2,75 мл) нагревали до 90°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали на вакуумном фильтре через слой целита, промывая CH₂Cl₂. Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→100% CH₂Cl₂ до 20% MeOH/CH₂Cl₂) с получением C₂₄H₃₁N₅O₄ (192,8 мг, 0,4251 ммоль, 100,0%). Этот неочищенный материал использовали в следующей стадии. ЭРИ-МС *m/z* вычисл. 453,2376, найдено 454,41 (M+1)⁺; время удерживания: 0,83 минуты.

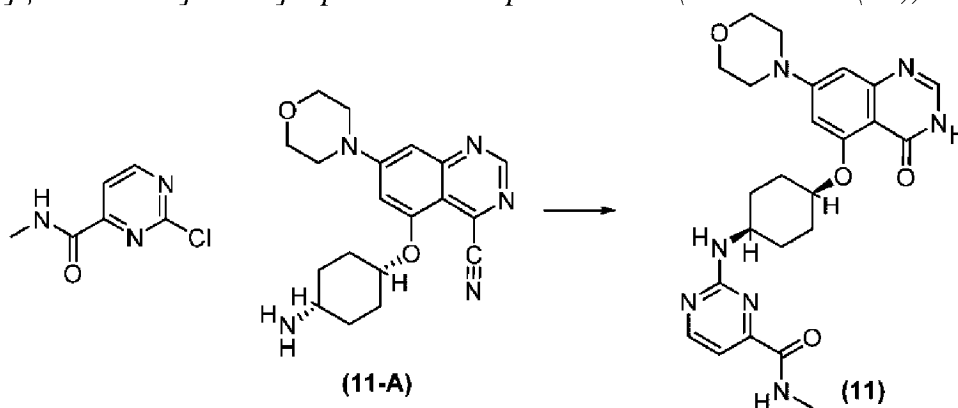
Получение 5-(4-аминоциклогексокси)-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (Соединения (11-B))



К раствору трет-бутил-N-[4-(4-циано-7-морфолино-хиназолин-5-

ил)оксициклогексил]карбамата (192,8 мг, 0,4251 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл) добавляли ТФУ (1,454 г, 982,4 мкл, 12,75 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью обращенно-фазовой Isco [50 г колонка C18 Aq; 0→40% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли, выпаривали и сушили путем азеотропной перегонки с толуолом (2×) и в вакууме с получением 5-(4-аминоциклогексокси)-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (Трифторуксусная кислота (1)) (47,8 мг, 0,1023 ммоль, 24,06%) (выход в 3 стадиях). ЭРИ-МС m/z вычисл. 353,18518, найдено 354,41 ($\text{M}+1$); время удерживания: 0,57 минуты.

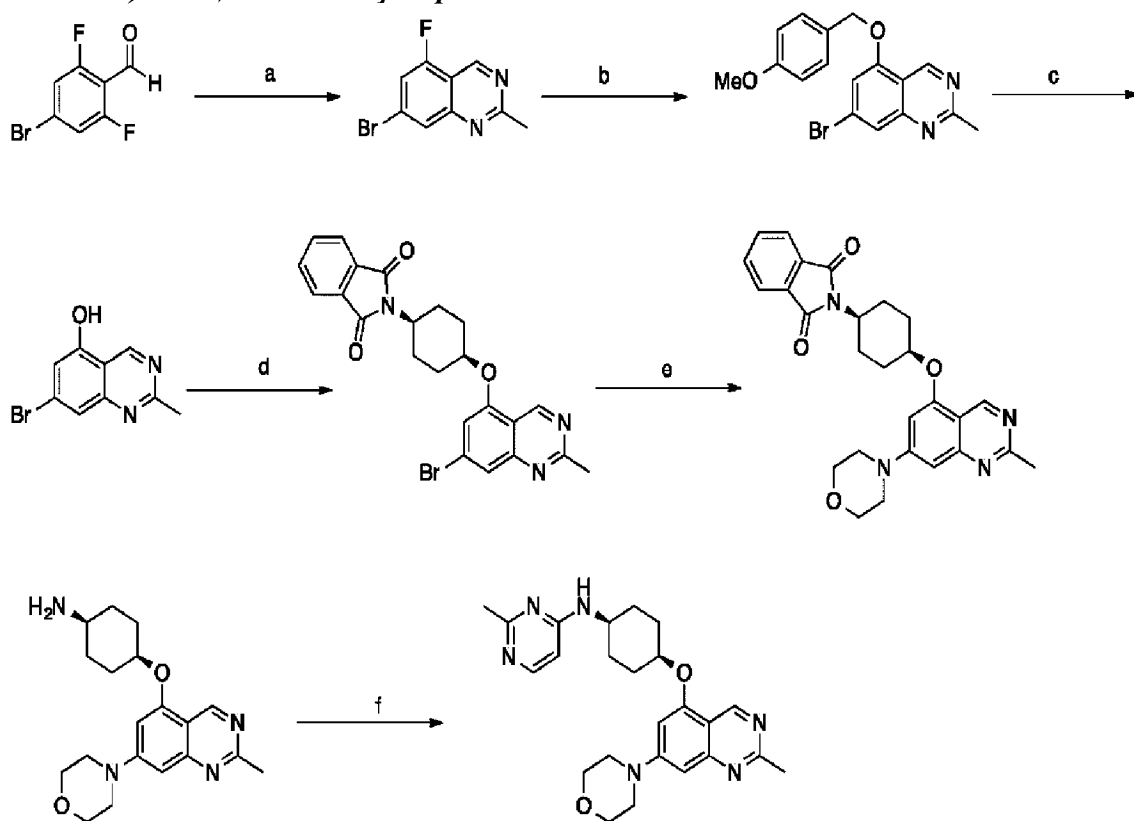
Получение N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]циклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамида (Соединения (11))



Смесь 5-(4-аминоциклогексокси)-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (Трифторуксусная кислота (1)) (47,8 мг, 0,1023 ммоль), 2-хлор-N-метил-4-пиримидин-карбоксамида (23 мг, 0,1340 ммоль) и Na_2CO_3 (256,2 мкл 2 М, 0,5124 ммоль) в воде (506,7 мкл) нагревали до 110°C в закрытой пробирке для микроволнового синтеза и перемешивали в течение 16 ч. ЖХМС показала превращение в основной пик, хотя он соответствовал $[\text{M}+1]$ 480,42. По-видимому, во время реакции образовался N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]-циклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамида (или его таутомер). Неочищенную суспензию охлаждали до комнатной температуры. Для улучшения растворения добавляли смесь 1:1 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (~1 мл) и ~6-8 капель ТФУ. Полученный раствор непосредственно наносили на обращенно-фазовую Isco [50 г колонка C18 Aq; 0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Фракции, соответствующие продукту $[\text{M}+1]$ 480,42, собирали и выпаривали при пониженном давлении. Образец растворяли в минимальном количестве смеси 1:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL-HCO3 MP. Фильтрат выпаривали с образованием белой сухой пленки. ^1H -ЯМР (CDCl_3) материала соответствовала N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]циклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамиду (или его таутомеру). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,46 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,87 (дд, $J=5,4, 4,5$ Гц, 1H), 7,29 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,70 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,48 (д, $J=2,5$ Гц, 1H), 5,76-5,31 (м, 1H), 4,72 (с, 1H), 3,99 (дт, $J=8,1, 4,0$ Гц, 1H), 3,92-3,74 (м, 4H), 3,42-3,22 (м, 4H), 2,98 (д, $J=5,1$ Гц, 3H), 2,32-2,12 (м, 2H), 2,12-1,84 (м, 4H), 1,77

(тд, J=13,2, 11,9, 3,2 Гц, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 479,2281, найдено 480,33 (M+1)+; время удерживания: 0,57 минуты.

[00445] **Получение Соединения 12: 2-метил-N-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-пиримидин-4-амин**



Реагенты и условия: (a) ацетамидин (HCl), K₂CO₃ и MS 4A, бутиронитрил, 130°C, 22 ч, (b) NaNH, PMB-ОН, ДМФА; (c) ТФУ, ДХМ; (d) 2-(4-гидроксициклогексил)изоиндолин-1,3-дион, PPh₃, DIAD, ТГФ; (e) морфолин, Pd(OAc)₂, рац-BINAP, CsCO₃, диоксан; (f) NH₂NH₂, MeOH; (g) 4-хлор-2-метил-пиримидин, трет-бутил xPhos палладацикла, NaOtBu, tBuOH.

Стадия а:

Смесь 4-бром-2,6-дифтор-бензальдегида (4 г, 18,1 ммоль), ацетамидина (Хлороводородная кислота (1)) (2,4 г, 25,4 ммоль), K₂CO₃ (3,5 г, 25 ммоль) и MS 4A (2,8 г, порошок) в бутиронитриле (20,00 мл) перемешивали при 130°C в течение 20 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли EtOAc (20 мл), фильтровали через слой целлита и выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт очищали на 120 г картридже с силикагелем при элюировании в градиенте 0-30% EtOAc/гептана. В результате получали 7-бром-5-фтор-2-метил-хиназолин (1,35 г, 31%). ¹H-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 9,47 (с, 1H), 7,89 (дт, J=1,9, 1,0 Гц, 1H), 7,31 (дд, J=8,7, 1,6 Гц, 1H), 2,84 (с, 3H).

Стадия b:

К раствору (4-метоксифенил)метанола (886 мг, 0,8 мл, 6,4 ммоль) в ДМФА (20,00 мл) добавляли NaNH (260 мг, 6,4 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 30

мин. К смеси добавляли 7-бром-5-фтор-2-метил-хиназолин (800 мг, 3,3 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали H₂O, сушили над Na₂SO₄ и выпаривали. Неочищенный продукт очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании в градиенте 0-60% EtOAc/гептана. В результате получали 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-хиназолин (900 мг, 75,5%). ¹H-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 9,58 (д, J=0,8 Гц, 1H), 7,74-7,65 (м, 1H), 7,43-7,37 (м, 2H), 7,06 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,99-6,92 (м, 2H), 5,17 (с, 2H), 3,85 (с, 3H), 2,86 (с, 3H).

Стадия с:

К раствору 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-хиназолина (1,2 г, 3,3 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли ТФУ (2,0 мл, 26 ммоль) и перемешивали полученную реакционную смесь в течение 30 мин. Реакционную смесь выпаривали и очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании в градиенте 0-100% EtOAc/гептана с получением 7-бром-2-метил-хиназолин-5-ола (450 мг, 56%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,60 (д, J=0,9 Гц, 1H), 7,56 (дт, J=1,8, 0,9 Гц, 1H), 7,01 (т, J=1,3 Гц, 1H), 2,83 (д, J=0,9 Гц, 3H).

Стадия d:

В раствор 7-бром-2-метил-хиназолин-5-ола (200 мг, 0,83 ммоль), 2-(4-гидроксициклогексил)изоиндолин-1,3-диона (210 мг, 0,85 ммоль) и PPh₃ (330 мг, 1,25 ммоль) в ТГФ (10 мл) был медленно добавляли DIAD (253 мг, 250 мкл, 1,25 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Смесь выпаривали в вакууме, очищали на 12 г картридже с силикагелем при элюировании в градиенте 0-70% EtOAc/гептана с получением 2-[4-(7-бром-2-метил-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (280 мг, 71%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,01 (т, J=1,1 Гц, 1H), 7,91-7,80 (м, 2H), 7,75-7,68 (м, 2H), 7,03 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,36 (с, 2H), 5,06-4,93 (м, 2H), 4,33 (тт, J=12,5, 4,2 Гц, 1H), 2,94-2,84 (м, 2H), 2,83-2,78 (м, 2H), 2,37 (с, 3H), 1,87-1,7 (м, 4H).

Стадия e:

Смесь 2-[4-(7-бром-2-метил-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-изоиндолин-1,3-диона (280 мг, 0,60 ммоль), морфолина (100 мкл, 1,1 ммоль), карбоната цезия (400 мг, 1,2 ммоль), рац-BINAP (40 мг, 0,06 ммоль) и PdOAc₂ (7 мг, 0,03 ммоль) в диоксане (5 мл) барботировали N₂ в течение 5 мин. Реакционную смесь герметично закрывали и перемешивали в течение ночи при 100°C. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле в градиенте 0-3% MeOH/ДХМ с получением 2-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (125 мг, 44%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,7 (с, 1H), 7,88-7,75 (м, 2H), 7,72-7,65 (м, 2H), 6,8 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,55 (с, 2H), 5,03-4,83 (м, 1H), 4,35-4,25 (м, 1H), 3,92-3,83 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 2,7-2,9 (м, 2H), 2,45-2,3 (м, 2H), 2,37 (с, 3H), 1,80 (м, 4H).

Стадия f:

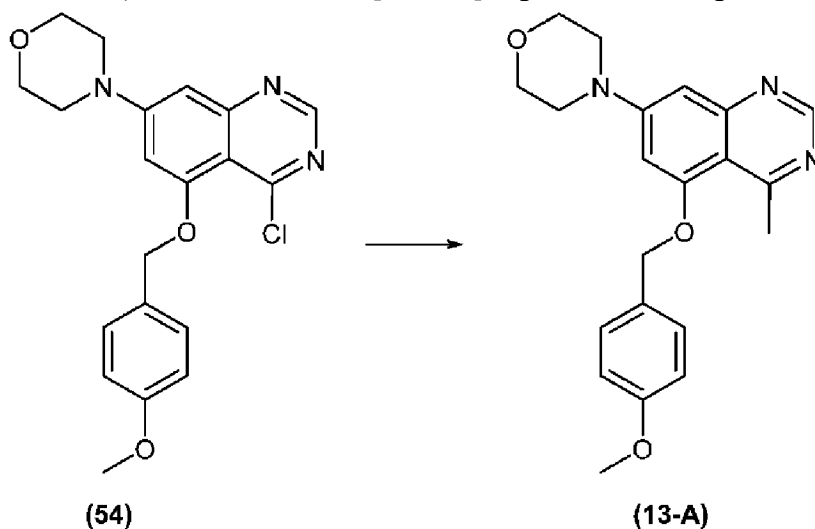
К раствору 2-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-

ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (120 мг, 0,25 ммоль) в MeOH (5 мл) добавляли гидразин (Вода (1)) (250 мг, 280 мкл, 5 ммоль) и полученную реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, выпаривали в вакууме и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г картридже) при элюировании в градиенте 0-10% (7М NH₃ в MeOH/ДХМ). В результате получали 4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (66 мг, 76%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,39 (д, J=0,6 Гц, 1H), 6,72 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,51 (д, J=2,1, 1H), 4,72-4,60 (м, 1H), 3,94-3,81 (м, 4H), 3,43-3,30 (м, 4H), 2,80 (с, 3H), 2,26-2,12 (м, 2H), 1,86-1,54 (м, 6H).

Стадия g:

Смесь 4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамина (66 мг, 0,19 ммоль), 4-хлор-2-метил-пиримидина (42 мг, 0,32 ммоль), трет-бутил xPhos палладацикла (13 мг, 0,02 ммоль) в т-BuOH (2 мл) добавляли трет-бутилат натрия (200 мкл 2 М раствора в ТГФ, 0,4 ммоль) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целлита и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле (4 г картридже) при элюировании в градиенте 0-6% MeOH/ДХМ с получением 2-метил-N-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-пиримидин-4-амина (20,9 мг, 23,7%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,27 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,01 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,44 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,19-6,05 (м, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,66 (с, 1H), 3,80 (т, J=4,9 Гц, 5H), 3,29 (дд, J=6,8, 3,1 Гц, 4H), 2,71 (д, J=1,9 Гц, 3H), 2,43 (д, J=1,8 Гц, 4H), 2,14 (д, J=13,8 Гц, 2H), 2,01-1,68 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 434,24, найдено 435,28 (M+1)+; время удерживания: 0,50 минуты.

[00446] *Получение Соединения 13: N-метил-2-[[4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамид*

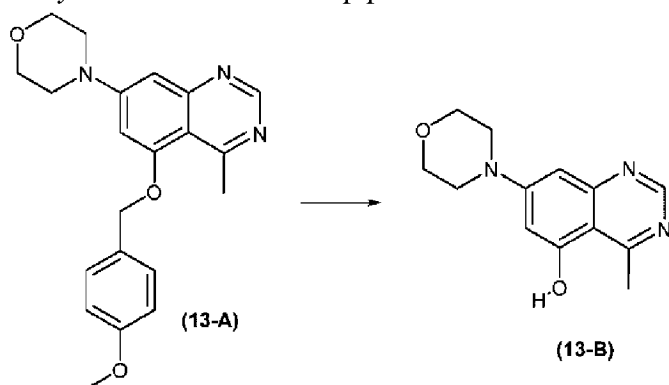


Получение 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-4-метил-хиназолин-7-ил]морфолина (Соединения (13-A))

4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]-морфолин (100 мг, 0,2592 ммоль) растворяли в ТГФ (1,3 мл) под N₂ и охлаждали до 0°C. Добавляли PdCl₂(dppf)-

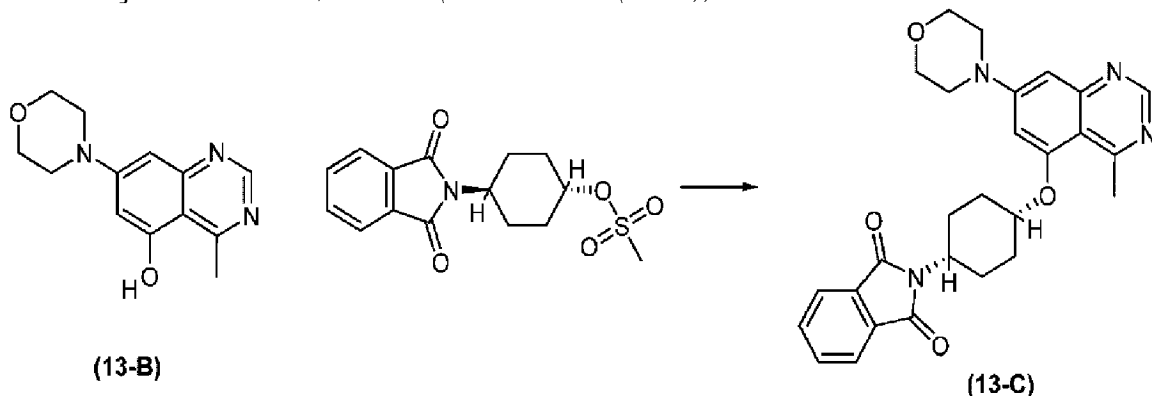
CH_2Cl_2 (10,6 мг, 0,01298 ммоль), затем MeMgBr (110 мкл 3 М раствора в диэтиловом эфире, 0,3300 ммоль) по каплям. Ледяную баню убирали и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре под N_2 в течение ночи. Эту стадию повторяли в большем масштабе, в этот раз при использовании 2-2,5 эквивалентов MeMgBr . Продукты двух партий объединяли и вливали в H_2O . Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали CH_2Cl_2 (2×20 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали с получением яркого оранжево-желтого твердого вещества. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент $0 \rightarrow 10\%$ $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-4-метил-хиназолин-7-ил]морфолина (245,0 мг, 0,6705 ммоль, 43,12%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 8,85 (с, 1H), 7,46-7,35 (м, 2H), 7,01-6,92 (м, 2H), 6,84 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,63 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 5,12 (с, 2H), 3,93-3,86 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,44-3,32 (м, 4H), 2,90 (с, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 365,17395, найдено 366,39 ($\text{M}+1$)+; время удерживания: 0,64 минуты.

Получение 4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (Соединения (13-B))



К раствору 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-4-метил-хиназолин-7-ил]морфолина (245,0 мг, 0,6705 ммоль) в CH_2Cl_2 (6,534 мл) добавляли ТФУ (2,0 мл, 25,96 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Растворитель удаляли в токе N_2 /умеренном нагреве. Неочищенный остаток непосредственно использовали в следующей реакции. Масса +1: 246,41. Время удерживания: 0,54

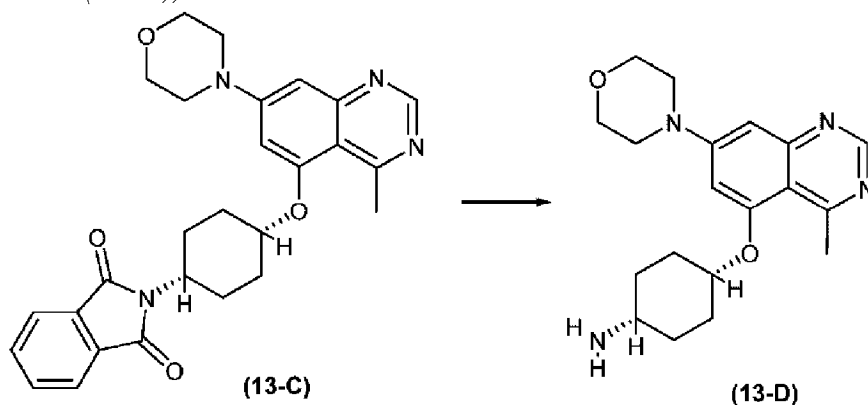
Получение 2-[4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)окси-циклогексил]изоиндолин-1,3-диона (Соединения (13-C))



Суспензию 4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (соли трифторуксусной

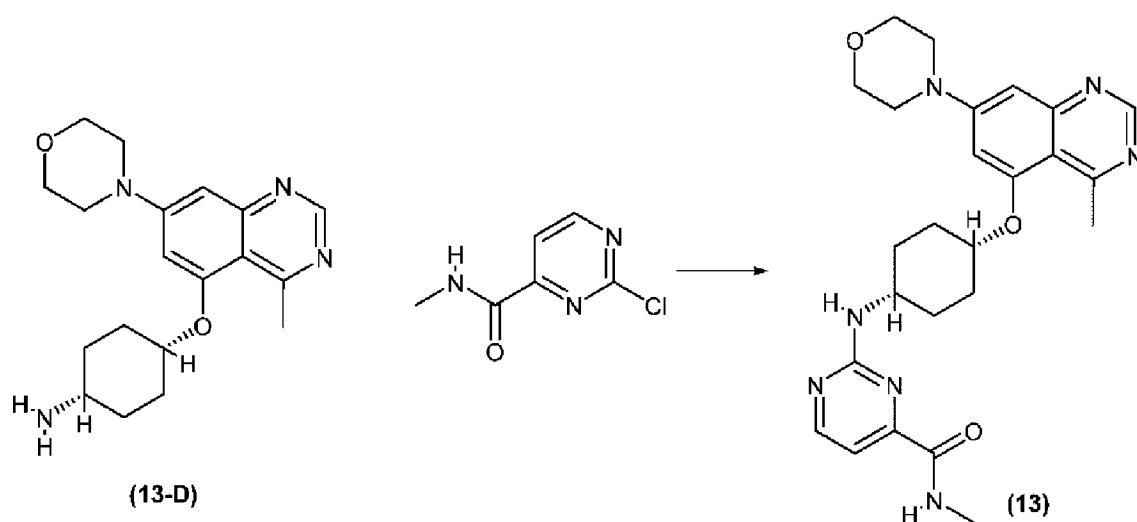
кислоты) (240,9 мг, 0,6705 ммоль), [4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)циклогексил]метансульфоната (542 мг, 1,676 ммоль) и Cs_2CO_3 (1,10 г, 3,376 ммоль) в безводном ДМФА (4,2 мл) нагревали до 90°C в течение 5 ч. ЖХМС показала неполное превращение. Добавляли еще 1,5 экв. мезилата и нагревали до 110°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита, промывая CH_2Cl_2 . Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток в сухом виде наносили на целит и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0→20% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 2-[4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (127,9 мг, 0,2707 ммоль, 40,37%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,89 (с, 1H), 7,91-7,77 (м, 2H), 7,77-7,65 (м, 2H), 6,82 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,61-6,49 (м, 1H), 4,89-4,74 (м, 1H), 4,29 (тт, $J=12,4, 3,9$ Гц, 1H), 4,00-3,79 (м, 4H), 3,44-3,31 (м, 4H), 3,27 (с, 3H), 2,77 (кд, $J=13,2, 12,7, 3,0$ Гц, 2H), 2,51-2,30 (м, 2H), 1,84-1,68 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 472,21106, найдено 473,4 ($M+1$)+; время удерживания: 0,66 минуты.

Получение 4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамин (Соединение (13-D))



К перемешиваемому раствору 2-[4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (127,9 мг, 0,2707 ммоль) в MeOH (10 мл) добавляли гидразин (172 мкл, 5,480 ммоль). Полученную реакцию герметично закрывали и перемешивали при комнатной температуре в течение 20 ч (ЖХМС показала полное превращение). Реакционную смесь выпаривали. К неочищенному остатку добавляли CH_2Cl_2 . Суспензию фильтровали через стеклянный фильтр средней пористости (твердую фазу несколько раз промывали CH_2Cl_2 и собирали в ту же колбу). Фильтрат выпаривали и неочищенный остаток очищали с помощью обращенно-фазовой Isco [50 г колонка C18 Aq; 0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли и выпаривали при пониженном давлении с получением продукта (Трифторуксусная кислота (1)) (21,9 мг, 0,04798 ммоль, 17,72%). Соль ТФУ использовали непосредственно в следующей реакции. Масса +1: 343,39. Время удерживания: 0,52

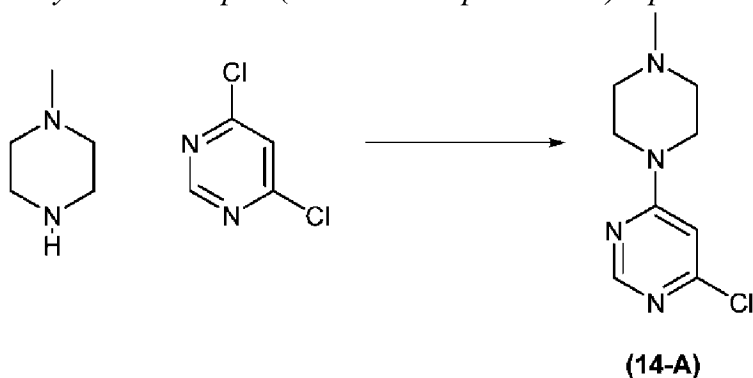
Получение N-метил-2-[[4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]триимидин-4-карбоксамида (Соединения (13))



Смесь 4-(4-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамина (Трифторуксусная кислота (1)) (21,9 мг, 0,04798 ммоль), 2-хлор-N-метил-пиримидин-4-карбоксиамида (12,35 мг, 0,07197 ммоль) и Na_2CO_3 (120 мкл 2 М, 0,2400 ммоль) в воде (250 мкл) нагревали с обратным холодильником (100°C) в закрытой пробирке для микроволнового синтеза. Полученную смесь оставляли с перемешиванием на 72 ч. Неочищенную суспензию обрабатывали MeOH и несколькими каплями ТФУ и полученный раствор очищали с помощью обращено-фазовой Isco [50 г колонка C18 Aq; 0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (модификатор ТФУ)]. Целевые фракции объединяли и выпаривали. Образец растворяли в минимальном количестве смеси 1:1 MeOH/ CH_2Cl_2 и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL-HCO₃ МР. Фильтрат выпаривали с получением продукта (5,8 мг, 0,01154 ммоль, 24,05%) в виде бледно-желтого твердого вещества ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,87 (с, 1H), 8,49 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,75 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,34 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,18 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,79-4,69 (м, 1H), 4,03 (ддт, J=13,1, 7,8, 4,4 Гц, 1H), 3,89 (дд, J=5,7, 4,1 Гц, 4H), 3,42-3,27 (м, 4H), 3,05 (с, 3H), 3,01 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,31-2,16 (м, 2H), 2,13-2,00 (м, 2H), 2,00-1,75 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 477,24884, найдено 478,44 (M+1)⁺; время удерживания: 0,59 минуты.

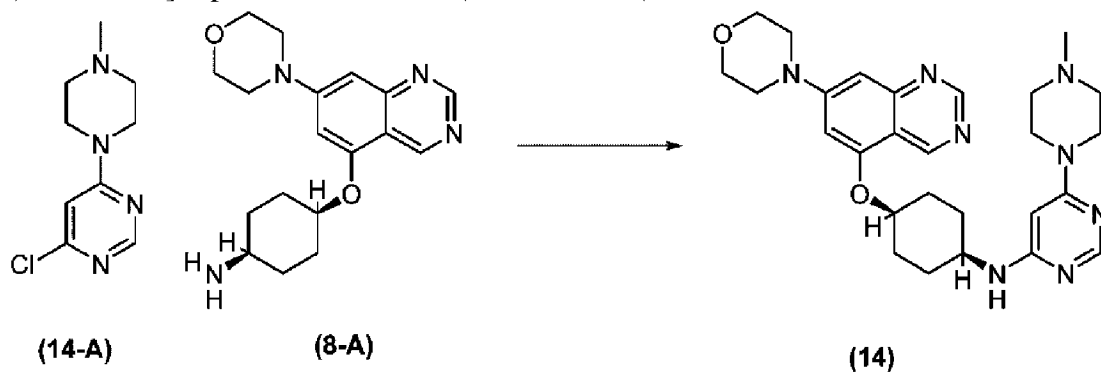
[00447] **Получение Соединения 14: 6-(4-метилпиперазин-1-ил)-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амин**

Получение 4-хлор-6-(4-метилпиперазин-1-ил)пиримидина (Соединения (14-A))



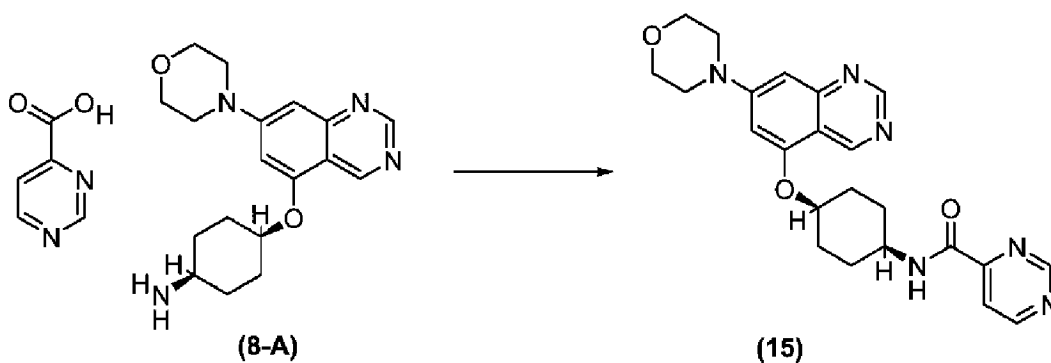
При 0°C к раствору 4,6-дихлорпиримидина (2,0 г, 13,42 ммоль) и Et₃N (1,494 г, 2,058 мл, 14,76 ммоль) в EtOH (40 мл) добавляли 1-метилпиперазин (1,344 г, 1,490 мл, 13,42 ммоль). Полученный раствор нагревали до комнатной температуры, затем перемешивали в течение 5 ч. Реакцию выпаривали в вакууме и делили между EtOAc и 1N NaOH. Слои разделяли и водную фазу дополнительно экстрагировали EtOAc (2× 30 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток растворяли в гексанах/EtOAc и оставляли на 5 дней, в течение которых образовывался осадок почти белого материала (не продукт). Твердую фазу отфильтровывали и выпаривали фильтрат с получением продукта. ¹H-ЯМР (CDCl₃) показала чистый требуемый 4-хлор-6-(4-метилпиперазин-1-ил)пиримидин (2,126 г, 9,896 ммоль, 73,75%) ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,37 (д, J=0,7 Гц, 1H), 6,49 (д, J=0,8 Гц, 1H), 3,67 (с, 4H), 2,56-2,41 (м, 4H), 2,34 (с, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 212,08287, найдено 213,14 (M+1)⁺; время удерживания: 0,39 минуты.

Получение 6-(4-метилпиперазин-1-ил)-N-[4-(7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амин (Соединения (14))



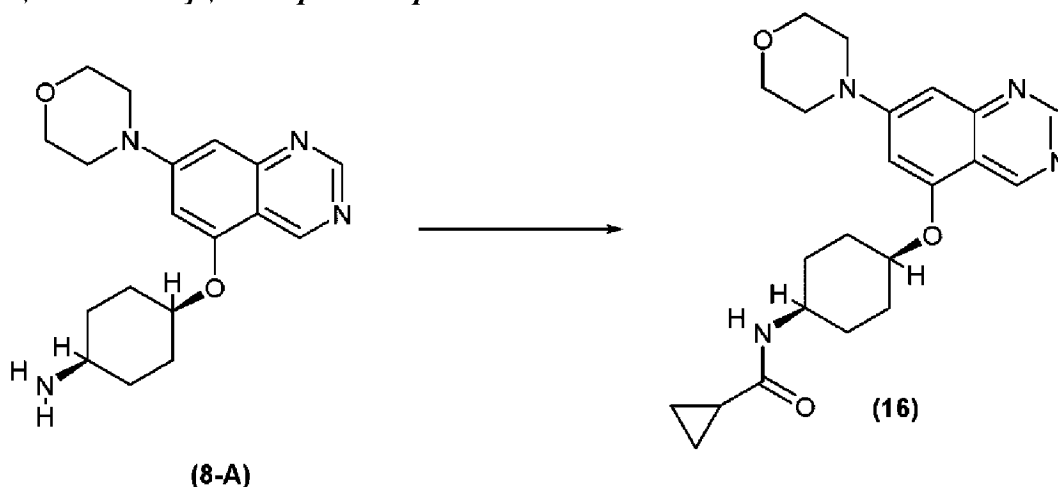
Суспензию 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (40 мг, 0,1218 ммоль), 4-хлор-6-(4-метилпиперазин-1-ил)-пиримидина (28,5 мг, 0,1340 ммоль), 4-хлор-6-(4-метилпиперазин-1-ил)пиримидина (28,5 мг, 0,1340 ммоль) и NaOtBu (35 мг, 0,3642 ммоль) в tBuOH (800 мкл) обрабатывали t-Bu XPhos палладациклом (8 мг, 0,01165 ммоль). Реакцию герметично закрывали и нагревали до 100°C в бане с алюминиевым бусами в течение 2 ч. Растворитель удаляли в токе N₂ и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0%→10% MeOH/CH₂Cl₂ [+0,1% Et₃N]). Целевые фракции объединяли и выпаривали с получением продукта (42,1 мг, 0,07509 ммоль, 61,65%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,42 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 8,18 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,77 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,44 (д, J=1,0 Гц, 1H), 4,85-4,62 (м, 2H), 3,97-3,74 (м, 5H), 3,60-3,55 (м, 4H), 3,45-3,27 (м, 4H), 2,52-2,46 (м, 4H), 2,33 (д, J=2,5 Гц, 3H), 2,26-2,15 (м, 2H), 2,05-1,91 (м, 2H), 1,91-1,64 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 504,2961, найдено 505,44 (M+1)⁺; время удерживания: 0,53 минуты.

[00448] *Получение Соединения 15: N-[4-(7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-карбоксамид*



К суспензии 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамина (40 мг, 0,1218 ммоль), пиримидин-4-карбоновой кислоты (23 мг, 0,1853 ммоль) и Et_3N (102 мкл, 0,7318 ммоль) в 1,4-диоксане (1,2 мл) по каплям добавляли ТЗР (235 мкл 50% в/об раствора в этилацетате, 0,3693 ммоль). Полученный раствор нагревали до 50°C в течение 20 ч. Растворитель удаляли в токе N_2 и неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле [12 г колонка Isco gold; линейный градиент 0→10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (+0,5% Et_3N)], но материал все еще содержал примеси. Материал растворяли/суспендировали в 2 мл ДМСО и очищали с помощью С18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха и растворяли остаток в 1:1 $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL- HCO_3 МР. Фильтрат выпаривали с получением N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-карбоксамид (20,9 мг, 0,04714 ммоль, 38,70%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 9,47 (с, 1H), 9,26 (д, $J=1,4$ Гц, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,97 (д, $J=5,0$ Гц, 1H), 8,12 (дд, $J=5,1, 1,5$ Гц, 1H), 8,02 (д, $J=8,2$ Гц, 1H), 6,82-6,75 (м, 1H), 6,58 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 4,83-4,73 (м, 1H), 4,20-4,07 (м, 1H), 3,95-3,82 (м, 4H), 3,43-3,31 (м, 4H), 2,33-2,17 (м, 2H), 2,06-1,82 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 434,20663, найдено 435,35 ($\text{M}+1$)+; время удерживания: 2,48 минуты.

[00449] **Получение Соединений 16:** N-[4-(7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]циклопропанкарбоксамид

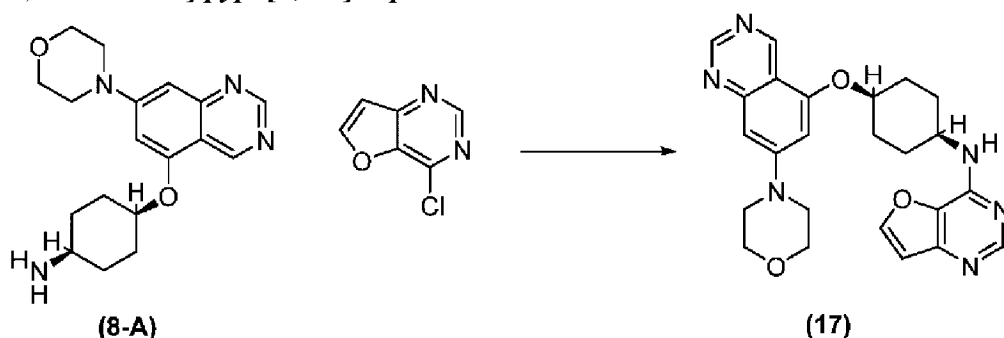


К раствору 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамина (40 мг, 0,1218 ммоль) в CH_3CN (1,0 мл) добавляли K_2CO_3 (20,21 мг, 0,1462 ммоль) с последующим

добавлением по каплям циклопропанкарбонилхлорида (12,73 мг, 11,05 мкл, 0,1218 ммоль). Полученную красно-оранжевую реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь выпаривали. Неочищенный остаток растворяли/суспендировали в 1:1 MeOH/H₂O, фильтровали через целит и подвергали C18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха, растворяли остаток в 1:1 MeOH/CH₂Cl₂ и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL-HCO₃ МР. Фильтрат выпаривали с получением

N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил] циклопропанкарбоксамид (7,2 мг, 0,01780 ммоль, 14,61%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,73-5,54 (м, 1H), 4,74 (т, J=3,9 Гц, 1H), 3,97 (ддд, J=14,9, 6,4, 4,1 Гц, 1H), 3,92-3,81 (м, 4H), 3,45-3,30 (м, 4H), 2,19 (дд, J=12,1, 2,7 Гц, 2H), 1,95-1,59 (м, 6H), 1,34 (тт, J=7,7, 4,6 Гц, 1H), 1,03-0,91 (м, 2H), 0,79-0,68 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 396,21616, найдено 397,44 (M+1)⁺; время удерживания: 0,58 минуты.

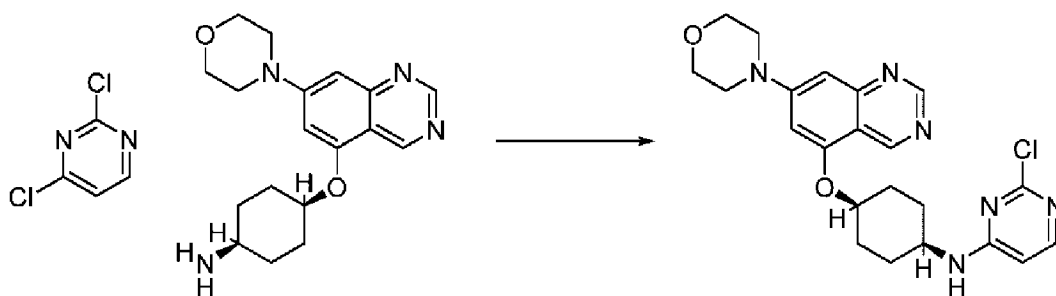
[00450] **Получение соединений 17:** N-[4-(7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]фууро[3,2-d]пиримидин-4-амин



Суспензию 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (40 мг, 0,1218 ммоль), 4-хлорфууро[3,2-d]пиримидина (21 мг, 0,1359 ммоль) и трет-бутилат натрия (35 мг, 0,3642 ммоль) дегазировали путем пропускания N₂ через смесь в течение 10 мин. Добавляли t-Bu XPhos палладацикл (8 мг, 0,01165 ммоль) и нагревали реакцию до 100°C в течение 16 ч. Реакционную смесь выпаривали, растворяли/суспендировали в 2 мл ДМСО, фильтровали через целит и очищали с помощью C18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха, растворяли остаток в 1:1 MeOH/CH₂Cl₂ и пропускали через картридж Stratospheres со смолой PL-HCO₃ МР. Фильтрат выпаривали с получением N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]фууро[3,2-d]пиримидин-4-амина (10,5 мг, 0,02116 ммоль, 17,38%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,49 (с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,51 (с, 1H), 7,76 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,87 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,82 (дд, J=2,2, 0,5 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,17 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,83 (д, J=2,9 Гц, 1H), 4,45-4,29 (м, 1H), 3,94-3,90 (м, 4H), 3,45-3,39 (м, 4H), 2,30 (д, J=9,4 Гц, 2H), 2,15-2,06 (м, 2H), 1,99-1,86 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 446,20663, найдено 447,12 (M+1)⁺; время удерживания: 0,55 минуты.

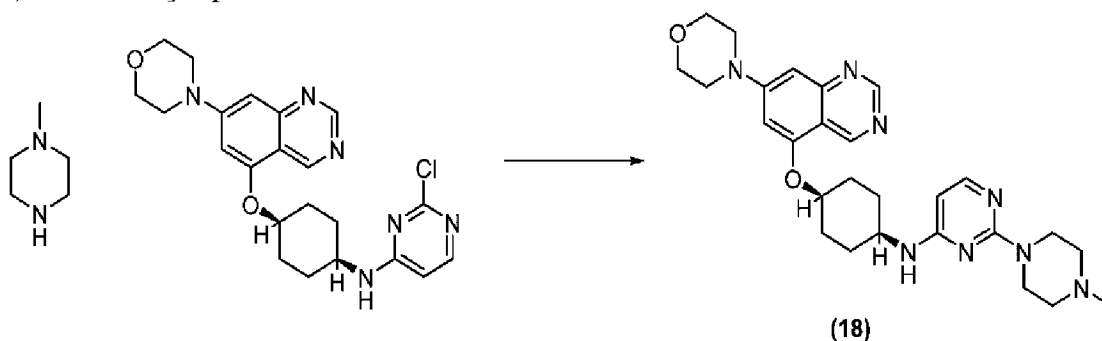
Получение Соединений 18: 2-(4-метилпиперазин-1-ил)-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амин

Получение 2-хлор-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексил]пиримидин-4-амина



Смесь 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (110 мг, 0,3349 ммоль), 2,4-дихлорпиримидина (55 мг, 0,3692 ммоль) и Na_2CO_3 (670 мкл 2 М, 1,340 ммоль) в воде (450 мкл) нагревали с обратным холодильником в закрытой пробирке для микроволнового синтеза в течение 16 ч, в это время материал собирался в большой шар (твердеющий после охлаждения). Супернатант удаляли пипеткой, твердое вещество дробили шпателем и промывали несколькими порциями воды. Твердое вещество растворяли в CH_2Cl_2 , раствор сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали до коричневатой-оранжевой пены. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0%→20% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 2-хлор-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амина (41,2 мг, 0,09344 ммоль, 27,89%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,41 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 7,99 (д, $J=5,7$ Гц, 1H), 6,79 (д, ($J=2,1$ Гц, 1H), 6,57 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,25 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 5,24 (д, $J=33,6$ Гц, 1H), 4,76 (д, $J=6,5$ Гц, 1H), 4,15-3,77 (м, 5H), 3,45-3,29 (м, 4H), 2,34-2,15 (м, 2H), 2,07-1,93 (м, 2H), 1,93-1,70 (м, 6H).

Получение 2-(4-метилпиперазин-1-ил)-N-[4-(7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амина

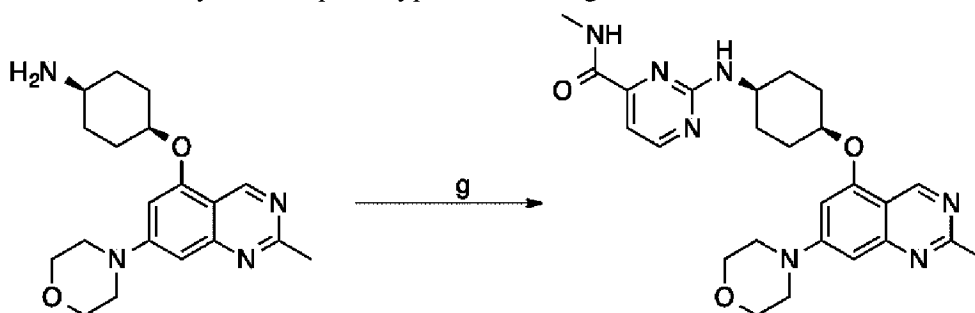


Смесь 2-хлор-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексил]пиримидин-4-амина (41,2 мг, 0,09344 ммоль), 1-метилпиперазина (25 мкл, 0,2254 ммоль) и основания Хюнига (40 мкл, 0,2296 ммоль) в $i\text{-PrOH}$ (700 мкл) нагревали до 170°C в микроволновом реакторе в течение 1 ч. $i\text{-PrOH}$ удаляли в вакууме. Неочищенный остаток растворяли в CH_2Cl_2 и вливали в насыщенный водный NH_4Cl . Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали CH_2Cl_2 . Объединенную органическую фазу промывали 1N NaOH и солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток очищали Isco (40 г колонка Gold; 0→60% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 2-(4-

метилпиперазин 1-ил)-N-[4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]пиримидин-4-амин (21,6 мг, 0,04152 ммоль, 44,44%). Полученный продукт растворяли в CH_3CN , кипятили с обратным холодильником и повторно выпаривали несколько раз для удаления остаточных растворителей. ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,89 (д, $J=5,8$ Гц, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,57 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 5,68 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 4,74 (с, 1H), 4,60 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 3,95-3,70 (м, 9H), 3,44-3,32 (м, 4H), 2,49-2,39 (м, 4H), 2,32 (с, 3H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,05-1,92 (м, 2H), 1,92-1,76 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 504,2961, найдено 505,49 ($M+1$)+; время удерживания: 0,53 минуты.

[00451] **Получение Соединения 19: N-метил-2-[4-(2-метил-7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексил]-пиримидин-4-карбоксиламид**

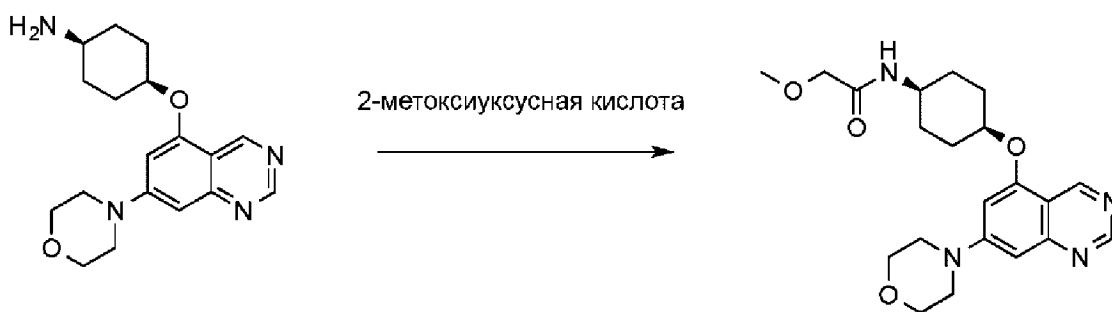
Соединение **19** получали, как показано на схеме синтеза Соединения **12** выше, но с использованием следующей процедуры в стадии g:



g) 2-хлор-N-метил-пиримидин-4-карбоксаид, трет-бутилат натрия, т-BuXPhos палладацикл, т-BuOH

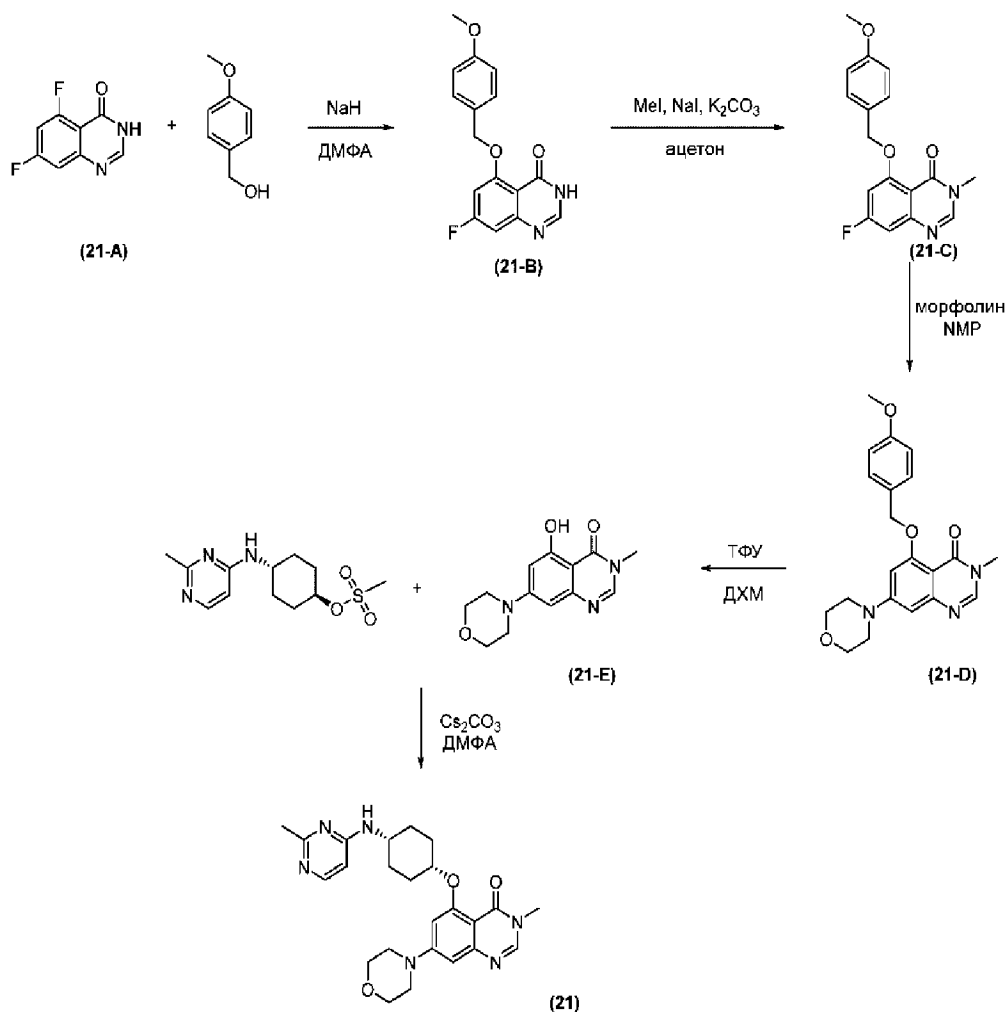
К смеси 4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксицикло-гексанамина (80 мг, 0,23 ммоль), хлор-N-метил-пиримидин-4-карбоксаида (68 мг, 0,4 ммоль) и т-бутил xPhos палладацикла 20 мг, 0,03 ммоль) в т-BuOH (2 мл) добавляли т-бутилат натрия (250 мкл 2 М, 0,50 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение ночи при 50°C. Реакционную смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле в градиенте 0-10% MeOH/ДХМ с получением целевого продукта. Продукт очищали с помощью C18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха и остаток пропускали через PL-HCO₃ MP SPE с получением N-метил-2-[4-(2-метил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-пиримидин-4-карбоксиламида (13,3 мг, 11,3%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,17 (с, 1H), 8,28 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 7,56 (с, 1H), 7,12 (дд, $J=4,8, 0,7$ Гц, 1H), 6,52 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 6,32 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,94 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,54 (д, $J=4,3$ Гц, 1H), 3,82 (дп, $J=13,9, 4,2$ Гц, 1H), 3,67 (дд, $J=5,9, 3,8$ Гц, 4H), 3,21-3,12 (м, 4H), 2,80 (д, $J=5,0$ Гц, 3H), 2,59 (с, 3H), 2,12-1,95 (м, 2H), 1,88-1,75 (м, 2H), 1,73-1,51 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 477,25, найдено 478,3 ($M+1$)+; время удерживания: 0,53 минуты.

[00452] **Получение Соединения 20: 2-метокси-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)ацетамид**



1-гидроксибензотриазол моногидрат (16 мг, 0,118 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)-N, N-диметил-пропан-1-амин (Хлороводородная кислота (1)) (35 мг, 0,183 ммоль) и 2-метоксиуксусную кислоту (8,8 мкл, 0,115 ммоль) объединяли в ДМФА (0,2 мл) под азотом при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 40 минут. Добавляли 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (25 мг, 0,0761 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 30 минут. Добавляли насыщенный бикарбонат натрия и экстрагировали смесь EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×), солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью хроматографии на 4 г силикагеля при использовании градиента 0-10% метанола/ДХМ. Получали 2-метокси-N-(((1S,4S)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)-ацетамид (10 мг), (выход 33%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,45 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,79 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 6,57 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,52 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,75 (п, $J=3,2$ Гц, 1H), 4,06-3,93 (м, 1H), 3,94-3,84 (м, 6H), 3,45 (с, 3H), 3,42-3,33 (м, 4H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,93-1,61 (м, 6H). ЭРИ-МС $m/z=401,32$ ($M+1$) $^+$.

[00453] *Получение 3-метил-5-[4-[(2-метилпиримидин-4-ил)-амино]циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-она: Соединение 21*



Получение 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она: Соединение (21-B)

К раствору (4-метоксифенил)метанола (10,69 г, 77,39 ммоль) в ДМФА (200 мл) при 0°C порциями добавляли NaH (6,89 г, 172,3 ммоль) в течение 5 минут, затем нагревали до комнатной температуры в течение 30 минут. Реакцию охлаждали до 0°C и порциями добавляли 5,7-дифтор-3H-хиназолин-4-он (23,78 г, 114,9 ммоль) в течение 5 минут. Реакцию перемешивали при этой температуре в течение 30 минут, затем нагревали до комнатной температуры в течение ночи. Реакцию сочли прошедшей не полностью, поэтому добавляли 0,96 мл спирта и 680 мг NaH и перемешивали реакцию при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакцию все еще считали прошедшей не полностью, поэтому еще 0,96 мл спирта и 680 мг NaH и перемешивали реакцию при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию разбавляли водой и доводили pH до 5 уксусной кислотой. Полученное твердое вещество отфильтровывали и промывали водой и Et₂O, затем сушили в вакууме с получением 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она (23,45 г, выход 100%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,00 (с, 1H), 7,54-7,46 (м, 2H), 7,00-6,83 (м, 4H), 5,16 (с, 2H), 3,76 (с, 3H).

Получение 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-хиназолин-4-она: Соединение (21-C)

В сосуд для микроволнового синтеза Biotage объемом 10 мл, снабженный

магнитным перемешивающим элементом, вносили 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3Н-хиназолин-4-он (406 мг, 1,352 ммоль), MeI (193,9 мг, 85,04 мкл, 1,366 ммоль), NaI (20,00 мг, 0,1334 ммоль) и K₂CO₃ (935,9 мг, 6,772 ммоль) в ацетоне (10 мл). Сосуд герметично закрывали тefлоновым колпачком с диафрагмой и нагревали до 100°C в микроволновом реакторе в течение 15 минут. Реакцию фильтровали и выпаривали в вакууме. Остаток очищали на обращенно-фазовой колонке C18 с дериватизированным силикагелем при использовании 10-50% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли, нейтрализовали добавлением NaHCO₃ (нас) и экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-хиназолин-4-она (227 мг, выход 53,4%). ЭРИ-МС m/z вычисл. 314,10666, найдено 315,09 (M+1)⁺.

Получение 5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-7-морфолино-хиназолин-4-она: Соединение (21-D)

Раствор 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-хиназолин-4-она (80 мг, 0,25 ммоль) и морфолина (430 мкл, 4,9 ммоль) в безводном NMP (1 мл) нагревали при 120°C в течение 18 часов. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Осадок отфильтровывали и промывали водой, затем сушили в вакууме с получением 5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-7-морфолино-хиназолин-4-она (60 мг, выход 64%). ЭРИ-МС m/z вычисл. 381,16885, найдено 382,21 (M+1)⁺.

Получение 3-метил-5-[4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]-циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-она: Соединение (21-E)

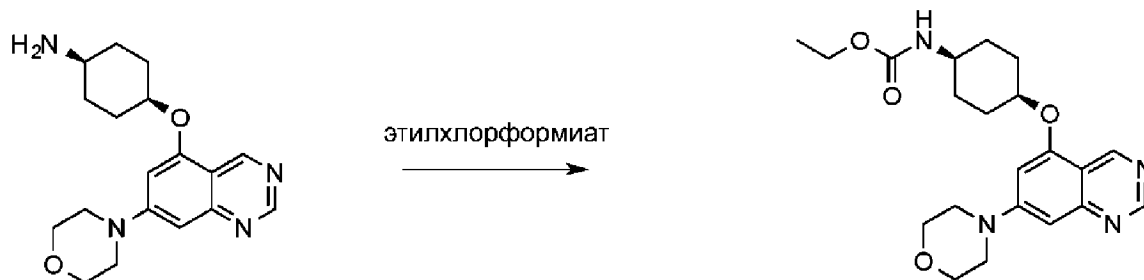
Раствор 5-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-7-морфолино-хиназолин-4-она (60 мг, 0,16 ммоль) и ТФУ (0,5 мл, 6,5 ммоль) в ДХМ (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме с получением 5-гидрокси-3-метил-7-морфолино-хиназолин-4-она. ЭРИ-МС m/z вычисл. 261,11133, найдено 262,07 (M+1)⁺.

Получение 3-метил-5-[4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]-циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-она: Соединение (21)

В сосуд для микроволнового синтеза, снабженный магнитным перемешивающим элементом, вносили 5-гидрокси-3-метил-7-морфолино-хиназолин-4-он (60,9 мг, 0,2331 ммоль), [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфонат (200 мг, 0,7009 ммоль) и Cs₂CO₃ (380 мг, 1,17 ммоль) в ДМФА (3 мл). Сосуд герметично закрывали тefлоновым колпачком с диафрагмой и нагревали в микроволновом реакторе при 120°C в течение 10 минут. Добавляли 50 мг [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]-метансульфоната и нагревали в микроволновом реакторе при 120°C в течение 10 минут. Реакцию нагревали в микроволновом реакторе при 120°C еще в течение 5 минут. Реакцию фильтровали и очищали с помощью обращенно-фазовой колонки C18 с дериватизированным SiO₂ при использовании 10-50% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO₃ (нас) и

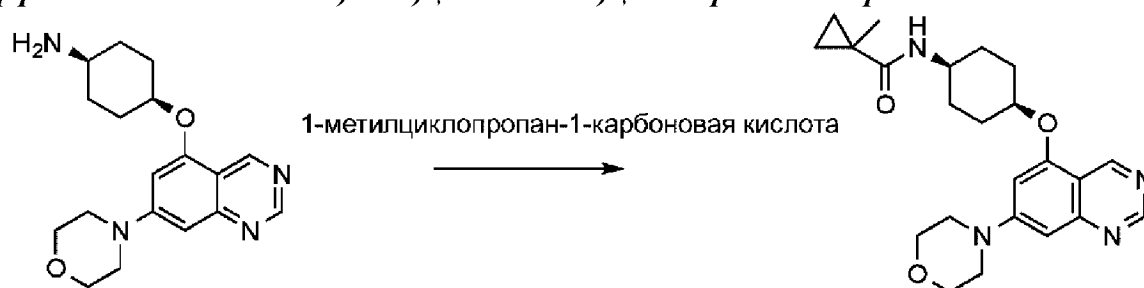
затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали соевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали с получением 3-метил-5-[4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексокси]-7-морфолино-хиназолин-4-она (32,6 мг, выход 30,8%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,08 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 7,93 (с, 1H), 6,65 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,48 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,18 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 5,22 (с, 1H), 4,72 (с, 1H), 3,97-3,81 (м, 4H), 3,53 (д, $J=10,6$ Гц, 3H), 3,40-3,25 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,23 (д, $J=12,9$ Гц, 2H), 2,05-1,70 (м, 7H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 450,23795, найдено 451,33 ($M+1$) $^+$.

[00454] **Получение Соединения 22: этил-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)карбамат.**



К охлаждаемому льдом раствору 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (25 мг, 0,076 ммоль) и ТЭА (32 мкл, 0,230 ммоль) в ДХМ (800 мкл) добавляли этилхлорформат (10,9 мкл, 0,114 ммоль). Оставляли с перемешиванием на 30 мин. Реакцию разбавляли ДХМ и добавляли насыщенный (водн) раствор бикарбоната натрия. Смесь пропускали через разделитель фаз и органическую фазу выпаривали при пониженном давлении. Подвергали хроматографии на колонке с 4 г силикагеля при использовании 0-10% $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$ в качестве элюента и затем очищали с помощью C_{18} препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха и остаток пропускали через PL-HCO_3 MP SPE с получением этил-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)карбамата (2,3 мг, выход 7%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,41 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,56 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,78-4,56 (м, 2H), 4,12 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,66 (д, $J=9,7$ Гц, 1H), 3,46-3,31 (м, 4H), 2,25-2,08 (м, 2H), 1,90 (дт, $J=12,5$, 4,1 Гц, 2H), 1,84-1,61 (м, 4H), 1,25 (т, $J=7,1$ Гц, 3H). ЭРИ-МС $m/z=401,32$ ($M+1$) $^+$.

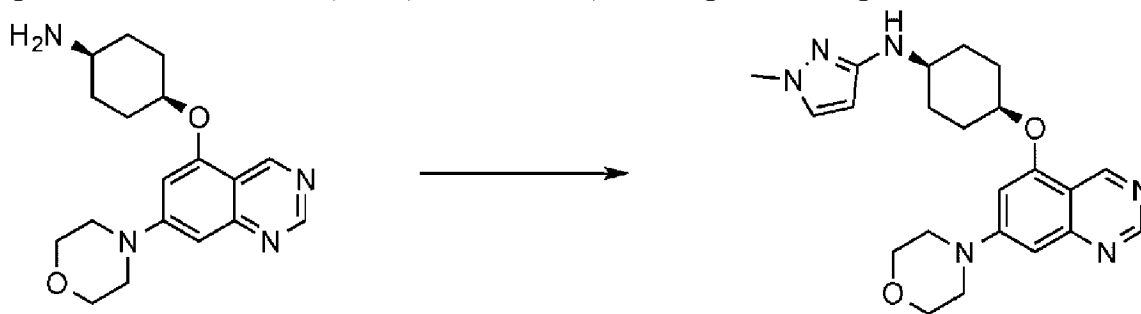
[00455] **Получение Соединения 23: 1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)циклопропан-1-карбоксамид**



1-гидроксибензотриазол моногидрат (16 мг, 0,118 ммоль), 3-(этилинометиленамино)-N, N-диметил-пропан-1-амин (Хлороводородная кислота (1))

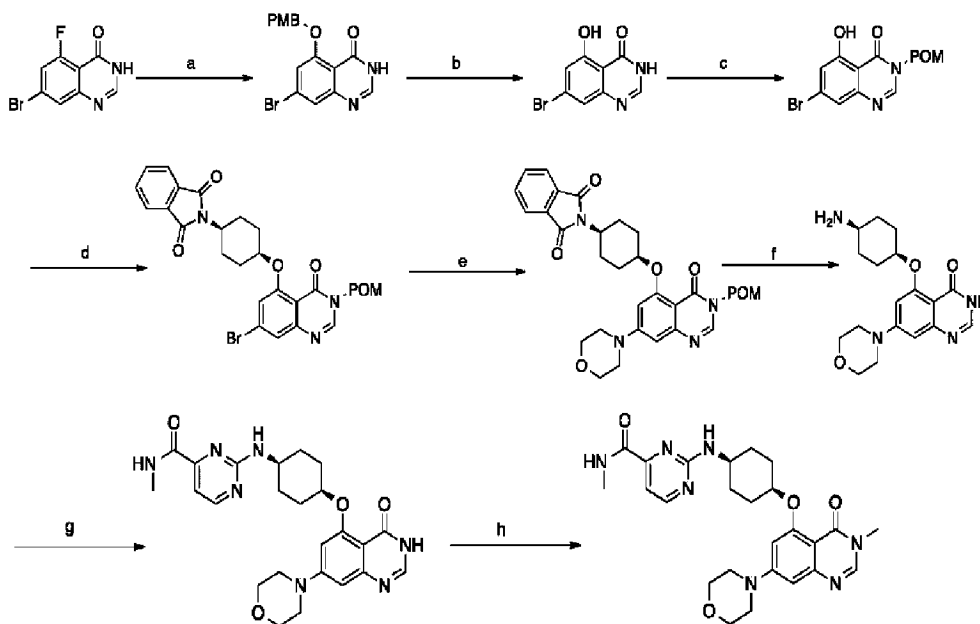
(35 мг, 0,183 ммоль) и 1-метилциклопропан-1-карбоновую кислоту (12 мг, 0,1199 ммоль) объединяли в ДМФА (0,2 мл) под азотом при комнатной температуре и оставляли с перемешиванием на 40 мин. Добавляли 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (25 мг, 0,0761 ммоль) и продолжали перемешивание еще 30 минут. Добавляли насыщенный бикарбонат натрия и экстрагировали смесь EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×), соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью хроматографии на 4 г силикагеле при использовании градиента 0-10% метанола/ДХМ. Получали 1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)-циклогексил)циклопропан-1-карбоксамид (13 мг, выход 40%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,46 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,85-6,74 (м, 1H), 6,56 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,67 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,74 (т, J=3,2 Гц, 1H), 4,04-3,80 (м, 5H), 3,47-3,32 (м, 4H), 2,28-2,14 (м, 2H), 1,96-1,83 (м, 2H), 1,83-1,51 (м, 4H), 1,35 (с, 3H), 1,19 (к, J=3,8 Гц, 2H), 0,65-0,53 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z=411,31 (M+1)+.

[00456] *Получение Соединения 24: 1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)циклопропан-1-карбоксамид*



В пробирке для микроволнового синтеза объемом 2 мл смесь 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (27 мг, 0,082 ммоль), 3-бром-1-метилпиразола (9,5 мкл, 0,0999 ммоль), аллил(хлор)палладия (0,8 мг, 0,004 ммоль), ди-трет-бутил(2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-[1,1'-бифенил]-2-ил)фосфана (4 мг, 0,008 ммоль) и 2 метилпопан-2-олата натрия (83 мкл 2М в тетрагидрофуране, 0,166 ммоль) в tBuOH (400 мкл) нагревали до 90°C и оставляли на ночь с перемешиванием. Реакцию разбавляли ДХМ, фильтровали через целит и выпаривали фильтрат при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на 12 г силикагеля при использовании 0-10% MeOH/ДХМ в качестве элюента с получением 1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)-окси)циклогексил)-1H-пиразол-3-амина (12,5 мг, 36%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,43 (д, J=1,5 Гц, 1H), 9,09 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,10 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 5,53 (т, J=2,0 Гц, 1H), 4,76-4,66 (м, 1H), 3,88 (дт, J=5,0, 3,0 Гц, 4H), 3,72 (д, J=1,5 Гц, 3H), 3,49-3,33 (м, 5H), 2,18 (дд, J=13,8, 4,1 Гц, 3H), 1,99 (дт, J=11,7, 3,7 Гц, 2H), 1,89-1,63 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z=409,33 (M+1)+.

[00457] *Получение Соединения 25: N-метил-2-[[4-(3-метил-7-морфолино-4-оксо-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамид*



Стадия а

К раствору (4-метоксифенил)метанола (5 мл, 40,1 ммоль) в ДМФА (50 мл) добавляли NaH (3 г, 75,0 ммоль) и перемешивали полученную смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 7-бром-5-фтор-3Н-хиназолин-4-он (5 г, 20,6 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 2 ч при комнатной температуре. Смесь разбавляли H₂O (100 мл) и нейтрализовали уксусной кислотой до pH5. Образовавшийся осадок собирали с помощью вакуумной фильтрации, промывали H₂O, Et₂O и сушили в вакууме в течение ночи. В результате получали [7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3Н-хиназолин-4-он (7 г, 95%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,01 (с, 1H), 7,49 (д, J=8,6 Гц, 2H), 7,36 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,26 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,02-6,89 (м, 2H), 5,20 (с, 2H), 3,76 (с, 3H).

Стадия b

К раствору 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3Н-хиназолин-4-она (7 г, 19,4 ммоль) в ДХМ (30 мл) добавляли ТФУ (15 мл, 194,7 ммоль) и перемешивали полученный раствор в течение 30 мин. Смесь выпаривали, разбавляли H₂O, нейтрализовали раствором NaHCO₃ и фильтровали для сбора твердого вещества. Твердое вещество сушили в вакууме в течение ночи с получением 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3Н-хиназолин-4-она (4,5 г, 98%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,16 (с, 1H); 7,26 (д, J=1,8 Hz, 1H), 7,03 (д, J=1,8 Hz, 1H), 3,6 (ш, 1H).

Стадия с

К суспензии NaH (1,9 г, 47,7 ммоль) в ДМФА (30 мл) при 0°C медленно добавляли 7-бром-5-гидрокси-3Н-хиназолин-4-он (5 г, 20,7 ммоль) и перемешивали полученную смесь при комнатной температуре в течение 20 мин. Смесь охлаждали до 0°C и затем добавляли POMCl (9,4 г, 9 мл, 62,2 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь вливали в раствор уксусной кислоты (10 мл) в H₂O (100 мл). Осадок отфильтровывали и растворяли в ДХМ, сушили над Na₂SO₄ и выпаривали. Неочищенный

продукт очищали на 120 г картридже с силикагелем при элюировании 0-25% EtOAc/гептаном и получали (7-бром-5-гидрокси-4-оксо-хиназолин-3-ил)метил-2,2-диметилпропаноат (4,5 г, 61%) ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 11,35 (д, $J=1,1$ Гц, 1H), 8,21 (д, $J=1,1$ Гц, 1H), 7,39 (т, $J=1,4$ Гц, 1H), 7,15 (т, $J=1,5$ Гц, 1H), 5,90 (д, $J=1,1$ Гц, 2H), 1,23 (д, $J=1,2$ Гц, 9H).

Стадия d

К смеси (7-бром-5-гидрокси-4-оксо-хиназолин-3-ил)метил-2,2-диметилпропаноата (3,5 г, 9,85 ммоль), PPh_3 (4,1 г, 15,8 ммоль) и 2-(4-гидроксициклогексил)изоиндолин-1,3-диона (2,8 г, 11,4 ммоль) в ТГФ (35 мл) по каплям добавляли DIAD (3,2 г, 3,1 мл, 15,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь выпаривали, очищали с помощью хроматографии на колонке с силикагелем при элюировании EtOAc/гептаном. В результате получали [7-бром-5-[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-циклогексокси]-4-оксо-хиназолин-3-ил]метил-2,2-диметилпропаноат (4,2 г, 73%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,22 (д, $J=1,4$ Гц, 1H), 7,73 (тт, $J=5,2, 3,7$ Гц, 2H), 7,65-7,57 (м, 2H), 7,40 (т, $J=1,7$ Гц, 1H), 7,00 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 5,90 (д, $J=1,4$ Гц, 2H), 4,65 (с, 1H), 4,16 (тт, $J=12,9, 3,9$ Гц, 1H), 2,80 (дт, $J=15,5, 12,0$ Гц, 2H), 2,29 (д, $J=14,5$ Гц, 2H), 1,74-1,52 (м, 5H), 1,16 (д, $J=1,5$ Гц, 9H).

Стадия e

Смесь [7-бром-5-[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)цикло-гексокси]-4-оксо-хиназолин-3-ил]метил-2,2-диметилпропаноата (500 мг, 0,86 ммоль), морфолина (83 мг, 85 мкл, 1,0 ммоль), карбоната цезия (566 мг, 1,7 ммоль), рац-BINAP (107 мг, 0,17 ммоль) в 1,4-диоксане (5,0 мл) барботировали N_2 в течение 5 мин. Смесь нагревали в течение 15 минут в микроволновом реакторе при 150°C . Смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита и выпаривали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании 0-20% ДХМ/EtOAc с получением [5-[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)циклогексокси]-7-морфолино-4-оксо-хиназолин-3-ил]метил-2,2-диметилпропаноата (56 мг, 11%). ЭРИ-МС m/z вычисл. 588,26, найдено 589,3 ($\text{M}+1$)+; время удерживания: 0,78 минуты.

Стадия f

К раствору [5-[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)циклогексокси]-7-морфолино-4-оксо-хиназолин-3-ил]метил-2,2-диметилпропаноата (56 мг, 0,1 ммоль) в MeOH (5 мл) добавляли NH_2NH_2 (100 мкл, 3,2 ммоль) и перемешивали полученный реакционный раствор при 70°C в течение 90 мин. После охлаждения до комнатной температуры смесь выпаривали и очищали на 4 г картридже с силикагелем при элюировании 0-10% (7H NH_3/MeOH)/ДХМ с получением требуемого 5-(4-амино-циклогексокси)-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она (30 мг, 91%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,93 (с, 1H), 6,64 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,41 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 3,86 (т, $J=4,9$ Гц, 4H), 3,31 (т, $J=5,0$ Гц, 4H), 3,11 (тд, $J=8,9, 7,1, 3,4$ Гц, 1H), 2,12 (д, $J=13,6$ Гц, 2H), 2,03-1,91 (м, 2H), 1,82 (д, $J=10,8$ Гц, 2H), 1,58 (т, $J=13,2$ Гц, 2H).

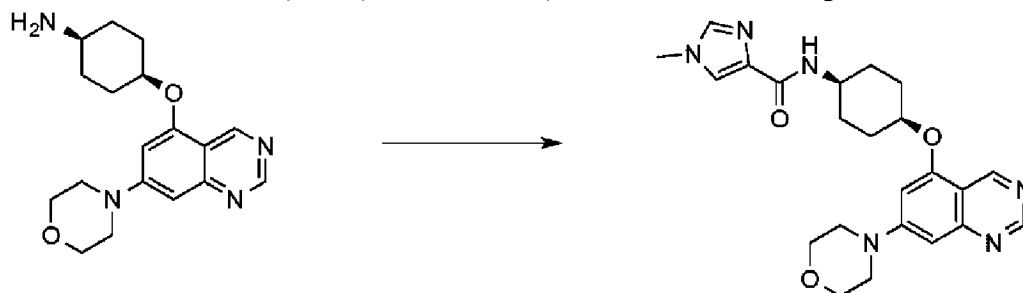
Стадия g

Смесь 5-(4-аминоциклогексокси)-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она (30 мг, 0,14 ммоль), 2-хлор-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (30 мг, 0,17 ммоль) и K_2CO_3 (100 мг, 0,72 ммоль) в H_2O (2 мл) перемешивали при 100°C в течение 18 ч. Смесь экстрагировали ДХМ, сушили над Na_2SO_4 , выпаривали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании 0-10% $MeOH/ДХМ$. В результате получали N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]циклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамид (15 мг, 35,9%). 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,48 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 8,05 (с, 1H), 7,97-7,78 (м, 2H), 7,31 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 6,73 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,49 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 4,04 (с, 1H), 3,93-3,81 (м, 4H), 3,50 (с, 1H), 3,43-3,29 (м, 4H), 3,00 (д, $J=5,1$ Гц, 3H), 2,29-2,17 (м, 2H), 2,11-1,97 (м, 2H), 1,92 (дк, $J=12,7, 4,2$ Гц, 2H), 1,85-1,70 (м, 2H).

Стадия h

К смеси N-метил-2-[[4-[(7-морфолино-4-оксо-3H-хиназолин-5-ил)окси]циклогексил]амино]-пиримидин-4-карбоксамида (15 мг, 0,031 ммоль), K_2CO_3 (80 мг, 0,58 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли MeI (50 мкл, 0,80 ммоль) и перемешивали при 70°C в течение 30 мин. Растворитель выпаривали и неочищенный продукт очищали на 4 г картридже с силикагелем при элюировании 0-10% $MeOH/ДХМ$. Полученный продукт содержал примеси. Продукт подвергали разделению СФХ с получением N-метил-2-[[4-(3-метил-7-морфолино-4-оксо-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]пиримидин-4-карбоксамида (2 мг, 16,3%). 1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,47 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,28 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 6,63 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,47 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 5,32 (с, 1H), 4,67 (с, 1H), 3,99 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 3,92-3,80 (м, 4H), 3,50 (с, 3H), 3,37-3,23 (м, 4H), 3,01 (д, $J=5,1$ Гц, 3H), 2,27-2,15 (м, 2H), 2,07-1,95 (м, 2H), 1,90 (дд, $J=13,0, 4,2$ Гц, 2H), 1,79 (т, $J=12,8$ Гц, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 493,24374, найдено 494,37 ($M+1$)⁺; время удерживания: 0,6 минуты.

[00458] *Получение* *Соединения* **26:** **1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)-1H-имидазол-4-карбоксамид**



1-гидроксibenзотриазол моногидрат (16 мг, 0,118 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)-N, N-диметил-пропан-1-амин (Хлороводородная кислота (1)) (35 мг, 0,183 ммоль) и 1-метил-1H-имидазол-4-карбоновую кислоту (15 мг, 0,119 ммоль) объединяли в ДМФА (0,2 мл) под азотом при комнатной температуре и оставляли с перемешиванием на 40 мин. Добавляли 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (25 мг, 0,0761 ммоль) и продолжали перемешивание еще 30

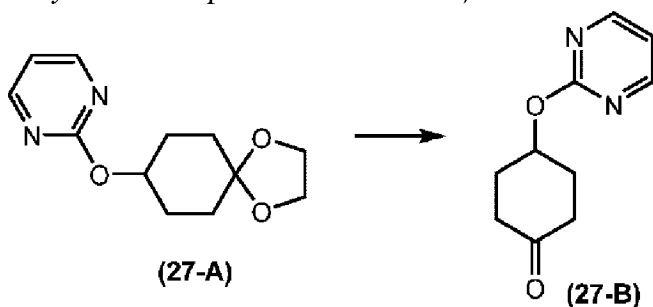
минут. Добавляли насыщенный бикарбонат натрия и экстрагировали смесь EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×), соевым раствором, сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью хроматографии на 4 г силикагеля при использовании градиента 0-10% метанола/ДХМ с получением 1-метил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)-окси)циклогексил)-1H-имидазол-4-карбоксамида (6 мг, 17%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,44 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 7,51 (д, J=1,3 Гц, 1H), 7,40-7,34 (м, 1H), 7,09 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,78 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,74 (д, J=3,9 Гц, 1H), 4,11 (тq, J=9,9, 6,2, 5,3 Гц, 1H), 3,89 (дд, J=5,9, 3,9 Гц, 4H), 3,73 (с, 3H), 3,43-3,33 (м, 4H), 2,29-2,17 (м, 2H), 2,04-1,73 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z=433.05 (M+1)+.

[00459] *Получение Соединения 27:*

Получение 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илокси)пиримидина: Соединение (27-A)

К суспензии NaH (370,1 мг, 9,254 ммоль) (60% в минеральном масле) в DMA (2 мл), охлаждаемой в ледяной бане, добавляли раствор 1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ола (1 г, 6,321 ммоль) в DMA (10 мл) и имидазоле (43 мг). После перемешивания при кт в течение 30 мин, добавляли 2-хлорпиримидин (868,7 мг, 7,585 ммоль) и перемешивали смесь в течение 30 мин при кт в течение 2 ч, затем при 60°C в течение 1 ч. Затем реакцию разбавляли EtOAc, промывали H₂O, сушили над Na₂SO₄ и выпаривали. Очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г силикагеля, 0-50% EtOAc/гептан) с получением 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илокси)пиримидина (3,20 г, 6,230 ммоль, 98,59%), который использовали в таком виде в следующей реакции. ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,43 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,83 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,06 (тт, J=6,5, 4,2 Гц, 1H), 4,06-3,75 (м, 4H), 1,98-1,77 (м, 6H), 1,64-1,55 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 236,11609, найдено 237,22 (M+1)+; время удерживания: 0,72 минуты.

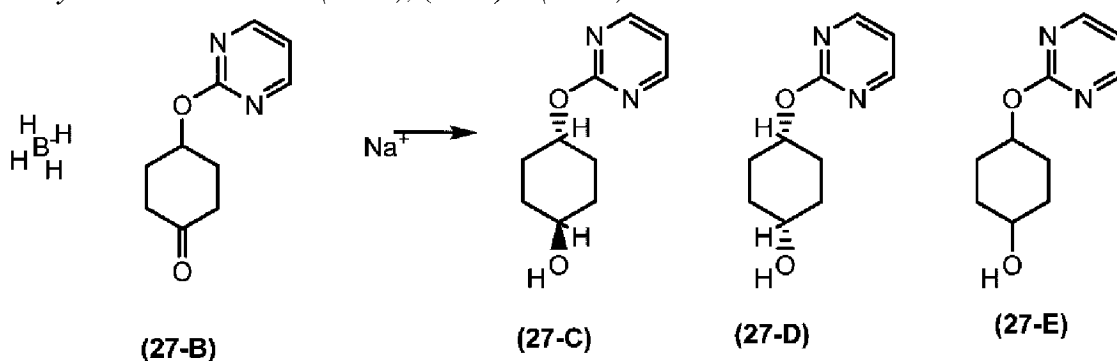
Получение 4-пиримидин-2-илоксициклогексанона: Соединение (27-B)



К раствору 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илокси)пиримидина (1,10 г, 4,656 ммоль) в диоксане (6 мл) добавляли HCl (7,883 мл 6 М, 47,30 ммоль). После перемешивания в течение 2 дней реакционную смесь выпаривали, нейтрализовали насыщ. водным раствором NaHCO₃, экстрагировали ДХМ (3×), сушили над MgSO₄, фильтровали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г силикагеля, 0-100% EtOAc/гептан) с получением 4-пиримидин-2-илоксициклогексанона (800 мг, 4,162 ммоль, 89,39%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,56 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,98 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,47 (тт, J=6,4, 3,3 Гц, 1H), 2,88-2,62 (м, 2H), 2,51-2,28 (м, 5H), 2,30-2,11 (м, 2H). ЭРИ-МС

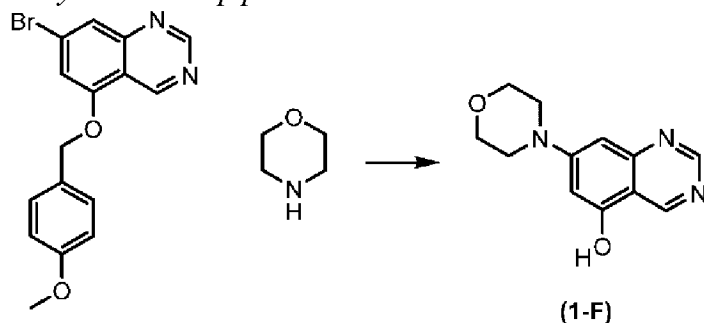
m/z вычисл. 192,08987, найдено 193,07 ($M+1$)+; время удерживания: 0,6 минуты.

Получение соединений **(27-C)**, **(27-D)** и **(27-E)**



К раствору Соединения **(27-B)** (383 мг, 1,993 ммоль) в MeOH (2 мл) добавляли борогидрид натрия (151 мг, 3,991 ммоль). Наблюдали умеренное выделение газа с небольшим повышением температуры. Реакцию оставляли с перемешиванием на 1 час, после чего останавливали HCl (6Н 0,70 мл) и продолжали перемешивание до прекращения выделения газа. Смесь подщелачивали до pH~8 1Н NaOH и экстрагировали EtOAc (20 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Получали 248 мг 4-пиримидин-2-илоксициклогексанола. 12 мг образца очищали с помощью препаративной ВЭЖХ хроматографии (градиент 10-90% CH₃CN/вода) для разделения цис/транс изомеров. Транс-4-пиримидин-2-илоксициклогексанол: ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,54 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,95 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,05 (тт, J=9,4, 4,0 Гц, 1H), 3,91-3,75 (м, 1H), 2,26-1,99 (м, 4H), 1,76-1,41 (м, 4H). Цис-4-пиримидин-2-илоксициклогексанол: ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=4,9 Гц, 2H), 7,04 (т, J=4,9 Гц, 1H), 5,21 (тт, J=5,3, 2,6 Гц, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,85 (п, J=5,9 Гц, 1H), 2,17-2,02 (м, 2H), 1,88-1,67 (м, 6H).

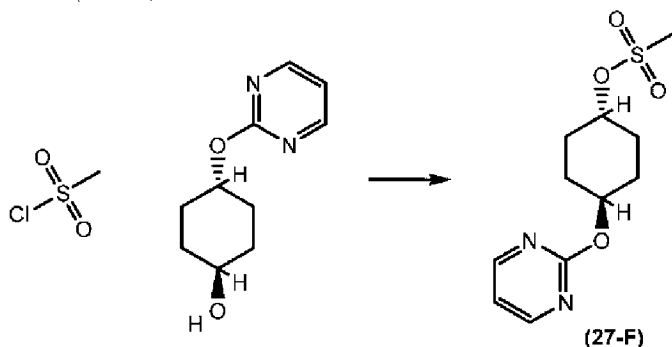
Получение 7-морфолинохиназолин-5-ола: Соединение **(1-F)**



Суспензию 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолина (300 мг, 0,8691 ммоль), Pd(OAc)₂ (18 мг, 0,08017 ммоль) и RuPhos (81,10 мг, 0,1738 ммоль) в 1,4-диоксане (5 мл) в сосуде для микроволнового синтеза объемом 20 мл барботировали N₂. Добавляли морфолин (113,6 мг, 113,7 мкл, 1,304 ммоль), затем трет-бутилат натрия (250,5 мг, 2,607 ммоль). Сосуд закрывали и нагревали при 100°C в течение 19 ч. Добавляли водный NH₄Cl и экстрагировали смесь EtOAc (6х). Объединенную органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали. Неочищенный продукт дополнительно очищали два раза с помощью хроматографии на силикагеле (4 г+12 г силикагеля, 0-10% MeOH/ДХМ) с

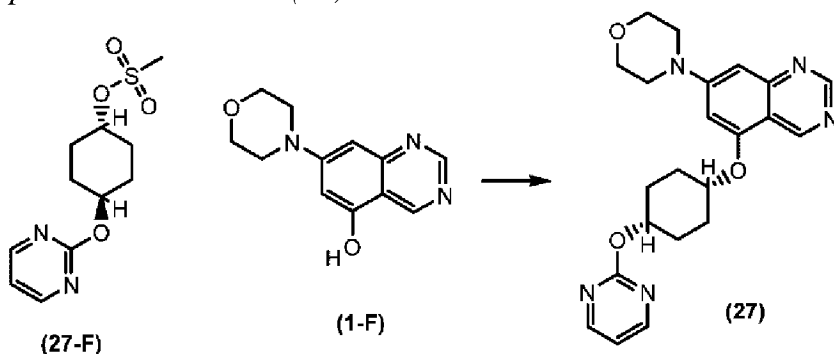
получением 7-морфолинохиназолин-5-ола (147 мг, 0,6357 ммоль, 73,14%). ^1H -ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 10,86 (с, 1H), 9,23 (с, 1H), 8,93 (с, 1H), 6,72 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 6,66 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 3,76 (т, $J=4,9$ Гц, 4H), 3,33 (дд, $J=6,2, 3,4$ Гц, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 231,10078, найдено 232,22 ($M+1$)+; время удерживания: 0,49 минуты.

Получение транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)-метансульфоната:
Соединение (27-F)



Раствор транс-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола (80 мг, 0,4119 ммоль) (из FC1), ТЭЕ (125,1 мг, 172,3 мкл, 1,236 ммоль) в ДХМ (5 мл) обрабатывали метансульфонилхлоридом (70,77 мг, 47,82 мкл, 0,6178 ммоль) в течение 1 ч. Реакционную смесь выпаривали и остаток очищали с помощью флеш-хроматографии (4 г силикагеля, 0-30% EtOAc/ДХМ) с получением транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (74 мг, 0,2717 ммоль, 65,95%). ^1H -ЯМР (300 МГц, Хлороформ- d) δ 8,43 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 6,86 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,05 (тт, $J=6,6, 3,4$ Гц, 1H), 4,78 (тт, $J=7,0, 3,2$ Гц, 1H), 2,17-1,93 (м, 5H), 1,82 (тдд, $J=13,0, 5,7, 3,5$ Гц, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 272,08307, найдено 273,12 ($M+1$)+; время удерживания: 0,76 минуты.

Получение 4-[5-цис-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)-хиназолин-7-ил]морфолина: Соединение (27)

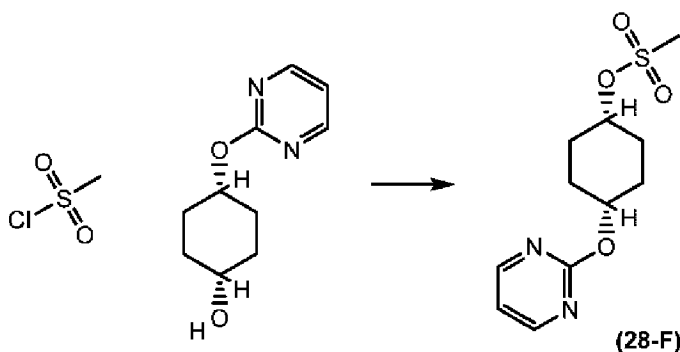


Смесь транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метан-сульфоната (58,7 мг, 0,2156 ммоль), 7-морфолинохиназолин-5-ола (40 мг, 0,1730 ммоль) и Cs_2CO_3 (67,64 мг, 0,2076 ммоль) в Диоксане (1 мл) и ДМФА (1 мл) закрывали в пробирке для микроволнового синтеза объемом 5 мл и нагревали до 110°C в течение 15 ч. Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ/MeOH 9:1 и фильтровали через целит. Фильтрат выпаривали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (2×4 г силикагеля, 0-5% MeOH/ДХМ) с получением 4-[5-цис-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)хиназолин-7-ил]морфолина (45 мг, 0,0994 ммоль, 57,45%). ^1H -ЯМР

(300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,53 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,93 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,60 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,20 (дк, J=7,6, 3,7 Гц, 1H), 4,67 (дт, J=6,3, 3,1 Гц, 1H), 3,99-3,79 (м, 4H), 3,51-3,15 (м, 4H), 2,38-2,06 (м, 4H), 2,11-1,78 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 407,19574, найдено 408,35 (M+1)⁺; время удерживания: 0,63 минуты.

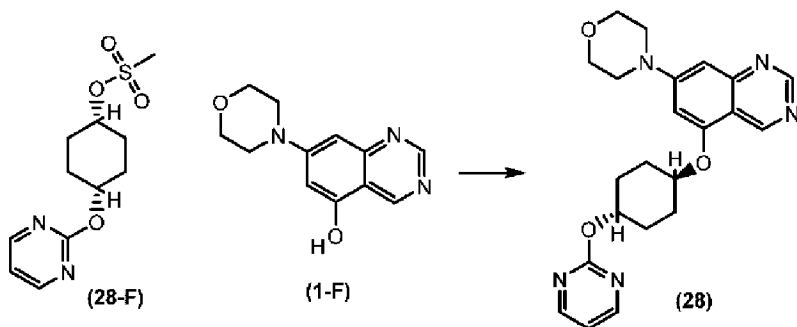
[00460] **Получение Соединения 28:** **4-[5-транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)хиназолин-7-ил]морфолин**

Получение цис-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метан-сульфоната: Соединение (27-F)



К раствору цис-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола (160 мг, 0,8238 ммоль) (FC2) и ТЭА (250,0 мг, 344,4 мкл, 2,471 ммоль) в ДХМ (1078 мл) добавляли метансульфонилхлорид (140,7 мг, 95,07 мкл, 1,228 ммоль). Смесь перемешивали при кт в течение 1 ч, выпаривали и хроматографировали на 12 г силикагеля при использовании 0→70% EtOAc/гептана в качестве элюента с получением цис-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (142 мг, 0,5214 ммоль, 63,31%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,51 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,93 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,15 (тт, J=7,9, 3,1 Гц, 1H), 4,97-4,70 (м, 1H), 3,04 (с, 3H), 2,38-2,04 (м, 4H), 1,95-1,68 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 272,08307, найдено 273,16 (M+1)⁺; время удерживания: 0,74 минуты.

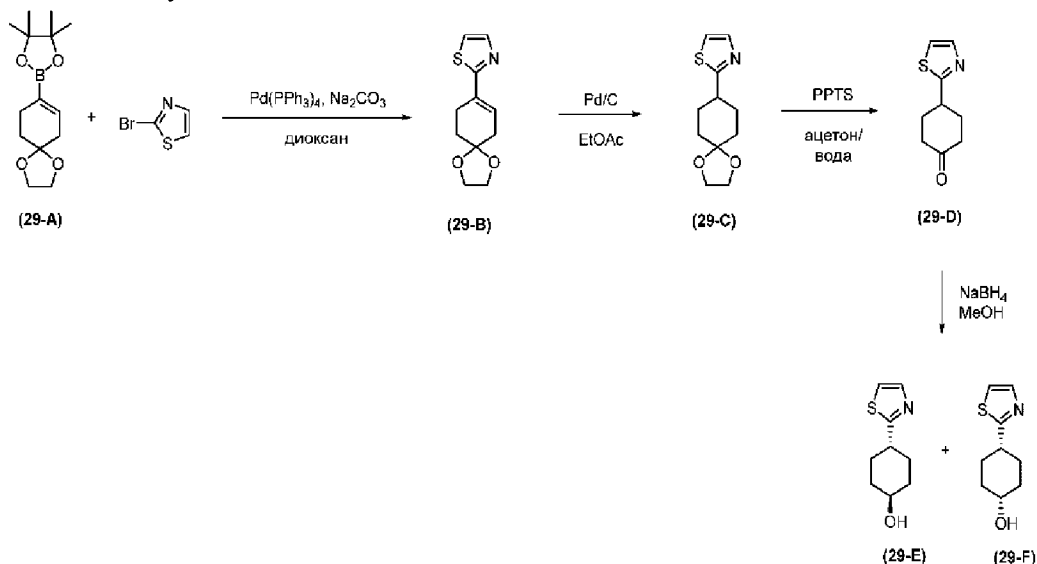
Получение 4-[5-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)-хиназолин-7-ил]морфолина: Соединение (27)



Смесь цис-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (43 мг, 0,1579 ммоль), 7-морфолинохиназолин-5-ола (40 мг, 0,1730 ммоль) и Cs₂CO₃ (67,64 мг, 0,2076 ммоль) в диоксане (1 мл) и ДМФА (1 мл) закрывали в пробирке для микроволнового синтеза объемом 5 мл и нагревали до 110°C в течение 15 ч. Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ/MeOH 9:1 и фильтровали через целит. Фильтрат выпаривали и очищали с помощью хроматографии на

силикагеле (2×4 г силикагеля, 0-5% MeOH/ДХМ) с получением 4-[5-транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)хиназолин-7-ил]морфолина (14,5 мг, 0,03203 ммоль, 18,51%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,43 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,54 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,95 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,80 (дд, J=2,1, 0,8 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,29-5,24 (м, 1H), 4,80-4,59 (м, 1H), 4,11-3,77 (м, 4H), 3,58-3,30 (м, 4H), 2,33-2,20 (м, 4H), 2,04-1,70 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 407,19574, найдено 408,39 (M+1)⁺; время удерживания: 0,62 минуты.

[00461] *Получение соединений 29 и 35*



Получение 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]дец-7-ен-8-ил)тиазола: Соединение (29-B)

Смесь 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]дец-7-ен-8-ил)-4,4,5,5-тетрамethyl-1,3,2-диоксаборолана (2,0 г, 7,5 ммоль), 2-бромтиазола (1,27 г, 7,74 ммоль), $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (436 мг, 0,377 ммоль) и Na_2CO_3 (7,60 мл 2М раствор, 15,2 ммоль) в диоксане (40 мл) вакуумировали и продували азотом (повторяли 2 раза), затем нагревали до 90°C в течение 6 часов. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой, затем экстрагировали EtOAc . Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью флеш-хроматографии при использовании EtOAc и гептана с получением 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]дец-7-ен-8-ил)тиазола (889 мг, выход 53,0%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,75 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,19 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,63-6,52 (м, 1H), 4,04 (с, 4H), 3,00-2,74 (м, 2H), 2,69-2,38 (м, 2H), 1,94 (т, J=6,6 Гц, 2H).

Получение 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ил)тиазола: Соединение (29-C)

Смесь 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]дец-7-ен-8-ил)тиазола (889 мг, 3,98 ммоль) и 10% палладия на активированном угле (425 мг, 0,399 ммоль) в EtOAc (15 мл) перемешивали при комнатной температуре и 1 атм водорода в течение ночи. Реакцию фильтровали через целит и выпаривали в вакууме с получением 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ил)тиазола (860 мг, выход 93,9%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,70 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,22 (д, J=3,3 Гц, 1H), 3,99 (с, 4H), 3,11 (тт, J=11,1, 3,8 Гц, 1H), 2,28-2,12 (м, 2H), 1,99-1,83 (м, 4H), 1,72 (тд, J=13,3, 4,3 Гц, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 225,08235, найдено 226,05 (M+1)⁺.

Получение 4-тиазол-2-илциклогексанона: Соединение (29-D)

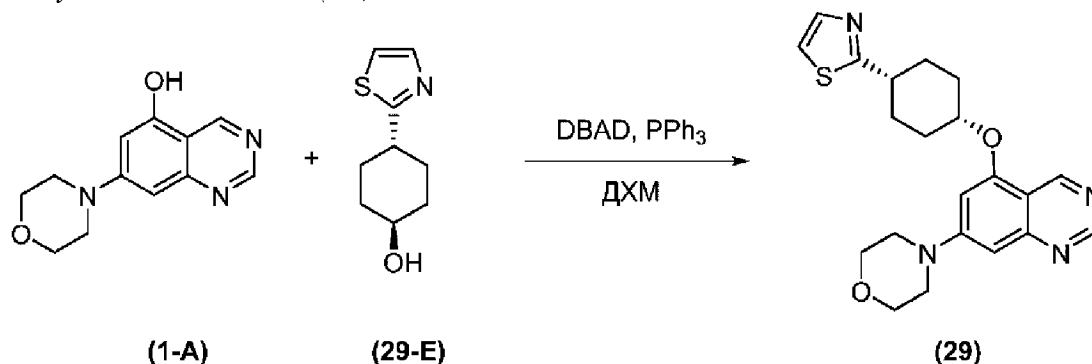
Раствор 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ил)тиазола (860 мг, 3,82 ммоль) и п-толуолсульфоната пиридиния (1,93 г, 7,68 ммоль) в ацетоне (19 мл) и воде (19 мл) нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Ацетон удаляли в вакууме. Водный слой экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали с получением 4-тиазол-2-илциклогексанона (641,5 мг, выход 90%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,74 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 7,28 (д, $J=0,8$ Гц, 1H), 3,53 (тт, $J=10,4, 3,4$ Гц, 1H), 2,66-2,40 (м, 6H), 2,27-2,05 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 181,05614, найдено 182,02 ($M+1$) $^+$.

Получение соединений (29-E) и (29-F)

К раствору 4-тиазол-2-илциклогексанона (564 мг, 3,11 ммоль) в MeOH (15 мл) при 0°C добавляли NaBH_4 (244 мг, 6,32 ммоль). Реакцию нагревали до комнатной температуры в течение 1 часа. Растворитель удаляли в вакууме. Реакцию разбавляли водой и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали с получением 4-тиазол-2-илциклогексанола (492 мг, выход 82,4%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,68 (т, $J=3,2$ Гц, 1H), 7,20 (дд, $J=5,3, 3,3$ Гц, 1H), 4,11-4,01 (м, 1H), 3,70 (тт, $J=10,6, 4,3$ Гц, 1H), 3,16-2,90 (м, 1H), 2,29-2,16 (м, 2H), 2,16-2,05 (м, 2H), 1,73-1,56 (м, 2H), 1,54-1,35 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 183,07178, найдено 184,0 ($M+1$) $^+$.

Смесь транс- и цис-4-тиазол-2-илциклогексанола (492 мг, 2,68 ммоль) очищали с помощью СФХ при использовании CO_2 и EtOH (0,2% Et_2NH) с получением транс-4-тиазол-2-илциклогексанола (381 мг, 2,08 ммоль) ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,70 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 7,21 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 3,72 (тт, $J=10,6, 4,3$ Гц, 1H), 3,02 (тт, $J=11,9, 3,7$ Гц, 1H), 2,33-2,19 (м, 2H), 2,19-2,05 (м, 2H), 1,77-1,37 (м, 4H) и цис-4-тиазол-2-илциклогексанола (65,7 мг, 0,359 ммоль) ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,70 (д, $J=3,3$ Гц, 1H), 7,22 (дт, $J=7,2, 3,6$ Гц, 1H), 4,08 (с, 1H), 3,11 (тт, $J=10,2, 3,9$ Гц, 1H), 2,19-2,01 (м, 2H), 2,01-1,92 (м, 2H), 1,92-1,81 (м, 2H), 1,81-1,70 (м, 2H).

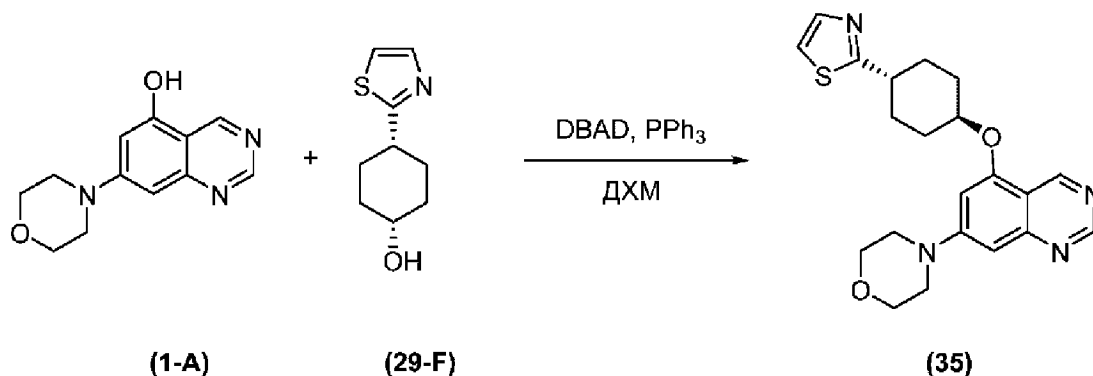
Получение соединения (29)



К раствору 7-морфолинохиназолин-5-ола (25 мг, 0,11 ммоль), цис-4-тиазол-2-илциклогексанола (30 мг, 0,16 ммоль) и PPh_3 (52 мг, 0,20 ммоль) в ДХМ (1 мл) добавляли ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (45 мг, 0,20 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали на обращенно-фазовой колонке C18 с дериватизированным SiO_2 при

использовании 5-50% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO₃ (нас) и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением 4-[5-(транс-4-тиазол-2-илциклогексокси)хиназолин-7-ил]морфолина (17,2 мг, 38,5%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 9,42 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,74 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,26 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,83 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,63-4,42 (м, 1H), 4,01-3,84 (м, 4H), 3,49-3,31 (м, 4H), 3,30-3,10 (м, 1H), 2,39 (д, J=9,6 Гц, 4H), 2,04-1,58 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 396,162, найдено 397,32 (M+1)⁺.

Получение соединения (35)



К раствору 7-морфолинохиназолин-5-ола (25 мг, 0,11 ммоль), транс-4-тиазол-2-илциклогексанола (25 мг, 0,14 ммоль) и PPh₃ (46 мг, 0,18 ммоль) в ДХМ (1 мл) добавляли ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (40 мг, 0,18 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию считали прошедшей не полностью, поэтому добавляли транс-4-тиазол-2-илциклогексанола (5 мг), PPh₃ (11 мг) и ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (10 мг), и перемешивали реакцию при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали на обращенно-фазовой колонке C18 с дериватизированным SiO₂ при использовании 5-40% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO₃ (нас) и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением 4-(5-((cis-4-(тиазол-2-ил) циклогексил)-окси)хиназолин-7-ил)морфолина (14,8 мг, выход 33,2%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 9,47 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,74 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,27 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,84 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 3,96-3,84 (м, 4H), 3,51-3,38 (м, 4H), 3,31-3,16 (м, 1H), 2,42-2,27 (м, 2H), 2,22-2,05 (м, 4H), 1,96-1,82 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 396,162, найдено 397,26 (M+1)⁺.

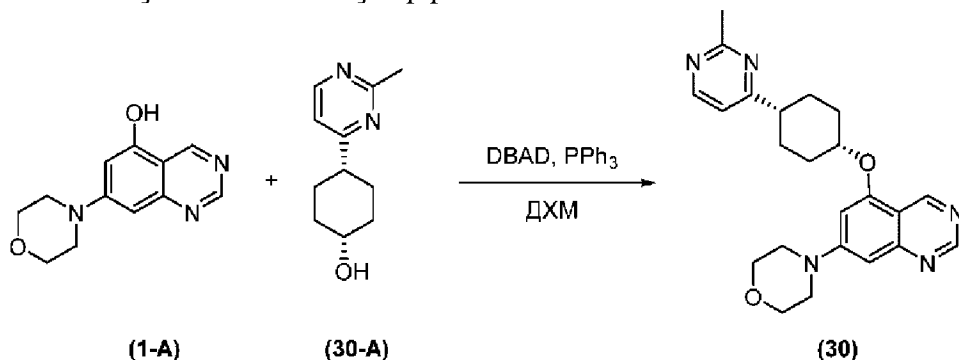
[00462] *Получение соединений 30 и 38*

Получение соединений (30-A) и (30-B)

Соединения (30-A) и (30-B) получали аналогично Соединениям (29-E) и (29-F). Смесь транс- и цис-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексанола (465 мг, 2,42 ммоль) очищали с помощью СФХ при использовании CO₂ и EtOH (0,2% Et₂NH) с получением транс-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексанола (331 мг, 1,69 ммоль) ¹H-ЯМР (300 МГц,

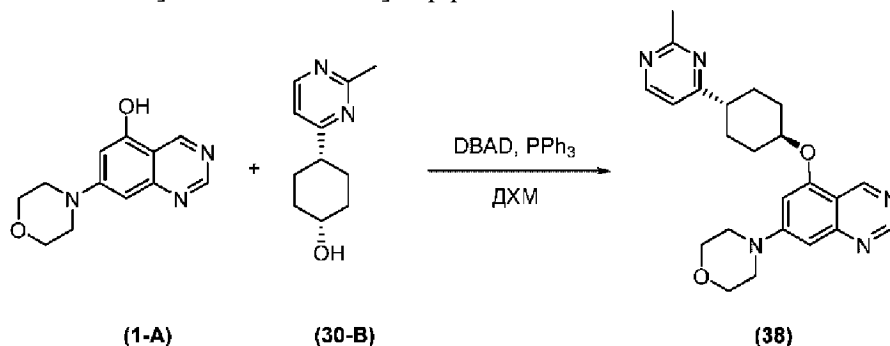
CDCl_3) δ 8,53 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,98 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 3,82-3,62 (м, 1H), 2,72 (с, 3H), 2,62 (тт, $J=12,0$, 3,5 Гц, 1H), 2,23-2,09 (м, 2H), 2,09-1,96 (м, 2H), 1,70-1,35 (м, 4H) и цис-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексанола (71 мг, 0,35 ммоль) ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,55 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 7,05 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 4,22-4,08 (м, 1H), 2,80-2,59 (м, 4H), 2,08-1,61 (м, 8H).

Получение соединения **30**: 4-[5-[цис-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексокси]хиназолин-7-ил]морфолин



К раствору 7-морфолинохиназолин-5-ола (27,5 мг, 0,12 ммоль), транс-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексанола (35 мг, 0,18 ммоль) и PPh_3 (56 мг, 0,21 ммоль) в ДХМ (1 мл) добавляли ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (49 мг, 0,21 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали на обращенно-фазовой колонке C18 с дериватизированным SiO_2 при использовании 5-40% CH_3CN (0,1% ТФУ) в H_2O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO_3 (нас) и затем экстрагировали EtOAc . Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали с получением 4-[5-[цис-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексокси]-хиназолин-7-ил]морфолина (18,5 мг, выход 36,5%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,51 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,59 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,06 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,84 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,61 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 4,96-4,82 (м, 1H), 4,03-3,82 (м, 4H), 3,51-3,30 (м, 4H), 2,90-2,77 (м, 1H), 2,75 (с, 3H), 2,44-2,28 (м, 2H), 2,19-1,75 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 405,21646, найдено 406,36 ($\text{M}+1$) $^+$.

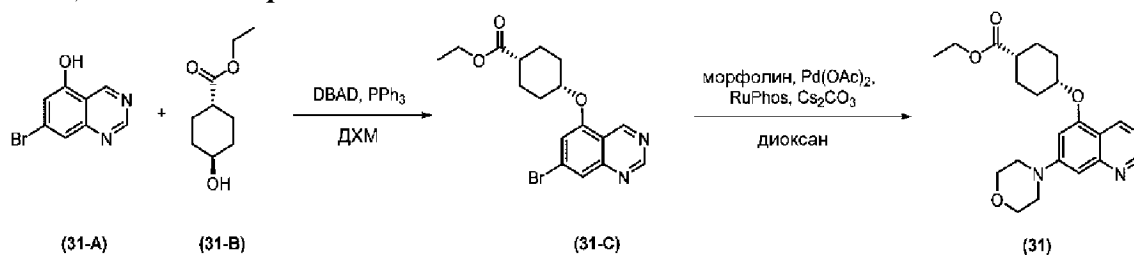
Получение соединения **38**: 4-[5-[транс-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексокси]хиназолин-7-ил]морфолин



К раствору 7-морфолинохиназолин-5-ола (25 мг, 0,11 ммоль), цис-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексанола (33 мг, 0,16 ммоль) и PPh_3 (52 мг, 0,20 ммоль) в

ДХМ (1 мл) добавляли ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (45 мг, 0,20 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле при использовании EtOAc с получением 4-[5-[транс-4-(2-метилпиримидин-4-ил)циклогексокси]хиназолин-7-ил]морфолина (17 мг, 0,041 ммоль, выход 37%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,41 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 8,57 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,02 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 6,83 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,64 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,63-4,41 (м, 1H), 4,05-3,83 (м, 4H), 3,53-3,29 (м, 4H), 2,86-2,76 (м, 1H), 2,75 (с, 3H), 2,51-2,33 (м, 2H), 2,25-2,10 (м, 2H), 1,96-1,62 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 405,21646, найдено 406,29 ($M+1$) $^+$.

[00463] **Получение Соединения 31: этил-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоксилат**



Получение Соединения (31-C)

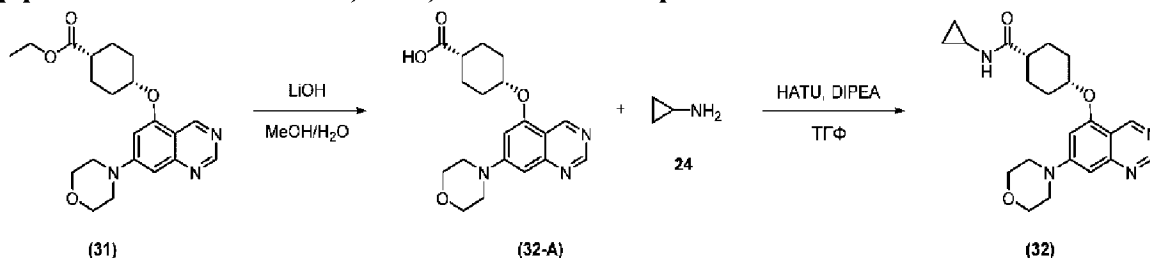
К раствору 7-бромхиназолин-5-ола (500 мг, 2,22 ммоль), этил-4-гидроксициклогексанкарбоксилата (516 мг, 3,00 ммоль) и PPh_3 (937 мг, 3,57 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли ди-трет-бутил-азодикарбоксилат (819 мг, 3,56 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле при использовании EtOAc и гептана, с получением этил-цис-4-(7-бромхиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоксилата (585 мг, выход 69,4%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,74 (с, 1H), 9,32 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,05 (д, $J=1,4$ Гц, 1H), 4,82-4,72 (м, 1H), 4,19 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 2,58-2,43 (м, 1H), 2,28-2,12 (м, 2H), 2,12-1,74 (м, 6H), 1,30 (т, $J=7,1$ Гц, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 378,0579, найдено 379,1 ($M+1$) $^+$.

Получение Соединения (31)

В сосуд для микроволнового синтеза Biotage объемом 0,5-2 мл, снабженный магнитным перемешивающим элементом, вносили этил-4-(7-бромхиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоксилат (100 мг, 0,264 ммоль), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (6 мг, 0,03 ммоль) и RuPhos (25 мг, 0,054 ммоль) в диоксане (1,6 мл) и через реакционную смесь пропускали азот в течение 10 минут. Добавляли морфолин (36 мкл, 0,41 ммоль) и Cs_2CO_3 (258 мг, 0,792 ммоль) и герметично закрывали сосуд тефлоновым колпачком с диафрагмой. Сосуд нагревали до 100°C в течение 4,5 часов. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой, затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью флеш-хроматографии при использовании EtOAc с получением этил-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоксилата (90 мг, выход 85%). ^1H -

ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,46 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 6,81 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,57 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 4,83-4,66 (м, 1H), 4,19 (к, $J=7,1$ Гц, 2H), 4,01-3,83 (м, 4H), 3,51-3,29 (м, 4H), 2,48 (тт, $J=10,3, 3,9$ Гц, 1H), 2,30-2,12 (м, 2H), 2,12-1,65 (м, 6H), 1,30 (т, $J=7,1$ Гц, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 385,20016, найдено 386,28 ($M+1$)⁺.

[00464] **Получение Соединения 32:** **цис-N-циклопропил-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексанкарбоксамид**



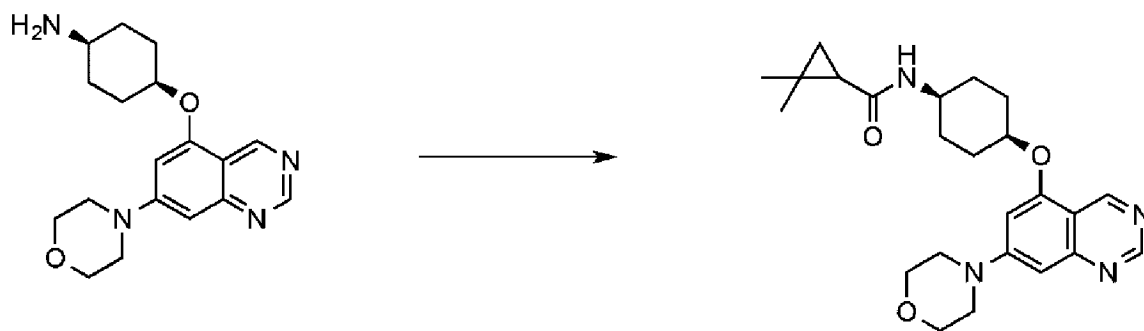
Получение Соединения (32-А)

Раствор этил-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексан-карбоксилата (210 мг, 0,545 ммоль: Соединение (31)) и LiOH (20 мг, 0,835 ммоль) в MeOH (3 мл) и воде (500 мкл) перемешивали при 65°C в течение 1,5 часов. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и доводили pH до 1 6M HCl. Растворитель удаляли с получением гидрохлорида 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексанкарбоновой кислоты.

Получение соединения (32)

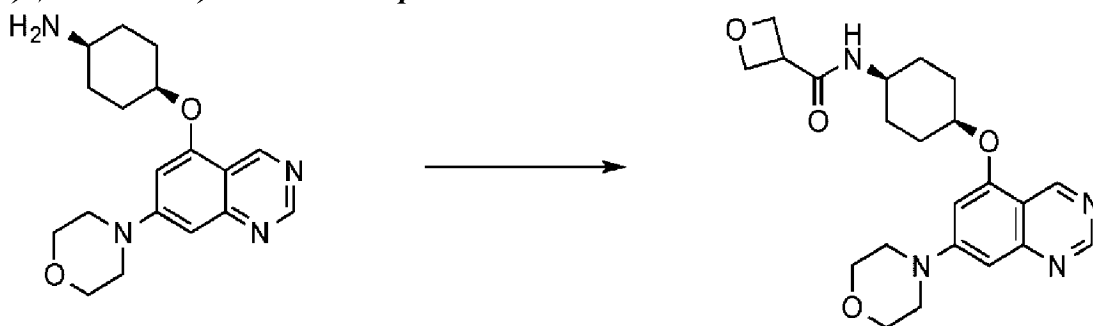
К раствору гидрохлорида 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоновой кислоты (46,4 мг, 0,118 ммоль), циклопропанамин (10 мкл, 0,14 ммоль) и HATU (49 мг, 0,13 ммоль) в ТГФ (2 мл) добавляли DIPEA (82 мкл, 0,47 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 40 минут. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали на обращенно-фазовой колонке C18 с дериватизированным SiO_2 при использовании 5-30% CH_3CN (0,1% ТФУ) в H_2O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO_3 (нас) и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали с получением цис-N-циклопропил-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексанкарбоксамид (27 мг, выход 56%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,47 (с, 1H), 9,11 (с, 1H), 6,81 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,56 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 5,65 (с, 1H), 4,87-4,72 (м, 1H), 4,02-3,83 (м, 4H), 3,48-3,35 (м, 4H), 2,82-2,68 (м, 1H), 2,37-2,17 (м, 3H), 2,02-1,68 (м, 8H), 0,90-0,75 (м, 2H), 0,59-0,41 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 396,21616, найдено 397,31 ($M+1$)⁺.

[00465] **Получение Соединения 33:** **2,2-диметил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)циклопропан-1-карбоксамид**



1-гидроксibenзотриазол моногидрат (23 мг, 0,170 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)-N, N-диметил-пропан-1-амин (Хлороводородная кислота (1) (49 мг, 0,256 ммоль) и 2,2-диметилциклопропанкарбоновую кислоту (18 мг, 0,158 ммоль) объединяли в ДМФА (280 мкл) под азотом при комнатной температуре и оставляли с перемешиванием на 40 мин. Добавляли 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (35 мг, 0,107 ммоль) и оставляли с перемешиванием на ночь. Добавляли насыщенный бикарбонат натрия и экстрагировали EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×), солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Остаток хроматографировали на колонке с 4 г силикагеля при использовании 0-10% MeOH/ДХМ в качестве элюента и дополнительно очищали с помощью C18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха, а остаток пропускали через PL-HCO₃ MP SPE с получением 2,2-диметил-N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)-циклопропан-1-карбоксамида (11,5 мг, выход 25%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 9,45 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,57 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,74 (к, J=3,2 Гц, 1H), 4,05-3,84 (м, 5H), 3,46-3,31 (м, 4H), 2,19 (дк, J=9,9, 3,3 Гц, 2H), 1,97-1,55 (м, 6H), 1,26 (дд, J=8,0, 5,3 Гц, 1H), 1,17 (с, 3H), 1,15 (с, 3H), 1,09 (т, J=4,8 Гц, 1H), 0,73 (дд, J=8,0, 4,3 Гц, 1H). ЭРИ-МС m/z=425,33 (M+1)+.

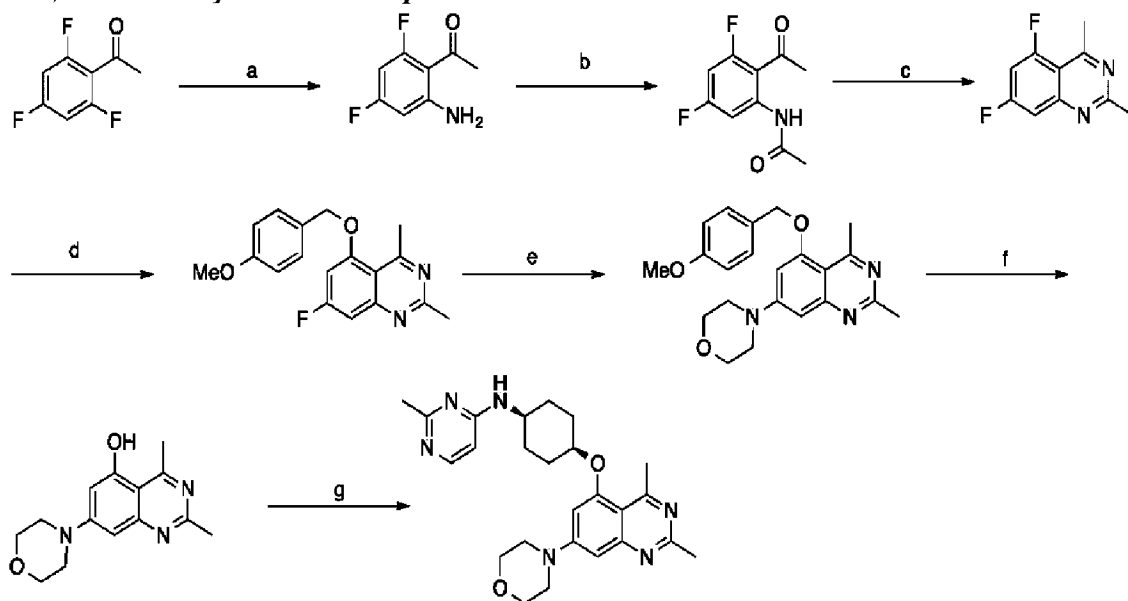
[00466] **Получение Соединения 34: N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)оксетан-3-карбоксамида**



1-гидроксibenзотриазол моногидрат (18 мг, 0,133 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)-N, N-диметил-пропан-1-амин (Хлороводород-ную кислоту (1) (38 мг, 0,198 ммоль) и оксетан-3-карбоновую кислоту (13 мг, 0,127 ммоль) и триэтиламин (15 мкл, 0,1076 ммоль) объединяли в ДМФА (1 мл) под азотом при комнатной температуре и оставляли с перемешиванием на 40 мин. Добавляли 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанамина (27 мг, 0,0822 ммоль) и оставляли

реакцию с перемешиванием на ночь. Добавляли насыщенный бикарбонат натрия и экстрагировали EtOAc (2×). Объединенную органическую фазу промывали водой (2×), солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью хроматографии на 4 г силикагеля при использовании градиента 0-10% метанола/ДХМ с получением N-((1s,4s)-4-((7-морфолинохиназолин-5-ил)окси)циклогексил)оксетан-3-карбоксамид (4 мг, выход 11%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 9,42 (с, 1H), 9,08 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,79 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 6,57 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 5,51 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 4,95-4,72 (м, 5H), 4,10-3,84 (м, 5H), 3,70 (тт, $J=8,3, 6,7$ Гц, 1H), 3,39 (дд, $J=5,8, 4,0$ Гц, 5H), 2,30-2,15 (м, 3H), 1,98-1,58 (м, 4H). ЭРИ-МС $m/z=413,46$ ($M+1$)+.

[00467] **Получение Соединения 36: N-[4-(2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-2-метил-пиримидин-4-амин**



Реагенты и условия: (a) NH_3 , 90°C , 22 ч; (b) AcCl , DIEA, ДХМ; (c) NH_3 , EtOH; (d) NaN , РМВ-ОН, ДМФА; (e) морфолин, DIEA, $i\text{PrOH}$; (f) ТФУ, ДХМ; (g) [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метансульфонат, Cs_2CO_3 , ДМФА

Стадия а

Смесь 1-(2,4,6-трифторфенил)этанона (7 г, 40,2 ммоль) и раствор аммиака (40 г, 665 ммоль, 30% в/в) перемешивали при 90°C в течение 22 ч в закрытой бутылке под давлением. После охлаждения до комнатной температуры смесь экстрагировали ДХМ, сушили над Na_2SO_4 , выпаривали и очищали на 120 г картридже с силикагелем при элюировании 0-30% EtOAc/гептаном. В результате получали 1-(2-амино-4,6-дифторфенил)этанон (5,1 г, 74%). ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,66-6,27 (м, 2H), 6,19-6,11 (м, 2H), 2,59 (дд, $J=8,4, 1,4$ Гц, 3H).

Стадия b

К раствору 1-(2-амино-4,6-дифторфенил)этанона (3,1 г, 18,1 ммоль) в ДХМ (30 мл) добавляли DIEA (3,8 мл, 21,8 ммоль) и AcCl (2 мл, 28,1 ммоль) при 0°C . Смесь перемешивали в течение 1 ч и выпаривали. Остаток разбавляли ДХМ, промывали нас.

раствором NaHCO_3 и выпаривали в вакууме. Белый остаток использовали в следующей стадии. В результате получали N-(2-ацетил-3,5-дифтор-фенил)ацетамид (3,8 г, 17,8 ммоль, 98,4%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 11,66 (с, 1H), 8,39 (ддд, $J=11,7, 2,6, 1,6$ Гц, 1H), 6,60 (ддд, $J=12,2, 8,2, 2,6$ Гц, 1H), 2,67 (д, $J=8,5$ Гц, 3H), 2,24 (с, 3H).

Стадия с

Смесь N-(2-ацетил-3,5-дифтор-фенил)ацетамида (1,7 г, 8 ммоль) и 2М NH_3 в EtOH (80 мл 2 М, 160 ммоль) перемешивали при 90°C в течение 18 ч. Смесь выпаривали в вакууме и очищали на 40 г картридже с силикагелем при использовании 0-30% EtOAc/гекс. В результате получали 5,7-дифтор-2,4-диметил-хиназолин (1,2 г, 77%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,40 (ддт, $J=9,3, 2,3, 1,2$ Гц, 1H), 7,03 (ддд, $J=11,2, 8,9, 2,4$ Гц, 1H), 3,01 (дд, $J=6,0, 0,9$ Гц, 3H), 2,83 (с, 3H).

Стадия d

К раствору (4-метоксифенил)метанола (270 мкл, 2,0 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли NaH (110 мг, 2,75 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 10 мин. К смеси добавляли раствор 5,7-дифтор-2,4-диметил-хиназолина (350 мг, 1,8 ммоль) в ДМФА (5 мл) и продолжали перемешивание еще в течение 30 мин. В смесь вливали H_2O , экстрагировали ДХМ, сушили над Na_2SO_4 и выпаривали. Неочищенный продукт очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании в градиенте 0-40% EtOAc/гептана и получали 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2,4-диметил-хиназолина (300 мг, 37%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,51-7,36 (м, 2H), 7,17 (дд, $J=9,4, 2,3$ Гц, 1H), 7,07-6,91 (м, 2H), 6,76 (дд, $J=10,9, 2,4$ Гц, 1H), 5,15 (с, 2H), 3,87 (с, 3H), 2,97 (с, 3H), 2,81 (с, 3H).

Стадия e

Смесь 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2,4-диметил-хиназолина (300 мг, 0,96 ммоль), морфолина (300 мкл, 3,4 ммоль) и DIEA (300 мкл, 1,7 ммоль) в iPrOH (3 мл) нагревали в микроволновом реакторе при 160°C в течение 20 мин. Смесь нагревали в микроволновом реакторе в течение 30 мин при 180°C и затем 60 мин при 190°C. Смесь выпаривали, очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании в градиенте 0-70% EtOAc/гептана и получали 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-2,4-диметил-хиназолин-7-ил]морфолин (60 мг, 0,158 ммоль, 16,5%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,49-7,37 (м, 2H), 7,03-6,90 (м, 2H), 6,77 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,58 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 5,11 (с, 2H), 3,99-3,81 (м, 7H), 3,46-3,32 (м, 4H), 2,88 (с, 3H), 2,73 (с, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 379,1896, найдено 380,1 ($M+1$)⁺; время удерживания: 0,6 минуты.

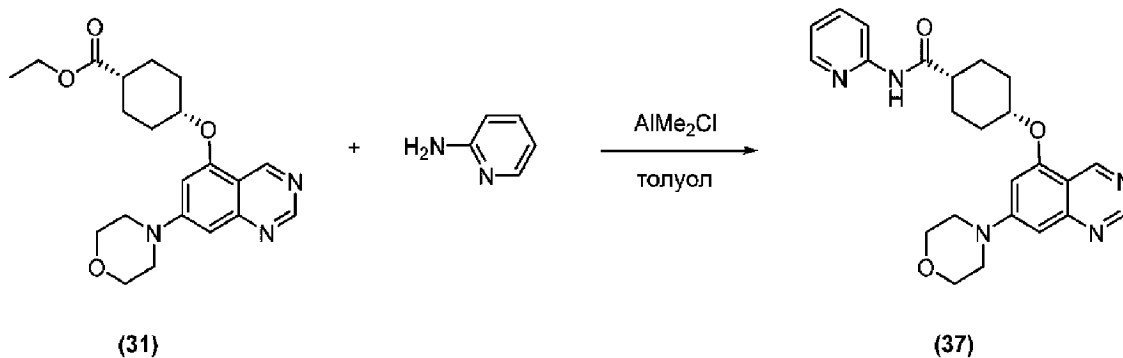
Стадия f

К раствору 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]-2,4-диметил-хиназолин-7-ил]морфолина (60 мг, 0,16 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли ТФУ (1 мл, 13 ммоль) и перемешивали полученный раствор в течение 1 ч. Смесь выпаривали и очищали на 4 г картридже с силикагелем при элюировании 0-5% MeOH/ДХМ с получением 2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (37 мг, 90%). ^1H -ЯМР (300 МГц, DMSO) δ 6,69 (с, 2H), 5,76 (с, 1H), 3,74 (т, $J=4,9$ Гц, 4H), 3,36 (с, 4H), 2,93 (с, 3H), 2,58 (с, 3H).

Стадия g

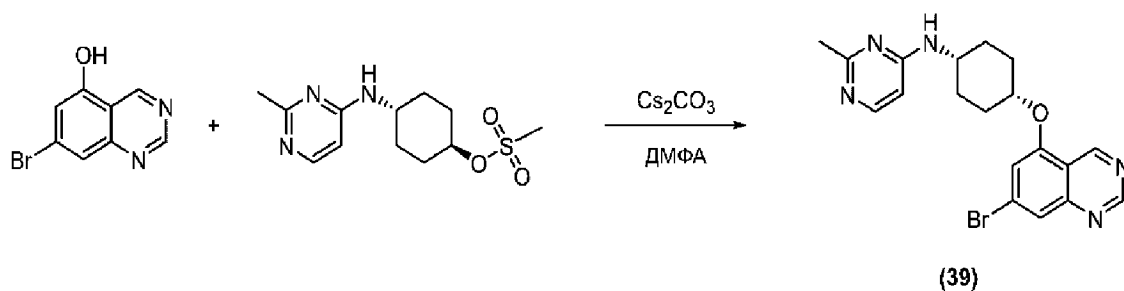
Смесь 2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ола (34 мг, 0,13 ммоль), [4-[(2-метилпиримидин-4-ил)амино]циклогексил]метан-сульфоната (55 мг, 0,19 ммоль) и карбоната цезия (70 мг, 0,21 ммоль) в ДМФА (1 мл) перемешивали при 90°C в течение 20 ч. Смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита и выпаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле при элюировании 0-10% MeOH/ДХМ и получали N-[4-(2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-2-метил-пиримидин-4-амин (6,1 мг, 0,013 ммоль, 9,9%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,13 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,76 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,50 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,18 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,93 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,73 (д, J=4,2 Гц, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,42-3,28 (м, 4H), 3,01 (с, 3H), 2,73 (с, 3H), 2,51 (с, 3H), 2,32-2,19 (м, 2H), 2,08-1,73 (м, 9H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 448,25867, найдено 449,32 (M+1)⁺; время удерживания: 0,5 минуты

[00468] *Получение 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)окси-(2-пиридил)циклогексанкарбоксамид: Соединение 37*



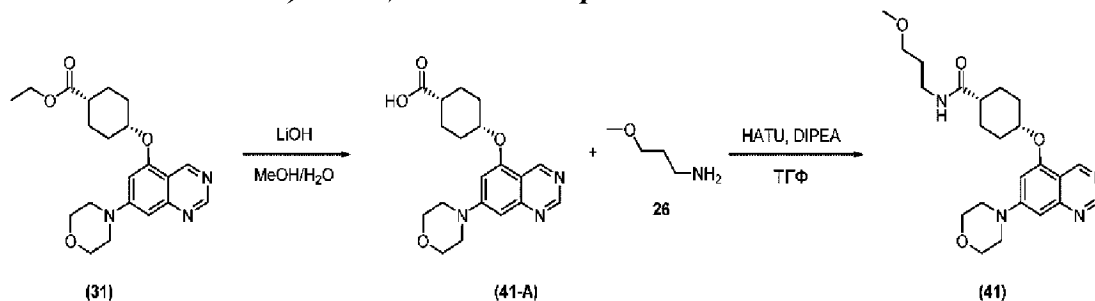
К раствору этил-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксицикло-гексанкарбоксилата (30 мг, 0,078 ммоль: Соединение (30)) и пиридин-2-амин (15 мг, 0,16 ммоль) в толуоле (0,5 мл) под азотом по каплям добавляли AlMe₂Cl (155 мкл 1,0 М, 0,155 ммоль). После завершения добавления реакцию нагревали до 80°C в течение 30 минут. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и выпаривали в вакууме. Остаток очищали ЖХСД на обращенно-фазовой колонке C18 с SiO₂ при использовании 5-40% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO₃ (нас) и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)окси-N-(2-пиридил)циклогексанкарбокс-амида (21,8 мг, выход 63,3%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 9,49 (с, 1H), 9,11 (с, 1H), 8,28 (д, J=7,7 Гц, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,84-7,68 (м, 1H), 7,15-7,02 (м, 1H), 6,83 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,59 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,88-4,76 (м, 1H), 4,05-3,81 (м, 4H), 3,40 (дд, J=14,8, 10,0 Гц, 4H), 2,59-2,42 (м, 1H), 2,42-2,25 (м, 2H), 2,25-2,04 (м, 2H), 2,04-1,71 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 433,2114, найдено 434,33 (M+1)⁺.

[00469] *Получение Соединения 39: N-[4-(7-бромхиназолин-5-ил)оксициклогексил]-2-метил-пиримидин-4-амин*



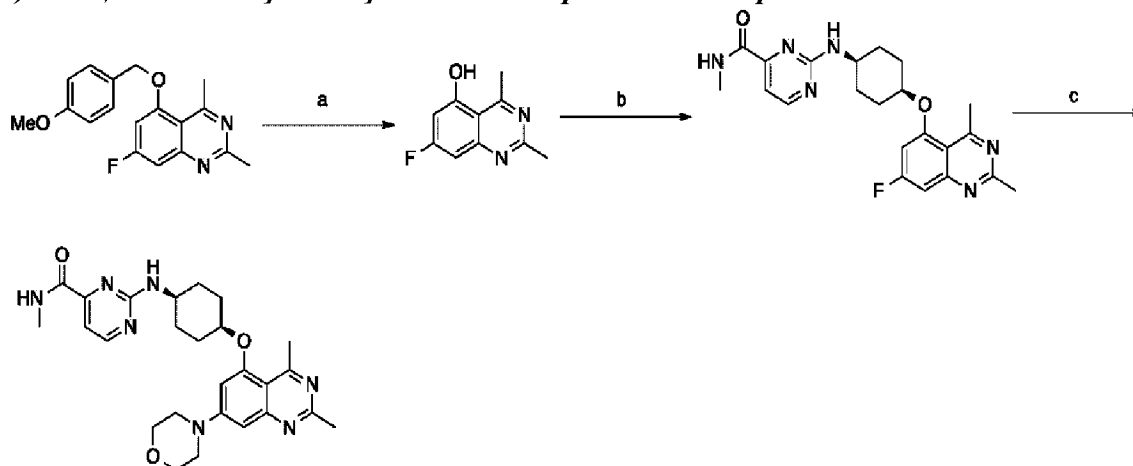
9,09 (с, 1H), 6,83 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 5,67-5,49 (м, 1H), 4,83-4,75 (м, 1H), 3,95-3,85 (м, 4H), 3,48-3,36 (м, 4H), 2,87 (д, J=4,8 Гц, 3H), 2,38-2,24 (м, 3H), 2,11-1,84 (м, 4H), 1,83-1,67 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 370,2005, найдено 371,38 (M+1)⁺.

[00471] **Получение Соединения 41: N-(3-метоксипропил)-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)окси-циклогексанкарбоксамид**



К раствору гидрохлорида 4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)оксициклогексанкарбоновой кислоты (46 мг, 0,13 ммоль), 3-метоксипропан-1-амин (13 мг, 0,15 ммоль) и HATU (55 мг, 0,14 ммоль) в ТГФ (1 мл) добавляли DIPEA (95 мкл, 0,55 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакцию выпаривали в вакууме, а остаток очищали с помощью ЖХСД на обращенно-фазовой колонке C18 с SiO₂ при использовании 5-50% CH₃CN (0,1% ТФУ) в H₂O (0,1% ТФУ). Фракции, содержащие продукт, объединяли и нейтрализовали NaHCO₃ (нас) и затем экстрагировали EtOAc. Органические экстракты объединяли и промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением N-(3-метоксипропил)-4-(7-морфолинохиназолин-5-ил)окси-циклогексанкарбоамида (39,4 мг, выход 69,3%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 9,47 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 6,81 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,38-6,21 (м, 1H), 4,83-4,72 (м, 1H), 3,98-3,84 (м, 4H), 3,53 (т, J=5,6 Гц, 2H), 3,49-3,29 (м, 9H), 2,40-2,19 (м, 3H), 2,12-1,63 (м, 8H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 428,24237.

[00472] **Получение Соединения 42: 2-[[4-(2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамид:**



Реагенты и условия: (a) ТФУ, ДХМ; (b) [4-[[4-(метилкарбамоил)-пиримидин-2-ил]амино]циклогексил]метан-сульфонат, Cs₂CO₃, ДМФА; (c) морфолин, DIEA, iPrOH

Стадия а

К раствору 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-2,4-диметил-хиназолина (130 мг, 0,41 ммоль) в ДХМ (1 мл) добавляли ТФУ (0,5 мл, 6,5 ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь выпаривали и очищали на 12 г картридже с силикагелем при элюировании 0-4% MeOH/ДХМ с получением 7-фтор-2,4-диметил-хиназолин-5-ола (70 мг, 87%) ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,00 (ддд, $J=28,8, 9,8, 2,4$ Гц, 2H), 3,17 (с, 3H), 2,87 (с, 3H).

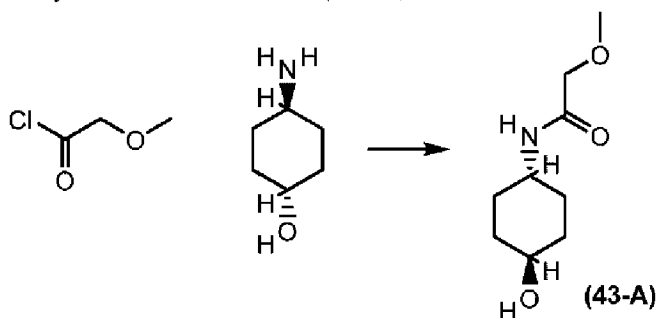
Стадия б

Смесь 7-фтор-2,4-диметил-хиназолин-5-ола (45 мг, 0,23 ммоль), [4-[[4-(метилкарбамоил)-пиримидин-2-ил]амино]цикло-гексил]метансульфоната (120 мг, 0,36 ммоль) и карбоната цезия (200 мг, 0,61 ммоль) в ДМФА (1 мл) перемешивали при 90°C в течение 20 ч. Смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита, выпаривали и очищали на 4 г картриджн с силикагелем при использовании 0-5% MeOH/ДХМ с получением 2-[[4-(7-фтор-2,4-диметил-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (10 мг, 10%). ЭРИ-МС m/z вычисл. 424,2, найдено 425,3 ($M+1$)+; время удерживания: 0,55 минуты.

Стадия с

Смесь 2-[[4-(7-фтор-2,4-диметил-хиназолин-5-ил)оксицикло-гексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (10 мг, 0,023 ммоль), морфолина (200 мкл, 2,3 ммоль) и DIEA (400 мкл, 2,3 ммоль) в $i\text{PrOH}$ (0,5 мл) перемешивали при 90°C в течение 3 дней. Смесь выпаривали и очищали с помощью C18 препаративной ВЭЖХ (вода/ацетонитрил с модификатором ТФУ). Целевые фракции выпаривали досуха, а остаток пропускали через PL-HCO₃ MP SPE с получением 2-[[4-(2,4-диметил-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (3,2 мг, 25%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,52 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,36 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 6,78 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,55-6,47 (м, 1H), 5,19 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,15-4,00 (м, 0H), 3,90 (дд, $J=6,0, 3,8$ Гц, 4H), 3,43-3,32 (м, 4H), 3,11-2,98 (м, 6H), 2,80 (с, 0H), 2,33-2,18 (м, 2H), 2,13-1,77 (м, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 491,2645, найдено 492,3 ($M+1$)+; время удерживания: 0,54 минуты.

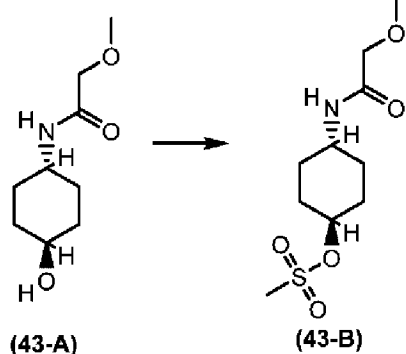
[00473] *Получение Соединения 43: 2-метокси-N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]ацетамид*

Получение Соединения (43-A)

При 0°C к раствору 4-аминоциклогексан-1-ола (5,01 г, 42,19 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли DIEA (14,7 мл, 84,39 ммоль) с последующим добавлением по каплям 2-

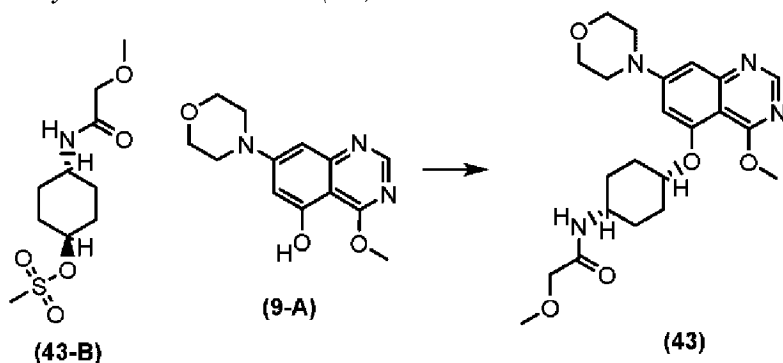
метоксиацетилхлорида (4,4 мл, 47,31 ммоль). Реакцию перемешивали в течение 5 минут, затем ледяную баню убирали и перемешивали реакцию в течение ночи при КТ. Затем реакционную смесь переносили в делительную воронку, органический слой промывали 1Н НСl, водный слой экстрагировали EtOAc, органические слои объединяли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали до коричневатого твердого вещества с получением 2,4 г неочищенного продукта. Этот неочищенный продукт растворяли в ДХМ и вводили в 80 г колонку ISCO с детектором ELSD, 0-7% MeOH/ДХМ. Целевые фракции объединяли и выпаривали в вакууме с получением N-(4-гидроксициклогексил)-2-метокси-ацетамида (800 мг). ¹Н-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 6,32 (с, 1H), 3,86 (с, 2H), 3,79 (ддд, J=11,7, 8,1, 3,9 Гц, 1H), 3,62 (тт, J=10,5, 3,9 Гц, 1H), 3,41 (д, J=0,6 Гц, 3H), 2,00 (дтд, J=11,8, 7,7, 7,1, 3,5 Гц, 4H), 1,47-1,35 (м, 2H), 1,31-1,17 (м, 2H).

Получение Соединения (43-В)



К раствору N-(4-гидроксициклогексил)-2-метокси-ацетамида (800 мг, 4,144 ммоль) в ДХМ (9,467 мл) добавляли DIEA (1,130 г, 1,523 мл, 8,744 ммоль) и MsCl (515,0 мг, 348,0 мкл, 4,496 ммоль). Смесь перемешивали в течение 0,5 ч и разбавляли ДХМ, промывали H₂O, сушили над Na₂SO₄, фильтровали через тонкий слой силикагеля, слой силикагеля промывали ДХМ и выпаривали. [4-[(2-метоксиацетил)амино]циклогексил]метансульфонат получали в виде почти белого твердого вещества (1,09 г, выход 99,1%). ¹Н-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 6,36 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,65 (м, 1H), 3,87 (м, 3H), 3,41 (с, 3H), 3,02 (с, 3H), 2,22-2,01 (м, 4H), 1,81-1,64 (м, 2H), 1,40-1,24 (м, 2H).

Получение Соединения (43)

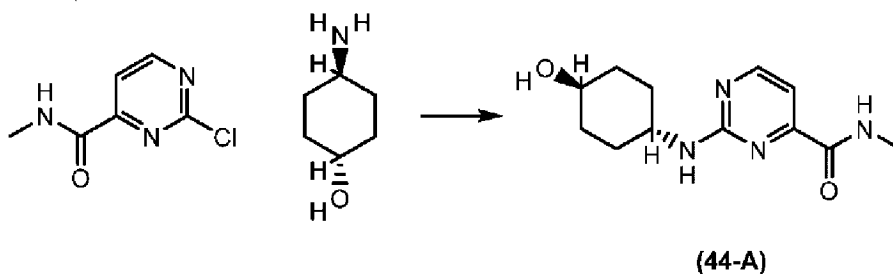


Смесь [4-[(2-метоксиацетил)амино]циклогексил]метан-сульфоната (75 мг, 0,2827 ммоль), 4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ола (соли трифторуксусной кислоты:

Соединение (9-А)) (54 мг, 50% чистота, 0,07194 ммоль) и Cs_2CO_3 (251 мг, 0,7704 ммоль) в ДМФА закрывали в пробирке для микроволнового синтеза объемом 5 мл и нагревали до 100°C . Нагрев прекращали и перемешивали при КТ в течение ночи, реакционную смесь фильтровали, выпаривали, растворяли в ДХМ, вводили в 4 г колонку ISCO и элюировали 0-10% $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$. Требуемые фракции собирали, объединяли и выпаривали с получением 22 мг неочищенного продукта. Этот материал растворяли в MeOH и очищали на колонке C18 с получением 24 мг желтого масла. Этот материал растворяли в ДХМ и пропускали через карбонатный картридж Stratospheres с получением прозрачного раствора, который выпаривали в вакууме и сушили в течение ночи в глубоком вакууме с получением 2-метокси-N-[4-(4-метокси-7-морфолино-хиназолин-5-ил)оксициклогексил]-ацетамида (14 мг, выход 43,8%). ^1H -ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 8,48 (с, 1H), 7,54 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 6,78 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,68 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 4,84 (м, 1H), 4,04 (с, 3H), 3,79 (с, 2H), 3,75 (м, 5H), 3,35 (м, 4H), 3,30 (с, 3H), 2,01 (м, 2H), 1,84-1,53 (м, 6H).

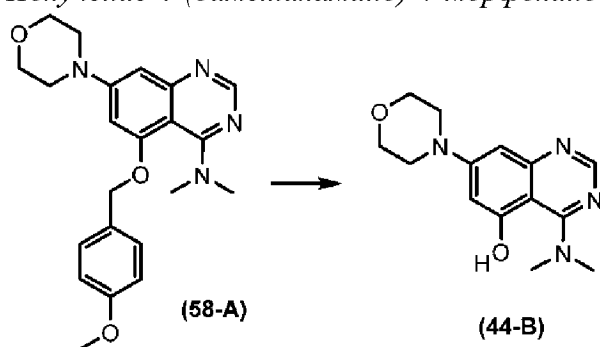
[00474] **Получение Соединения 44: 2-[[4-[4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ил]оксициклогексил]амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида**

Получение 2-[(4-гидроксициклогексил)амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида: Соединение (44-А)



К смеси 2-хлор-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (4,5 г, 26,23 ммоль), 4-аминоциклогексан-1-ола (3 г, 26,05 ммоль) в $i\text{PrOH}$ (25,00 мл) добавляли DIEA (6 мл, 34,45 ммоль) и кипятили с обратным холодильником в течение ночи, затем выпаривали с получением 4,2 г (96%) 2-[(4-гидроксициклогексил)амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,48 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,34 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 3,80 (дтт, $J=39,2, 9,9, 3,8$ Гц, 2H), 3,51 (с, 1H), 3,03 (д, $J=5,1$ Гц, 3H), 2,29-0 2,00 (м, 4H), 1,65-1,22 (м, 4H).

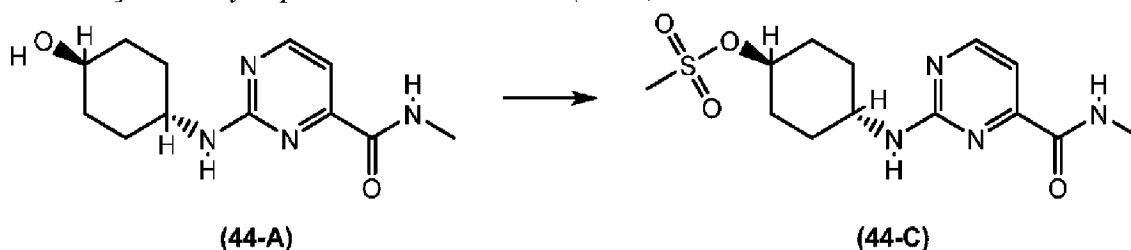
Получение 4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ола: Соединение (44-B)



Раствор 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N,N-диметил-7-морфолино-хиназолин-4-

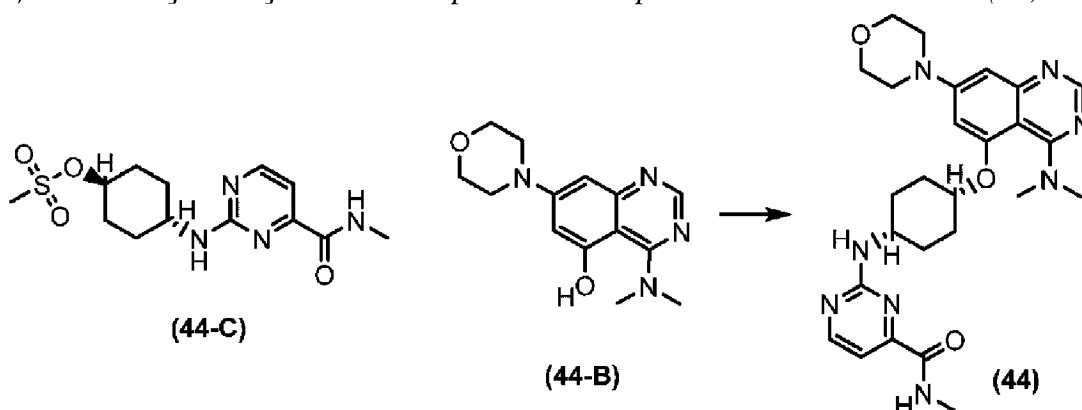
аминa (370 мг, 0,8911 ммоль) в ДХМ (4,456 мл) и ТФУ (5 мл, 64,90 ммоль) перемешивали при 50°C в течение 3 ч. Затем реакцию выпаривали досуха, обрабатывали насыщенным водным бикарбонатом натрия и 3× экстрагировали EtOAc. Объединенную органическую фазу выпаривали досуха, растворяли в минимальном количестве EtOAc и по каплям вносили в гептан. Полученный рыжевато-коричневый осадок фильтровали и сушили с получением 4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ола в виде рыжевато-коричневого твердого вещества (240 мг, 0,8749 ммоль, 98,20%), которое использовали без последующей очистки. ЭРИ-МС m/z вычисл. 274,14297, найдено 275,0 ($M+1$)+; время удерживания: 0,55 минуты.

Получение [4-[[4-(метилкарбамоил)пиримидин-2-ил]амино]циклогексил]метансульфоната: Соединение (44-С)



В раствор 2-[[4-(4-гидроксициклогексил)амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксиамида (4,3 г, 17,18 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли DIEA (15 мл, 86,12 ммоль) и MsCl (2,8 мл, 36,18 ммоль). Раствор перемешивали в течение 3 ч, после чего выпаривали и очищали на 80 г картридже с силикагелем при использовании 0-100% EtOAc/гекс с получением [4-[[4-(метилкарбамоил)пиримидин-2-ил]амино]циклогексил]метансульфоната (5,2 г, 15,83 ммоль, 92,17%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,49 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,36 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 5,15 (с, 1H), 4,73 (тт, $J=10,3$, 3,8 Гц, 1H), 3,92 (дтд, $J=10,7$, 7,5, 3,7 Гц, 1H), 3,11-2,98 (м, 6H), 2,23 (дк, $J=12,7$, 3,1, 2,5 Гц, 4H), 1,92-1,63 (м, 4H).

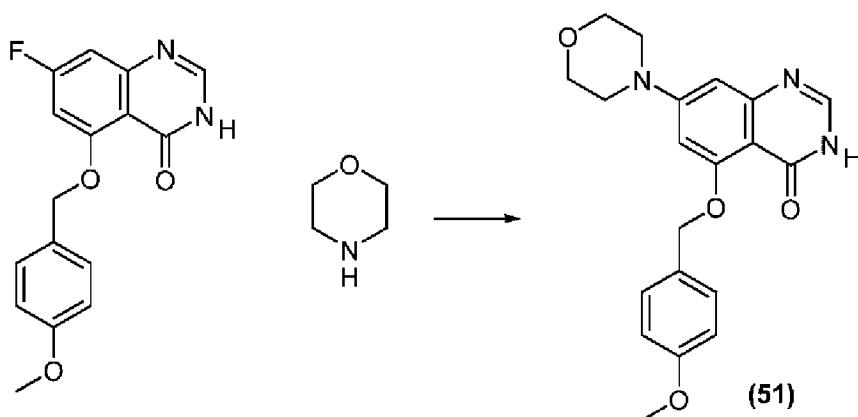
Получение 2-[[4-[4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ил]оксициклогексил]амино]-N-метил-тиримидин-4-карбоксиамида: Соединение (44)



4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ол (75 мг, 0,2734 ммоль), [4-[[4-(метилкарбамоил)пиримидин-2-ил]амино]цикло-гексил]метансульфонат (125,7 мг, 0,3828 ммоль) и карбонат цезия (267,2 мг, 0,8202 ммоль) в ДМФА (1,367 мл) перемешивали в течение ночи в закрытой пробирке при 100°C. Добавляли еще 0,7 экв. мезилата и

перемешивали при 100°C еще 3 ч. Затем реакцию разбавляли водой и 3× экстрагировали EtOAc. Объединенную органическую фазу выпаривали досуха и очищали с помощью флеш-хроматографии при элюировании 0-20% MeOH в ДХМ. Чистые фракции объединяли, выпаривали и лиофилизировали с получением 2-[[4-[4-(диметиламино)-7-морфолино-хиназолин-5-ил]оксициклогексил]-амино]-N-метил-пиримидин-4-карбоксамида (19,7 мг, 0,03694 ммоль, 13,51%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,49 (д, J=4,9 Гц, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,76 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,34 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,54 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,13 (с, 1H), 4,55 (с, 1H), 4,06-3,78 (м, 5H), 3,31 (дд, J=14,5, 9,7 Гц, 4H), 3,15 (с, 6H), 3,02 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,12-2,00 (м, 2H), 1,81 (дд, J=30,2, 11,2 Гц, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 506,2754, найдено 507,0 (M+1)⁺; время удерживания: 0,64 минуты.

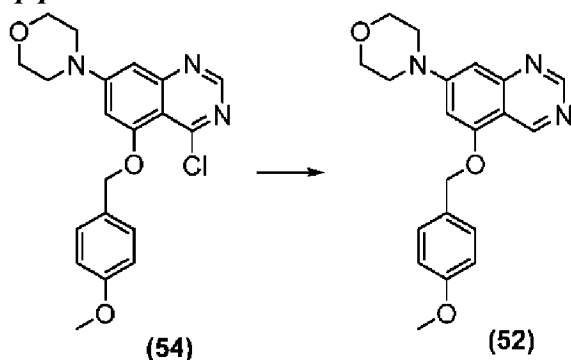
[00475] **Получение Соединения 51: 5-[(4-метоксифенил)-метокси]-7-морфолино-3H-хиназолин-4-он**



К смеси 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она (1,38 г, 3,821 ммоль), тБутилата (натрий ион (1)) (1,11 г, 11,55 ммоль), Pd(OAc)₂ (43 мг, 0,1915 ммоль) и RuPhos (176 мг, 0,3772 ммоль) добавляли раствор морфолина (467 мкл, 5,355 ммоль) в 1,4-диоксане (16,8 мл) (сначала добавляли 14 мл, затем еще 2,8 мл, потому что смесь плохо перемешивалась). Полученную смесь нагревали при 100°C в течение ночи. Смесь охлаждали до комнатной температуры и делили между ДХМ и насыщенным водным NH₄Cl. Слои разделяли и воду и взвесь сухих веществ промывали ДХМ. Органические слои объединяли и фильтровали водный слой. Все органические слои объединяли и сушили над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали с получением 1,3 г продукта. Этот материал растворяли в ДХМ и MeOH и очищали с помощью колоночной флеш-хроматографии (40 г колонка, уравновешенная ДХМ, элюировали 0-10% MeOH/ДХМ в течение 20 мин) с получением 240 мг белого твердого вещества. Твердый материал с фильтров и из водных слоев растворяли в MeOH/ДХМ, объединяли и выпаривали, повторно растворяли в смеси ДХМ/MeOH и добавляли 14 г целита. Эту смесь выпаривали почти досуха, наносили в сухом виде на 40 г колонку ISCO и элюировали, как указано выше, с получением продукта в виде белого твердого вещества (370 мг). Первые фракции с этой колонки выпаривали с получением дополнительного количества продукта (480 мг) в виде почти белого твердого вещества. Чистые материалы объединяли с получением 1,1 грамма 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она. ¹H-ЯМР (400

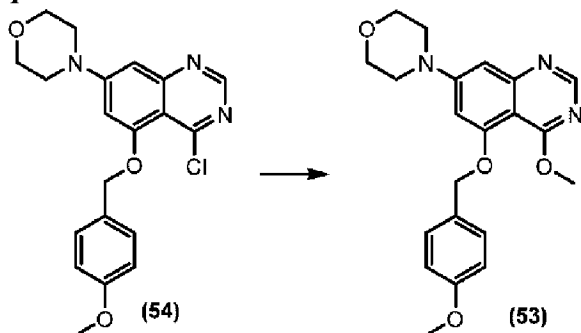
МГц, ДМСО- d_6) δ 11,45 (с, 1H), 7,83 (д, $J=3,1$ Гц, 1H), 7,57-7,45 (м, 2H), 6,99-6,87 (м, 2H), 6,60 (дд, $J=39,0, 2,3$ Гц, 2H), 5,13 (с, 2H), 3,75 (м, 7H), 3,31 (м, 4H).

[00476] *Получение Соединения 52: 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолин*



К раствору 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (8,0 г, 20,73 ммоль) в CH_2Cl_2 (470 мл) добавляли NaCl (360 мл). Полученную двухфазную смесь нагревали с обратным холодильником (при 55°C в бане с алюминиевыми бусами) и добавляли NH_4OH (100 мл из 30% в/об, 856,0 ммоль) и цинк (45,0 г, 688,0 ммоль). Нагревание продолжали в течение 2,5 ч. Смесь фильтровали через целит и осадок на фильтре промывали CH_2Cl_2 и H_2O . Фильтрат разделяли на водный и органический слои. Водный слой дополнительно экстрагировали CH_2Cl_2 (2×), промывали солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток в сухом виде наносили на целит и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (220 г колонка Isco, линейный градиент 0%→10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением 4-[5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (3,96 г, 10,14 ммоль, 48,92%), чистота ~90-95%. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,42 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,41 (д, $J=8,5$ Гц, 2H), 7,01-6,92 (м, 2H), 6,79 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 6,64 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 3,95-3,86 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,44-3,31 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 351,1583, найдено 352,39 ($\text{M}+1$)+; время удерживания: 0,63 минуты.

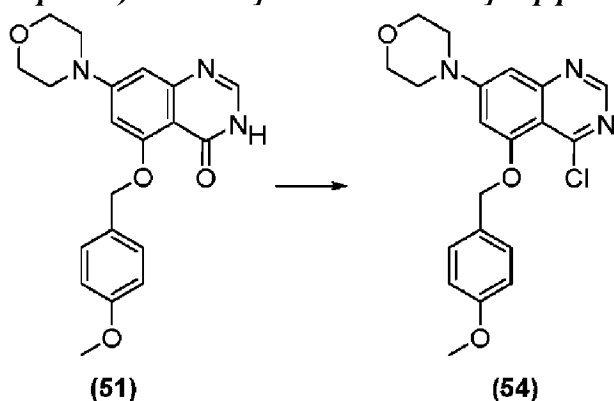
[00477] *Получение 4-[4-метокси-5-[(4-метоксифенил)метокси]-хиназолин-7-ил]морфолина: Соединение 53*



4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолин (450 мг, 1,166 ммоль), метанол (0,236 мл, 5,826 ммоль), K_2CO_3 (322 мг, 2,330 ммоль) и ДМФА (5,0 мл) объединяли в сосуде для микроволнового синтеза и нагревали в микроволновом реакторе при 150°C в течение 30 минут, что приводило к неполному превращению согласно

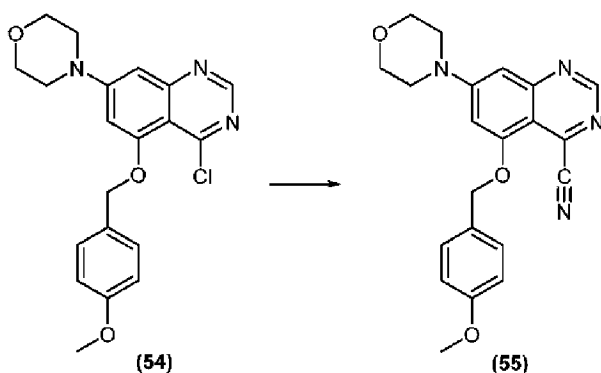
данным ЖХМС. Нагревали снова в микроволновом реакторе при 175°C в течение 1 ч. Реакционную смесь фильтровали через стеклянный фильтр и выпаривали растворитель. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г колонка Isco gold, линейный градиент 0%→10% MeOH/CH₂Cl₂) с получением 4-[4-метокси-5-[(4-метоксифенил)-метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (206 мг, 0,5347 ммоль, 45,86%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,61 (с, 1H), 7,55-7,43 (м, 2H), 7,04-6,93 (м, 2H), 6,84 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,61 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,13 (с, 3H), 3,95-3,88 (м, 4H), 3,86 (с, 3H), 3,42-3,30 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 381,16885, найдено 382,32 (M+1)⁺; время удерживания: 0,65 минуты.

[00478] *Получение Соединения 54: 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолин*



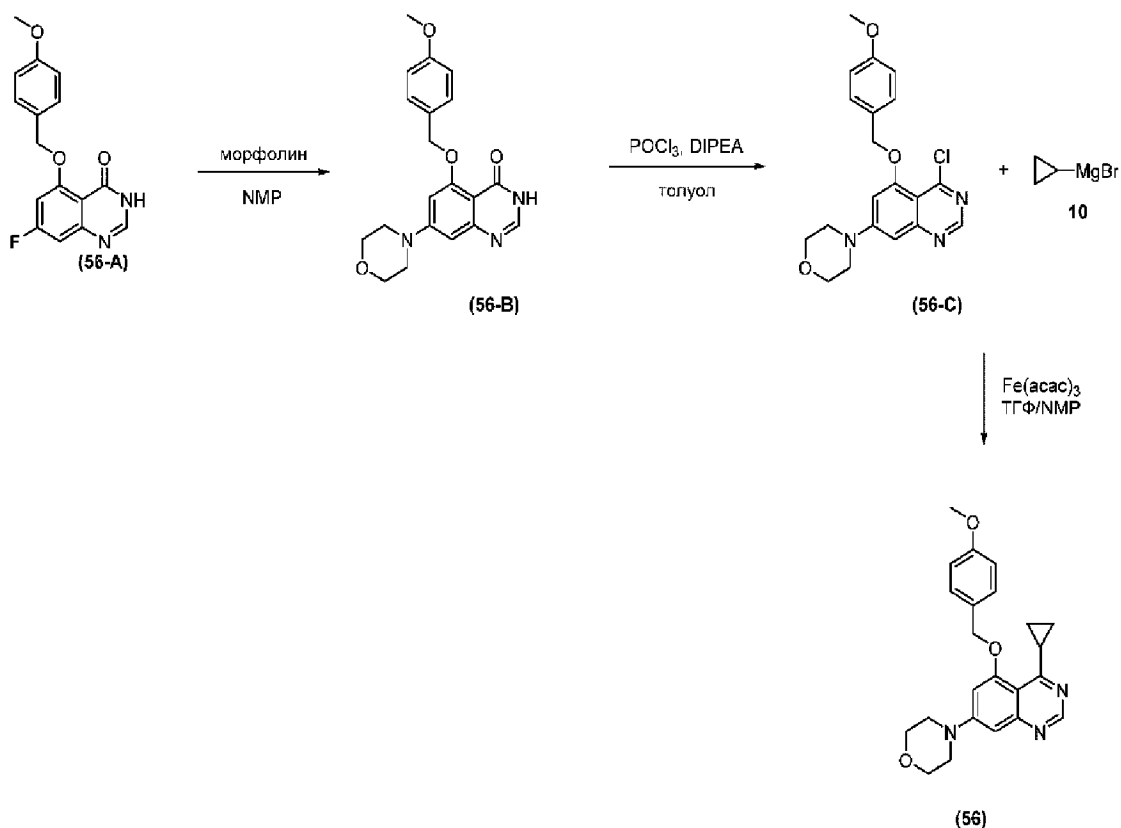
К суспензии 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она (Соединение (51): 18,60 г, 47,08 ммоль) в толуоле (250 мл) добавляли N,N-диизопропилэтиламин (41,00 мл, 235,4 ммоль) с последующим добавлением POCl₃ (17,55 мл, 188,3 ммоль). Реакцию нагревали при 80°C в течение 3 часов. Реакцию разбавляли CH₂Cl₂ и вливали в насыщенный водный NaHCO₃. Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали CH₂Cl₂. Объединенный органический слой сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали с получением оранжевого аморфного вещества. Неочищенный остаток в сухом виде наносили на целит и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (40 г колонка Isco gold, линейный градиент 0%→15% MeOH/CH₂Cl₂) с получением 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (11,977 г, 31,04 ммоль, 65,92%). ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (с, 1H), 7,51-7,40 (м, 2H), 7,01-6,89 (м, 2H), 6,84 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,66 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 3,93-3,85 (м, 4H), 3,83 (с, 3H), 3,43-3,34 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 385,11932, найдено 386,32 (M+1)⁺; время удерживания: 0,77 минуты.

[00479] *Получение Соединения 55: 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрил*



Смесь 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (400 мг, 1,037 ммоль), KCN (204 мг, 3,133 ммоль), п-толуолсульфоната натрия (132 мг, 0,6798 ммоль) и ДМФА (7,2 мл) герметично закрывали и нагревали до 80°C в течение 16 ч. Реакционную смесь делили между H₂O и CH₂Cl₂. Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали CH₂Cl₂ (2×20 мл). Объединенную органическую фазу два раза промывали водой и один раз солевым раствором, сушили (Na₂SO₄), фильтровали и выпаривали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (12 г колонка Isco gold, линейный градиент 0%→10% MeOH/CH₂Cl₂) с получением 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-хиназолин-4-карбонитрила (263,5 мг, 0,7000 ммоль, 67,51%). Сушили при нагреве/в вакууме для удаления остаточного ДМФА. ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,08 (с, 1H), 7,53-7,43 (м, 2H), 6,98-6,91 (м, 2H), 6,81 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,69 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,29 (с, 2H), 3,95-3,85 (м, 4H), 3,82 (с, 3H), 3,48-3,36 (м, 4H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 376,15353, найдено 377,32 (M+1)⁺; время удерживания: 0,81 минуты.

[00480] *Получение* *Соединения* 56: 4-[4-циклопропил-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолин



Получение Соединения (56-B)

Раствор 7-фтор-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она (5,63 г, 18,8 ммоль) и морфолина (33 мл, 380 ммоль) в безводном NMP (60 мл) нагревали до 120°C в течение ночи. Реакцию охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Осадок отфильтровывали и сушили в вакууме при 55°C с получением 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она (3,26 г, выход 47,3%). ¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО) δ 11,46 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,51 (д, J=8,7 Гц, 2H), 6,95 (д, J=8,7 Гц, 2H), 6,60 (дд, J=29,8, 2,1 Гц, 2H), 5,14 (с, 2H), 3,90-3,58 (м, 7H), 3,31 (с, 4H).

Получение Соединения (56-C)

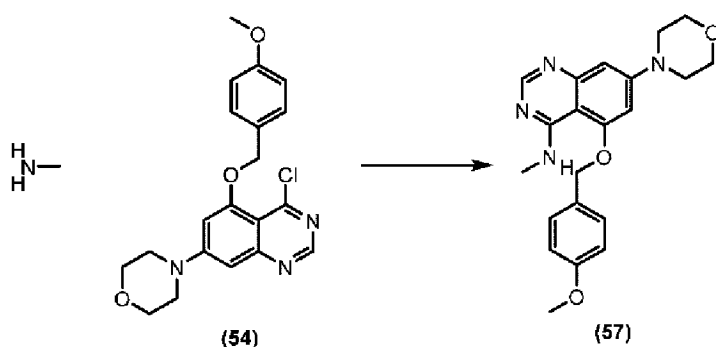
К суспензии 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-3H-хиназолин-4-она (2,0 г, 5,4 ммоль) в толуоле (25 мл) добавляли DIPEA (5,69 мл, 32,7 ммоль) с последующим добавлением POCl₃ (2,54 мл, 27,3 ммоль). Реакцию нагревали до 80°C в течение 3,5 часов. Реакцию охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой и экстрагировали EtOAc/ДХМ. Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью флеш-хроматографии при использовании EtOAc и гептанов с получением 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хинозолин-7-ил]морфолина (1,46 г, выход 69,5%). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,73 (с, 1H), 7,52-7,41 (м, 2H), 7,04-6,91 (м, 2H), 6,87 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,68 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,68 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,19 (с, 2H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,86 (с, 3H), 3,48-3,35 (м, 4H).

Получение соединения (56)

К смеси 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хинозолин-7-ил]морфолина (200

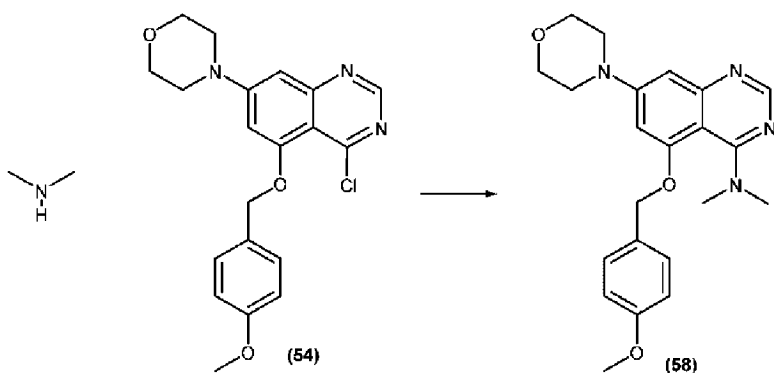
мг, 0,520 ммоль) и $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (55 мг, 0,16 ммоль) в ТГФ (5 мл) и NMP (0,25 мл) под азотом по каплям добавляли (циклопропил)магнийбромид (1,20 мл 0,5 М, 0,6000 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию считали прошедшей не полностью, поэтому по каплям добавляли 1 мл (циклопропил)магнийбромида и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 5,5 часов. Реакцию вливали в делительную воронку, содержащую охлажденный льдом NH_4Cl , и экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали соевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Остаток очищали с помощью флеш-хроматографии при использовании EtOAc и гептанов с получением 4-[4-циклопропил-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (176 мг, выход 84,8%). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,79 (с, 1H), 7,48-7,35 (м, 2H), 7,00-6,88 (м, 2H), 6,83 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,65 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 5,15 (с, 2H), 3,93-3,85 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,48-3,28 (м, 5H), 1,35-1,22 (м, 2H), 0,99-0,86 (м, 2H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 391,1896, найдено 392,25 ($\text{M}+1$) $^+$.

[00481] *Получение Соединения 57: 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N-метил-7-морфолино-хиназолин-4-амин*



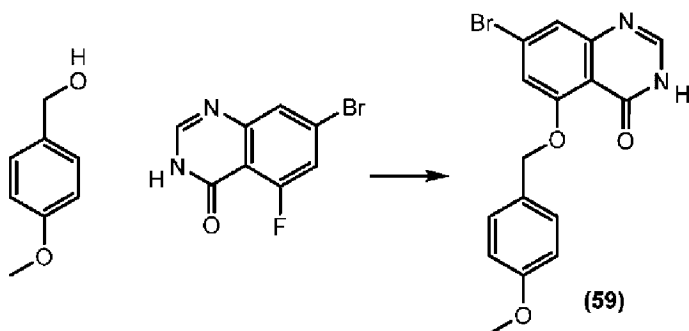
К раствору 4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолина (500 мг, 1,296 ммоль) в 1,4-диоксане (6,480 мл) добавляли метиламин (3,240 мл 2 М, 6,480 ммоль) в ТГФ. Реакцию нагревали в течение 15 минут при 60°C. Реакцию разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (3×). Объединенную органическую фазу промывали соевым раствором, выпаривали досуха, растворяли в минимальном количестве EtOAc и по каплям вносили в холодную смесь гептанов при энергичном перемешивании. Полученный светло-оранжевый осадок отфильтровывали и сушили в течение ночи в вакууме при 50°C с получением 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N-метил-7-морфолино-хиназолин-4-амина (378 мг, 0,9638 ммоль, 74,36%). ^1H -ЯМР (300 МГц, DMSO) δ 8,22 (с, 1H), 7,88 (т, $J=4,6$ Гц, 1H), 7,48 (дд, $J=9,1, 2,4$ Гц, 2H), 7,02-6,93 (м, 2H), 6,74 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 6,51 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 5,33 (с, 2H), 3,77-3,71 (м, 7H), 3,28-3,18 (м, 4H), 2,92 (д, $J=4,7$ Гц, 3H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 380,18484, найдено 381,0 ($\text{M}+1$) $^+$; время удерживания: 0,73 минуты.

[00482] *Получение Соединения 58: 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N,N-диметил-7-морфолино-хиназолин-4-амин*



4-[4-хлор-5-[(4-метоксифенил)метокси]хиназолин-7-ил]морфолин (500 мг, 1,296 ммоль), диметиламин (Хлороводородную кислоту (1)) (528,4 мг, 563,3 мкл, 6,480 ммоль) и триэтиламин (1,311 г, 1,806 мл, 12,96 ммоль) в 1,4-диоксане (6,480 мл) перемешивали при 60°C в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и 3× экстрагировали EtOAc. Объединенную органическую фазу выпаривали досуха, растворяли в минимальном количестве EtOAc и по каплям вносили в холодный гептан при энергичном перемешивании. Полученный красновато-коричневый осадок отфильтровывали и сушили в течение ночи в вакууме при 50 град. С с получением 384 мг (71,4%) 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N,N-диметил-7-морфолино-хиназолин-4-амин, который в таком виде использовали в следующей реакции. 5-[(4-метоксифенил)метокси]-N,N-диметил-7-морфолино-хиназолин-4-амин (384 мг, 0,9248 ммоль, 71,36%) ¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО) δ 8,21 (с, 1H), 7,42 (т, J=5,7 Гц, 2H), 7,05-6,94 (м, 2H), 6,79 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,14 (с, 2H), 3,79-3,73 (м, 7H), 3,35-3,31 (м, 4H), 2,91 (с, 6H). ЭРИ-МС m/z вычисл. 394,2005, найдено 395,0 (M+1)⁺; время удерживания: 0,74 минуты.

[00483] **Получение 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она:**
Соединение 59



К раствору (4-метоксифенил)метанола (31,1 г, 225,1 ммоль) в ДМФА (279,9 мл) добавляли NaH (9,31 г, 232,8 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли 7-бром-5-фтор-3H-хиназолин-4-он (27,33 г, 112,5 ммоль) и продолжали перемешивание еще в течение 2 ч. Останавливали путем добавления воды (600 мл), затем добавляли AcOH с образованием осадка. Твердое вещество собирали с помощью вакуумной фильтрации, промывали водой, затем Et₂O. Твердое вещество сушили в глубоком вакууме в течение ночи с получением 7-бром-5-[(4-метоксифенил)метокси]-3H-хиназолин-4-она (34,32 г, 80,2%). ¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-

δ 12,07 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,55-7,42 (м, 2H), 7,37 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,28 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 7,03-6,90 (м, 2H), 5,20 (с, 2H), 3,76 (с, 3H)

Пример 2: Биологический анализ соединений согласно изобретению

А. Анализ ингибирования ДНК-ПК

[00484] Соединения подвергали скринингу на их способность ингибировать ДНК-ПК киназу при использовании стандартного радиометрического анализа. Кратко, в этом киназном анализе исследовали перенос концевой ^{33}P -фосфата в ^{33}P -АТФ к пептидному субстрату. Анализ проводили в 384-луночных планшетах до конечного объема 50 мкл в лунке, содержащей приблизительно 6 нМ ДНК-ПК, 50 мМ HEPES (pH 7,5), 10 мМ MgCl_2 , 25 мМ NaCl, 0,01% BSA, 1 мМ DTT, 10 мкг/мл гидродинамически фрагментированной двухцепочечной ДНК (полученной от Sigma), 0,8 мг/мл пептида ДНК-ПК (Glu-Pro-Pro-Leu-Ser-Gln-Glu-Ala-Phe-Ala-Asp-Leu-Trp-Lys-Lys-Lys, полученного от American Peptide) и 100 мкМ АТФ. Таким образом, соединения согласно изобретению растворяли в ДМСО с получением 10 мМ исходных стоковых растворов. Затем приготавливали серийные разведения в ДМСО с получением готовых растворов для анализа. Аликвоту 0,75 мкл ДМСО или ингибитора в ДМСО добавляли в каждую лунку с последующим добавлением раствора субстрата АТФ, содержащего ^{33}P -АТФ (полученный от Perkin Elmer). Реакцию начинали при добавлении пептида ДНК-ПК и дцДНК. Через 45 минут реакцию останавливали 25 мкл 5% фосфорной кислоты. Реакционную смесь переносили в 384-луночные РН планшеты MultiScreen HTS (полученные от Millipore), оставляли для связывания на один час и три раза промывали 1% фосфорной кислотой. После добавления 50 мкл высокоэффективного сцинтиллятора Ultima GoldTM (полученного от Perkin Elmer), образцы считывали в сцинтилляционном и люминесцентном счетчике для микропланшетов Packard TopCount NXT (Packard BioScience). Значения K_i вычисляли с помощью макроса Microsoft Excel Solver для аппроксимации данных к кинетической модели для конкурентного ингибирования прочного связывания. В приведенных ниже Таблицах 1 и 2 значение K_i меньше 0,001 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "А"; K_i больше или равное 0,001 микромолярного порядка и меньше 0,01 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "В"; K_i больше или равное 0,01 микромолярного порядка и меньше 0,1 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "С"; K_i больше или равное 0,1 микромолярного порядка и меньше 1 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "D"; и K_i больше или равное 1 микромолярного порядка обозначено "Е".

В. Клеточный анализ ДНК-ПК

[00485] ДНК-ПК рекрутируется и активируется двухцепочечными разрывами (ДЦР) в ДНК и играет важную роль в механизме репарации по пути негомولوجичного соединения концов (NHEJ). После активации ДНК-ПК подвергается быстрому аутофосфорилированию по Ser2056. Измерение фДНК-ПК (Ser2056) в ответ на ДЦР в ДНК обеспечивает анализ клеточной сигнализации для оценки потенциальных ингибиторов ДНК-ПК киназы.

[00486] Неокарциностатин (NCS) использовали в качестве радиомиметика для индукции ДЦР ДНК. В сэндвич-ИФА использовали платформу на основе технологии электрохемилюминесценции Meso Scale Discovery, которая обычно обеспечивает более высокую чувствительность, чем традиционные форматы ИФА. Внутренняя валидация показала, что этот анализ позволяет проводить высокоспецифичное и количественное измерение фДНК-ПК (Ser2056).

[00487] Клетки A549 (НМРЛ человека) сеяли при плотности 25000 клеток/лунка в 100 мкл DMEM (номер по кат. Invitrogen 11995-040) с добавкой 1% Pen/Strep (номер по кат. Invitrogen 15070-063) и 10% FBS (номер по кат. Hyclone SH30071.03HI) в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном (Costar #3904) и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C и 5% CO₂. На следующий день соединения и растворы NCS приготавливали путем добавления 100 мкл среды DMEM в лунку в полипропиленовый планшет Corning с глубокими лунками, имеющими V-образное дно (номер по кат. 3357). Прибор HP Compound Dilution D300 использовали для добавления соединений в соответствующие лунки при использовании синглетного логарифмического и 16-точечного титрования.

[00488] Раствор NCS в DMEM приготавливали путем добавления NCS в среду DMEM в концентрации 200 нг/мл (конечная концентрация для анализа 50 нг/мл). 100 мкл раствора DMEM/NCS добавляли в лунки с соединениями. Затем 100 мкл этого раствора сразу добавляли к клеткам A549. После этого клетки инкубировали в течение 15 минут при 37°C.

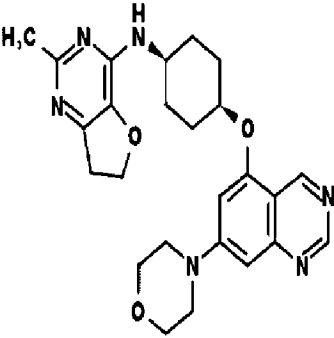
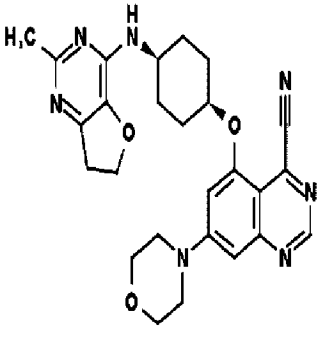
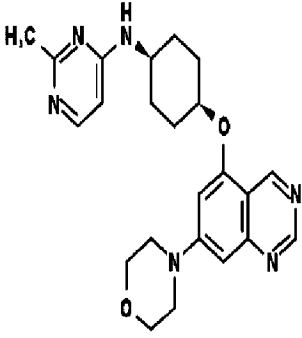
[00489] Буфер для полного лизиса приготавливали путем добавления 1% ингибитора фосфатазы (номер по кат. Sigma P2850) и 1% ингибитора протеазы (номер по кат. Sigma P8340) в лизисный буфер для клеточного анализа Lanthascreen (номер по кат. Invitrogen PV5598). Среда из планшета удаляли, стряхивая среду и промакивая бумагой. В каждую лунку добавляли 60 мкл/лунка буфера для полного лизиса. Эти планшеты затем инкубировали в течение по меньшей мере 5 минут в лизисном буфере при комнатной температуре для обеспечения полного лизиса. В этот момент лизаты можно переносить в подготовленные планшеты для ИФА.

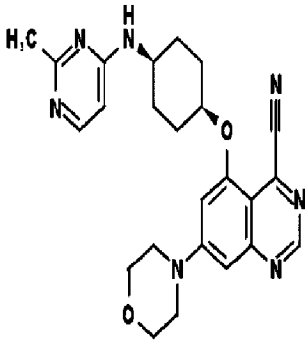
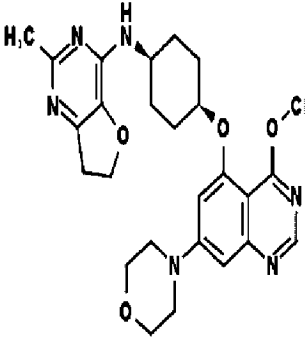
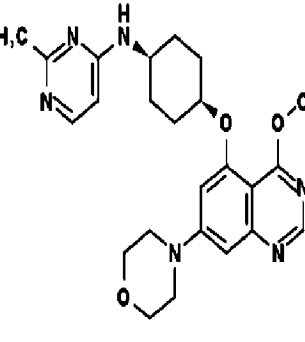
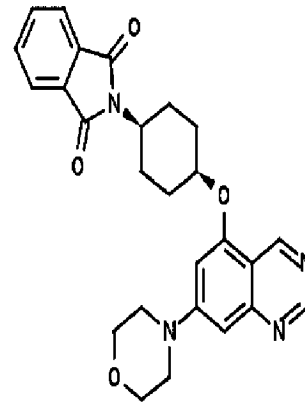
[00490] Подготовленные планшеты для ELISA приготавливали путем блокирования планшетов Mesoscale Goat-Anti-Mouse (GAM) при использовании 150 мкл/лунка 3% Blocker A (номер по кат. Mesoscale R93-BA) в течение одного часа при комнатной температуре и встряхивании. Захватывающее антитело приготавливали путем разведения мышиного моноклонального антитела против суммарной ДНК-ПК (номер по кат. AbCAM ab1832) до 3 мкг/мл в 1% Blocker A. Блокированные планшеты промывали один раз 200 мкл D-PBS. Захватывающее антитело (25 мкл/лунка) добавляли в каждую лунку и оставляли для инкубирования на час при комнатной температуре и встряхивании. Затем планшеты промывали один раз 200 мкл D-PBS, после чего добавляли 25 мкл подготовленного клеточного лизата из клеточных планшетов в ИФА планшет Mesoscale GAM. Затем лизат инкубировали в планшетах в течение одного часа при комнатной

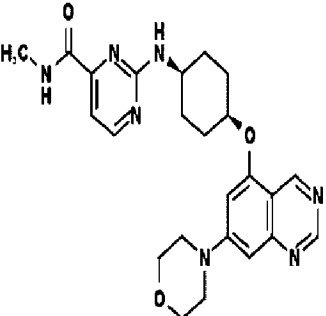
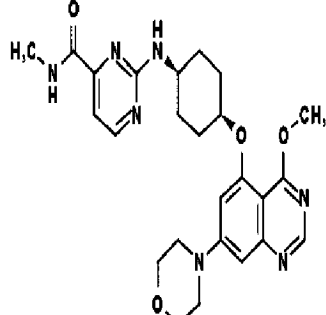
температуре и встряхивании. Детектирующее антитело (Epitomics кроличье антитело против pS2056 ДНК-ПК) подготавливали в разведении 1/1000 (до конечной концентрации 450 нг/мл) в 1% Blocker A. Планшеты GAM промывали один раз 200 мкл D-PBS и затем в планшет добавляли 25 мкл/лунка детектирующего антитела. Планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре и встряхивании. Sulfotag подготавливали путем добавления козьего антитела против иммуноглобулинов кролика Sulfo-Tag (номер по кат. Mesoscale R32AB-1) в разведении 1/500 (1 мкг/мл) в 1% Blocker A. Планшеты GAM промывали 200 мкл D-PBS и затем в каждую лунку добавляли 25 мкл препарата Sulfotag. После инкубирования планшетов с конечным раствором Sulfotag в течение 1 часа, их один раз промывали 200 мкл D-PBS. 1× Read Buffer (номер по кат. Mesoscale R32-TC) приготавливали путем разбавления 4× буфера в ddH₂O. 150 мкл 1× буфера добавляли в каждую лунку планшета GAM, а затем планшет считывали на Sector Imager 2400. Полученные данные (электрохемилюминесценции) наносили на график в зависимости от концентрации каждого соединения, и значения IC₅₀ получали при использовании программы Prism (GraphPad Prism версии 6.0e для Macintosh).

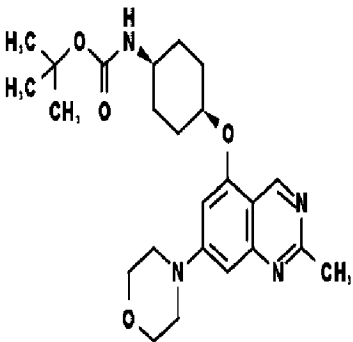
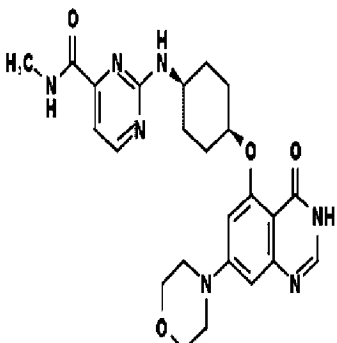
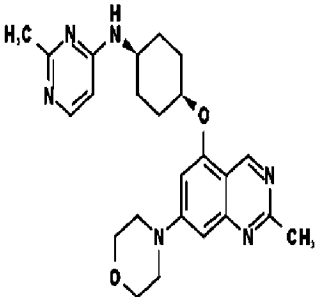
[00491] В Таблицах 1 и 2 ниже, значение IC₅₀ меньше 0,10 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "А"; IC₅₀ больше или равное 0,10 микромолярного порядка и меньше 1,0 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК обозначено "В"; и IC₅₀ больше или равное 1,0 мкМ для ингибирования ДНК-ПК обозначено "С".

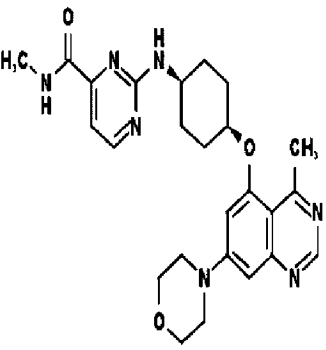
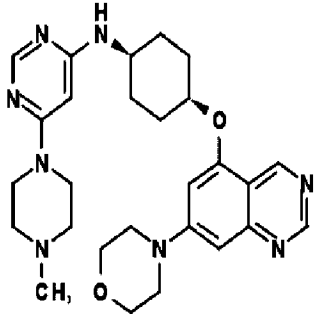
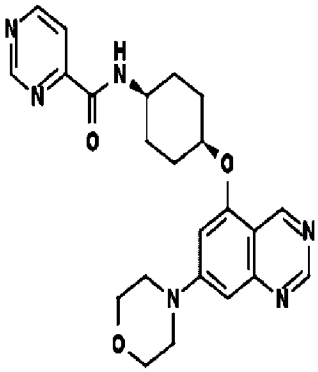
Таблица 1: Данные анализа и значения K_i и IC_{50} для некоторых соединений согласно изобретению

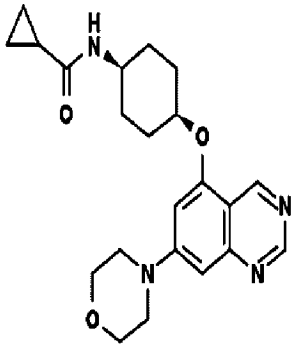
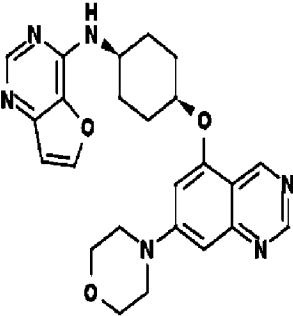
Соед.	Молекула	M+1	Время удерживания ХХМС (Метод)	ЯМР	K_i (мкМ) ДНК-ПК	IC_{50} (мкМ)
1		463,26	0,5 (A)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (с, 1H), 6,58 (д, J=1,5 Гц, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,59 (т, J=9,0 Гц, 2H), 4,52 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,24-4,11 (м, 1H), 3,94-3,83 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 3,19 (т, J=9,0 Гц, 2H), 2,48 (с, 3H), 2,21 (д, J=13,1 Гц, 2H), 1,99 (дд, J=12,6, 3,6 Гц, 2H), 1,90-1,72 (м, 4H),	A	A
2		488,34	0,63 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,08 (с, 1H), 6,83 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,67 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,84 (с, 1H), 4,64 (дд, J=8,6, 4,2 Гц, 1H), 4,62-4,52 (м, 2H), 4,27-4,17 (м, 1H), 3,94-3,85 (м, 4H), 3,51-3,40 (м, 4H), 3,18 (т, J=9,1 Гц, 2H), 2,49 (с, 3H), 2,33-2,22 (м, 2H), 2,07-1,86 (м, 6H),	A	A
3		421,42	0,55 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,12 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,86-6,77 (м, 1H), 6,60 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,18 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,79 (д, J=3,5 Гц, 1H), 4,02-3,80 (м, 5H), 3,48-3,30 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,32-2,20 (м, 2H), 2,07-1,95 (м, 2H), 1,94-1,76 (м, 4H),	A	A

4		446,35	0,61 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,08 (с, 1H), 8,06 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,71-6,63 (м, 1H), 6,14 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,93 (с, 1H), 4,85 (с, 1H), 4,06-3,79 (м, 5H), 3,49 (с, 3H), 3,48-3,40 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,34-2,21 (м, 2H), 2,13-1,85 (м, 6H),	A	A
5		493,34	0,58 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,58 (с, 1H), 6,80 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,68 (с, 1H), 4,58 (т, J=9,1 Гц, 2H), 4,46 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,13 (с, 3H), 3,93-3,82 (м, 4H), 3,38-3,27 (м, 4H), 3,19 (т, J=9,1 Гц, 2H), 2,49 (с, 3H), 2,25-2,13 (м, 2H), 1,99-1,74 (м, 6H),	A	A
6		451,35	0,57 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,58 (с, 1H), 8,12 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,55 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,17 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,69 (с, 1H), 4,12 (с, 3H), 3,94-3,84 (м, 4H), 3,70 (д, J=12,4 Гц, 1H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,21 (д, J=11,0 Гц, 2H), 1,98-1,73 (м, 6H),	A	A
7		459,31	0,66 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,80 (д, J=0,6 Гц, 1H), 9,15 (с, 1H), 7,89-7,78 (м, 2H), 7,78-7,65 (м, 2H), 6,80 (дд, J=2,3, 0,6 Гц, 1H), 6,61 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,30 (тт, J=12,5, 4,1 Гц, 1H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,47-3,30 (м, 4H), 2,83 (кд, J=12,8, 3,4 Гц, 2H), 2,35 (д, J=15,0 Гц, 2H), 1,84-1,62 (м, 4H),	B	B

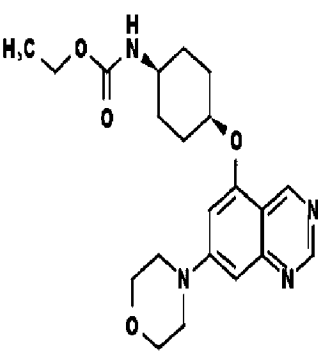
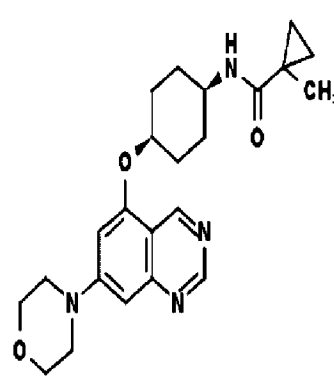
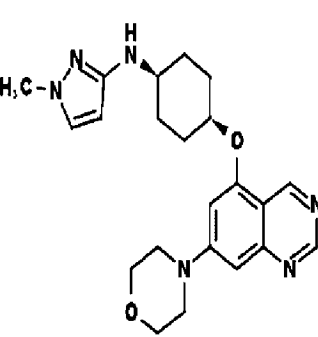
8		464,35	0,58 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,49 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,76 (д, J=4,5 Гц, 1H), 7,32 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,79 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,59 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,18 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,86-4,70 (м, 1H), 4,15-3,96 (м, 1H), 3,96-3,78 (м, 4H), 3,49-3,33 (м, 4H), 3,00 (д, J=5,2 Гц, 3H), 2,32-2,14 (м, 2H), 2,10-1,96 (м, 2H), 1,96-1,74 (м, 4H), 1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,50 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,77 (с, 1H), 7,33 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,86-6,74 (м, 1H), 6,59 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,16 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,03 (д, J=7,9 Гц, 1H), 3,95-3,82 (м, 4H), 3,39 (дд, J=5,7, 4,1 Гц, 4H), 3,01 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,24 (д, J=10,1 Гц, 2H), 2,08-1,96 (м, 2H), 1,96-1,68 (м, 4H),	A	A
9		494,33	0,6 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,60 (с, 1H), 8,49 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,38-7,30 (м, 1H), 6,91 (д, J=3,6 Гц, 1H), 6,55 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,09 (с, 1H), 4,71 (с, 1H), 4,18 (д, J=2,0 Гц, 3H), 4,04-3,83 (м, 5H), 3,42-3,32 (м, 4H), 3,01 (д, J=5,2 Гц, 3H), 2,22 (д, J=9,3 Гц, 2H), 2,06-1,93 (м, 2H), 1,83 (т, J=9,4 Гц, 4H),	A	A

10		443,2	0,6 (C)	¹H-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 9,32 (с, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,50 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,71 (с, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,89 (т, J=4,9 Гц, 4H), 3,63 (с, 1H), 3,42 (т, J=4,9 Гц, 4H), 2,84 (с, 3H), 2,17 (д, J=13,4 Гц, 2H), 1,97-1,60 (м, 6H), 1,47 (с, 9H),	В	С
11		480,33	0,57 (A)	¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,46 (д, J=4,9 Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,87 (дд, J=5,4, 4,5 Гц, 1H), 7,29 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,70 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,48 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,76-5,31 (м, 1H), 4,72 (с, 1H), 3,99 (дт, J=8,1, 4,0 Гц, 1H), 3,92-3,74 (м, 4H), 3,42-3,22 (м, 4H), 2,98 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,32-2,12 (м, 2H), 2,12-1,84 (м, 4H), 1,77 (тд, J=13,2, 11,9, 3,2 Гц, 2H),	А	С
12		435,2	0,49 (A)	¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,38 (с, 1H), 8,10 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,80-6,69 (м, 1H), 6,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,21 (д, J=6,0 Гц, 1H), 5,09 (с, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,01-3,82 (м, 4H), 3,38 (дд, J=6,0, 3,9 Гц, 4H), 2,81 (с, 3H), 2,54 (с, 3H), 2,25 (д, J=11,5 Гц, 2H), 2,12-1,68 (м, 6H), ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,27 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,01 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,44 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,19-6,05 (м, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,66 (с, 1H), 3,80 (т, J=4,9 Гц, 5H), 3,29 (дд, J=6,8, 3,1 Гц, 4H), 2,71 (д, J=1,9 Гц, 3H), 2,43 (д, J=1,8 Гц, 4H), 2,14 (д, J=13,8 Гц, 2H), 2,01-1,68 (м, 6H),	В	В

13		478,44	0,59 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,87 (с, 1H), 8,49 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,75 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,34 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,18 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,79-4,69 (м, 1H), 4,03 (ддт, J=13,1, 7,8, 4,4 Гц, 1H), 3,89 (дд, J=5,7, 4,1 Гц, 4H), 3,42-3,27 (м, 4H), 3,05 (с, 3H), 3,01 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,31-2,16 (м, 2H), 2,13-2,00 (м, 2H), 2,00-1,75 (м, 4H),	A	A
14		505,44	0,53 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,42 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 8,18 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,77 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,44 (д, J=1,0 Гц, 1H), 4,85-4,62 (м, 2H), 3,97-3,74 (м, 5H), 3,60-3,55 (м, 4H), 3,45-3,27 (м, 4H), 2,52-2,46 (м, 4H), 2,33 (д, J=2,5 Гц, 3H), 2,26-2,15 (м, 2H), 2,05-1,91 (м, 2H), 1,91-1,64 (м, 4H),	A	A
15		435,35	2,48 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,47 (с, 1H), 9,26 (д, J=1,4 Гц, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,97 (д, J=5,0 Гц, 1H), 8,12 (дд, J=5,1, 1,5 Гц, 1H), 8,02 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,82-6,75 (м, 1H), 6,58 (д, J=2,2 Гц, 1H), 4,83-4,73 (м, 1H), 4,20-4,07 (м, 1H), 3,95-3,82 (м, 4H), 3,43-3,31 (м, 4H), 2,33-2,17 (м, 2H), 2,06-1,82 (м, 6H),	A	A

16		397,44	0,58 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,56 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,73-5,54 (м, 1H), 4,74 (т, J=3,9 Гц, 1H), 3,97 (ддд, J=14,9, 6,4, 4,1 Гц, 1H), 3,92-3,81 (м, 4H), 3,45-3,30 (м, 4H), 2,19 (дд, J=12,1, 2,7 Гц, 2H), 1,95-1,59 (м, 6H), 1,34 (тт, J=7,7, 4,6 Гц, 1H), 1,03-0,91 (м, 2H), 0,79-0,68 (м, 2H), ; 1H-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 9,44 (с, 1H), 9,09 (д, J=1,4 Гц, 1H), 6,78 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,60-6,52 (м, 1H), 5,73-5,52 (м, 1H), 4,73 (д, J=3,5 Гц, 1H), 3,97 (ддт, J=10,2, 7,3, 3,8 Гц, 1H), 3,89 (тт, J=4,9, 1,3 Гц, 4H), 3,38 (тт, J=4,9, 1,3 Гц, 4H), 2,28-2,09 (м, 2H), 1,89 (дт, J=13,0, 4,2 Гц, 2H), 1,85-1,60 (м, 4H), 1,39-1,28 (м, 1H), 1,03-0,90 (м, 2H), 0,80-0,69 (м, 2H),	A	A
17		447,12	0,55 (A)	1H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,49 (с, 1H), 9,12 (с, 1H), 8,51 (с, 1H), 7,76 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,87 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,82 (дд, J=2,2, 0,5 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,17 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,83 (д, J=2,9 Гц, 1H), 4,45-4,29 (м, 1H), 3,94-3,90 (м, 4H), 3,45-3,39 (м, 4H), 2,30 (д, J=9,4 Гц, 2H), 2,15-2,06 (м, 2H), 1,99-1,86 (м, 4H),	A	A

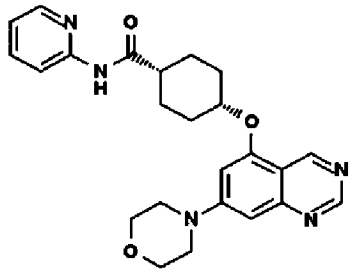
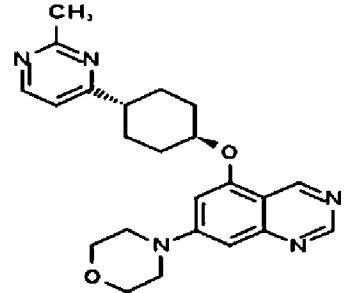
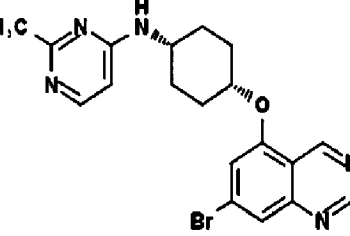
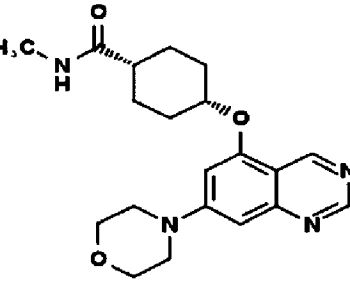
18		505,49	0,53 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,43 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,89 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,57 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,68 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,74 (с, 1H), 4,60 (д, J=7,9 Гц, 1H), 3,95-3,70 (м, 9H), 3,44-3,32 (м, 4H), 2,49-2,39 (м, 4H), 2,32 (с, 3H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,05-1,92 (м, 2H), 1,92-1,76 (м, 4H),	A	A
19		478,2	0,53 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,17 (с, 1H), 8,28 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,56 (с, 1H), 7,12 (дд, J=4,8, 0,7 Гц, 1H), 6,52 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,32 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,94 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,54 (д, J=4,3 Гц, 1H), 3,82 (дд, J=13,9, 4,2 Гц, 1H), 3,67 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,21-3,12 (м, 4H), 2,80 (д, J=5,0 Гц, 3H), 2,59 (с, 3H), 2,12-1,95 (м, 2H), 1,88-1,75 (м, 2H), 1,73-1,51 (м, 4H), [1]	B	A
20		401,32	0,56 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,45 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,79 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,52 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,75 (р, J=3,2 Гц, 1H), 4,06-3,93 (м, 1H), 3,94-3,84 (м, 6H), 3,45 (с, 3H), 3,42-3,33 (м, 4H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,93-1,61 (м, 6H),	B	C
21		451,33	0,51 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 8,08 (д, J=5,9 Гц, 1H), 7,93 (с, 1H), 6,65 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,48 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,18 (д, J=6,1 Гц, 1H), 5,22 (с, 1H), 4,72 (с, 1H), 3,97-3,81 (м, 4H), 3,53 (д, J=10,6 Гц, 3H), 3,40-3,25 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,23 (д, J=12,9 Гц, 2H), 2,05-1,70 (м, 7H),		B

22		401,32	0,63 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,41 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,56 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,78-4,56 (м, 2H), 4,12 (к, J=7,1 Гц, 2H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,66 (д, J=9,7 Гц, 1H), 3,46-3,31 (м, 4H), 2,25-2,08 (м, 2H), 1,90 (дт, J=12,5, 4,1 Гц, 2H), 1,84-1,61 (м, 4H), 1,25 (т, J=7,1 Гц, 3H),	A	A
23		411,31	0,62 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,46 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,85-6,74 (м, 1H), 6,56 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,67 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,74 (т, J=3,2 Гц, 1H), 4,04-3,80 (м, 5H), 3,47-3,32 (м, 4H), 2,28-2,14 (м, 2H), 1,96-1,83 (м, 2H), 1,83-1,51 (м, 4H), 1,35 (с, 3H), 1,19 (к, J=3,8 Гц, 2H), 0,65-0,53 (м, 2H),	A	A
24		409,33	0,51 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,43 (д, J=1,5 Гц, 1H), 9,09 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,10 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 5,53 (т, J=2,0 Гц, 1H), 4,76-4,66 (м, 1H), 3,88 (дт, J=5,0, 3,0 Гц, 4H), 3,72 (д, J=1,5 Гц, 3H), 3,49-3,33 (м, 5H), 2,18 (дд, J=13,8, 4,1 Гц, 3H), 1,99 (дт, J=11,7, 3,7 Гц, 2H), 1,89-1,63 (м, 4H),	A	A

25		494,37	0,6 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,47 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,28 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,63 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,47 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,32 (с, 1H), 4,67 (с, 1H), 3,99 (д, J=9,4 Гц, 1H), 3,92-3,80 (м, 4H), 3,50 (с, 3H), 3,37-3,23 (м, 4H), 3,01 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,27-2,15 (м, 2H), 2,07-1,95 (м, 2H), 1,90 (дд, J=13,0, 4,2 Гц, 2H), 1,79 (т, J=12,8 Гц, 2H),	B
26		433,05	0,25 (C)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,44 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 7,51 (д, J=1,3 Гц, 1H), 7,40-7,34 (м, 1H), 7,09 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,78 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,74 (д, J=3,9 Гц, 1H), 4,11 (тк, J=9,9, 6,2, 5,3 Гц, 1H), 3,89 (дд, J=5,9, 3,9 Гц, 4H), 3,73 (с, 3H), 3,43-3,33 (м, 4H), 2,29-2,17 (м, 2H), 2,04-1,73 (м, 6H),	B
27		408,35	0,63 (C)	¹ H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,45 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,53 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,93 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,85-6,72 (м, 1H), 6,60 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,20 (дк, J=7,6, 3,7 Гц, 1H), 4,67 (дт, J=6,3, 3,1 Гц, 1H), 3,99-3,79 (м, 4H), 3,51-3,15 (м, 4H), 2,38-2,06 (м, 4H), 2,11-1,78 (м, 4H),	A
28		408,39	0,62 (C)	¹ H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,43 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,54 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,95 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,80 (дд, J=2,1, 0,8 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,29-5,24 (м, 1H), 4,80-4,59 (м, 1H), 4,11-3,77 (м, 4H), 3,58-3,30 (м, 4H), 2,33-2,20 (м, 4H), 2,04-1,70 (м, 4H),	A

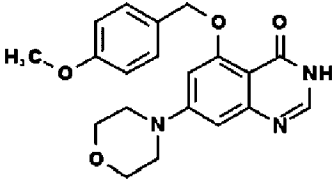
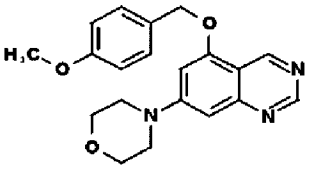
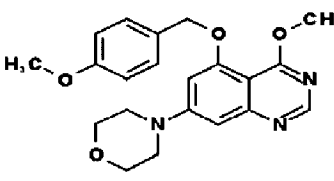
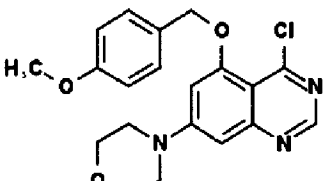
29		397,26	0,53 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,47 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,74 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,27 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,84 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 3,96-3,84 (м, 4H), 3,51-3,38 (м, 4H), 3,31-3,16 (м, 1H), 2,42-2,27 (м, 2H), 2,22-2,05 (м, 4H), 1,96-1,82 (м, 2H),		
30		406,36	0,51 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,51 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,59 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,06 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,84 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,96-4,82 (м, 1H), 4,03-3,82 (м, 4H), 3,51-3,30 (м, 4H), 2,90-2,77 (м, 1H), 2,75 (с, 3H), 2,44-2,28 (м, 2H), 2,19-1,75 (м, 6H),		
31		386,28	0,58 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,46 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 6,81 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,83-4,66 (м, 1H), 4,19 (к, J=7,1 Гц, 2H), 4,01-3,83 (м, 4H), 3,51-3,29 (м, 4H), 2,48 (тт, J=10,3, 3,9 Гц, 1H), 2,30-2,12 (м, 2H), 2,12-1,65 (м, 6H), 1,30 (т, J=7,1 Гц, 3H),		
32		397,31	0,53 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,47 (с, 1H), 9,11 (с, 1H), 6,81 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,56 (д, J=1,8 Гц, 1H), 5,65 (с, 1H), 4,87-4,72 (м, 1H), 4,02-3,83 (м, 4H), 3,48-3,35 (м, 4H), 2,82-2,68 (м, 1H), 2,37-2,17 (м, 3H), 2,02-1,68 (м, 8H), 0,90-0,75 (м, 2H), 0,59-0,41 (м, 2H),		

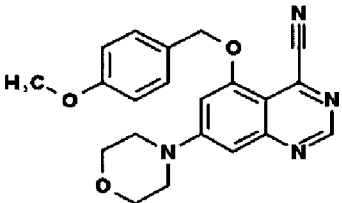
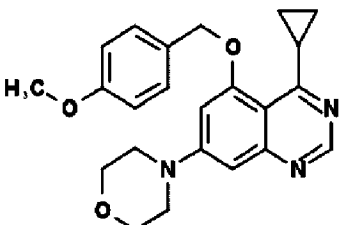
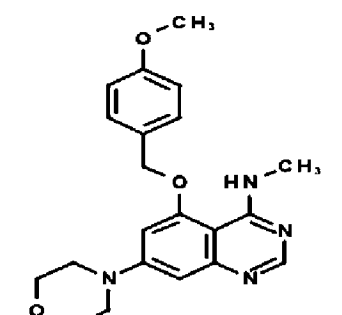
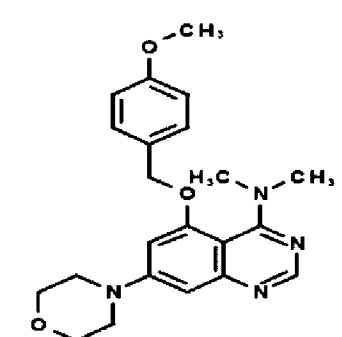
33		425,33	0,57 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,45 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,78 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,57 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,74 (к, J=3,2 Гц, 1H), 4,05-3,84 (м, 5H), 3,46-3,31 (м, 4H), 2,19 (дк, J=9,9, 3,3 Гц, 2H), 1,97-1,55 (м, 6H), 1,26 (дд, J=8,0, 5,3 Гц, 1H), 1,17 (с, 3H), 1,15 (с, 3H), 1,09 (т, J=4,8 Гц, 1H), 0,73 (дд, J=8,0, 4,3 Гц, 1H),		
34		413,46	0,55 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,42 (с, 1H), 9,08 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,79 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,51 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,95-4,72 (м, 5H), 4,10-3,84 (м, 5H), 3,70 (тт, J=8,3, 6,7 Гц, 1H), 3,39 (дд, J=5,8, 4,0 Гц, 5H), 2,30-2,15 (м, 3H), 1,98-1,58 (м, 4H),		
35		397,32	0,57 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,42 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,74 (д, J=3,3 Гц, 1H), 7,26 (д, J=3,3 Гц, 1H), 6,83 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,63-4,42 (м, 1H), 4,01-3,84 (м, 4H), 3,49-3,31 (м, 4H), 3,30-3,10 (м, 1H), 2,39 (д, J=9,6 Гц, 4H), 2,04-1,58 (м, 4H),		
36		449,32	0,5 (D)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 8,13 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,76 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,50 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,18 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,93 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,73 (д, J=4,2 Гц, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,42-3,28 (м, 4H), 3,01 (с, 3H), 2,73 (с, 3H), 2,51 (с, 3H), 2,32-2,19 (м, 2H), 2,08-1,73 (м, 9H),		

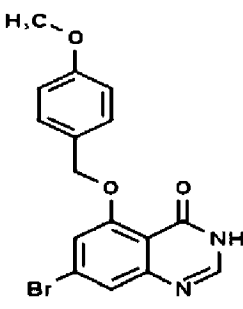
37		434,33	0,48 (A)	$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl_3) δ 9,49 (с, 1H), 9,11 (с, 1H), 8,28 (д, $J=7,7$ Гц, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,84-7,68 (м, 1H), 7,15-7,02 (м, 1H), 6,83 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,59 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 4,88-4,76 (м, 1H), 4,05-3,81 (м, 4H), 3,40 (дд, $J=14,8, 10,0$ Гц, 4H), 2,59-2,42 (м, 1H), 2,42-2,25 (м, 2H), 2,25-2,04 (м, 2H), 2,04-1,71 (м, 4H),		
38		406,29	0,5 (A)	$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl_3) δ 9,41 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 8,57 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,02 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 6,83 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,64 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,63-4,41 (м, 1H), 4,05-3,83 (м, 4H), 3,53-3,29 (м, 4H), 2,86-2,76 (м, 1H), 2,75 (с, 3H), 2,51-2,33 (м, 2H), 2,25-2,10 (м, 2H), 1,96-1,62 (м, 6H),		
39		414,17	0,55 (A)	$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl_3) δ 9,72 (с, 1H), 9,33 (с, 1H), 8,12 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 7,81 (д, $J=0,7$ Гц, 1H), 7,08 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 6,22 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 5,04 (с, 1H), 4,90-4,75 (м, 1H), 3,90 (с, 1H), 2,54 (с, 3H), 2,36-2,18 (м, 2H), 2,14-1,59 (м, 6H),		
40		371,38	0,53 (A)	$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl_3) δ 9,47 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 6,83 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 6,57 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 5,67-5,49 (м, 1H), 4,83-4,75 (м, 1H), 3,95-3,85 (м, 4H), 3,48-3,36 (м, 4H), 2,87 (д, $J=4,8$ Гц, 3H), 2,38-2,24 (м, 3H), 2,11-1,84 (м, 4H), 1,83-1,67 (м, 2H),		

41		429,29	0,52 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 9,47 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 6,81 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,38-6,21 (м, 1H), 4,83-4,72 (м, 1H), 3,98-3,84 (м, 4H), 3,53 (т, J=5,6 Гц, 2H), 3,49-3,29 (м, 9H), 2,40-2,19 (м, 3H), 2,12-1,63 (м, 8H),		
42		492,3	0,54 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 8,52 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,36 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,55-6,47 (м, 1H), 5,19 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,15-4,00 (м, 0H), 3,90 (дд, J=6,0, 3,8 Гц, 4H), 3,43-3,32 (м, 4H), 3,11-2,98 (м, 6H), 2,80 (с, 0H), 2,33-2,18 (м, 2H), 2,13-1,77 (м, 6H),		
43		431,25	2,19 (A)	¹ H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,48 (с, 1H), 7,54 (д, J=7,5 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,68 (д, J=2,1 Гц, 1H), 4,84 (м, 1H), 4,04 (с, 3H), 3,79 (с, 2H), 3,75 (м, 5H), 3,35 (м, 4H), 3,30 (с, 3H), 2,01 (м, 2H), 1,84-1,53 (м, 6H),		
44		507	0,64 (C)	¹ H-ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 8,49 (д, J=4,9 Гц, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,76 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,34 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,78 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,54 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,13 (с, 1H), 4,55 (с, 1H), 4,06-3,78 (м, 5H), 3,31 (дд, J=14,5, 9,7 Гц, 4H), 3,15 (с, 6H), 3,02 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,12-2,00 (м, 2H), 1,81 (дд, J=30,2, 11,2 Гц, 6H),		

Таблица 2: Данные анализа и значения K_i и IC_{50} для некоторых соединений согласно изобретению

Соед.	Молекула	M+1	Время удерживания ЖХМС	ЯМР	K_i (мкМ) ДНК-ПК	IC_{50} (мкМ)
51		368,14	0,63 (A)	¹ H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d ₆) δ 11,47 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,51 (д, J=8,6 Гц, 2H), 6,95 (д, J=8,7 Гц, 2H), 6,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,55 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 3,88-3,59 (м, 7H), 3,33-3,27 (м, 4H),	D	C
52		352,16	0,58 (A)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 9,42 (с, 1H), 9,09 (с, 1H), 7,41 (д, J=8,5 Гц, 2H), 7,01-6,92 (м, 2H), 6,79 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,64 (д, J=2,0 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 3,95-3,86 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,44-3,31 (м, 4H),	B	C
53		382,14	0,62 (A)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,59 (с, 1H), 7,47 (д, J=8,8 Гц, 2H), 6,99-6,92 (м, 2H), 6,82 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,59 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,13 (с, 2H), 4,11 (с, 3H), 3,90-3,85 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,37-3,31 (м, 4H), ¹ H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,61 (с, 1H), 7,55-7,43 (м, 2H), 7,04-6,93 (м, 2H), 6,84 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,61 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,13 (с, 3H), 3,95-3,88 (м, 4H), 3,86 (с, 3H), 3,42-3,30 (м, 4H),	C	C
54		386,1	0,74 (A)	¹ H-ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,71 (с, 1H), 7,45 (д, J=8,6 Гц, 2H), 6,98-6,91 (м, 2H), 6,84 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,66 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 3,97-3,85 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,48-3,29 (м, 4H),	C	

55		377,14	0,77 (A)	¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,07 (с, 1H), 7,48 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,94 (д, J=8,6 Гц, 2H), 6,80 (с, 1H), 6,69 (с, 1H), 5,29 (с, 2H), 3,94-3,84 (м, 4H), 3,82 (с, 3H), 3,48-3,35 (м, 4H), ¹H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 9,09 (с, 1H), 7,58-7,44 (м, 2H), 7,03-6,90 (м, 2H), 6,82 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,71 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,31 (с, 2H), 3,98-3,86 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,51-3,38 (м, 4H),	B	C
56		392,25	0,63 (A)	¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,79 (с, 1H), 7,48-7,35 (м, 2H), 7,00-6,88 (м, 2H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,65 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,15 (с, 2H), 3,93-3,85 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,48-3,28 (м, 5H), 1,35-1,22 (м, 2H), 0,99-0,86 (м, 2H),		B
57		381	0,73 (C)	¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО) δ 8,22 (с, 1H), 7,88 (т, J=4,6 Гц, 1H), 7,48 (дд, J=9,1, 2,4 Гц, 2H), 7,02-6,93 (м, 2H), 6,74 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,51 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,33 (с, 2H), 3,77-3,71 (м, 7H), 3,28-3,18 (м, 4H), 2,92 (д, J=4,7 Гц, 3H),		
58		395	0,74 (C)	¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО) δ 8,21 (с, 1H), 7,42 (т, J=5,7 Гц, 2H), 7,05-6,94 (м, 2H), 6,79 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,57 (д, J=2,1 Гц, 1H), 5,14 (с, 2H), 3,79-3,73 (м, 7H), 3,35-3,31 (м, 4H), 2,91 (с, 6H),		

59				¹ H-ЯМР (300 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ 12,07 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,55-7,42 (м, 2H), 7,37 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,28 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,03-6,90 (м, 2H), 5,20 (с, 2H), 3,76 (с, 3H),	
----	---	--	--	---	--

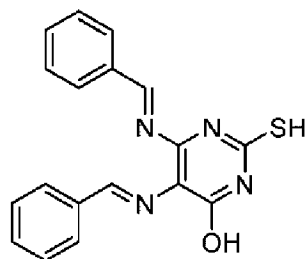
ПРИМЕРЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ

[00492] Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены исключительно в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение настоящего изобретения.

[00493] ПРИМЕР 3: Материалы и методы

[00494] Анализ со световым репортером (TLR): Стабильная линия клеток HEK293-EGFP (Улучшенный зеленый флуоресцентный ингибированный белок) была приобретена в System Biosciences (SBI). Линия клеток HEK293-EGFP содержит прерванную кодирующую последовательность GFP со стоп-кодоном и 53 пн геномный фрагмент из локуса AAVS1. Клетки поддерживали в DMEM (номер по кат. Life Technologies 10313-039) с высоким содержанием глюкозы (номер по кат. Life Technologies 10313-039), с добавкой 10% термоинактивированной FBS (фетальной бычьей сыворотки, Expression Systems Inc.), GlutaMax и пенициллина+стрептомицина, и культивировали при 37°C и 5% CO₂.

[00495] Трансфекция клеток и обработка ингибитором NHEJ: стабильные клетки HEK293-EGFP будут трансфицировать двойным плазмидным вектором "два в одном" гРНК/CRISPR-Cas9, плазмидой донором репарации (обе плазмиды от System Biosciences). Трансфекцию будут проводить при использовании нуклеофекторной системы Амаха (Lonza) в соответствии с протоколом производителя. Через 16 часов клетки будут обрабатывать соединениями, представленными формулой (I), в разных концентрациях, включающих 1 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ соединения. Структура Scr7 является



следующей: , и может использоваться в качестве контроля. Среду будут менять после дополнительного 24-часового инкубирования. Анализ FACS будут выполнять через 5 дней после трансфекции; затем клетки будут собирать для выделения геномной ДНК и ПЦР генотипирования.

[00496] Сортировка клеток и проточная цитометрия: Для проточного цитометрического анализа клетки HEK293 будут трипсинизировать и ресуспендировать в буфере PBS/1% BSA FACS и анализировать с помощью проточного цитофлуориметра Fortessa (Becton Dickinson). Часть клеток будут центрифугировать и использоваться для выделения геномной ДНК.

[00497] Анализ жизнеспособности клеток при обработке соединениями: Для оценки потенциального токсического действия при обработке ингибитором NHEJ, жизнеспособность клеток будут оценивать после воздействия различных концентраций соединений. Жизнеспособность клеток HEK293-EGIP будут определять при использовании набора CellTiter Glo (Promega). Клетки, трансфицированные плазмидой-донором, будут выращивать в присутствии соединения (1 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ) в течение 24, 48 или 72 ч и подвергать анализу CellTiter Glo. Каждый эксперимент будут повторять три независимых раза в трех повторностях. Для поддержания здоровых клеток, способных достигать фазы S/G2, которая необходима для HDR, клетки будут обрабатывать соединением в концентрации 2,5 мкМ.

[00498] Выделение геномной ДНК, ПЦР генотипирование и количественный анализ гелей: Специально разработанные пары праймеров для ПЦР обеспечат еще один способ оценки HDR-опосредованного редактирования генома для получения функциональных eGFP-положительных клеток. Пара праймеров для ПЦР генотипирования показана ниже и соответствует SEQ ID NO: 6 и 7. Продукт ПЦР размером 219 пн соответствует немодифицированным клеткам, а 163 пн нуклеотид соответствует модификации по пути HDR. Интенсивность этих полос в >2,5% геле позволяет оценить HDR с помощью денситометрии при использовании Bio-Imager. Методика позволяет выполнять относительное ранжирование улучшения HDR при воздействии ингибиторов. Измеренные значения интенсивности каждой полосы будут нормализованы путем вычисления отношений полос ПЦР, соответствующих "вставкам", деленным на "общие" (с вставками и немодифицированные). Кратное изменение будут вычислять при сравнении отношения вставок с соединением и вставок без соединения.

[00499] ПРИМЕР 4: Анализ для мониторинга эффективности HDR

[00500] Анализы будут проводить для определения эффективности HDR в клетках HEK293-EGIP. Для этого будут использовать бицистронную конструкцию, которая направленно воздействует на локус AAVS1 человека (ФИГ. 1А). Бицистронная векторная система коэкспрессирует оптимизированную по кодонам человека Cas9, направляемую промотором EF1, а также специализированную гидовую РНК (гРНК), состоящую из химерного crРНК-tracrРНК транскрипта, направляемого промотором H1. Для обеспечения эффективного импорта белка hspCas9 в ядро, hspCas9 содержит два сигнала ядерной локализации (NLS) на N-конце и C-конце. После открытой рамки считывания hspCas9 (ORF) расположен регуляторный элемент, называемый WPRE (посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита лесного сурка) для усиления экспрессии генов и стабилизации мРНК транскрипта.

[00501] Линия модифицированных человеческих клеток, EGIP HEK293, будет использоваться для мониторинга эффективности HDR при использовании бицистронной конструкции, описанной выше и на Фиг. 1А. Репортерная линия клеток EGIP HEK293 была приобретена в SBI. Линия клеток HEK293-EGIP содержит прерванную кодирующую последовательность GFP со стоп-кодоном и 53 пн геномным фрагментом из локуса AAVS1. Стабильная линия была создана путем лентивирусного инфицирования клеток 293Т промотором EF1-альфа для направления экспрессии eGFP с последующей селекцией пурамицином. Последовательность eGFP была модифицирована вставкой 56 нуклеотидов (показанных заглавными буквами) из сайта безопасной гавани AAVS1 человека. Эта последовательность содержит стоп-кодон (TAA, красный) после аминокислоты T109 в транслированной последовательности eGFP. Гидовые последовательности-мишени выделены жирным шрифтом. После трансфекции гидом и донором сайт AAVS1 внутри прерванного eGFP был разрезан, и донорная конструкция обеспечивала гомологичную последовательность для репарации eGFP путем удаления стоп-кодона и вставки AAVS1. При использовании этой системы отредактированные клетки, которые подвергаются донорной HDR репарации, будут давать GFP-положительные клетки. Соответственно, совместная трансфекция Cas9, гРНК, направленной на AAVS1, и AAVS1/EGFP спасающего донора восстанавливала последовательность посредством HDR с получением GFP+ клеток.

[00502] Популяция GFP-положительных клеток будет прямо пропорциональна эффективности направляемой гомологией репарации.

[00503] Для этих анализов, вектор "два в одном" Cas9-гРНК и вектор с eGFP донорной матрицей будут вводить в клетки EEKIP HEK293 путем электропорации при использовании нуклеофектора Amaxa (Lonza) для направления синтеза Cas9-гРНК и eGFP донорной матрицы. Соединения будут добавлять через 16 часов после трансфекции с последующей заменой среды через 48 часов. Затем клетки будут оставлять для размножения еще на 72 часа до анализа FACS.

[00504] Последовательность HDR донорной матрицы содержала 5' плечо гомологии 266 нуклеотидов (выделено жирным, черным шрифтом и подчеркнуто) и 3' плечо гомологии 378 нуклеотидов (выделено курсивом и подчеркнуто) (см. SEQ ID NO: 1 ниже). При трансфекции с гидовой РНК и донорной матрицей сайт AAVS1 в прерванном eGFP будет вырезан, и донорская конструкция будет обеспечивать гомологичную последовательность для репарации eGFP с удалением стоп-кодона и вставки AAVS1.

[00505] Последовательность HDR матрицы, которая будет использоваться в анализе со световым репортером, показана ниже (SEQ ID NO: 1):

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGA
GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
CGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC
```

GATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA
 AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC
 GGCCAGTGAAACTAGTGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
GGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG
TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG
TCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA
CGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCG
CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCAC
TACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCT
GAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGC
TGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGTGACACCGGTGATAT
 CAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC
 AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAAT
 GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
 CGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGC
 TCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
 GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC
 GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
 AAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC
 CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA
 CCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTTCTCATAGCTCACG
 CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
 ACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAA
 CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
 GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
 TACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTT
 TTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
 GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTT
 GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTGATCCCCGCCACGGT
 TGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTGTCTTTGCCAC
 GGAACGGTCTGCGTTGTGCGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGT
 TCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGT
 TACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTG
 CAATTTATTATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAAT
 GAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTC

TGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAAT
 AAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCA
 AAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATC
 AAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACG
 AAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGC
 GCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTA
 ATACCTGGAATGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAG
 GAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTT
 AGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGA
 AACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGC
 CCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTT
 AATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTA
 TTAATGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTG
 CAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAATTCATCGATGATGGTTGAGATGTGTAT
 AAGAGACAGATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT
 TTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA
 GTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGG
 CGTATCACGAGGCCCTTTCGTC (SEQ ID NO: 1)

[00506] Сайты праймеров, используемых для анализа, описанного в настоящем документе, показаны ниже. Эти сайты праймеров расположены в донорной последовательности. Реакция ПЦР на геномной матрице дает продукт размером 700 нуклеотидов, при этом ожидается, что NHEJ будет давать фрагменты длиной приблизительно 300 нуклеотидов и 400 нуклеотидов. После событий HDR ожидаемый продукт ПЦР при использовании предоставленной донорной матрицы имеет длину 644 нуклеотида. Сайты праймеров, используемых для анализа, включают следующие последовательности.

[00507] Guide RNA_1: GTCCCCTCCACCCACAGTG (SEQ ID NO: 2)

[00508] Guide RNA_2: GGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO: 3)

[00509] Прямой Surveyor праймер: GCGACGTAAACGGCCACAAG (SEQ ID NO: 4)

[00510] Обратный Surveyor праймер: GTCCATGCCGAGAGTGATCC (SEQ ID NO:

5)

[00511] HDR primer_1: ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC (SEQ ID NO: 6)

[00512] HDR primer_2: ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCG (SEQ ID NO: 7)

[00513] ПРИМЕР 3: Оценка ингибиторов ДНК-ПК для повышения эффективности HDR CRISPR редактирования генома

[00514] Клетки HEK293-EGIP будут подвергать нуклеофекции следующими конструкциями и культивировать, как описано: только двойная экспрессия гРНК-Cas9, двойная экспрессия гРНК-Cas9 с донорной матрицей репарации, двойная экспрессия гРНК-Cas9 с донорной матрицей и культивирование клеток с 2,5 мкМ Соединения 1, и двойная экспрессия гРНК-Cas9 с донорной матрицей репарации и культивирование клеток

с 2,5 мкМ предполагаемого ингибитора лигазы IV Scr7. Клетки будут подвергать контакту с соединениями формулы (I) или с Scr7 в течение 24 часов.

[00515] Будут оценивать увеличение количества клеток HEK-EGIP с CRISPR-отредактированным геномом по сравнению с условием, включающим только гРНК-Cas9 и донорную матрицу. Добавление соединений формулы (I) в среду культивирования клеток HEK293-EGIP, нуклеофицированных гРНК-Cas9 и донорной матрицей, будут оценивать по увеличению количества клеток HEK-EGIP с CRISPR-отредактированным геномом по сравнению с условием, включающим только гРНК-Cas9 и донорную матрицу.

[00516] В некоторых вариантах осуществления кратное усиление процесса репарации ДНК с применением системы CRISPR-Cas9 в присутствии донорной матрицы репарации будут количественно определять с помощью сортера клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Проточный цитометрический анализ будут проводить через 10 дней после трансфекции. Эксперименты проточной цитометрии будут проводить в тройной повторности.

[00517] В некоторых вариантах осуществления для количественного определения кратного усиления процесса HDR-опосредованной репарации ДНК в системе CRISPR-Cas9 будут использовать надежный анализ со "Светофорным репортером" (TLR) (ФИГ. 1B). В системе TLR стабильная клеточная линия HEK293-EGIP, экспрессирующая "сломанный" зеленый флуоресцентный белок eGFP, зависит от HDR-опосредованной репарации для образования функционального eGFP в присутствии донорной ДНК матрицы (см. ФИГ. 1B и 1C). Как показано на схеме экспериментального процесса на ФИГ. 1C, функциональные GFP-положительные клетки образуются по пути HDR при замене 56 нт вставки правильной последовательностью ДНК. GFP-положительные клетки обычно появляются через сорок восемь часов после трансфекции с помощью электропорации. Анализ методом проточной цитометрии будут проводить в тройной повторности.

[00518] ПРИМЕР 5: Сравнение низкомолекулярных ингибиторов NHEJ для увеличения HDR редактирования генома

[00519] Дальнейшие эксперименты будут проводить с использованием линии клеток HEK293-EGIP, чтобы установить эффективность HDR после контакта с ингибитором ДНК-ПК для любого из соединений, описанных в настоящем документе.

[00520] Для этих экспериментов клетки HEK293-EGIP будут подвергнуты нуклеофекции только донорной матрицей или донорной матрицей и Cas9-огРНК. С целью исследования способности соединений, описанных в настоящем документе, улучшать HDR редактирование, в клетки, которые будут подвергать нуклеофекции либо одной донорной матрицей, либо донорной матрицей и Cas9-огРНК, будут вводить либо Scr7, либо ингибитор ДНК-ПК, описанный в настоящем документе.

[00521] Статус HDR рекомбинации будут определять с помощью традиционного генотипирования в "конечной точке" с ПЦР-праймерами и количественного определения по интенсивности полос в агарозном геле. Праймеры давали разные ампликоны: полоса

размером 219 пн нуклеотидов соответствовала немодифицированным клеткам, а продукт размером 163 пн нуклеотидов - событию HDR. Интенсивность этих полос в >2,5% геле позволяет оценивать HDR с помощью денситометрии при использовании Bio-Imager. Методика позволяет выполнять относительное ранжирование условий улучшения HDR при воздействии ингибиторов NHEJ. Пары праймеров для ПЦР генотипирования в этих анализах показано ниже.

[00522] HDR primer_1 ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC (SEQ ID NO: 6)

[00523] HDR primer_2 ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCG (SEQ ID NO: 7)

[00524] Белок Cas9 и гРНК могут быть доставлены в форме синтетических РНК вместо векторных систем, приобретаемых в SBI. В дополнение к повышению эффективности HDR, наши внутренние эксперименты по редактированию генома показали более высокую жизнеспособность клеток после трансфекции рибонуклеопротеиновым белком (RNP) по сравнению с трансфекцией ДНК. Кроме того, синхронизация клеток в фазе S/G2 также может стимулировать HDR (Lin S et al. Elife. 2014 Dec 15;3, 2014). Эти новые стратегии и эффективное обнаружение редактирования генома, такие как цифровая капельная ПЦР и секвенирование следующего поколения, будут использоваться при оптимизации редактирования генома как в терапевтических, так и в исследовательских целях.

[00525] ПРИМЕР 6: Оценка введения соединений-ингибиторов ДНК-ПК для увеличения редактирования генов

[00526] Будут проводить анализы для определения способности ингибитора ДНК-ПК обеспечивать редактирование гена-мишени. Для этих анализов будут оценивать редактирование гена Серпина A1 из формы M в Z. С этой целью клетки гепатоцеллюлярной карциномы Huh7 будут подвергать нуклеофекции с гРНК и белком Cas9, с или без донорной матрицы репарации, в которую был введен сайт KpnI. Затем клетки после нуклеофекции будут культивировать в присутствии ДМСО или 2,5 мкМ соединений-ингибиторов ДНК-ПК, описанных в настоящем документе, в течение трех дней, после чего геномную ДНК будут амплифицировать и оценивать на предмет введения сайта Kpn.

[00527] Анализ производят следующим образом: при редактировании гена Серпина A1 эндонуклеаза Kpn способна расщеплять фрагмент гена, что приводит к появлению вырезанной полосы на геле только при редактировании гена Серпина A1. И наоборот, если Серпин A1 не редактирован, эндонуклеаза Kpn не может вырезать фрагмент гена, и, таким образом, на геле новая вырезанная полоса будет отсутствовать.

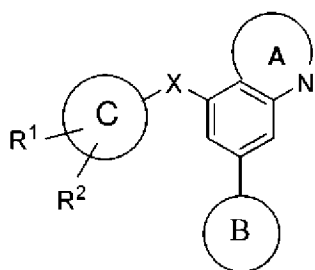
[00528] Хотя вышеизложенное изобретение было описано более подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, специалистам в данной области будет легко понять с учетом принципов настоящего изобретения, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

[00529] Все ссылки, представленные в настоящем документе, включены в него во

всей полноте посредством ссылки. При использовании в настоящем описании, все сокращения, символы и условные обозначения соответствуют используемым в современной научной литературе. См., например, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2nd Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997.

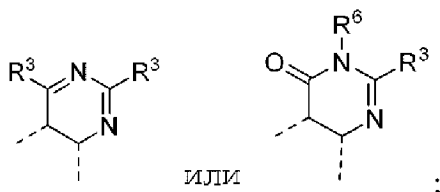
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное следующей формулой:

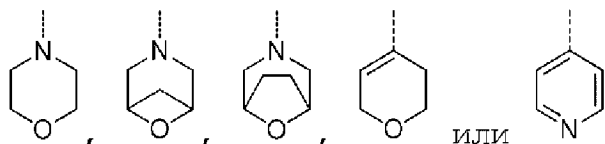


(I), или его фармацевтически приемлемая соль, где

Кольцо А является ароматической кольцевой системой, выбранной из



Кольцо В является кольцевой системой, выбранной из



где Кольцо В обязательно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -ОН и C_{1-4} алкила, который обязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

Кольцо С представляет собой C_{4-6} циклоалкильную, 5-6-членную гетероарильную или фенильную группу, где Кольцо С обязательно дополнительно замещено одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, C_{1-2} алкила, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

X представляет собой -NH-, -O-, - OC_{1-4} алкил-, -S- или - CH_2 -;

каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой водород, -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, - NHC(O)OR⁴, -NHC(O)NHR⁴, -NHS(O)₂R⁴, -NHR⁴, - C_{1-4} алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷, где R^1 и R^2 не могут быть одновременно водородом;

каждый R³ независимо представляет собой водород, - C_{1-4} алкил, галоген, - OC_{1-2} алкил, -C(O)ОН, C(O) OC_{1-2} алкил, -CN, -C(O)NHC₁₋₂алкил, -C(O)NH₂, C_{3-4} циклоалкил или -NRR¹, где каждый указанный R³ алкил и циклоалкил независимо обязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -Cl, -ОН и - OC_{1-2} алкила;

каждый R⁴ независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, C_{3-10} циклоалкил, 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-10-членный гетероцикл, где каждая из указанных групп R⁴ обязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C_{1-4} алкила, CN, NO₂, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-6} циклоалкила, C_{0-4} алкил- C_{3-5}

циклоалкила, C_{0-4} алкил- $O-C_{1-4}$ алкила, C_{0-4} алкил- $O-C_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила, $C(O)OC_{1-4}$ алкила, $C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил- $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкила, $C(O)N(C_{1-4} \text{ алкил})_2$, $C(O)NH(C_{0-4} \text{ алкил-}C_{3-5} \text{ циклоалкила})$, CH_2OR^5 , C_{0-4} алкил- $C(O)R^5$, C_{0-4} алкил- $C(O)N(R^5)_2$, C_{0-4} алкил- $C(O)OR^5$, C_{0-4} алкил- $NHC(O)R^5$, C_{0-4} алкил- $N(R^5)_2$, 5-6-членного гетероциклила, $-O(C_{1-4} \text{ алкил})OR^5$, $-OR^5$ и оксо, и где каждый из указанных необязательных заместителей R^4 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-4} алкила, $-OH$, $-OC_{1-4}$ алкила, $-SC_{1-4}$ алкила, $-C(O)C_{1-4}$ алкила, $-C(O)OC_{1-4}$ алкила и $-C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила; и

каждый R^5 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, фенил, 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклил, где каждый R^5 необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-2} алкила, $-CH_2OH$, $-CN$, $-OH$, OC_{1-2} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7 членного гетероциклила, или две R^5 группы с промежуточным атомом азота необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо; и

R^6 представляет собой водород или C_{1-4} алкил, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, $-CH_2OH$, $-CN$, $-OH$ и OC_{1-2} алкила;

R^7 представляет собой 6-10-членный арил, 5-10-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклил, каждый из которых необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из $-F$, $-Cl$, C_{1-2} алкила, $-CH_2OH$, $-CN$ и $-OR$; и

каждый из R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-4} алкил, или R и R' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, необязательно образуют морфолиновое кольцо, азетидиновое кольцо, пирролидиновое кольцо, пиперидиновое кольцо или пиперазиновое кольцо.

2. Соединение по п.1, где указанная арильная группа для R^4 необязательно замещена и выбрана из фенила или нафталина; гетероарильная группа для R^4 необязательно замещена и выбрана из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола или бензоксазола; и указанная гетероциклильная группа для R^4 необязательно замещена и выбрана из тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуropyримидина, дигидропиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридопиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидрофуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона.

3. Соединение по п.1 или 2, где указанная гетероциклическая группа для заместителей R^4 необязательно замещена и выбрана из оксетана, азетидина,

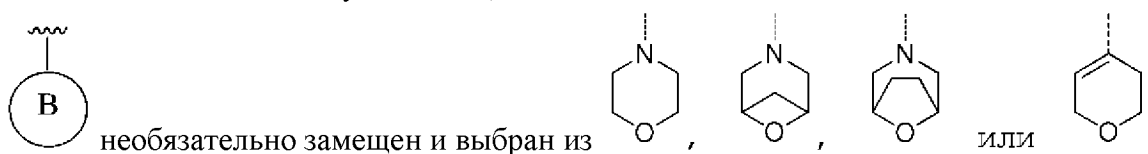
тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина, пирролидина, пиперазина, фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола, оксадиазола или тетразола.

4. Соединение по любому из пп.1-3, где указанная гетероарильная группа для R^5 необязательно замещена и выбрана из имидазола, триазола, тиазола, пиридина или пиримидина, и где указанная гетероциклическая группа для R^5 необязательно замещена и выбрана из оксетана, тетрагидрофурана или тетрагидропирана.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C_{4-6} циклоалкил или необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил.

6. Соединение по любому из пп.1-5, где X представляет собой -O- или -NH-.

7. Соединение по любому из пп.1-6, где



8. Соединение по любому из пп.1-7, где каждый R^3 независимо представляет собой водород, C_{1-4} алкил, галоген, - OC_{1-2} алкил, -CN, - C_{3-4} циклоалкил или -NRR', где каждый указанный R^3 алкил и циклоалкил независимо необязательно замещен.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где

каждый R^4 независимо представляет собой водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, C_{3-5} циклоалкила или фенила.

10. Соединение по любому из пп.1-8, где каждый R^4 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуropyримидина, дигидропиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридопиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидрофуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона.

11. Соединение по любому из пп.1-8, где каждый R^4 независимо представляет собой необязательно замещенную группу, выбранную из имидазола, пиразола, пиримидина, фуropyримидина, оксетана или дигидрофуropyримидина.

12. Соединение по любому из пп.1-8, где каждый R^4 независимо представляет собой

водород или необязательно замещенную группу, выбранную из C_{1-4} алкила, $\begin{array}{c} | \\ R^a \\ \text{---} \\ | \\ R^b \end{array}$ или кольцевой группы, выбранной из C_{3-5} циклоалкила, пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана,

дигидроизоксазола или фенила, где

X^1 представляет собой N или CR^{4d} ;

X^2 представляет собой N или CR^{4c} , где X^1 и X^2 не могут быть одновременно N;

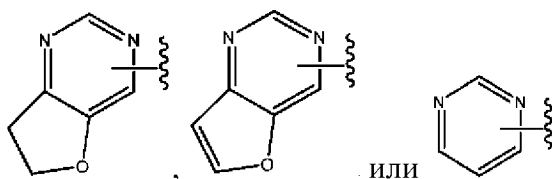
каждый из R^{4a} , R^{4b} и R^{4c} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO_2 , C_{1-4} алкил, C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкил, C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкил, C_{0-4} алкил-O- C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, $C(O)OC_{1-4}$ алкил, $C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкил, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкил, $C(O)N(C_{1-4} \text{ алкил})_2$, $C(O)NH(C_{0-4} \text{ алкил-}C_{3-5} \text{ циклоалкил})$, гетероциклическую группу, выбранную из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина или пиперазина, или гетероарильную группу, выбранную из фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола или тетразола; или R^{4c} и R^{4a} , или R^{4c} и R^{4b} , вместе с промежуточными атомами, необязательно образует дигидрофуранильную, дигидропиранильную или тетрагидропиперидинильную гетероциклическую кольцевую группу;

R^{4d} независимо представляет собой водород, F, Cl, Br, CN, NO_2 , C_{1-4} алкил, C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, C_{2-4} алкинил, $C(O)OC_{1-4}$ алкил, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкил или $C(O)N(C_{1-4} \text{ алкил})_2$;

где каждая из кольцевых групп R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, Cl, Br, CN, NO_2 , C_{1-4} алкила, C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{0-4} алкил-O- C_{1-4} алкила, C_{0-4} алкил-O- C_{0-4} алкил- C_{3-5} циклоалкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, $C(O)OC_{1-4}$ алкила, $C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ алкила, $C(O)N(C_{1-4} \text{ алкил})_2$, $C(O)NH(C_{0-4} \text{ алкил-}C_{3-5} \text{ циклоалкила})$, гетероциклической группы, выбранной из оксетана, азетидина, тетрагидрофурана, дигидропирана, тетрагидропирана, морфолина, пиперидина или пиперазина, и гетероарильной группы, выбранной из фурана, оксазола, оксадиазола, пиррола, пиразола, триазола или тетразола;

каждая из указанных гетероциклических и гетероарильных групп для R^{4a} , R^{4b} и R^{4c} , и для заместителей R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C_{1-4} алкила, -OH, $-C(O)C_{1-4}$ алкила, $-C(O)OC_{1-4}$ алкила или $C(O)OC_{0-4}$ алкил- C_{3-5} циклоалкила; и где каждая указанная алкильная и циклоалкильная группа для R^{4a} , R^{4b} и R^{4c} , и для заместителей R^4 необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -OH.

13. Соединение по любому из пп.1-12, где каждый R^4 независимо представляет собой C_{1-4} алкил или кольцевую группу, выбранную из C_{3-5} циклоалкила, пиразола,



имидазола, оксетана, или , где указанный R^4 C_{1-4} алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы,

состоящей из -Br, -Cl, -F и -O(C₁₋₄ алкила), и где каждая из указанных кольцевых групп R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -Br, -Cl, -F, C₁₋₄алкила, -CN, -O(C₁₋₄ алкила), C₃₋₆циклоалкила, C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкила, C(O)NHC₁₋₄ алкила, C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂ и пиперазина, где каждый из указанных необязательных заместителей R⁴ необязательно и независимо замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, C₁₋₄алкила, -ОН и -OC₁₋₄алкила.

14. Соединение по п.13, где указанный R⁴ C₁₋₄ алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F и -O(C₁₋₄ алкила), и где каждая из указанных кольцевых групп R⁴ необязательно и независимо замещена одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C₁₋₄алкила, -O(C₁₋₄ алкила), C₀₋₄ алкил-O-C₁₋₄ алкила, C(O)NHC₁₋₄ алкила, C(O)N(C₁₋₄ алкил)₂ и пиперазина, где каждый из указанных необязательных заместителей R⁴ необязательно замещен одним или более C₁₋₄алкилами.

15. Соединение по любому из пп.1-14, где каждый из R¹ и R² независимо представляет собой водород, -C(O)NHR⁴, -C(O)OR⁴, -NHC(O)R⁴, -NHC(O)OR⁴, -C₀₋₄ алкил-NHR⁴, -OR⁴ или R⁷.

16. Соединение по любому из пп.1-15, где R⁷ необязательно замещен и выбран из пиррола, имидазола, пиразола, триазола, тиазола, изотиазола, оксазола, пиридина, фуropyридина, пиримидина, пиримидинона, пиразина, пиридазина, хинолона, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, тетрагидрофурана, оксетана, тетрагидропирана, дигидроизоксазола, пиримидин-2,4(1H,3H)-диона, дигидрофуropyримидина, дигидропиранопиримидина, дигидропирролопиримидина, тетрагидропиридопиримидина, дигидропиридопиримидина, дигидрофуropyридина, дигидропиридопиридина, тетрагидроптеридина или изоиндолин-1,3-диона.

17. Соединение по п.16, где R⁷ необязательно замещен и выбран из пиримидина, имидазола, пиразола, тиазола, фуropyримидина, пирролопиримидина, бензимидазола, бензотиазола, бензоксазола, оксетана, дигидрофуropyримидина или изоиндолин-1,3-диона.

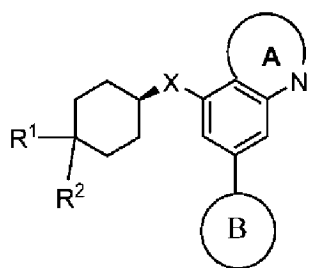
18. Соединение по п.17, где R⁷ необязательно замещен и выбран из пиримидина, пиразола, фуropyримидина, тиазола или изоиндолин-1,3-диона.

19. Соединение по любому из пп.1-18, где X представляет собой -O-.

20. Соединение по любому из пп.1-19, где Кольцо С представляет собой необязательно замещенный C₄₋₆ циклоалкил.

21. Соединение по п.20, где Кольцо С представляет собой необязательно замещенный циклогексан.

22. Соединение по любому из пп.1-21, представленное следующей формулой:

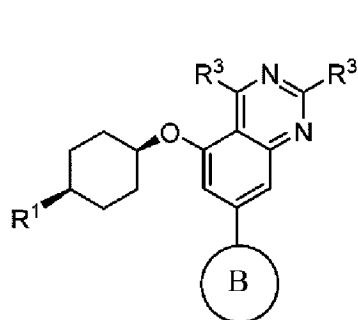


(II), или его фармацевтически приемлемая соль, где:

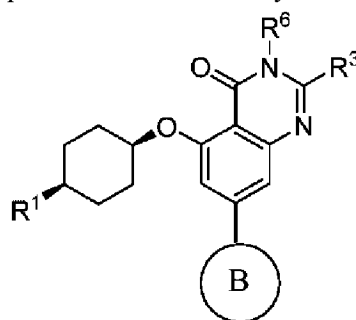
R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; и

R^2 представляет собой водород.

23. Соединение по любому из пп. 1-22, представленное следующей формулой:



(III-A-1) или



(III-B-1), или его

фармацевтически приемлемая соль.

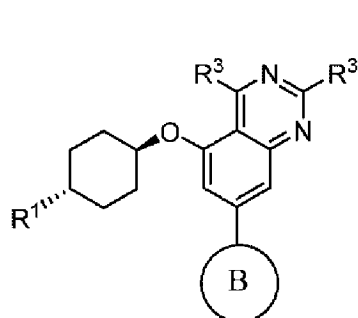
24. Соединение по п.23, где каждый R^1 независимо представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$, $-OR^4$ или R^7 .

25. Соединение по п.24, где R^1 представляет собой $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-NHR^4$ или $-OR^4$.

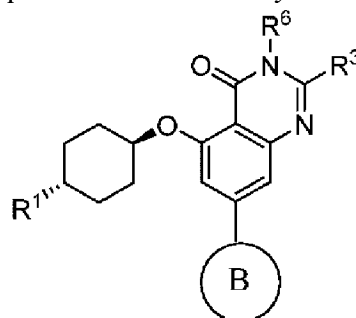
26. Соединение по п.25, где R^1 представляет собой $-NHR^4$.

27. Соединение по п.25, где R^1 представляет собой $-OR^4$.

28. Соединение по любому из пп. 1-22, представленное следующей формулой:



(III-A-2) или



(III-B-2), или его

фармацевтически приемлемая соль.

29. Соединение по п.28, где каждый R^1 независимо представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 .

30. Соединение по п.29, где R^1 представляет собой $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 или $-OR^4$.

31. Соединение по п.30, где R^1 представляет собой $-NHR^4$.

32. Соединение по п.30, где R^1 представляет собой $-OR^4$.

33. Соединение по любому из пп.1-32, где каждый R^3 независимо представляет собой водород, метил, $-Cl$, $-OCH_3$, $-CN$, циклопропил, $-NHCH_3$ или $-N(CH_3)_2$; и

R^6 представляет собой водород или метил.

34. Соединение по любому из пп.1-19, где Кольцо С представляет собой необязательно замещенный 5-6-членный гетероарил.

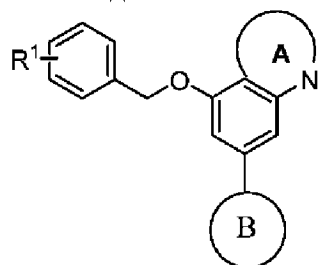
35. Соединение по любому из пп.1-34, где



36. Соединение по любому из пп.1-18, где Кольцо С представляет собой необязательно замещенный фенил.

37. Соединение по любому из пп.1-36, где X представляет собой $-OC_{1-4}$ алкил-.

38. Соединение по п.37, представленное следующей формулой:



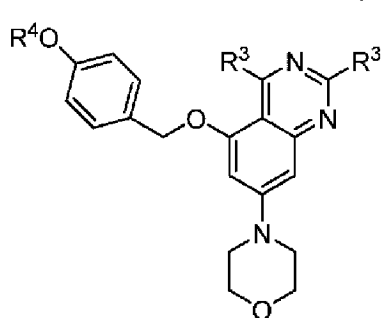
(IV), или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R^1 представляет собой водород, $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-C_{0-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 .

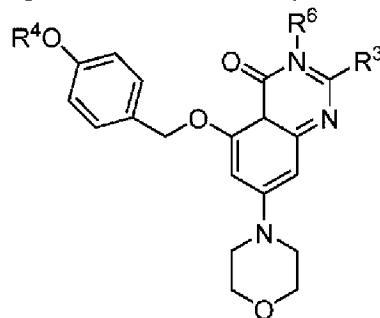
39. Соединение по любому из пп.36-38, где



40. Соединение по любому из пп.36-39, представленное следующей формулой:



(V-A) или



(V-B), или его

фармацевтически приемлемая соль.

41. Соединение по п.40, где

R^3 представляет собой водород, метил, циклопропил, $-F$, $-Cl$, $-OC_{1-2}$ алкил, $-NRR'$ или $-CN$, где каждый указанный R^3 алкил необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей $-F$, $-OH$ и $-O(C_{1-2}$ алкила);

каждый R^4 независимо представляет собой необязательно замещенный C_{1-4} алкил, который необязательно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из -F, -OH, и -O(C_{1-2} алкила);

каждый R и R' независимо представляет собой водород или C_{1-2} алкил.

42. Соединение по п.41, где

каждый R^3 независимо представляет собой водород, метил, -Cl, -OCH₃, -CN, циклопропил, -NHCH₃ или -N(CH₃)₂; и

R^6 представляет собой водород или метил.

43. Соединение, выбранное из списка соединений в Таблицах 1 и 2, или его фармацевтически приемлемая соль.

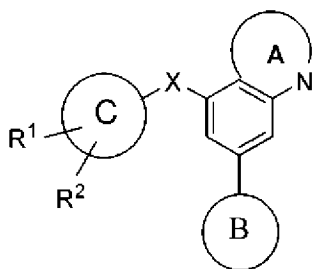
44. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-43 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

45. Способ сенсibilизации клетки по отношению к терапевтическому средству или патологическому состоянию, вызывающему повреждение ДНК, включающий этап контакта клетки с соединением по любому из пп.1-43 или фармацевтической композицией, содержащей указанное соединение.

46. Способ потенцирования терапевтической схемы для лечения рака у пациента, включающий этап введения указанному пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение.

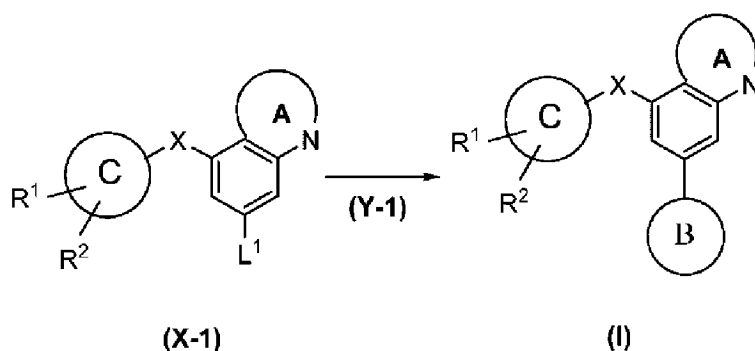
47. Способ лечения рака или ингибирования роста раковой клетки у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами.

48. Способ получения соединения, представленного Формулой (I):



(I), или его фармацевтически приемлемой соли, где переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43, и где способ включает:

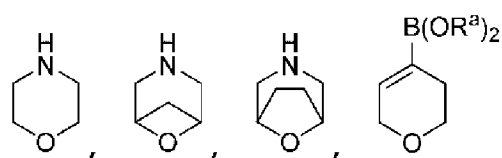
реакцию Соединения (X-1) с Соединением (Y-1) с получением соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



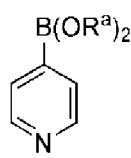
где:

L^1 в Соединении (X-1) представляет собой галоген, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат, и другие переменные Соединения (X-1) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43; и

Соединение (Y-1) представляет собой

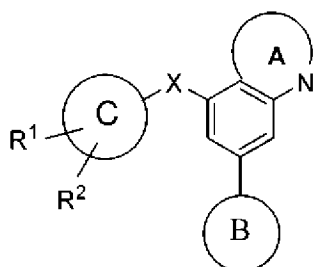


или



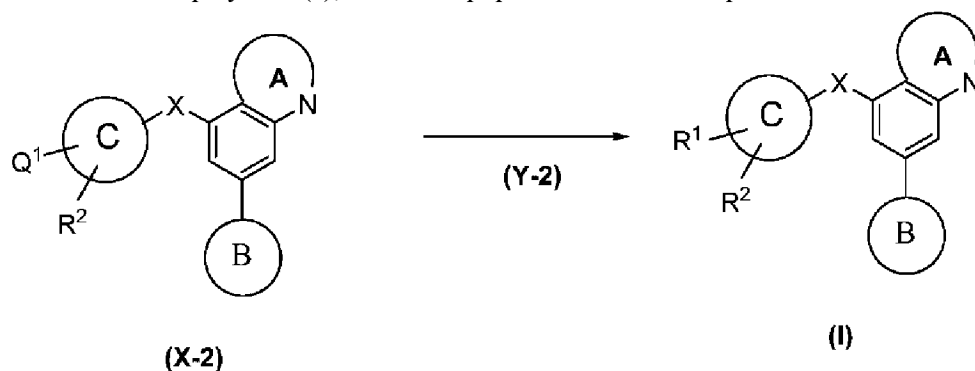
, где R^a представляет собой -H, или два R^a вместе с атомом кислорода, к которому они присоединены, образуют диоксановое кольцо, необязательно замещенное одним или более C_{1-2} алкилами.

49. Способ получения соединения, представленного следующей формулой:



(I), или его фармацевтически приемлемой соли, где R^1 представляет собой $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-NHR^4$ или $-OR^4$; и другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43; и где способ включает:

реакцию Соединения (X-2) с Соединением (Y-2) с получением соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:

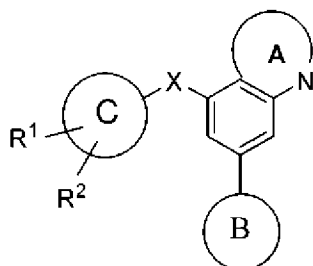


, где

Q^1 в Соединении (X-2) представляет собой $-NH_2$ или $-OH$, а другие переменные Соединения (X-2) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп. 1-43; и

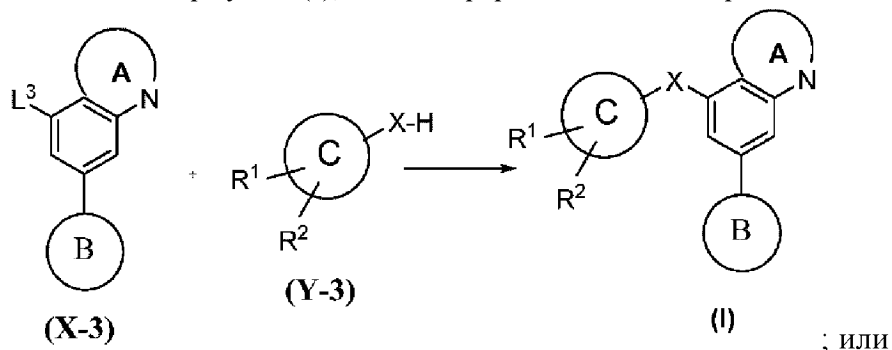
Соединение (Y-2) представляет собой $R^4-C(O)-L^2$, $R^4-O-C(O)-L^2$, $NHR^4-C(O)-L^2$, $R^4S(O)_2-L^2$, R^4-L^2 , $R^{4c}(O)OR^b$ или $R^4-N=C=O$, где каждый R^4 является таким, как описано в любом из пп.1-43, L^2 представляет собой галоген, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат, и R^b представляет собой C_{1-4} алкил.

50. Способ получения соединения, представленного следующей формулой:

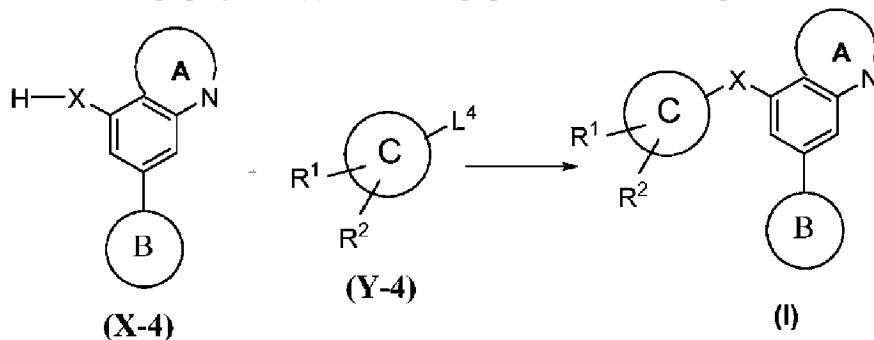


(I), или его фармацевтически приемлемой соли, где X представляет собой $-NH-$ или $-O-$, а другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43, и где способ включает:

(i) реакцию Соединения (X-3) с Соединением (Y-3) с получением соединения, представленного Формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:

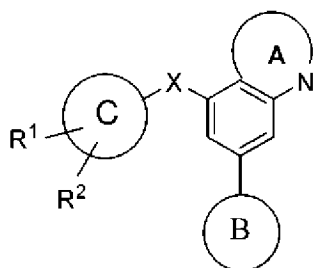


(ii) реакцию Соединения (X-4) с Соединением (Y-4) с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



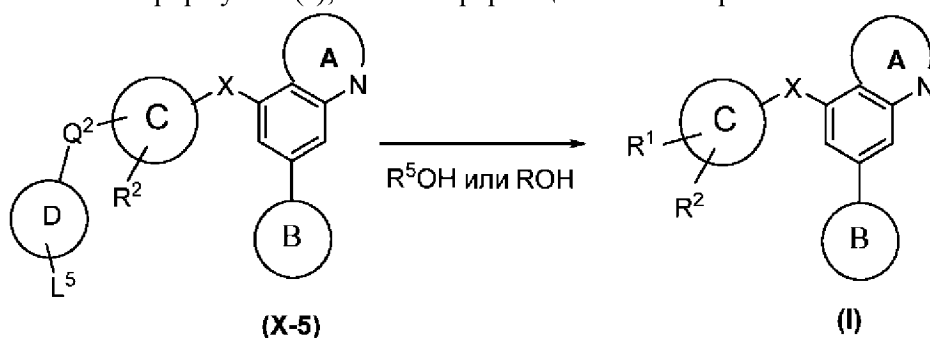
где L^3 представляет собой галоген; L^4 представляет собой галоген, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат, и где переменные каждого из Соединений (X-3), (X-4), (Y-3) и (Y-4) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43.

51. Способ получения соединения, представленного следующей формулой:



(I), или его фармацевтически приемлемой соли, где R^1 представляет собой $-C(O)NHR^4$, $-C(O)OR^4$, $-NHC(O)R^4$, $-NHC(O)OR^4$, $-NHC(O)NHR^4$, $-NHS(O)_2R^4$, $-NHR^4$, $-C_{1-4}$ алкил- NHR^4 , $-OR^4$ или R^7 ; R^2 представляет собой водород; каждый из R^4 независимо представляет собой 5-10-членный гетероарил, который замещен $-OR^5$; R^7 независимо представляет собой 5-10-членный гетероарил, который замещен $-OR$; R , R^5 и другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43, при условии, что оба R и R^5 не являются водородом, и где способ включает:

реакцию Соединения (X-5) с R^5OH или ROH с получением соединения, представленного формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли:



где:

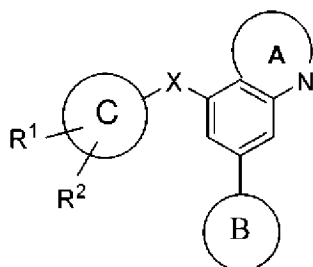
Q^2 представляет собой связь, $-C(O)NH-$, $-C(O)O-$, $-NHC(O)-$, $-NHC(O)O-$, $-NHC(O)NH-$, $-NHS(O)_2-$, $-NH-$, $-C_{1-4}$ алкил- $NH-$ или $-O-$,

Кольцо D представляет собой 5-10-членный гетероарил;

L^5 представляет собой галоген; и

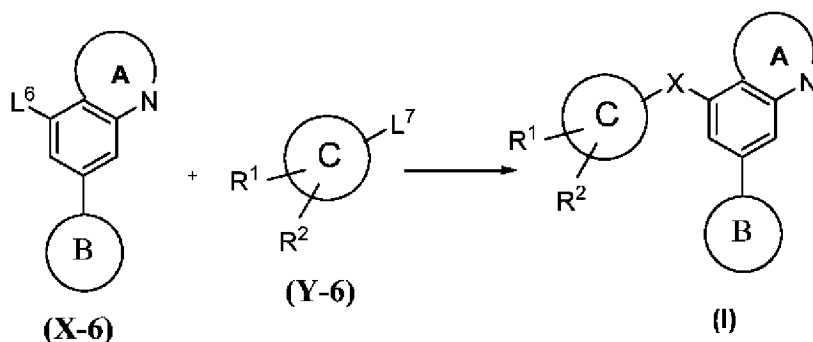
R в ROH , R^5 в R^5OH и другие переменные Соединения (X-5) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43, при условии, что оба R и R^5 не являются водородом.

52. Способ получения соединения, представленного следующей формулой:



(I), или его фармацевтически приемлемой соли, где X

представляет собой -O-, а другие переменные Формулы (I) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43, и где способ включает:



где L^6 представляет собой -OH; L^7 представляет собой -OH; и остальные переменные каждого из Соединений (X-6) и (Y-6) отдельно и независимо являются такими, как описано в любом из пп.1-43.

53. Способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий:

введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-43 или его фармацевтически приемлемой соли;

где одна или более геномных областей-мишеней редактируются.

54. Способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути направляемой гомологией репарации (HDR), включающий:

введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-43 или его фармацевтически приемлемой соли,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, по пути HDR.

55. Способ ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути нехомологичного соединения концов (NHEJ), включающий:

введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-43 или его фармацевтически приемлемой соли,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где репарация разрыва ДНК по пути NHEJ ингибирована или подавлена.

56. Способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий:

введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-43

или его фармацевтически приемлемой соли,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней гена(ов)-мишени(ей), приводя к редактированию одной или более геномных областей-мишеней, и где редактирование изменяет экспрессию нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями).

57. Способ по п.54 или 55, где разрыв ДНК включает двухцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК.

58. Способ по любому из пп.53-57, где соединение является сокристаллом, содержащим соединение, имеющее структуру Формулы (I), и вещество для образования сокристалла, выбранное из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты.

59. Способ по п.53, где эффективность редактирования геномных областей-мишеней в одной или более клетках повышена по сравнению с эффективностью редактирования в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

60. Способ по п.54, где эффективность репарации разрыва ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути HDR повышена по сравнению с эффективностью репарации в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

61. Способ по п.55, где эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути NHEJ повышена по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

62. Способ по любому из пп.59-61, где указанная эффективность повышена по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

63. Способ по любому из пп.59-62, где указанная эффективность измеряется частотой направленной интеграции полинуклеотида.

64. Способ по любому из пп.59-62, где указанная эффективность измеряется частотой направленного мутагенеза.

65. Способ по п.64, где направленный мутагенез включает точечные мутации, делеции и/или вставки.

66. Способ по п.56, где экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), повышена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клетках до введения.

67. Способ по п.66, где указанная экспрессия повышена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, в 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии в

одной или более клетках до введения.

68. Способ по п.56, где экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), снижена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клетках до введения.

69. Способ по п.68, где экспрессия гена снижена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клетках до введения.

70. Способ по п.56, где экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), по существу устранена в одной или более клетках.

71. Способ по любому из пп.53-70, где клетка синхронизирована в S или G2 фазе клеточного цикла.

72. Способ по любому из пп.53-71, где одна или более клеток, которые подвергают введению или контакту с указанным соединением, обладают повышенной выживаемостью по сравнению с одной или более клетками, которые не подвергали введению или контакту с указанным соединением.

73. Способ по любому из пп.53-72, где систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток одновременно.

74. Способ по любому из пп.53-72, где систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток последовательно.

75. Способ по п.74, где систему редактирования генома вводят в одну или более клеток до соединения.

76. Способ по п.74, где соединение вводят в одну или более клеток до системы редактирования генома.

77. Способ по любому из пп.53-76, где одна или более клеток являются культивируемыми клетками.

78. Способ по любому из пп.53-76, где одна или более клеток являются клетками *in vivo* в организме.

79. Способ по любому из пп.53-76, где одна или более клеток являются клетками *ex vivo* из организма.

80. Способ по п.78 или п.79, где организмом является млекопитающее.

81. Способ по п.78 или п.79, где организмом является человек.

82. Способ по любому из пп.53-81, где систему редактирования генома и соединение вводят одним и тем же путем.

83. Способ по любому из пп.53-81, где систему редактирования генома и соединение вводят разными путями.

84. Способ по п.83, где систему редактирования генома вводят внутривенно, а соединение вводят перорально.

85. Способ по любому из пп.53-84, где система редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN),

системы на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo.

86. Способ по п.85, где система редактирования генома является системой на основе CRISPR.

87. Способ по п.86, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf.

88. Способ по п.87, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas, и где система CRISPR-Cas содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; (ii) и активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas.

89. Способ по п.88, где указанная направляющая РНК и активаторная РНК слиты в одной молекуле.

90. Способ по п.88, где белок Cas является белком Cas9 II типа.

91. Способ по п.90, где белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазу или их любые комбинации.

92. Способ по п.90, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент гидовой РНК, при этом гидовая РНК содержит направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

93. Способ по любому из пп.53-92, где систему редактирования генома доставляют одним или более векторами.

94. Способ по п.93, где один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК.

95. Способ по п.94, где вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, вектора на основе аденоассоциированного вируса и вектора на основе вируса простого герпеса.

96. Способ по любому из пп.53-95, где систему редактирования генома доставляют синтетической РНК.

97. Способ по любому из пп.53-95, где систему редактирования генома доставляют

наносоставом.

98. Способ по любому из предыдущих пп., где соединение представлено Формулой (II), (III-A-1), (III-A-2), (III-B-1), (III-B-2), (IV), (V-A) или (V-B) или его фармацевтически приемлемыми солями.

99. Набор или композиция для редактирования одной или более геномных областей-мишеней, содержащие:

систему редактирования генома; и

соединение по любому из пп.1-43 или его фармацевтически приемлемую соль.

100. Набор или композиция по п.99, где система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы, системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системой на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo.

101. Набор или композиция по п.100, где система редактирования генома является системой на основе CRISPR.

102. Набор или композиция по п.101, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf.

103. Набор или композиция по п.102, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas, и где система CRISPR-Cas содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; (ii) и активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas.

104. Набор или композиция по п.102, где белок Cas является белком Cas9 II типа.

105. Набор или композиция по п.102, где белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазой или их любую комбинацию.

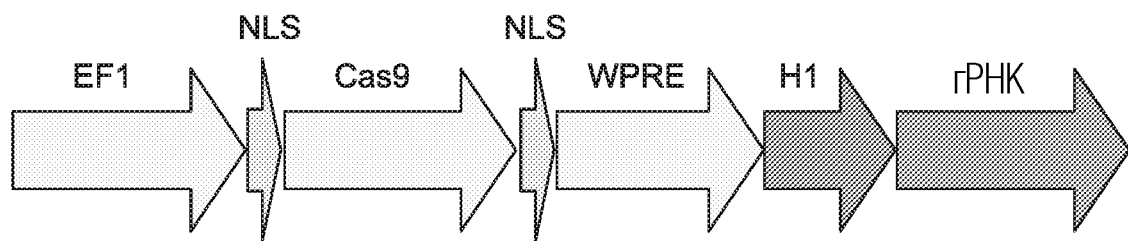
106. Набор или композиция по п.102, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит: (a) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cpf.

107. Набор или композиция по любому из пп.99-106, где система редактирования генома включена или упакована в один или более векторов.

108. Набор или композиция по п.107, где один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК.

109. Набор или композиция по п.108, где вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, вектора на основе аденоассоциированного вируса и вектора на основе вируса простого герпеса.

По доверенности

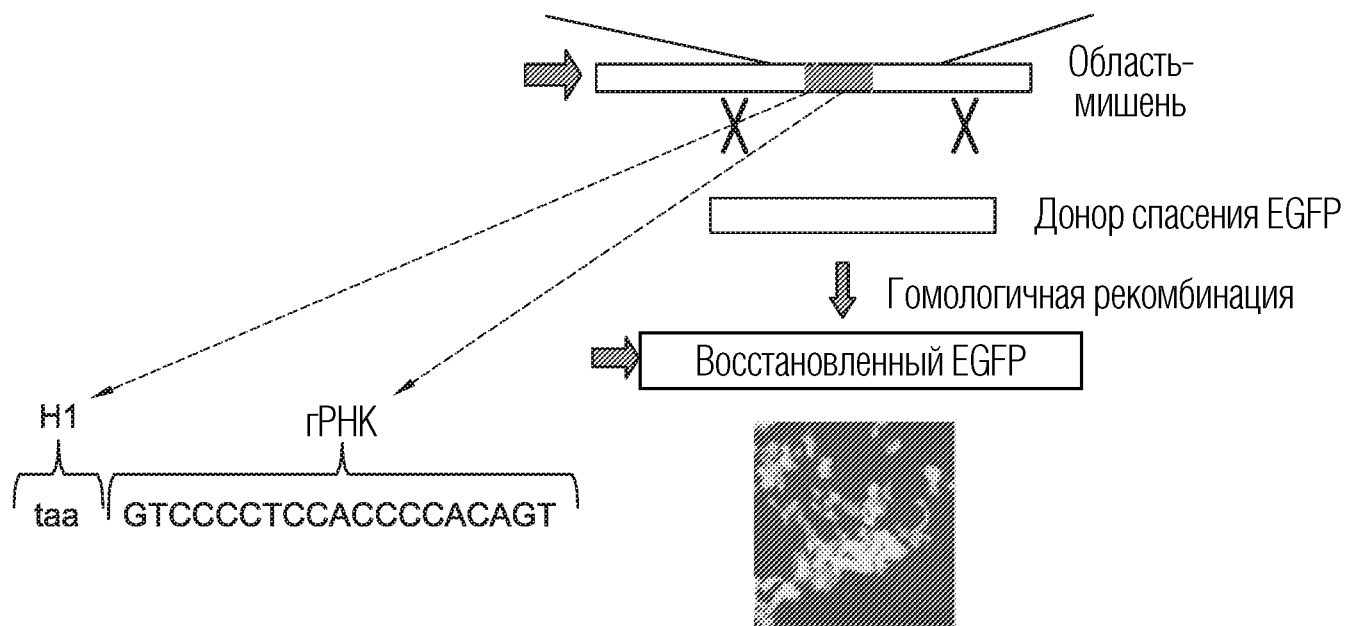


ФИГ. 1А

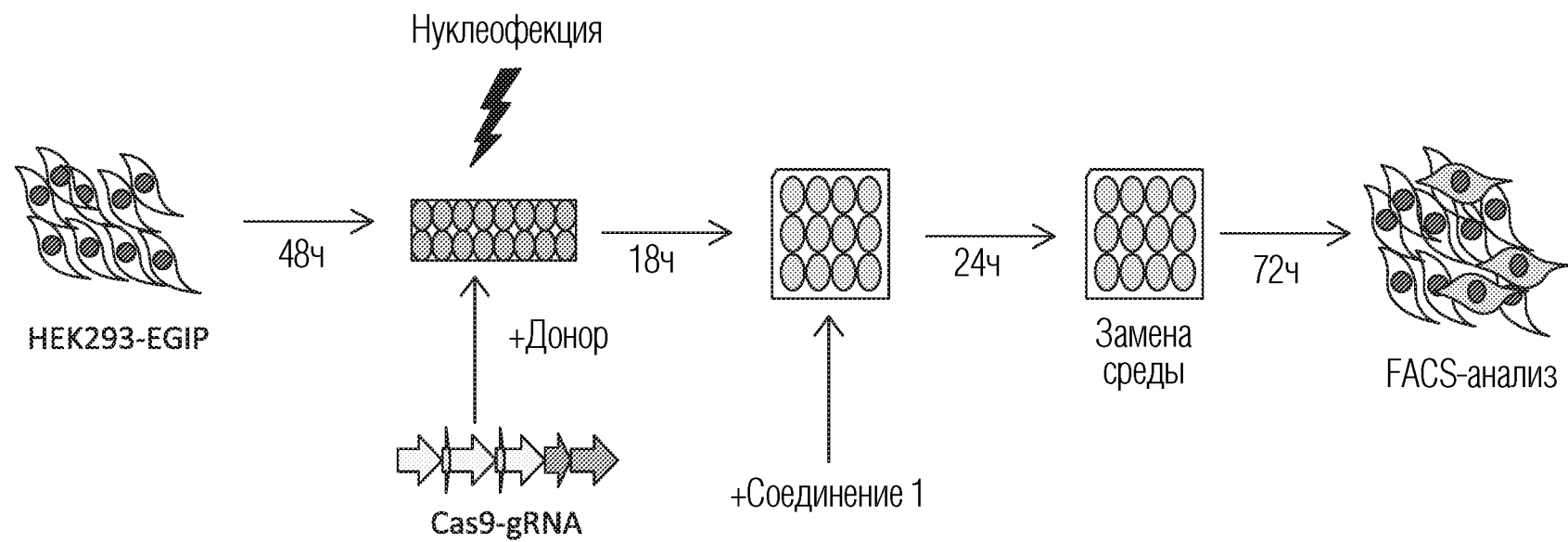
```

tcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcactcttcaagtccgccatgcccgaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaagg
acgacggcaactacaagacctaaGTCCCCTCCACCCCACAGTGGGGCCACTAGGGACAGGATTGGTGACA
GAAAAGcgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctgggaaccgcatcgagctgaagggcacgacttcaaggaggacggcaac

```



ФИГ. 1В



ФИГ. 1С