

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290039** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.04.04**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.06.12**

(51) Int. Cl. *A61K 31/415* (2006.01)  
*A61K 31/416* (2006.01)  
*A61K 31/433* (2006.01)  
*A61K 31/4355* (2006.01)  
*A61K 31/437* (2006.01)  
*A61K 31/4439* (2006.01)  
*A61K 31/455* (2006.01)  
*A61K 31/5025* (2006.01)  
*A61K 31/506* (2006.01)  
*A61K 31/519* (2006.01)  
*A61K 31/517* (2006.01)  
*A61K 31/551* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 21/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 31/44* (2006.01)  
*A61K 31/496* (2006.01)  
*A61K 31/53* (2006.01)

---

**(54) ИНГИБИТОРЫ КАЗЕИНКИНАЗЫ 1 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЭКСПРЕССИЕЙ DUX4, ТАКИХ КАК МЫШЕЧНАЯ  
ДИСТРОФИЯ И РАК**

---

(31) **19180120.8**

(32) **2019.06.13**

(33) **EP**

(86) **PST/EP2020/066280**

(87) **WO 2020/249717 2020.12.17**

(71) Заявитель:

**ФАСИО ИНТЕЛЛЕКТУАЛ  
ПРОПЕРТИ Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Де Майер Йорис (BE), Гезе Маркус,  
Монекке Зебастиан, Хирш Рольф  
(DE), Локи Пуй Ленг (GB)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям для лечения заболеваний, связанных с экспрессией DUX4, таких как мышечные дистрофии. Изобретение также относится к применению таких соединений или к способам применения таких соединений.

---

**A1**

**202290039**

**202290039**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572324EA/026

### **ИНГИБИТОРЫ КАЗЕИНКИНАЗЫ 1 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЭКСПРЕССИЕЙ DUX4, ТАКИХ КАК МЫШЕЧНАЯ ДИСТРОФИЯ И РАК**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к комбинациям соединений для лечения заболеваний, связанных с экспрессией DUX4, таких как мышечные дистрофии. Изобретение также относится к использованию таких комбинаций или к способам применения таких комбинаций.

#### **Введение**

Лице-лопаточно-плечевая мышечная дистрофия (FSHD) - одна из наиболее распространенных наследственных мышечных дистрофий. Симптомы начинаются в возрасте до 20 лет со слабости и атрофии мышц вокруг глаз и рта, плеч, плеч и голеней. Позже слабость может распространяется на мышцы живота и иногда на мышцы бедра, в результате чего примерно 20% пациентов в конечном итоге становятся прикованными к инвалидной коляске. В настоящее время пациенты полагаются на лечение таких симптомов, как боль и усталость, с использованием обезболивающих, когнитивной терапии и физических упражнений, иногда с применением медицинских устройств, используемых для поддержания подвижности пациента. Кроме того, усиление функции лопатки может быть достигнуто хирургическим лечением лопатки. В лучшем случае эти вмешательства остаются направленными на облегчение симптомов по своей природе и не влияют на прогрессирование заболевания, что свидетельствует о необходимости терапии, способной изменить прогрессирование заболевания.

В последние годы был достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных основ FSHD, что привело к идентификации и характеристике фундаментальных генетических нарушений, вызывающих FSHD. Широкую поддержку получила модель патогенеза, где эпигенетическая дерепрессия фактора транскрипции Double Homeobox 4 (DUX4) в мышечных клетках запускает патологические изменения, инициируя каскад дерегуляции транскрипции, что приводит к атрофии мышц, воспалению и окислительному стрессу, который может являться ключевой характеристикой заболевания (Lemmers et al., 2010, DOI: 10.1126/science.1189044; Sharma et al., 2016, DOI: 10.4172/2157-7412.1000303, Snider et al., 2010, DOI: 10.1371/journal.pgen.1001181; Tawil et al., 2014, DOI: 10.1186/2044-5040-4-12).

FSHD иногда делят на два подтипа, а именно FSHD1 и FSHD2. FSHD1 связан с большими делециями в tandemном массиве ДНК (D4Z4), расположенном в субтеломерной области хромосомы 4q35. Каждый из повторов D4Z4 содержит копию гена DUX4. У здоровых людей DUX4 экспрессируется в зародышевой линии, но эпигенетически подавляется в соматических тканях. Здоровые, генетически незатронутые люди определяются как имеющие от 10 до 100 повторяющихся единиц D4Z4 на обоих плечах

хромосомы 4q, тогда как люди с FSHD1 имеют от 1 до 10 повторяющихся единиц D4Z4 на одном плече хромосомы 4q. Делеции повторов D4Z4, характеризующие FSHD, удаляют значительную часть регуляторного хроматина из этой области, включая несколько сотен гистонов и значительное количество CpG-богатой ДНК. Эти элементы важны для метилирования ДНК и формирования гетерохроматина, и потеря таковых значительно изменяет эпигенетический статус массива D4Z4. Уменьшение количества D4Z4 само по себе не является патогенным. Только в случае, когда уменьшение количества D4Z4 происходит на разрешающем заболевании аллеле 4qA, содержащем полиморфизм, который может влиять на полиаденилирование дистального транскрипта DUX4, измененный эпигенетический контекст становится ассоциированным с альтернативным сплайсингом и повышенной экспрессией DUX4 в скелетных мышцах пациентов с FSHD1. В гораздо более редкой форме FSHD2 причиной заболевания является мутировавшая форма эпигенетического фактора, такого как SMCHD1 или DNMT3B. В этом случае область D4Z4 гипометилирована, а мышечные клетки характеризуются дерепрессированным белком DUX4. Было высказано предположение, что FSHD1 и FSHD2 представляют собой континуум, а не являются отдельными формами (Van den Boogaard et al., 2016, DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.03.013). Обе формы FSHD приводят к чрезмерной экспрессии DUX4. Взрывоподобная экспрессия DUX4 только в небольшой фракции миофибрилл вызывает гибель миоцитов, в конечном итоге приводя к мышечной слабости и истощению (Lemmers et al., 2010).

Проще говоря, сверхэкспрессия DUX4 является первичным патогенным событием, лежащим в основе FSHD, и подавление таковой является многообещающим терапевтическим подходом к FSHD. В подтверждение этого, небольшое количество единиц повторов обычно связаны с тяжелым фенотипом FSHD. Умеренное количество повторов обеспечивает более легкую форму и вариабельную клиническую тяжесть заболевания. Также в FSHD2 область D4Z4 гипометилирована, а мышечные клетки характеризуются дерепрессированным белком DUX4. Пациенты с менее чем 10 повторяющимися единицами D4Z4, которые также имеют мутацию в SMCHD1, имеют очень тяжелый клинический фенотип, иллюстрирующий, что комбинация размера повтора и активности эпигенетических модификаторов, вносящих вклад в дерепрессию DUX4, определяет возможную тяжесть заболевания при FSHD. DUX4 действует как фактор транскрипции, экспрессия которого инициирует каскад транскрипции, приводящий к прогрессирующей дисфункции и гибели мышечных клеток, и, в конечном итоге, к явной патологии (Kowaljow et al., 2007, DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002; Vanderplanck et al., 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0026820; Geng et al., 2012, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.11.013; Yao et al., 2014, DOI: 10.1093/hmg/ddu251; Wallace et al., 2011, DOI: 10.1002/ana.22275).

Вследствие значимой роли DUX4 в FSHD, подавление DUX4 является основным терапевтическим подходом для остановки прогрессирования заболевания. Этот подход также может быть полезен для лечения других заболеваний, таких как рак, включая

острый лимфобластный лейкоз (Yasuda et al., 2016, doi: 10.1038/ng.3535) и саркомы (Oyama et al., 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-04967-0; Bergerat et al., 2017, DOI: 10.1016/j.prgp.2016.11.015) и т. д. Однако механизмы, лежащие в основе экспрессии DUX4, плохо изучены, и соответствующие мишени для лекарств плохо определены. В результате в настоящее время способов лечения FSHD не существует, и существует потребность в соединениях и композициях, которые можно использовать для подавления экспрессии DUX4. Campbell et al. (2017, DOI 10.1186/s13395-017-0134-x) протестировали набор химических соединений с известной эпигенетической активностью, а также библиотеку Pharmakon 1600, состоящую из соединений, прошедших клинические испытания, с целью выявления молекул, снижающих экспрессию DUX4, определяемую как уровень экспрессии мРНК гена-мишени DUX4 в иммортализованных культурах клеток скелетных мышц FSHD. Они идентифицировали несколько классов молекул, включающих в себя ингибиторы бромодомена и экстра-терминального (BET) семейства белков и агонисты бета-2-адренергического рецептора. Их исследования показывают, что соединения этих двух классов подавляют экспрессию DUX4, блокируя активность бромодомен-содержащего белка 4 (BRD4) или повышая уровни циклического аденозинмонофосфата (сAMP), соответственно. WO2019/071144 и WO2019/071147 предлагают использование ингибиторов p38, таких как лосмапимод, для снижения экспрессии DUX4 в контексте лечения FSHD.

Измерение тяжести и прогрессирования FSHD является особенно сложной задачей, потому что, в отличие от большинства мышечных дистрофий, прогрессирующих симметрично с постоянной скоростью, FSHD характеризуется ступенчатым, асимметричным прогрессированием мышечной атрофии и слабости. Следовательно, показатели результатов и биомаркеры для стратификации пациентов важны для измерения бремени болезни и тестирования эффектов вмешательств. Как и при других мышечных дистрофиях, в ходе заболевания мышечная ткань замещается жиром. Степень жировой инфильтрации, измеряемая с помощью MRI, коррелирует с обычно используемым показателем функционального статуса, оценкой клинической тяжести FSHD (Mul et al., 2017, DOI: 10.1212/WNL.0000000000004647). Кроме того, было высказано предположение, что воспаление мышц вносит вклад в патофизиологию FSHD и предшествует разрушению мышц и замещению жира, тем самым представляя собой ранний маркер активности заболевания. Воспаление мышц можно исследовать с помощью последовательностей MRI с коротким восстановлением инверсии TI (STIR). При гиперинтенсивности STIR (STIR+) визуализируется отек. Иммуноопосредованный механизм FSHD согласуется с очаговым воспалением и инфильтратами Т-лимфоцитов CD8+, характерными для биопсий пораженных FSHD (Wang et al., Hum Mol Genet. 2019 Feb 1; 28 (3): 476-486. Doi: 10.1093/hmg/ddy364, Frisullo et al., 2011, DOI: 10.1007/s10875-010-9474-6). Выраженные воспалительные клеточные инфильтраты, имитирующие воспалительные миопатии, часто наблюдаются при биопсии мышц STIR+, вследствие чего было высказано предположение, что такое может представлять собой ранний

маркер активного заболевания (Geng et al. 2012, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.11.013). Таким образом, MRI с последовательностями STIR была предложена в качестве показателя прогноза (Tasca et al., 2016, DOI: 10.1002/ana.24640; Janssen et al., 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0085416). Исследования, посвященные изучению воспаления мышц и замещения жира при FSHD, показали, что тяжелое воспаление мышц предсказывает более быстрое замещение жира в мышцах (Tasca et al., 2016, DOI: 10.1002/ana.24640; Ferguson et al., 2018, DOI: 10.1002). /mus.26038; Wang et al., 2019, выше). Было также высказано предположение, что, как только мышца достигает промежуточной жировой фракции, происходит ускорение в направлении полного замещения жира и что именно воспаление мышц может выступать в качестве спускового механизма данного процесса (Janssen et al., 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0085416).

В недавнем исследовании изучалась патофизиология FSHD у 45 пациентов в течение 14 месяцев путем количественной оценки гиперинтенсивности STIR, указывающей на воспаление, и содержания жира в мышцах бедра, а также изучалась его связь с прогрессированием болезни в течение 14 месяцев (Dahlqvist et al., 2019, 10.1007/s00415-019-09242-y). Сорок три пациента были исследованы на предмет воспаления мышц и содержания жира, у каждого пациента оценивали девять мышц бедра. Тридцать три пациента имели по крайней мере одну мышцу со STIR+ в начальном обследовании и 34 пациента на последующем обследовании. Из всех 370 проанализированных мышц 83 были STIR+ на начальном обследовании (исходный уровень) и 103 на последующем. Все мышцы имели значительное увеличение содержания жира в течение 14 месяцев. Это прогрессирование замещения жира было более чем в два раза быстрее в мышцах STIR+ по сравнению с мышцами STIR- и увеличивалось с увеличением степени интенсивности замещения. Это показывает, что у пациентов с активным воспалением мышечных волокон болезнь активно прогрессирует.

Интересно, что недавнее исследование было направлено на изучение корреляции между изменениями MRI, соответствующими патологическими изменениями и экспрессией гена-мишени DUX4 при FSHD. Данные поперечного сечения показали, что показатели STIR+ MRI могут иметь существенное прогностическое значение для выявления мышц с экспрессией DUX4 и выявления активного заболевания. Действительно, при использовании повышенного рейтинга STIR для отбора мышц с повышенной экспрессией мишени DUX4 экспрессия DUX4 наблюдалась в ~90% образцов (Wang et al., выше). Кроме того, биопсии, взятые в STIR+ мышцах, показали изменения экспрессии генов, которые могут быть ассоциированы с воспалением, ремоделированием внеклеточного матрикса и регенерации мышц (Tasca et al., 2012, DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0038779). Это предполагает причинную связь между воспалительным инфильтратом и экспрессией DUX4. Многие из генов, активируемых DUX4, обычно функционируют в зародышевой линии и/или в ранних стволовых клетках и не присутствуют в здоровых скелетных мышцах взрослого человека. Считается, что активация гаметогенной программы несовместима с постмитотическими скелетными

мышцами, что приводит к апоптозу или клеточной дисфункции.

В то время как терапевтические подходы, приводящие к снижению DUX4, как ожидается, будут влиять на воспалительные процессы, жировую инфильтрацию и фиброзные процессы при FSHD, пациенты с признаками активного заболевания, которое характеризуется как экспрессией DUX4, так и воспалением, выиграют от лечения, которое влияет на оба этих процесса. WO2019/071144 и WO2019/071147 раскрывают использование ингибиторов p38, таких как лосмапимод, для снижения экспрессии DUX4 в контексте лечения FSHD. Ингибиторы p38 широко разрабатываются для лечения воспалительных заболеваний, таких как хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) и ревматоидный артрит. При врожденном иммунном ответе митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK) и ядерный фактор-kB (NF-kB) активируются рецепторами опознавания паттерна (PRR) при связывании молекулярных паттернов, ассоциированных с патогенами (PAMP). Четырнадцать MAPK, обнаруженные в клетках млекопитающих, имеют решающее значение для генерации иммунных ответов. В целом они играют ключевую роль в пути передачи сигнала MAPK, который клетки используют для адаптации к воспалительным и стрессовым условиям. Патогены или воспалительные стимулы инициируют каскад фосфорилирования, опосредованный киназой p38, который приводит к транскрипции и трансляции генов, связанных с воспалительным ответом, и кодирующих белки, такие как TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 и IL-8 (Xing 2105, DOI: 10.4081/mk.2015.5508). Теоретически ингибиторы p38 могут влиять как на экспрессию DUX4, так и на локальное воспаление в мышцах FSHD, что является маркером заболевания с повышенной экспрессией DUX4 и активной регенерацией (Wang et al., 2019, выше; Tasca et al., 2012, DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0038779).

Однако известно, что p38 $\alpha$  MAPK играет критическую роль в биологии скелетных мышц, в частности, в прекращении пролиферирования миобластов с целью дифференциации и последующего слияния с образованием многоядерных мышечных трубок, что является нежелательным эффектом при лечении FSHD. В WO2019/071144 и WO2019/071147 данные, полученные с использованием иммортализованных миобластов, были использованы для предположения, что ингибиторы киназ p38a и p38b не влияют на миогенин или экспрессию других миогенных факторов и не влияют на пролиферацию миобластов или дифференцировку миобластов, характеризующуюся миогенным слиянием в культуре мышечных трубок FSHD. Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что ингибиторы p38 действительно ингибируют миогенное слияние первичных мышечных трубок FSHD, полученных от пациента. Хотя экспрессия маркеров миогенной дифференцировки, таких как миогенин или MYH2, оставалась неизменной, ингибирование миогенного слияния было обнаружено с помощью анализа изображений с высоким содержанием (high content image analysis) при изучении слияния первичных культур мышечных трубок, где ингибиторы p38 нарушали слияние мышечных трубок.

Следовательно, существует очевидная потребность в соединениях, которые ингибируют как DUX4, так и/или воспалительную реакцию при FSHD, не влияя на

формирование мышечной трубки. Существует потребность в соединениях, снижающих ингибирование формирования мышечной трубки.

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что ингибиторы казеинкиназы 1 (СК1, также известный как CSNK1) могут защищать от негативного воздействия при образовании мышечной трубки. Комбинированное ингибирование СК1 и р38 привело к ингибированию DUX4 без отрицательного воздействия на формирование мышечной трубки. Этот благоприятный фенотип можно было наблюдать, комбинируя ингибитор СК1 с ингибитором р38.

Серин/треонинкиназы (ЕС 2.7.11.1) представляют собой класс протеинкиназ, являющихся многообещающими лекарственными мишенями для низкомолекулярных ингибиторов. Из-за участия таковых в различных сигнальных каскадах в эукариотических клетках ингибирование серин/треониновых киназ может быть применимо к лечению таких заболеваний, как рак, диабет и различные воспалительные заболевания.

Казеинкиназа 1 (СК1, также известная как CSNK1) принадлежит к семейству серин/треонинкиназ. Казеинкиназа 1 (СК1) представляет собой семейство серин/треонинкиназ, повсеместно экспрессируемое у млекопитающих, которое, как известно, фосфорилирует широкий спектр белков. Соответственно, изоформы СК1 играют важную регуляторную роль в различных клеточных процессах, включая пролиферацию, репарацию ДНК, апоптоз, дифференцировку клеток, циркадный ритм, передачу сигналов Wnt, нуклео-цитоплазматическое перемещение факторов транскрипции и транскрипцию ДНК (Eide EJ, Virshup DM (2001) doi: 10.1081/CBI-100103963). Семейство СК1 состоит из различных изоформ ( $\alpha$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$  и  $\epsilon$ ) у людей и различных альтернативных вариантов сплайсинга таковых. Изоформы СК1 обладают высококонсервативным киназным доменом, но значительно различаются по длине и составу N- и C-концевых последовательностей. C-концевой домен имеет множество сайтов аутофосфорилирования и считается вовлеченным в регуляцию активности аутофермента. У млекопитающих фермент существует в семи изоформах ( $\alpha$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\delta$ , и  $\epsilon$ ), все из которых имеют одинаковый киназный домен. Посредством фосфорилирования различных белков-субстратов эти изоформы способны активировать, стабилизировать, инактивировать или дестабилизировать функции этих белков-субстратов, таким образом осуществляя регуляцию. Например, фактор-супрессор опухоли p53 и онкоген mdm2, являющиеся важными белками для контроля аномального роста клеток, являются субстратами СК1. Фосфорилирование p53 казеинкиназами, такими как казеинкиназа 1 $\delta$  или казеинкиназа 1 $\epsilon$ , приводит к изменению взаимодействия между p53 и mdm2. Также известно, что казеинкиназа 1 $\delta$  и казеинкиназа 1 $\epsilon$  участвуют в качестве регуляторных белков, и ассоциируются с образованием веретена как центрального тела во время деления клетки, и что казеинкиназа 1 $\delta$  и казеинкиназа 1 $\epsilon$  участвуют в апоптозе, опосредованном TRAIL (фактор, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли) и Fas. Также сообщалось, что ингибирование казеинкиназы 1 $\delta$  и казеинкиназы 1 $\epsilon$  неселективным ингибирующим СК1 соединением IC261 снижает рост опухолевых

клеток поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo* (Brockschmidt et al., 2008, DOI: 10.1136/gut.2007.123695). Таким образом, ингибиторы СК1 были исследованы на предмет различных важных фенотипических и терапевтических эффектов.

WO2011051858 раскрывает ингибиторы СК1 (для обеих,  $\delta$  и  $\epsilon$ ), полезные для лечения и/или предотвращения заболеваний и расстройств, связанных с центральной нервной системой. Эти ингибиторы образуют ряд замещенных имидазольных соединений, более конкретно, ряд 4-арил-5-гетероарил-1-гетероциклоалкилимидазолов и родственных аналогов. Сообщаются сведения как об их синтезе, так и значения  $IC_{50}$  для СК1  $\delta$  and  $\epsilon$ , значения которых обычно находятся в наномолярном диапазоне. Близкородственное семейство ингибиторов СК1 раскрыто в WO2012085721.

WO2015119579 раскрывает семейство, которое также имеет азольное ядро, а именно семейство 2,4,5-три-замещенных азольных соединений для использования в качестве ингибиторов СК1. Ингибиторы используются для индукции или усиления дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты посредством ингибирования СК1. Раскрыты синтетические пути получения ингибиторов, и показано, что ингибиторы обычно имеют значения  $IC_{50}$  в наномолярном диапазоне, как СК1  $\delta$  and  $\epsilon$  ингибиторы.

EP 2949651 раскрывает семейство производных замещенных бензотиазолов, которые действуют как ингибиторы СК1, и их использование связано с лечением и/или профилактикой заболеваний, опосредованных СК1, особенно воспалительных, неврологических, психиатрических, нейродегенеративных и/или офтальмологических заболеваний и некоторых регенеративных процессов. Предложены методы синтеза, и показано, что ингибиторы обладают наномолярной ингибирующей активностью в отношении СК1  $\delta$  и  $\epsilon$ . Bischof et al., *Amino Acids* (2012) 43: 1577-1591 DOI: 10.1007/s00726-012-1234-x, García-Reyes et al., *J. Med. Chem.* 2018, 61, 4087-4102, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00095, и Richter et al., *J. Med. Chem.*, DOI: 10.1021/jm500600b описывает аналогичные ингибиторы СК1.

В WO2009016286 описаны производные 6-циклоамино-3- (пирид-4-ил) имидазо [1,2-b] пиридазина, применимые в качестве ингибиторов протеинкиназы, в частности, в качестве ингибиторов СК1  $\delta$  и  $\epsilon$ . Их синтез подробно описан, а способность ингибиторов СК1 ингибировать фосфорилирование казеина казеинкиназами 1  $\delta$  and  $\epsilon$  оценена в соответствии с процедурой, описанной в US 2005/0131012, определяющей значения  $IC_{50}$  в наномолярном диапазоне.

WO2015195880 раскрывает семейство с аналогичным ядром, а именно семейство представляет собой замещенные бициклические пиразолы, применимые в качестве ингибиторов протеинкиназы. Описаны синтетические стратегии получения ингибиторов, и показано, что полученные ингибиторы СК1 эффективны в отношении СК1  $\delta$  и  $\epsilon$ . Особое значение придается возможности лечения рака.

Hirota et al., *PLoS Biol* 8(12): e1000559. doi:10.1371/journal.pbio.1000559 and Monastyrskiy et al., *Bioorg Med Chem.* 2018 Feb 1;26(3):590-602. doi:

10.1016/j.bmc.2017.12.020 описывает ингибиторы СК1, которые содержат 6-аминопуриновое ядро, подходящие для лечения нарушений циркадного ритма или рака.

Halekotte et al., *Molecules* 2017, DOI: 10.3390/molc ules22040522, Luxenburger et al., *Molecules* 2019, DOI: 10.3390/modules24050873, и Peifer et al., *J. Med. Chem.* 2009, 52, 7618-7630. DOI: 10.1021/jm9005127 описывают ингибиторы СК1 с азольным или гетероазольным ядром. Их использование связано с лечением рака, нейродегенеративных заболеваний, нарушений сна или воспалений.

Члены семейства p38 MAPK, состоящего из изоформ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ , кодируются отдельными генами, которые играют решающую роль в клеточных ответах, необходимых для адаптации к стрессу и выживания (обзор в Whitmarsh 2010 DOI: 10.1186/1741-7007-8-47; Kremontsov et al., 2013, DOI: 10.1128/MCB.00688-13). При многих воспалительных заболеваниях, включая сердечно-сосудистые и другие хронические заболевания, эти же p38 MAPK сигналы, индуцированные стрессом, могут запускать дезадаптивные реакции, которые усугубляют, а не облегчают заболевание (обзор в Whitmarsh 2010). Действительно, было показано, что в скелетных мышцах различные клеточные стрессы, включая хроническое напряжение, воздействие инсулина и измененные эндокринные состояния, дифференцировку миобластов в миоциты, активные формы кислорода, а также апоптоз, индуцируют каскад киназы p38 (Keren, et. al., 2006, DOI: 10.1016/j.mce.2006.03.017; Zarubin et al., 2006, DOI: 10.1038/sj.cr.7290257). Фактически, каскад киназы p38 может быть активирован рядом внешних стимулов, включая провоспалительные цитокины и клеточный стресс, что приводит к активации киназ MAPK с двойной специфичностью, MKK3 и MKK6. Активация MKK3 и MKK6, которые, в свою очередь, фосфорилируют p38 в его петле активации, запускают последующие события фосфорилирования. К ним относятся фосфорилирование HSP27, MAPKAPK2 (MK2) и различных факторов транскрипции, что приводит к изменениям транскрипции в ядре. Было идентифицировано некоторое количество регулируемых p38 транскриптов и большое количество нижестоящих эффекторов киназы p38 (описано в Cuenda et al., 2007, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.03.010 и Kyriakis et. Al., 2001, DOI: 10.1152/Physrev.2001.81.2.807, и Viemann et al. 2004, DOI: 10.1182/blood-2003-09-3296).

Несколько соединений с различными химическими каркасами, ингибирующие сигнальный каскад p38 $\alpha$  MAPK, вошли в клинические испытания при различных (не нервно-мышечных) показаниях, включая ревматоидный артрит, хроническую обструктивную болезнь легких, боль, сердечно-сосудистые заболевания и рак.

Известно, что p38 $\alpha$  MAPK играет критическую роль в биологии скелетных мышц, особенно в прекращении дифференциации пролиферирующих миобластов и последующего слияния с образованием многоядерных мышечных трубок. Активация этого пути, как полагают, присуща мышечным клеткам, экспрессирующим MyoD, и служит для гарантии комплексной и своевременной активации мышечной программы (Keren et al., 2006). Лечение FSHD с использованием ингибиторов p38 описано в WO2019103926. Лечение пациентов с мышечной дистрофией, которые постоянно

подвергаются процессам дегенерации и регенерации, с помощью ингибиторов p38α описано в WO2019/071144 и WO2019/071147. Полный нокаут (KO, Complete knockout) p38α является эмбрионально летальным. Спасение эмбрионов обеспечивает выживание детенышей до нескольких дней после рождения и позволяет изолировать сателлитные клетки для изучения миогенных предшественников, лишенных p38α. Миобласты, лишенные p38α, экспрессируют значительно меньше значимых генов дифференцировки и демонстрируют серьезный дефицит слияния. Гистология детенышей P2 показывает значительно увеличенное количество циклических сателлитных клеток и смещенное влево распределение волокон. (Perdiguero et. al, 2007, DOI: 10.1038/sj.emboj.7601587). Было показано, что активация пути p38 усиливается у мышей mdx и Sgcd -/-, генетической модели мышечной дистрофии Дюшенна или мышечной дистрофии Limb-Girdle, соответственно. У мышей mdx нокаут (KO) p38α в зрелой мышце (cre, управляемый промотором Myl1) не выявил дефицита в ранние временные точки, а мышцы с дефицитом p38α в возрасте 6 месяцев показали значительно большую центральную нуклеацию и меньшее распределение волокон по сравнению с контролем. Никаких других патологических показателей заболевания, таких как фиброз или повышение уровня креатинкиназы в сыворотке, не наблюдалось, что позволяет предположить, что потеря p38α из скелетных мышц не является патологией для зрелых волокон, но усиливала активность сателлитных клеток дикого типа или иным образом влияла на движение центральных ядер к периферии миофибрилл по мере их созревания (Wissing et al., 2014, DOI: 10.1093/hmg/ddu270). Нокаут-аллель Myl1-cre, который использовался для удаления p38 в этом исследовании, неактивен в сателлитных клетках, поэтому потеря p38 не может напрямую влиять на регенерацию скелетных мышц, что указывает на то, что защита, обеспечиваемая потерей p38, должна быть обусловлена уменьшением некроза миофибрилл без воздействия сателлитных клеток (Wissing et al., 2014). В первичных мышечных клетках FSHD уровень p38 не повышается по сравнению с клетками от здоровых доноров, что позволяет предположить, что потенциальная возможность ингибиторов p38 уменьшать некроза не обязательно проявляется при всех мышечных дистрофиях, включая FSHD. Принимая во внимание, что хотя фармакологические ингибиторы p38 могут быть использованы для смягчения дистрофической патологии мышечных дистрофий, когда активность p38 повышена, даже при этих заболеваниях такое использование не является механистически простым, учитывая известные антагонистические эффекты ингибиторов p38 на сателлитные клетки и на регенерацию мышц.

В свете вышеизложенного существует потребность в соединениях или комбинациях соединений, ингибирующих DUX4 и/или воспалительную реакцию при FSHD, не влияя на формирование мышечной трубки. Существует потребность в соединениях, снижающих ингибирование формирования мышечной трубки. Существует потребность в соединениях, уменьшающих индуцированное ингибитором p38 нарушение формирования мышечной трубки. Существует потребность в улучшенном восстановлении

DUX4, предпочтительно без влияния на формирование мышечной трубки. Существует потребность в стимулировании формирования мышечной трубки, предпочтительно во время лечения FSHD. Существует потребность в улучшении эффекта ингибиторов p38 при лечении состояний, связанных с DUX4, например при лечении FSHD. Существует потребность в улучшенном лечении субъектов, страдающих от состояний, связанных с DUX4, таких как FSHD, также страдающих от воспаления.

#### **Краткое содержание изобретения**

В первом аспекте изобретение относится к ингибитору казеинкиназы 1 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4 у субъекта, причем предпочтительно субъект страдает мышечным воспалением. Предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 используется для стимулирования по меньшей мере одного процесса, выбранного из миогенного слияния и дифференцировки, причем предпочтительно субъект страдает мышечным воспалением. Предпочтительно указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, из которых мышечная дистрофия является более предпочтительной. Наиболее предпочтительно указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой фасциально-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). Предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 для использования в соответствии с изобретением снижает экспрессию DUX4 по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80% или более. Предпочтительно, ингибитор казеинкиназы ингибирует по меньшей мере казеинкиназу 1δ.

Во втором аспекте изобретение относится к комбинации ингибитора казеинкиназы 1 и ингибитора p38 для использования при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, у субъекта, причем предпочтительно субъект страдает мышечным воспалением. Предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 используется для стимулирования по меньшей мере одного процесса, выбранного из миогенного слияния и дифференцировки, причем предпочтительно субъект страдает мышечным воспалением. Ингибитор казеинкиназы 1 и ингибитор p38 могут быть двумя разными веществами, или ингибитор казеинкиназы 1 и ингибитор p38 могут быть одним и тем же веществом. Предпочтительно указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, из которых мышечная дистрофия является более предпочтительной. Наиболее предпочтительно указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой фасциально-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). Предпочтительно, ингибитор p38 ингибирует по меньшей мере p38α. Предпочтительно, ингибитор казеинкиназы ингибирует по меньшей мере казеинкиназу 1δ. Предпочтительно комбинация ингибитора казеинкиназы 1 и ингибитора p38 для использования в соответствии с изобретением снижает экспрессию DUX4 по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80% или более.

В третьем аспекте изобретение относится к способу *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* для стимулирования миогенного слияния и/или дифференцировки, причем способ включает

стадию контактирования клетки с ингибитором казеинкиназы 1 или с комбинацией, как определено в данном документе.

В четвертом аспекте изобретение относится к способу снижения экспрессии DUX4 у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает стадию введения эффективного количества ингибитора казеинкиназы 1, как определено в данном документе, или стадию введения эффективного количества комбинации, как определено в данном документе, где субъект страдает мышечным воспалением. Предпочтительно субъект страдает заболеванием или состоянием, связанным с экспрессией DUX4, которое представляет собой мышечную дистрофию или рак, из которых мышечная дистрофия является более предпочтительной. Наиболее предпочтительно указанная мышечная дистрофия, связанная с экспрессией DUX4, представляет собой фасциально-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

### **Описание вариантов**

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что ингибиторы СК1 улучшают миогенное слияние. Это способствует формированию мышечной трубки. Этот эффект особенно полезен, когда вводятся другие лекарства для лечения состояний, связанных с DUX4, например, когда вводятся ингибиторы p38, потому что такие лекарства нарушают формирование мышечной трубки. Чтобы преодолеть это нежелательное ятрогенное явление, можно одновременно назначать ингибиторы СК1. Например, было обнаружено, что комбинация ингибитора СК1 и ингибитора p38 снижает экспрессию DUX4, одновременно способствуя правильному формированию мышечной трубки. Соответственно, изобретение обеспечивает применение ингибитора СК1 для улучшения миогенного слияния у субъекта с ятрогенным нарушением формирования мышечной трубки, например в результате введения ингибитора p38.

Авторы изобретения определили воспалительную реакцию на повреждение волокон как требующий внимания механизм обострения DUX4-опосредованных состояний, таких как FSHD. Нарушение регуляции экспрессии эмбрионального фактора транскрипции в мышечных клетках индуцирует множество молекул, которые могут функционировать как неоантигены, которые непосредственно распознаются инфильтрирующими Т-клетками. Фактически, некоторые из генов, регулируемых DUX4, такие как семейство PRAME, являются известными антигенами рака яичка, поэтому экспрессия этих генов в скелетных мышцах также может вызывать адаптивный иммунный ответ. Кроме того, индукция DEFV103 с помощью DUX4 влияет как на адаптивный, так и на врожденный иммунный ответ. DEFV103 может играть провоспалительную роль в адаптивном иммунном ответе и может действовать как хемоаттрактант для моноцитов, лимфоцитов и дендритных клеток. В этом отношении он может усиливать адаптивный иммунный ответ на антигены зародышевой линии, экспрессируемые в мышцах при FSHD (Geng et al. 2012, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.11.013). Наконец, эффекторные механизмы, задействованные иммунными клетками в мышечной ткани (без ограничения таковыми), такие как цитокины и воспалительные факторы, высвобождающиеся во время процесса

заболевания, способствуют возникновению вредоносных сигнальных каскадов/событий, которые непосредственно принимают участие в гибели миофибрилл, и могут действовать как триггер экспрессии DUX4. Взятые вместе, воспалительные маркеры, такие как, например, определяемые STIR MRI, имеют существенную прогностическую ценность для идентификации пациентов с воспалением и экспрессией DUX4, где наличие обоих маркеров характеризуют активное заболевание. В соответствии с изобретением предлагаются соединения и комбинации соединений для лечения субъектов, у которых была диагностирована активная форма FSHD.

Предполагая центральную роль DUX4 в гипотезе консенсуса заболевании для FSHD, ожидается, что терапевтический подход с возможностью модификации заболевания будет базироваться на ингибировании DUX4. Авторы изобретения неожиданно определили казеинкиназу 1 (CK1) в качестве новой лекарственной мишени для обеспечения репрессии DUX4 в мышечных клетках и для стимулирования миогенного слияния в мышечных клетках, особенно в мышечных клетках с нарушенным миогенным слиянием. Это изобретение было сделано с использованием первичных мышечных клеток, полученных от пациентов с FSHD. Из-за специфичности локуса FSHD приматов и сомнительной релевантности рекомбинантных, иммортализованных или опухолевых клеток или животных моделей для изучения эндогенных регуляторных механизмов DUX4, первичные мышечные клетки, полученные от пациентов, являются наиболее подходящей доступной моделью заболевания. Анализы, основанные на иммортализованных клетках, несут риск изменения эпигеномов, что тем самым ограничивает их актуальность при изучении эндогенной регуляции экспрессии DUX4. В частности, субтеломерное расположение D4Z4 и важность эпигенома D4Z4 в стабильности репрессии DUX4 (Stadler et al., 2013, DOI: 10.1038/nsmb.2571) подчеркивают необходимость использования первичных мышечных клеток для обнаружения физиологически значимых мишеней для лекарств, регулирующих экспрессию DUX4.

Исторически сложилось так, что DUX4 сложно обнаружить в мышцах с FSHD. Было показано, что его экспрессия в первичных миобластах пациентов с FSHD является стохастической. Исследования показали, что только 1 из 1000 или 1 из 200 ядер является DUX4-положительным в пролиферирующих миобластах FSHD и во время дифференцировки миобластов, соответственно. Сообщается, что из-за этого особенно низкого содержания DUX4 обнаружение белка DUX4 представляет собой техническую проблему. В то время как первичные мышечные клетки FSHD широко представлены в литературе по FSHD, ни один из отчетов, по-видимому, неприменим за пределами лабораторного уровня. Ограничения, связанные с использованием первичных клеток, и признанная сложность обнаружения низких уровней эндогенного DUX4 иллюстрируют проблемы, связанные с применением первичных мышечных клеток FSHD в форматах с более высокой пропускной способностью. Хотя экспрессия DUX4 возрастает при дифференцировке пролиферирующих миобластов FSHD в многоядерные мышечные трубки *in vitro*, уровни остаются низкими, а динамическая изменчивость традиционно

считается чрезвычайно сложной для надежных крупномасштабных подходов к скринингу (Campbell et al., 2017).

#### Соединение для использования

В первом аспекте изобретение обеспечивает ингибитор казеинкиназы 1 (СК1) для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с (чрезмерной) экспрессией DUX4, где ингибитор казеинкиназы 1 снижает экспрессию DUX4. Такой ингибитор СК1 упоминается здесь как ингибитор СК1 для применения согласно изобретению. Ингибиторы СК1 известны в данной области и более подробно описаны ниже в данном документе.

Описанное здесь медицинское применение сформулировано в виде соединения, как определено здесь, для использования в качестве лекарственного средства для лечения заявленного состояния (состояний) (например, путем введения эффективного количества соединения), но в равной степени может быть сформулировано как i) способ лечения заявленного(ых) состояния(ий) с использованием соединения, как определено в данном документе, включая стадию введения субъекту эффективного количества соединения, ii) соединения, как определено в данном документе, для использования в производстве лекарственного средства для лечения указанного состояния, где предпочтительно соединение вводится в эффективном количестве, и iii) применение соединения, как определено в данном документе, для лечения заявленного состояния (состояний), предпочтительно путем введения эффективного количества. Все такие медицинские применения предусмотрены настоящим изобретением. Предпочтительные субъекты - это субъекты, нуждающиеся в лечении. Лечение предпочтительно ведет к отсрочке, улучшению, облегчению, стабилизации, излечению или профилактике заболевания или состояния. Другими словами, соединение для применения согласно изобретению может быть соединением для отсрочки, облегчения, улучшения, стабилизации, лечения или предотвращения указанного заболевания или состояния. В частности, соединения для применения в соответствии с изобретением могут быть предназначены для ослабления вредных побочных эффектов других лекарственных средств.

Ингибитор СК1 для применения согласно изобретению снижает экспрессию DUX4. Эта экспрессия DUX4 предпочтительно является общей экспрессией DUX4 у субъекта, подлежащего лечению. Экспрессия DUX4 может быть определена с использованием методов, известных в данной области техники, или приведенных в примерах. Например, экспрессия DUX4 может быть определена с использованием методов ПЦР, такого как ОТ-ПЦР, или с использованием иммуноокрашивания, масс-спектрометрии или ELISA, например, на образце, содержащем клетки или клеточные экстракты, предпочтительно полученные от субъекта. В этом контексте уменьшение предпочтительно является уменьшением по сравнению либо с заранее определенным значением, либо с контрольным значением. Предпочтительным эталонным значением (контролем) является эталонное значение, полученное путем определения экспрессии DUX4 в необработанном образце, содержащем клетки или клеточные экстракты. Этот

необработанный образец может быть получен от того же субъекта или от другого здорового субъекта, более предпочтительно, представляет собой образец, полученный таким же способом, и, таким образом, содержащий тот же тип клеток. Удобно, когда и тестовый образец, и эталонный образец могут быть частями одного полученного большего образца. В качестве альтернативы тестовый образец получен от субъекта до начала лечения. Наиболее предпочтительным эталонным значением (контролем) является уровень экспрессии DUX4 в образце, полученном от субъекта до первого введения ингибитора казеинкиназы 1 согласно изобретению. Другим предпочтительным эталонным значением является фиксированное значение, которое представляет отсутствие экспрессии DUX4.

Снижение экспрессии DUX4 предпочтительно означает, что экспрессия снижается по крайней мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Если экспрессия DUX4 снижается, например, на 100%, то возможно, что экспрессия DUX4 больше не может быть обнаружена. Снижение можно оценить на уровне белка, например, с помощью иммуноокрашивания, ELISA или масс-спектрометрии, или его можно оценить на уровне мРНК, например, с помощью методов ПЦР, такого как ОТ-ПЦР. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает ингибитор казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению, где снижение экспрессии DUX4 определяют с помощью ПЦР или иммуноокрашивания, где предпочтительным методом ПЦР является ОТ-ПЦР. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение предоставляет ингибитор казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению, где экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80% или более, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, 40%, 60%, 80% или более. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 10%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 20%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 30%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 40%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 50%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 60%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 70%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 80%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 90%. В других предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается по меньшей мере на 95%. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления экспрессия DUX4

снижается примерно на 100%, предпочтительно на 100%.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает ингибитор казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению, где ингибитор казеинкиназы 1 снижает экспрессию DUX4 в мышечных клетках, иммунных клетках или раковых клетках, предпочтительно в мышечных клетках или иммунных клетках, наиболее предпочтительно в мышечных клетках. Предпочтительными мышечными клетками являются миобласты, сателлитные клетки, мышечные трубки и миофибриллы. Предпочтительными иммунными клетками являются В-клетки, Т-клетки, дендритные клетки, нейтрофилы, естественные клетки-киллеры, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, мегакариоциты, миелоидные супрессорные клетки, моноциты/макрофаги и тимоциты и, необязательно, тучные клетки. Другими предпочтительными клетками являются тромбоциты и эритроциты. В других вариантах осуществления экспрессия DUX4 снижается в раковых клетках.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает ингибиторы СК1 для применения согласно изобретению, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, предпочтительно, когда указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию, наиболее предпочтительно фациоскапуло-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

В этом контексте предпочтительной мышечной дистрофией является FSHD; предпочтительным раком является рак простаты (WO2014081923), множественная миелома (US20140221313), рак легких (Lang et al., 2014, DOI: 10.14205/2310-8703.2014.02.01.1), рак толстой кишки (Paz et al., 2003, DOI : 10.1093/hmg/ddg226) саркома или лейкемия; предпочтительной саркомой является мелкоклеточная саркома (Oyama et al., 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-04967-0; Bergerat et al., 2017, DOI: 10.1016/j.prp.2016.11.015; Chebib and Jo, 2016, DOI: 10.1002/cncy.21685); предпочтительным лейкозом является острый лимфобластный лейкоз (ALL), в частности лейкоз (ALL) предшественника В-клеток (Yasuda et al., 2016, doi: 10.1038/ng.3535; Lilljebjörn & Fioretos, 2017, DOI: 10.1182/blood-2017-05- 742643; Zhang et al., 2017, DOI: 10.1038/ng.3691).

Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает ингибиторы СК1 для применения согласно изобретению, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, предпочтительно, когда указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой FSHD, рак простаты, множественную миелому, рак легких, рак толстой кишки (предпочтительно колоректальную карциному), саркому (предпочтительно мелкоклеточную саркому), лейкемию (предпочтительно острый лимфобластный лейкоз, более предпочтительно острый лимфобластный лейкоз В-клеточного предшественника), предпочтительно указанное заболевание или состояние, связанное с DUX4 экспрессией - FSHD. В более

предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к ингибиторам СК1 для применения согласно изобретению, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, предпочтительно, когда указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой FSHD или рак, где рак предпочтительно представляет собой рак простаты, множественную миелому, рак легких, рак толстой кишки (предпочтительно колоректальную карциному), саркому (предпочтительно мелкоклеточную саркому), лейкоз (предпочтительно острый лимфобластный лейкоз, более предпочтительно острый лимфобластный лейкоз предшественника В-клеток), при этом рак представляет собой более предпочтительно саркому, наиболее предпочтительно мелкоклеточную саркому.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение обеспечивает ингибиторы СК1 для применения согласно изобретению, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой рак, причем рак предпочтительно представляет собой рак простаты, множественную миелому, рак легких, рак толстой кишки (предпочтительно колоректальную карциному), саркому (предпочтительно саркому маленьких круглых клеток), лейкоз (предпочтительно острый лимфобластный лейкоз, более предпочтительно - острый лимфобластный лейкоз предшественника В-клеток), при этом рак более предпочтительно представляет собой саркому, наиболее предпочтительно саркому маленьких круглых клеток.

Другие мишени DUX4 известны как «раковые антигены яичка» (CTAs, cancer testis antigens), которые представляют собой гены, которые обычно экспрессируются только в яичках, но при некоторых формах рака подавляются, вызывая иммунный ответ. Эти наблюдения подразумевают, что дерепрессия DUX4 при раке опосредует активацию промоторов HSATII, СТА и/или THE1B (Young et al., 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003947). В соответствии с этим Dmitriev et al. (2014, DOI: 10.1111/jcmm.12182) демонстрируют сходство между профилями экспрессии FSHD и раковых клеток, предполагая общий этап в патогенезе этих заболеваний.

#### Комбинации ингибиторов

В одном аспекте изобретение предоставляет комбинации ингибитора СК1 и агента, который, как известно, нарушает миогенное слияние и/или дифференцировку. Агент, который, как известно, нарушает миогенное слияние и/или нарушает миогенную дифференцировку, обычно проявляется в виде побочного эффекта, например, нарушение миогенного слияния может быть ятрогенным явлением, связанным с агентом. Такая комбинация является полезной, поскольку изобретатели обнаружили, что ингибирование СК1 способствует миогенному слиянию и дифференцировке и ослабляет нарушающий эффект на миогенное слияние или дифференцировку, который оказывает другой агент. Это позволяет эффективно использовать как ингибитор СК1, так и другой агент при лечении мышечных дистрофий, таких как, предпочтительно, FSHD. Такая комбинация называется здесь комбинацией согласно изобретению.

Предпочтительно агент, нарушающий миогенное слияние и/или дифференцировку,

выбран из группы, состоящей из ингибитора р38, агониста  $\beta$ 2-адренергического рецептора и ингибитора ВЕТ. Наиболее предпочтительно агент, нарушающий миогенное слияние и/или дифференцировку, представляет собой ингибитор р38; такие ингибиторы определены ниже. В других предпочтительных вариантах осуществления агент, нарушающий миогенное слияние и/или дифференцировку, представляет собой агонист  $\beta$ 2-адренергического рецептора, более предпочтительно выбранный из группы, включающей абедитерол, алифедрин, амибегрон, арбутамин, арформотерол, аротинолол, БААМ, бамбутерол, бефунолол, битолтерол, броксатерол, буфенин, карбутерол, кармотерол, циматерол, кленбутерол, колтерол, корбадрин, денопамин, дипивефрин, добутамин, эдофамин, допексамин, дроксидопу (L-DOPS), эфедрин, эпинефрин, этафедрин, этилэфрин, этилведодопу, этилнэпинефрин, фенотерол, формотерол, гексопреналин, хигенамин, индакатерол, изоэтарин, изопреналин, изоксуприн, L-DOPA (леводопа), L-фенилаланин, L-тирозин, левосальбутамол, мабутерол, мелеводопу, метоксифенамин, метилдопу, мирабегрон, норэпинефрин, орципреналин, оксифедрин, PF-610355, фенилпропаноламин, пирбутерол, преналтерол, рактопамин, прокатерол, псевдоэфедрин, репротерол, римитерол, ритодрин, сальбутамол, салметерол, солабегрон, тербуталин, третохинол, тулобутерол, вилантеролеамотерол, XP21279, зилпатерол и цинтерол, более предпочтительно выбранный из сальбутамола, тербуталина, салметерола, тулобутерола и бамбутерола.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинация согласно изобретению представляет собой комбинацию, содержащую по меньшей мере два различных соединения, первое соединение является ингибитором СК1, а второе соединение является вторым агентом. Предпочтительным примером такой комбинации является комбинация, содержащая ингибитор СК1 и включающая дополнительное соединение, которое является ингибитором р38. Другим предпочтительным примером такой комбинации является комбинация, содержащая ингибитор СК1 и включающая дополнительное соединение, которое является агонистом  $\beta$ 2-адренергического рецептора. Такая комбинация именуется здесь и далее комбинацией из двух соединений согласно изобретению.

Предпочтительные комбинации двух соединений согласно изобретению предполагают молярные отношения ингибиторов, как показано в таблице ниже, где «другой» обозначает второе соединение. Предпочтительные двухкомпонентные комбинации согласно изобретению включают массовые отношения ингибиторов, как показано в таблице ниже. Предпочтительные комбинации из двух соединений согласно изобретению включают соотношения ингибирующей активности для ингибиторов, как показано в приведенной ниже таблице.

№	СК1	другой	№	СК1	другой	№	СК1	другой
1	10%	90%	6	60%	40%	11	20-80%	80-20%
2	20%	80%	7	70%	30%	12	30-70%	70-30%
3	30%	70%	8	80%	20%	13	40-60%	60-40%
4	40%	60%	9	90%	10%	14	45-65%	65-45%
5	50%	50%	10	95%	5%	15	10-90%	90-10%

Предпочтительные двухкомпонентные комбинации согласно изобретению включают количество ингибитора СК1, эффективное для ингибирования по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности СК1 у субъекта или в образце, более предпочтительно не менее 40%, еще более предпочтительно не менее 60%, наиболее предпочтительно не менее 80%. Предпочтительные двухкомпонентные комбинации согласно изобретению включают количество ингибитора р38, эффективное для ингибирования по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности р38 у субъекта или в образце, более предпочтительно, по крайней мере, 40%, даже более предпочтительно, по крайней мере, 60%, наиболее предпочтительно, по крайней мере, 80%. В предпочтительных двухкомпонентных комбинациях согласно изобретению дополнительное средство представляет собой ингибитор р38, предпочтительно лосмапимод.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинация по настоящему изобретению включает ингибитор СК1, который обладает дополнительной функцией ингибирования киназ, независимо нарушающей миогенное слияние и/или дифференцировку. Предпочтительным примером такового является ингибитор СК1, который также является ингибитором р38. Такая комбинация далее именуется функциональной комбинацией согласно изобретению.

Предпочтительные комбинации согласно изобретению (двухкомпонентные или функциональные) ингибируют СК1 и р38. Предпочтительно активность СК1 ингибируется по крайней мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Предпочтительно активность р38 ингибируется по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. Более предпочтительны комбинации, где как СК1, так и р38 ингибируются по меньшей мере на 5%, более предпочтительно по меньшей мере на 10%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 15%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 25%, еще более предпочтительно по меньшей мере 30%, еще более предпочтительно по меньшей мере 35%, еще более предпочтительно по меньшей мере 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере 45%, еще более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 55%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 65%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 70%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 80%, еще более предпочтительно на по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

*Содействие миогенному слиянию и/или дифференцировке*

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1, как определено в данном документе, или комбинация, как определено здесь, предназначен(а) для

стимуляции миогенного слияния и/или для стимуляции миогенной дифференцировки. Авторы изобретения определили, что ингибиторы СК1 способствуют обеим этим важным характеристикам здоровых или восстанавливающихся мышц. Использование таковых для стимулирования миогенного слияния и/или миогенной дифференцировки способствует регенерации мышц.

Миогенное слияние представляет собой образование многоядерных мышечных трубок из множества миобластов. Миобласт представляет собой тип эмбриональных клеток-предшественников, которые дифференцируются, давая начало мышечным клеткам. Дифференцировка регулируется миогенными регуляторными факторами, включая MyoD, Myf5, миогенин и MRF4. GATA4 и GATA6 также играют роль в дифференцировке миоцитов. Волокна скелетных мышц образуются при слиянии миобластов; таким образом, мышечные волокна представляют собой клетки с несколькими ядрами, известные как миоядры, причем каждое клеточное ядро происходит из одного миобласта. Слияние миобластов характерно для скелетных мышц (например, двуглавой мышцы плеча), а не для сердечной мышцы или гладких мышц. Миобласты в скелетных мышцах, которые не образуют мышечных волокон, де-дифференцируются обратно в миосателлитные клетки. Эти сателлитные клетки остаются рядом со скелетным мышечным волокном, расположенным между сарколеммой и базальной мембраной эндомизия (соединительная ткань, которая делит мышечные пучки на отдельные волокна). Чтобы повторно активировать миогенез, необходимо стимулировать сателлитные клетки, чтобы они дифференцировались в новые волокна. Авторы изобретения определили, что ингибиторы СК1 способствуют этой дифференцировке сателлитных клеток, тем самым в конечном итоге способствуя образованию мышечных трубок и миогенезу.

Ингибиторы p38, как известно, нарушают нормальное функционирование биологических процессов скелетных мышц, в частности, нарушают пролиферирующие миобласты, которые проходят дифференцировку и впоследствии сливаются с образованием многоядерных мышечных трубок. В изобретении предложен ингибитор СК1 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4 у субъекта, где ингибитор СК1 предназначен для стимуляции миогенного слияния и/или дифференцировки. Такое усиленное слияние и дифференцировка помогает восстановить здоровую биологию скелетных мышц. Предпочтительно субъект также страдает воспалением мышц; это позволяет улучшить эффект использования, как описано в другом месте в данном документе.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 предназначен для стимуляции миогенного слияния. Миогенное слияние является квинтэссенцией для формирования и регенерации мышц, и его можно оценить с помощью любого известного метода. Предпочтительно его оценивают с использованием анализа изображений, более предпочтительно с использованием анализа изображений с высоким разрешением, наиболее предпочтительно, как описано в примерах. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 для стимуляции миогенного слияния увеличивает

миогенное слияние по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 90, 95, 100% или более, предпочтительно по меньшей мере 10% или более, более предпочтительно по меньшей мере на 30% или более, еще предпочтительнее по меньшей мере на 50% или более. Может случиться так, что миогенного слияния изначально не было ни у субъекта, ни в мышце, ни в образце. В таком случае ингибитор СК1 для стимулирования миогенного слияния предпочтительно восстанавливает миогенное слияние, более предпочтительно по меньшей мере до 1%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или более здорового контроля, более предпочтительно, по крайней мере, до 5% от здорового контроля, еще более предпочтительно, по крайней мере, до 15%, наиболее предпочтительно, по крайней мере, до 25% здорового контроля.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 предназначен для стимуляции миогенной дифференцировки. В этих вариантах осуществления клетка предпочтительно является первичной клеткой. В этих вариантах осуществления клетка предпочтительно не является иммортализованной клеткой. Миогенную дифференцировку можно оценить с помощью методов, известных в данной области, таких как количественная оценка маркеров миогенной дифференцировки, таких как MYH2, MyoD, Myf5, миогенин и MRF4, предпочтительно таких как миогенин или MYH2. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 для стимуляции миогенной дифференцировки увеличивает миогенную дифференцировку по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 90, 95, 100% или более, предпочтительно по меньшей мере на 10% или более, более предпочтительно по меньшей мере на 30% или более, еще предпочтительнее по меньшей мере на 50% или более. Может случиться так, что миогенная дифференцировка не присутствовала ни в субъекте, ни в мышце, ни в образце. В таком случае ингибитор СК1 для стимуляции миогенной дифференцировки предпочтительно восстанавливает миогенную дифференцировку, более предпочтительно по крайней мере до 1%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или более здорового контроля, более предпочтительно, по крайней мере, до 5% от здорового контроля, еще более предпочтительно, по крайней мере, до 15%, наиболее предпочтительно, по крайней мере, до 25% от здорового контроля.

В предпочтительных вариантах осуществления комбинация согласно изобретению предназначена для стимуляции миогенного слияния, где признаки и определения имеют значения, данные в настоящем документе. В предпочтительных вариантах осуществления комбинация согласно изобретению способствует миогенной дифференцировке, где признаки и определения имеют значения, определенные в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления комбинация согласно изобретению предназначена для стимуляции миогенного слияния и/или дифференцировки, причем признаки и определения имеют значения, определенные в данном документе. Использование комбинации особенно полезно, потому что активность ингибитора СК1

смягчает пагубные побочные эффекты другого агента, такого как ингибитор p38. При использовании, как описано в этом разделе, комбинация согласно изобретению предпочтительно содержит ингибитор p38 в качестве дополнительного агента. Известно, что такой ингибитор p38 нарушает миогенное слияние и/или дифференцировку. Авторы изобретения обнаружили неожиданный синергетический эффект снижения DUX4, а также идентифицировали ингибиторы СК1 как подходящие для снижения нежелательных побочных эффектов ингибиторов p38 на мышечные клетки.

*Лечение пациентов с дистрофией, страдающих воспалением мышц*

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1, как определено здесь, или комбинация, как определено здесь, предназначены для лечения пациентов, страдающих как от состояния, связанного с DUX4, так и от мышечного воспаления. Воспаление мышц вносит свой вклад в патофизиологию мышечных дистрофий, таких как FSHD. Он предшествует разрушению мышц и замене таковой жировой тканью, тем самым представляя собой ранний маркер активности заболевания. Воспаление мышц можно идентифицировать с помощью средств, известных в данной области техники. Предпочтительно мышечное воспаление идентифицируют с помощью по меньшей мере одного метода, выбранного из использования биопсии и использования последовательностей MRI с короткой восстановленной инверсией T1 (STIR), предпочтительно с использованием MRI со STIR. При гиперинтенсивности STIR (STIR+) визуализируется отек, который коррелирует с воспалением. Предпочтительной воспаленной мышцей является мышца STIR+. Предпочтительной биопсией мышцы является биопсия мышцы STIR+. Предпочтительным мышечным воспалением является МАРК-ассоциированное мышечное воспаление, более предпочтительно мышечное воспаление, связанное с транскрипцией и трансляцией генов, связанных с воспалительным ответом, которые кодируют белки, такие как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-8. Воспаление мышц предсказывает более быстрое мышечное замещение жиром. Ингибиторы p38 являются известными противовоспалительными агентами, но уменьшают миогенное слияние и нарушают миогенную дифференцировку и регенерацию. Комбинация ингибитора СК1 и ингибитора p38 преодолевает эти проблемы и приводит к синергетическому снижению экспрессии DUX4.

У предпочтительного субъекта, страдающего мышечным воспалением, есть по крайней мере одна воспаленная мышца, более предпочтительно по крайней мере 2, еще более предпочтительно по крайней мере 3, еще более предпочтительно по крайней мере 4, еще более предпочтительно по крайней мере 5, наиболее предпочтительно по крайней мере 6, 7, 8, 9, 10 или 11. Предпочтительно воспаленная мышца представляет собой скелетную мышцу, более предпочтительно, это скелетная мышца лица, лопатки или плеча. Предпочтительным субъектом, страдающим мышечным воспалением, является субъект, также страдающий мышечной дистрофией, более предпочтительно также страдающий FSHD. Предпочтительно такой субъект, страдающий FSHD, имеет по меньшей мере одну воспаленную мышцу, более предпочтительно по меньшей мере одну мышцу STIR+.

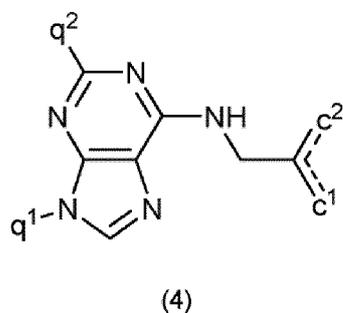
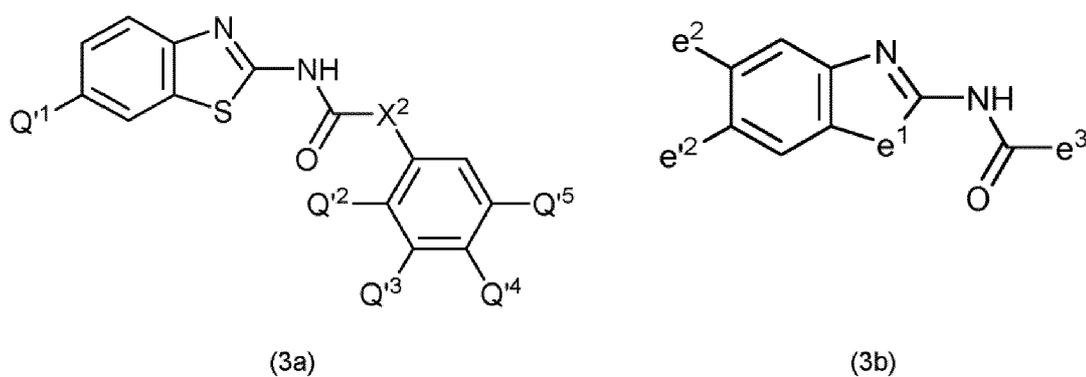
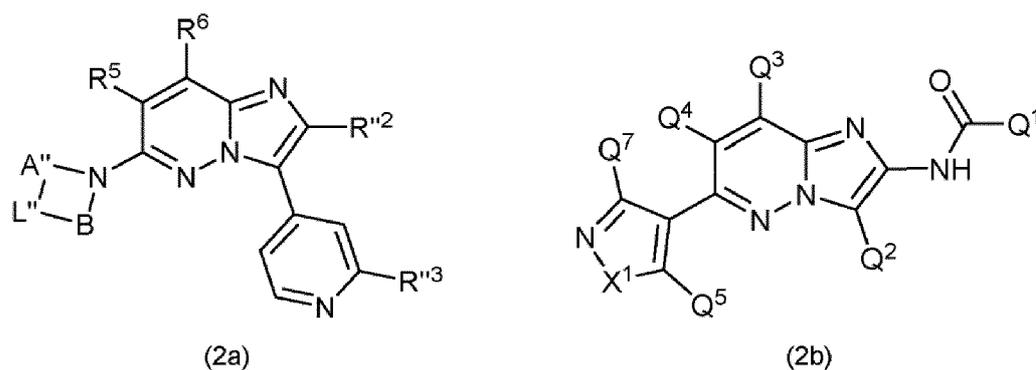
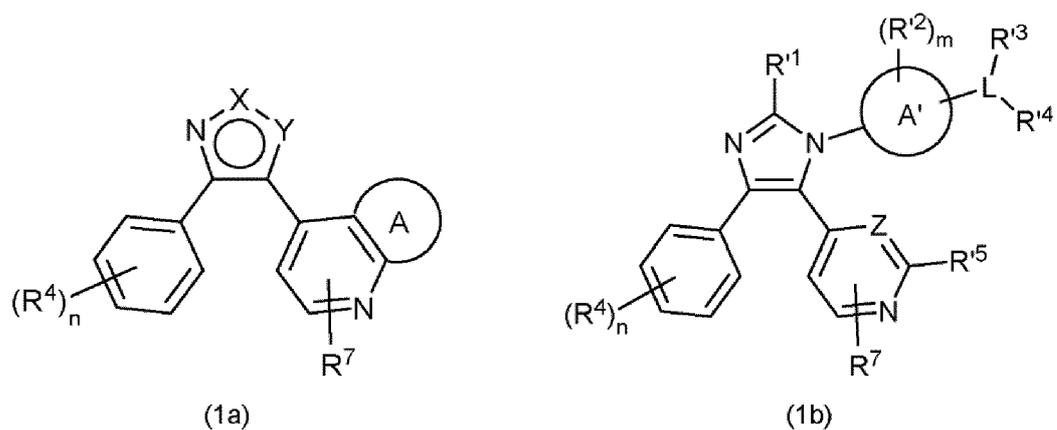
В изобретении предлагается ингибитор казеинкиназы 1 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, у субъекта, где субъект страдает воспалением мышц. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к ингибитору казеинкиназы 1 для применения при лечении FSHD, где субъект страдает воспалением мышц. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к ингибитору казеинкиназы 1 для использования при лечении FSHD, где у субъекта имеется по меньшей мере одна воспаленная мышца, предпочтительно по меньшей мере одна воспаленная скелетная мышца лица, лопатки или плеча. Эта мышца представляет собой предпочтительно STIR+. Известно, что воспаление мышц предшествует жировой инфильтрации. Соответственно, изобретение предоставляет ингибитор казеинкиназы 1 для предотвращения или замедления жировой инфильтрации в мышце субъекта, страдающего FSHD.

В изобретении предложена комбинация по изобретению для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, у субъекта, где субъект страдает мышечным воспалением, как определено здесь. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает комбинацию согласно изобретению для использования при лечении FSHD, где субъект страдает воспалением мышц. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает комбинацию согласно изобретению для использования при лечении FSHD, где у субъекта имеется по меньшей мере одна воспаленная мышца, предпочтительно по меньшей мере одна воспаленная скелетная мышца лица, лопатки или плеча. Эта мышца предпочтительно является STIR+. Известно, что воспаление мышц предшествует жировой инфильтрации. Соответственно, изобретение предоставляет комбинацию согласно изобретению для предотвращения или замедления жировой инфильтрации в мышце субъекта, страдающего FSHD.

При использовании, как описано в этом разделе, комбинация согласно изобретению предпочтительно содержит р38 ингибитор в качестве дополнительного агента. Известно, что такой ингибитор р38 обладает противовоспалительной активностью. Авторы изобретения обнаружили неожиданный синергетический эффект снижения DUX4 и определили ингибиторы СК1 как подходящие для снижения нежелательных побочных эффектов ингибиторов р38 на мышечные клетки.

#### Ингибитор казеинкиназы 1

Ингибиторы казеинкиназы 1 (ингибиторы СК1) известны в данной области техники. Предпочтительные ингибиторы СК1 представляют собой небольшие молекулы. Предпочтительно в контексте данного изобретения ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую структурную формулу (1a), (1b), (2a), (2b), (3a), (3b) или (4):



где X и Y независимо представляют собой =N-, -NR<sup>1</sup>-, CR<sup>1</sup>-, -O-, или -S-, при условии, что по крайней мере один из X и Y представляет собой CR<sup>1</sup>,

кольцо A отсутствует (так что фактически это два H), или представляет собой 4-7-членный циклоалкил, или гетероциклоалкил, или 5-6-членный гетероарил, в котором до 2 атомов углерода заменены гетероатомом, выбранным из =N-, -NR<sup>2</sup>-, -O-, -S- и любой

оставшийся атом углерода могут быть замещены  $R^3$ , если позволяет валентность; предпочтительно кольцо А представляет собой 4-7-членный циклоалкил, или гетероциклоалкил, или 5-6-членный гетероарил, в котором до 2 атомов углерода заменены гетероатомом, выбранным из=N-, -NR<sub>2</sub>-, -O-, -S- и любой оставшийся атом углерода может быть замещен R<sub>3</sub>, если позволяет валентность;

каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1-4</sub> алкил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, -CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>CF<sub>3</sub>, 4-10-членный арил, 4-10-членный гетероарил, 4-10-членный гетероциклоалкил, где указанный арил, гетероарил или гетероциклоалкил может быть замещен одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из галогена, OH, оксо, циано, -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, карбоновой кислоты, которая необязательно этерифицирована метанолом или этанолом, карбоксамидом, нитро, C<sub>1-6</sub>-алкокси, C<sub>1-6</sub> алкил или C<sub>1-6</sub> алкил-O-C<sub>1-6</sub> алкил; предпочтительно, каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1-4</sub> алкил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, -CF<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>CF<sub>3</sub>, 4-10-членный гетероциклоалкил, где указанный гетероциклоалкил может быть замещен двумя независимо выбранными заместителями из галогена, OH, оксо, циано, C<sub>1-6</sub> алкила или C<sub>1-6</sub> алкил-O-C<sub>1-6</sub> алкила; где, когда X представляет собой CR<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> в этом фрагменте CR<sup>1</sup> также может быть -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>CH<sub>3</sub> or -(S=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>CH<sub>3</sub>;

Каждый R<sup>2</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1-6</sub>-алкил, C<sub>4-10</sub>-бициклоалкил, - (CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>CN, -SO<sub>2</sub>- C<sub>1-6</sub> алкил, SO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>C<sub>3-6</sub> циклоалкил, - C<sub>1-6</sub> алкил-O-C<sub>1-6</sub> алкил, - C<sub>1-6</sub> алкил-C(O)O-C<sub>1-6</sub> алкил, -C<sub>3-6</sub> циклоалкил-C(O)O-C<sub>1-6</sub> алкил, -C(O)-(O)<sub>u</sub>-C<sub>1-6</sub> алкил, -C(O)-C<sub>1-6</sub> алкил-O-C<sub>1-6</sub> алкил, -C(O)-(O)<sub>u</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(C<sub>6-10</sub> арил), -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(C<sub>6-10</sub> арил), -C(O)-(O)<sub>u</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(5--10-членный гетероарил), -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>C(O)-NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(5--10-членный гетероарил), -C(O)-(O)<sub>u</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(3-10-членный гетероциклоалкил), -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(4-10-членный гетероциклоалкил), -C(O)-(O)<sub>u</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(3-10-членный циклоалкил) или -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(3-10-членный циклоалкил),

где указанные арил, гетероарил, циклоалкил и гетероциклоалкил в R<sup>2</sup> могут быть замещены максимум двумя заместителями, независимо выбранными из галогена, OH, циано, C<sub>1-6</sub> алкила или C<sub>1-6</sub>алкил-O-C<sub>1-6</sub> алкила,

и где любой алкил, циклоалкил и гетероциклоалкил R<sup>2</sup> может быть дополнительно замещен оксо-, если позволяет валентность;

каждый R<sup>3</sup> независимо отсутствует, C<sub>1-3</sub> алкил, галоген, оксо, -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> или -OR<sup>5</sup>;

каждый R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, -CF<sub>3</sub>, C<sub>1-3</sub> алкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-C<sub>3-4</sub> циклоалкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-C<sub>1-3</sub> алкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-циано или -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-гидрокси, где галоген предпочтительно представляет собой F и предпочтительно в положении *пара*- к пятичленному кольцу, содержащему X и Y, где C<sub>1-3</sub> алкил предпочтительно представляет собой метил и предпочтительно в положении *мета*- к пятичленному кольцу, содержащему X и Y; предпочтительно, каждый R<sup>4</sup> независимо представляет собой галоген, -CF<sub>3</sub>, C<sub>1-3</sub> алкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-C<sub>3-4</sub> циклоалкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-C<sub>1-3</sub> алкил, -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-циано или -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-гидрокси ;

каждый R<sup>5</sup> независимо представляет собой H или C<sub>1-6</sub> алкил;

каждый  $R^6$  независимо представляет собой H или  $C_{1-6}$  алкил;  
или когда соединение имеет общую формулу (2a),  $R^5$  и  $R^6$  могут вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образовывать -S- или -O-;

$R^7$  представляет собой H, галоген или  $C_{1-3}$  алкил, или  $-N\gamma^7\gamma'^7$ ; где, когда  $R^7$  представляет собой  $-N\gamma^7\gamma'^7$ , он предпочтительно является орто-атомом азота в пиридиноподобной части, к которой он присоединен;

n равно 0, 1 или 2; предпочтительно 1;

каждый t независимо равен 0, 1 или 2;

каждый u независимо равен 0 или 1;

каждый  $\gamma^7$  и  $\gamma'^7$  независимо представляет собой H или - (C=O) 0-1 (NH) 0-1 (CH<sub>2</sub>) 0-4 O-1 r<sup>8</sup>; или  $\gamma^7$  и  $\gamma'^7$  вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют циклическую структуру; предпочтительно по крайней мере один из  $\gamma^7$  и  $\gamma'^7$  представляет собой H; предпочтительно циклическая структура, образованная  $\gamma^7$  и  $\gamma'^7$ , является 5-, 6- или 7-членной, более предпочтительно представляет собой пиперазин-1-ил, или 4- ( $R^5$ ) пиперазин-1-ил, или 4-фенилпиперазин-1-ил; где в предпочтительных вариантах осуществления  $\gamma^7$  представляет собой H, а  $\gamma'^7$  представляет собой  $\gamma^8$ ;

$\gamma^8$  представляет собой H,  $C_{1-6}$  алкил, замещенный  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$  ацил, замещенный  $C_{1-6}$  ацил, циклогексил, циклогексил с 1 или 2 замещениями гетероатомов, фенил, замещенный фенил, нафтил, пирролил, замещенный пирролил, индолил, замещенный индолил или  $NR^5R^6$ , где ацильные или алкильные фрагменты в  $\gamma^8$  необязательно являются ненасыщенными, где замещения в  $\gamma^8$  предпочтительно выбраны из списка: галоген, трифторметил, метил, этил, фенил, фторфенил, метоксифенил, диметоксифенил, метокси, этокси, пропилокси и фенокси; предпочтительно  $\gamma^8$  представляет собой метоксифенил, диметоксифенил, этоксифенил, индолил, диметиламин, толуил, хлортолуил, трифторметилфенил, нафтил, 1-метилпиррол-2-ил и 4-диметоксифенил-1-метилпиррол-2-ил; где более предпочтительно  $\gamma^8$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил, такой как бут-2-ил, оксанил, такой как оксан-4-ил, 1-фенилэт-1-ил, ацетил, п-фторфенилацетил, 2-феноксипропионил или 3- (о, р -диметоксифенил) пропеноил, где, когда  $\gamma^8$  представляет собой замещенный пирролил, он предпочтительно представляет собой 1- ( $\gamma^9$ ) -4- ( $\gamma^{10}$ ) -5- ( $\gamma^{11}$ ) -пиррол-2-ил;

$\gamma^9$  представляет собой  $R^5$  или - (CH<sub>2</sub>)<sub>0-2</sub> пирролидинил, замещенный 0, 1, 2 или 3 гидроксигруппами и 0 или 1 остатком  $\gamma^{11}$ , предпочтительно  $\gamma^9$  представляет собой метил или - CH<sub>2</sub>- (3,4-дигидропирролидин-2-ил) или - CH<sub>2</sub>- (3,4-дигидрокси-5- $\gamma^{11}$ -пирролидин-2-ил);

$\gamma^{10}$  представляет собой H или фенил, или метоксилированный фенил, где метоксилированный фенил предпочтительно представляет собой р -метоксифенил или о, р -диметоксифенил;

$\gamma^{11}$  представляет собой H или связан с  $\gamma^{11}$  фрагментом - CH<sub>2</sub>- или - CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>-, предпочтительно фрагментом - CH<sub>2</sub>-;

$\gamma^{11}$  представляет собой H или связан с  $\gamma^{11}$  фрагментом - CH<sub>2</sub>- или - CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>-;

предпочтительно фрагментом -  $\text{CH}_2$ -;

и где

$A'$  представляет собой 4-7-членный циклоалкил, азотсодержащий 4-7-членный гетероциклоалкил, или, альтернативно,  $A'$  может быть непосредственно конденсирован с кольцом, к которому он присоединен через  $R'^1$ ; предпочтительно,  $A'$  представляет собой азотсодержащий 4-7-членный гетероциклоалкил, или, альтернативно,  $A'$  может быть непосредственно конденсирован с кольцом, к которому он присоединен через  $R'^1$ ;

$L$  представляет собой  $C_{1-3}$  алкил;

$R'^1$  представляет собой водород,  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{3-4}$  циклоалкил;

каждый  $R'^2$  независимо представляет собой  $C_{1-3}$  алкил, фтор, гидроксил,  $C_{1-3}$  алкокси или циано;

$R'^3$  представляет собой водород,  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{3-4}$  циклоалкил;

$R'^4$  представляет собой 5-10-членный гетероарил с 1-3 гетероатомами, необязательно замещенный 1-3 заместителями  $R^4$ ;

$R'^5$  представляет собой водород или  $-N(R^8)_2$ ;

$Z$  представляет собой  $N$  или  $-CR^9$ ;

каждый  $R^8$  независимо представляет собой водород или  $C_{1-3}$  алкил;

$R^9$  - водород,  $C_{1-3}$  алкил или галоген;

$m$  равно 0, 1 или 2;

$q$  равно 1, 2 или 3;

и где

$R''^2$  представляет собой арильную группу, необязательно замещенную одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкилокси,  $C_{1-6}$  алкилтио,  $C_{1-6}$  фторалкила,  $C_{1-6}$  фторалкилокси и  $-CN$ ;

$R''^3$  представляет собой  $H$ ,  $C_{1-3}$  алкил,  $-NR''^4R''^5$ , гидроксил или  $C_{1-4}$  алкилокси; или  $R''^3$  вместе с атомом углерода, к которому он присоединен, представляет собой  $N$ ; предпочтительно  $R''^3$  вместе с атомом углерода, к которому он присоединен, представляет собой  $N$ ;

$A''$  представляет собой  $C_{1-7}$ -алкилен, необязательно замещенный одним или двумя  $R^a$ ;

$B$  представляет собой  $C_{1-7}$ -алкилен, необязательно замещенный  $R^b$ ;

$L''$  представляет собой либо  $N$ , замещенный  $R^c$  или  $R^d$ , либо  $C$ , замещенный  $R^{e1}$  и  $R^d$ , или двумя группами  $R^{e2}$ ;

атомы углерода  $A''$  и  $B$  необязательно замещены одной или несколькими группами  $R^f$ , которые могут быть идентичными или отличаться друг от друга;

$R^a$ ,  $R^b$  и  $R^c$  определены так, что:

две группы  $R^a$  могут вместе образовывать  $C_{1-6}$  алкилен;

$R^a$  и  $R^b$  вместе могут образовывать связь или  $C_{1-6}$  алкилен;

$R^a$  и  $R^c$  могут вместе образовывать связь или  $C_{1-6}$  алкилен;

$R^b$  и  $R^c$  могут вместе образовывать связь или  $C_{1-6}$  алкилен;

$R^d$  представляет собой группу, выбранную из H,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{3-7}$ циклоалкила,  $C_{3-7}$ циклоалкил-  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкилтио-  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкилокси-  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  фторалкила, бензила,  $C_{1-6}$  ацила и гидрокси-  $C_{1-6}$  алкил;

$R^{e1}$  представляет собой  $-NR^{''4}R^{''5}$  или циклический моноамин, необязательно содержащий атом кислорода, причем циклический моноамин необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из F,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкилокси и гидроксила;

две группы  $R^{e2}$  образуют с атомом углерода, который их несет, циклический моноамин, необязательно содержащий атом кислорода, причем этот циклический моноамин необязательно замещен одним или несколькими  $R^f$ , которые могут быть идентичными или отличаться друг от друга;

$R^f$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{3-7}$ циклоалкил,  $C_{3-7}$  циклоалкил,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$  алкилокси-  $C_{1-6}$  алкил, гидрокси-  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$ фторалкил или бензил;

$R^{''4}$  и  $R^{''5}$  каждый независимо представляет собой H,  $C_{1-4}$  алкил,  $C_{3-7}$  циклоалкил или  $C_{3-7}$  циклоалкил-  $C_{1-6}$  алкил;

и где

$X^1$  выбран из O и  $NQ^6$ ; при условии, когда  $X^1$  представляет собой  $NQ^6$ ,  $Q^5$  и  $Q^6$  вместе с атомом азота и соседним атомом углерода, к которому они соответственно присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее атомы углерода и от 0 до 3 дополнительных гетероатомов, выбранных из N,  $NQ^8$ , O, S и замещенных 1-5  $Q^{10}$ ;

$Q^1$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, необязательно замещенный галогеном, OH, CN и  $NQ^aQ^a$ , или  $Q^1$  представляет собой -  $(CQ^dQ^d)_r$ -карбоциклл, замещенный 0-5  $Q^{11}$ , и -  $CQ^dQ^d)_r$ -гетероциклл, содержащий атомы углерода и от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из N,  $NQ^9$ , O, S и замещенных 0-5  $Q^{11}$ ;

$Q^2$  выбран из H,  $C_{1-4}$ алкила, галогена, CN, арила и гетероарила;

$Q^3$  выбран из H и  $C_{1-4}$  алкила;

$Q^4$  выбран из H,  $C_{1-4}$  алкилгалогена и CN;

$Q^5$  выбран из H,  $C_{1-4}$ алкила, замещенного 0-4  $Q^e$ ,  $-(CH_2)_r$  -  $C_{3-6}$ карбоциклила, замещенного 0-4  $Q^e$ , и  $-(CH_2)_r$ -гетероциклила, содержащего атомы углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, S и замещенных 0-4  $Q^e$ ;

$Q^7$  представляет собой арил, замещенный 0-3  $Q^e$ ;

$Q^8$  выбран из H,  $C_{1-4}$  алкила, замещенного 0-3  $Q^e$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aC(=O)Q^b$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aC(=O)OQ^b$ ,  $-(CH_2)_rOC(=O)NQ^aQ^a$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aC(=O)NQ^aQ^a$ ,  $-(CH_2)_rC(=O)OQ^b$ ,  $-(CH_2)_rS(O)_2NQ^aQ^a$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aS(O)_2NQ^aQ^a$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aS(O)_2Q^c$ ,  $-(CH_2)_r$ -карбоциклл, замещенный 0-3  $Q^e$  и  $-(CH_2)_r$ -гетероциклл, замещенный 0-3  $Q^e$ ;

$Q^9$  выбран из H,  $-C(=O)Q^b$ ,  $C_{1-6}$  алкила, замещенного 0-5  $Q^e$ ,  $-(CH_2)_r$ - $C_{3-6}$  карбоциклила, замещенного 0-5  $Q^e$ , и  $-(CH_2)_r$ - гетероциклила, замещенного 0-5  $Q^e$ ;

$Q^{10}$  выбран из H,  $C_{1-6}$  алкила, замещенного 0-3  $Q^e$ ,  $-(CH_2)_rNQ^aQ^a$   $-(CH_2)_rC(=O)Q^b$ ,  $-(CH_2)_rC(=O)OQ^b$ ,  $-(CH_2)_rC(=O)NQ^aQ^a$ ,  $-S(O)_pQ^c$ ,  $-(CH_2)C_{3-6}$  карбоциклл, замещенный 0-3  $Q^e$ , и  $-(CH_2)_r$ - гетероциклл, замещенный 0-3  $Q^e$ ;

каждый  $Q^{11}$  независимо выбран из H, галогена, =O, CN, NO<sub>2</sub>, -OQ<sup>b</sup>, -S(O)<sup>p</sup>Q<sup>c</sup>, -C(=O)Q<sup>b</sup>, -(CQ<sup>d</sup>Q<sup>d</sup>)<sub>r</sub>NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -(CQ<sup>d</sup>Q<sup>d</sup>)<sub>r</sub>C(=O)NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -NQ<sup>a</sup>C(=O)Q<sup>b</sup>, -NQ<sup>a</sup>C(=O)OQ<sup>b</sup>, -OC(=O)NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -NQ<sup>a</sup>C(=O)NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -(CQ<sup>d</sup>Q<sup>d</sup>)<sub>r</sub>C(=O)OQ<sup>b</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -NQ<sup>a</sup>S(O)<sub>2</sub>NQ<sup>a</sup>Q<sup>a</sup>, -NQ<sup>a</sup>S(O)<sub>2</sub>Q<sup>c</sup>, C<sub>1-6</sub> алкил, замещенный 0-5 Q<sup>e</sup>, -(CQ<sup>d</sup>Q<sup>d</sup>)<sub>r</sub>-C<sub>3-6</sub> карбоцикллил, замещенный 0-5 Q<sup>e</sup>, и -(CQ<sup>d</sup>Q<sup>d</sup>)<sub>r</sub>-гетероцикллил, замещенный 0-5 Q<sup>e</sup>;

каждый Q<sup>a</sup> независимо выбран из H, CN, C<sub>1-6</sub>алкила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкенила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкинила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>3-10</sub> карбоцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup> и -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-гетероцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>; или два экземпляра Q<sup>a</sup> вместе с атомом азота, к которому они оба присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, замещенное 0-5 Q<sup>e</sup>;

каждый Q<sup>b</sup> независимо выбран из H, C<sub>1-6</sub> алкила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкенила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкинила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>3-10</sub> карбоцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup> и -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-гетероцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>;

каждый Q<sup>c</sup> независимо выбран из C<sub>1-6</sub> алкила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкенила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>2-6</sub> алкинила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, C<sub>3-6</sub> карбоцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>, и гетероцикллила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>;

каждый Q<sup>d</sup> независимо выбран из H и C<sub>1-4</sub>алкила, замещенного 0-5 Q<sup>e</sup>;

каждый Q<sup>e</sup> независимо выбран из C<sub>1-6</sub> алкила, замещенного 0-5 Q<sup>f</sup>, C<sub>2-6</sub> алкенила, C<sub>2-6</sub> алкинила, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-C<sub>3-6</sub> циклоалкила, галогена, CN, NO<sub>2</sub>, =O, CO<sub>2</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>OQ<sup>f</sup>, SQ<sup>f</sup>, и -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NQ<sup>f</sup>Q<sup>f</sup>;

каждый Q<sup>f</sup> независимо выбран из H, F, C<sub>1-5</sub> алкила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила и фенила, или два элемента Q<sup>f</sup> вместе с атомом азота, к которому они оба присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, необязательно замещенное C<sub>1-4</sub> алкилом;

каждый p независимо равен 0, 1 или 2; и

каждый r независимо равен 0, 1, 2, 3 или 4,

и где

X<sup>2</sup> выбран из -NH-, -CH<sub>2</sub>-, -CH(Ph)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(Ph)-, -CH=CH-, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)CH(Ph)- и -CH<sub>2</sub>NHC(O)CH<sub>2</sub>-,

Q'<sup>1</sup> выбран из Q'<sup>6</sup>, галогена, -, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -OQ'<sup>6</sup>, -CO<sub>2</sub>Q'<sup>6</sup>, -SO<sub>2</sub>N(Q'<sup>6</sup>)<sub>2</sub>, и -NO<sub>2</sub>;

Q'<sup>2</sup>, Q'<sup>3</sup>, Q'<sup>4</sup>, и Q'<sup>5</sup> независимо выбраны из H, галогена, C<sub>1-6</sub>алкокси, -NH<sub>2</sub>, -NHQ'<sup>6</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -OCF<sub>3</sub>, и -CO<sub>2</sub>Q'<sup>6</sup>; где

Q'<sup>6</sup> выбран из H и C<sub>1-6</sub>алкила; и если X<sup>2</sup> представляет собой -CH(Ph)-, -CH<sub>2</sub>CH(Ph)- or -CH<sub>2</sub>NHC(O)CH(Ph)-, то Q'<sup>2</sup>, Q'<sup>3</sup>, Q'<sup>4</sup>, и Q'<sup>5</sup> представляют собой H,

e<sup>1</sup> представляет собой S, O или NR<sup>5</sup>, предпочтительно S, O или NH;

каждый из e<sup>2</sup> и e<sup>2</sup> независимо представляет собой H, галоген, C<sub>1-3</sub> алкил, галогенированный C<sub>1-3</sub> алкил, C<sub>1-3</sub> алкокси, S(=O)<sub>0-2</sub>C<sub>1-3</sub> алкил и [C(=O)O]C<sub>1-3</sub> алкил, или e<sup>2</sup> и e<sup>2</sup> вместе образуют 3-6-членную циклическую структуру; предпочтительно по крайней мере один из e<sup>2</sup> и e<sup>2</sup> не является H; более предпочтительно каждый из e<sup>2</sup> и e<sup>2</sup> независимо представляет собой H, трифторметил, S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C(=O)OCH<sub>3</sub>, Cl, F или вместе образуют -O-CF<sub>2</sub>-O-;

$e^3$  представляет собой замещенный фенил, замещенный пиридинил, замещенный тиазолил, замещенный оксазолил или  $-\text{CH}_2\text{-S-2-}((3-(e^4)\text{-4-оксо-3,4,6,7-тетрагидротиено [3,2-d] пиридин-2-ил)}$ ); где замещения в  $e^3$  предпочтительно представляют собой  $-\text{OR}^5$ , галогенированный  $-\text{OR}^5$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}^5$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)\text{R}^5$ , тетразолил,  $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^5$ , or  $-\text{NH-C}(=\text{O})-e^5$ , где фрагмент  $-\text{NH-C}(=\text{O})-e^5$  предпочтительно находится в положении 2 однократно замещенного тиазолила, более предпочтительно, указанный замещенный тиазолил представляет собой тиазол-4-ил;

$e^4$  представляет собой фенил, замещенный фенил, бензил или замещенный бензил, где замещение в  $e^4$  предпочтительно представляет собой  $\text{C}_{1-3}$ алкил,  $\text{C}_{1-3}$ алкокси, галогенированный  $\text{C}_{1-3}$ алкил или галогенированный  $\text{C}_{1-3}$ алкокси, более предпочтительно метокси, трифторметил или трифторметокси; наиболее предпочтительно  $e^4$  представляет собой фенил, бензил, p-метоксибензил, o, m-диметоксибензил, m-трифторметилбензил, p-трифторметилбензил или p-трифторметоксибензил;

$e^5$  представляет собой фенил, замещенный фенил, пиримидил или замещенный пиримидил, фурил или замещенный фурил, где замещение в  $e^5$  предпочтительно представляет собой  $\text{C}_{1-3}$  алкил,  $\text{C}_{1-3}$  алкокси, галогенированный  $\text{C}_{1-3}$  алкил или галогенированный  $\text{C}_{1-3}$  алкокси, более предпочтительно -  $\text{OCF}_3$ ; предпочтительно  $e^5$  представляет собой 2-трифторметоксифенил, пиридин-4-ил или фуран-2-ил, наиболее предпочтительно 2-трифторметоксифенил;

$q^1$  представляет собой H или  $\text{C}_{2-8}$  углеводород, необязательно замещенный 1-5 галогенами, предпочтительно углеводород  $\text{C}_{2-8}$ , необязательно замещенный 1-5 галогенами, где галогены предпочтительно представляют собой фтор, где углеводород  $\text{C}_{2-8}$  предпочтительно представляет собой этил, изопропил, фенил, тиофенил, пиридинил или толуил, где толуил предпочтительно представляет собой o-толуил, где толуил предпочтительно галогенированный, более предпочтительно тригалогенированный по своей метильной части, где фенил предпочтительно галогенирован, более предпочтительно представляет собой m-фторфенил, p-фторфенил, m, p-дифторфенил, o, m-дифторфенил, m, m-дифторфенил, o, p-дифторфенил или 2,5-дифторфенил, где тиофенил предпочтительно представляет собой 3-тиофенил, где пиридинил предпочтительно является галогенированным или метилированным, где галогенированный пиридинил предпочтительно представляет собой 2-фторпиридинил, такой как 2-фторпиридин-4-ил, или 6-хлорпиридинил, такой как 6-хлорпиридин-3-ил; где метилированный пиридинил предпочтительно представляет собой 2-метилпиридинил, такой как 2-метилпиридин-4-ил; наиболее предпочтительно  $q^1$  представляет собой изопропил, m-фторфенил или пиридин-3-ил;

$q^2$  представляет собой H,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{Nq}^3$ , или  $\text{Nq}^3\text{q}^4$ ; более предпочтительно  $q^2$  представляет собой H, N-морфолинил, 4-метил-1-пиперазинил или 1-пиперазинил, наиболее предпочтительно H или N-морфолинил;

$q^3$  представляет собой  $-(\text{CH}_2)_r\text{-OH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_r\text{-H}$ , or  $-(\text{CH}_2)_r\text{-Nq}^3\text{q}^4$ ; предпочтительно  $q^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Nq}^3\text{q}^4$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Nq}^3\text{q}^4$ ,

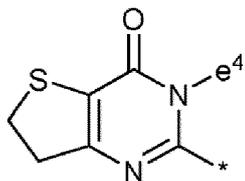
или  $-\text{CH}_2\text{Nq}^3\text{q}^4$ ; где  $q^3$  и  $q^4$  вместе образуют 5-7-членный циклический углеводород, предпочтительно 6-членный циклический углеводород, где циклический углеводород необязательно замещен одним или несколькими метокси, гидроксиметилом, амина, метиламино, диметиламино или оксогруппами, где циклический углеводород может содержать гетероатомы в своем кольце в дополнение к азоту  $q^2$ , предпочтительно O или S; предпочтительно, когда  $q^4$  и  $q^3$  вместе образуют циклический углеводород,  $q^4$  и  $q^3$  представляют собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{SO}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{SO})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{NHCH}_3])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{NH}_2])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{N}(\text{CH}_3)_2])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{NCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{CH}_2\text{OH}])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{COCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

или когда присутствует  $q^4$ ,  $q^3$  вместе с  $q^4$  образуют 5-7-членный циклический углеводород, предпочтительно 6-членный циклический углеводород, где циклический углеводород необязательно замещен одним или несколькими метокси, гидроксиметилом, амина, метиламино, диметиламино или оксо. фрагменты, в которых циклический углеводород может содержать гетероатомы в своем кольце в дополнение к азоту  $q^2$ , предпочтительно O или S; предпочтительно, когда  $q^4$  и  $q^3$  вместе образуют циклический углеводород,  $q^4$  и  $q^3$  представляют собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{SO}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{SO})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{NHCH}_3])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{NH}_2])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{N}(\text{CH}_3)_2])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{NCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}[\text{CH}_2\text{OH}])\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , или  $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{COCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ;

$c^1$  и  $c^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенную 5-10-членную циклическую структуру, в которой необязательное замещение предпочтительно представляет собой метил, трифторметил, галоген, фенил, 1-пиперазинил, 4-метил-1-пиперазинил. или метокси, более предпочтительно трифторметил, галоген или метокси, где 5-10-членная циклическая структура предпочтительно представляет собой фенил, пиридинил, такой как пиридин-2-ил, или пиридин-3-ил, индолил, такой как индол-2-ил, бензимидазолил, такой как бензимидазол-2-ил, бензотиазолил, такой как бензотиазол-2-ил, бензоксазолил, такой как бензоксазол-2-ил, инденил, такой как инден-2-ил, имидазолил, такой как имидазол-2-ил, тиазолил, такой как тиазолил, 2-ил или оксазолил, такой как оксазол-2-ил; более предпочтительно 5-10-членная циклическая структура представляет собой фенил, трифторметилфен-3-ил, фторфен-2-ил, бензимидазол-2-ил, 5-хлорбензимидазол-2-ил, 5,6-дихлорбензимидазол-2-ил, 5-фторбензимидазол-2-ил, 5,6-дифторбензимидазол-2-ил, 5-метоксибензимидазол-2-ил, 5,6-диметоксибензимидазол-2-ил, пиридин-2-ил, пиридин-3-ил, 6-метилпиридин-2-ил, 5-метилпиридин-2-ил, имидазол-2-ил, оксазол-2-ил, тиазол-2-ил, 4-фенилимидазол-2-ил, 4-фенилоксазол-2-ил, 4-фенилтиазол-2-ил, 4,5-дифторбензимидазол-2-ил, 4,5-дихлорбензимидазол-2-ил, 4,5-диметоксибензимидазол-2-ил, 1- (1-метилпиперазин-4-ил) фен-4-ил, 3- (1-метилпиперазин-4-ил) пиридин-6-ил, бензотиазол-2-ил или бензоксазол-2-ил; наиболее предпочтительно 5-10-членная

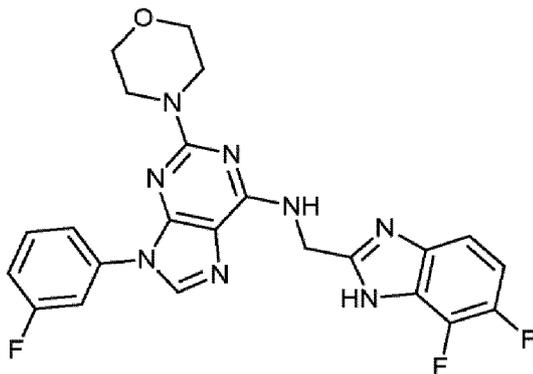
циклическая структура представляет собой фенил, *m*-трифторметилфенил или 4,5-дифторбензимидазол-2-ил;

или их изомеры или фармацевтически приемлемые соли.

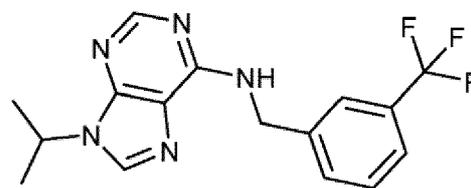


2 - ((3- (e<sup>4</sup>) -4-оксо-3,4,6,7-тетрагидротиено [3,2-d] пириимидин-2-ил)

Ингибитор СК1 может быть представлен SR-3029.



SR-3029



Лонгдайсин

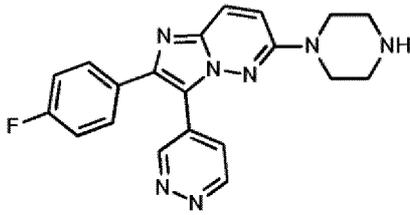
В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (Ia) или (Ib) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где X, Y, A, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, n, t, u, A', L, R'<sup>1</sup>, R'<sup>2</sup>, R'<sup>3</sup>, R'<sup>4</sup>, R'<sup>5</sup>, Z, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, m и q и другие переменные определены выше. В следующем предпочтительном варианте осуществления он имеет общую формулу (Ia) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где X, Y, A, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, n, t, u, A', L, R'<sup>1</sup>, R'<sup>2</sup>, R'<sup>3</sup>, R'<sup>4</sup>, R'<sup>5</sup>, Z, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, m и q и другие переменные определены выше. В другом предпочтительном варианте осуществления он имеет общую формулу (Ib) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где X, Y, A, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, n, t, u, A', L, R'<sup>1</sup>, R'<sup>2</sup>, R'<sup>3</sup>, R'<sup>4</sup>, R'<sup>5</sup>, Z, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, m и q и другие переменные определены выше. Ингибиторы СК1 этого класса сами по себе известны в данной области, их структура и синтез более подробно описаны, например, в WO2011051858, WO2012085721 и WO2015119579 или в Halekotte et al., *Molecules* 2017, DOI: 10.3390/Molecules22040522, или в Luxenburger et al., *Molecules* 2019, DOI: 10.3390/modules24050873, или в Peifer et al., *J. Med. Chem.* 2009, 52, 7618-7630 DOI: 10.1021/jm9005127.

Предпочтительно, когда R<sup>7</sup> представляет собой - Nr<sup>7</sup>r<sup>7</sup>, Y представляет собой NH, X представляет собой C(S-CH<sub>3</sub>) or C([S=O]-CH<sub>3</sub>), R<sup>4</sup> представляет собой F и *para*, n равно 1, A отсутствует и один из r<sup>7</sup> и r<sup>7</sup> представляет собой H. Также предпочтительно, когда R<sup>7</sup> представляет собой - Nr<sup>7</sup>r<sup>7</sup>, X представляет собой -O-, Y представляет собой C (изопропил), R<sup>4</sup> представляет собой F и *para*, n равно 1, A отсутствует и один из r<sup>7</sup> и r<sup>7</sup> представляет собой H.

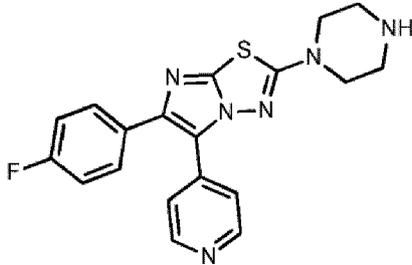
Ингибиторы СК1 этого класса содержат азольное ядро. В предпочтительных вариантах осуществления этого аспекта ингибитор казеинкиназы 1 относится к классу, содержащему азольное ядро. Более предпочтительно, эти ингибиторы СК1 для использования содержат 4-арил-5-гетероарил-1-гетероциклоалкилимидазольный фрагмент. Предпочтительно, для этих ингибиторов присутствует единственный  $R^4$  пара к азольному ядру; более предпочтительно этот  $R^4$  представляет собой F. Соответственно, в других более предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает азольное ядро, связанное с 4-галогенфенильным фрагментом, предпочтительно 4-фторфенильным фрагментом. Наиболее предпочтительными соединениями, содержащими азольное ядро, являются соединения D, E, F и G, как показано в Таблице 3; соединение D даже более предпочтительно. Другими предпочтительными соединениями в этом классе являются соединения, показанные в Таблице 1 у Halekotte et al., соединения, показанные в Таблице 1 у Luxenburger et al., соединения, показанные в Таблице 3 у Luxenburger et al., Соединения, показанные в Таблице 3 у Peifer et al., и соединения в Таблице 4 у Peifer et al.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (2a) или (2b) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^{''2}$ ,  $R^{''3}$ ,  $A''$ ,  $B$ ,  $L''$ ,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^{e1}$ ,  $R^{e2}$ ,  $R^f$ ,  $R^{''4}$ ,  $R^{''5}$ ,  $X^1$ ,  $Q^1$ ,  $Q^2$ ,  $Q^3$ ,  $Q^4$ ,  $Q^5$ ,  $Q^6$ ,  $Q^7$ ,  $Q^8$ ,  $Q^9$ ,  $Q^{10}$ ,  $Q^{11}$ ,  $Q^a$ ,  $Q^b$ ,  $Q^c$ ,  $Q^d$ ,  $Q^e$ ,  $Q^f$ ,  $g$  и  $r$  имеют значения, указанные выше. В другом предпочтительном варианте осуществления он имеет общую формулу (2a) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^{''2}$ ,  $R^{''3}$ ,  $A''$ ,  $B$ ,  $L''$ ,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^{e1}$ ,  $R^{e2}$ ,  $R^f$ ,  $R^{''4}$ ,  $R^{''5}$ ,  $X^1$ ,  $Q^1$ ,  $Q^2$ ,  $Q^3$ ,  $Q^4$ ,  $Q^5$ ,  $Q^6$ ,  $Q^7$ ,  $Q^8$ ,  $Q^9$ ,  $Q^{10}$ ,  $Q^{11}$ ,  $Q^a$ ,  $Q^b$ ,  $Q^c$ ,  $Q^d$ ,  $Q^e$ ,  $Q^f$ ,  $r$  и  $g$  определены выше. В следующем предпочтительном варианте осуществления он имеет общую формулу (2b) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^{''2}$ ,  $R^{''3}$ ,  $A''$ ,  $B$ ,  $L''$ ,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^{e1}$ ,  $R^{e2}$ ,  $R^f$ ,  $R^{''4}$ ,  $R^{''5}$ ,  $X^1$ ,  $Q^1$ ,  $Q^2$ ,  $Q^3$ ,  $Q^4$ ,  $Q^5$ ,  $Q^6$ ,  $Q^7$ ,  $Q^8$ ,  $Q^9$ ,  $Q^{10}$ ,  $Q^{11}$ ,  $Q^a$ ,  $Q^b$ ,  $Q^c$ ,  $Q^d$ ,  $Q^e$ ,  $Q^f$ ,  $r$ , и  $g$  определены выше. Ингибиторы СК1 этого класса сами по себе известны в данной области, их структура и синтез более подробно описаны, например, в WO2009016286 и WO2015195880, а также в WO2009037394 и WO2010/130934.

Ингибиторы СК1 этого класса содержат имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро. В предпочтительных вариантах осуществления этого аспекта ингибитор казеинкиназы 1 относится к классу, включающему имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро. Ингибиторы СК1 с имидазо [1,2-b] пиридазиновым ядром более предпочтительно имеют 3- (пирид-4-ил) имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро, даже более предпочтительно 6-цикло-3- (пирид -4-ил) имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает азольное ядро или имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро. Ингибиторы СК1 общей формулы (2a), где  $R^{''3}$  вместе с атомом углерода, к которому он присоединен, представляют собой известные формы N, известны из WO2009037394. Предпочтительным таким соединением, в котором эти атомы образуют N, является следующее:



Следующее соединение,



представляет собой предпочтительное соединение, в котором соединение имеет общую формулу (2a) и R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют -S-; такие соединения известны из WO2010/130934.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (2a) или (2b), где X, Y, A, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, n, t, u, A', L, R'<sup>1</sup>, R'<sup>2</sup>, R'<sup>3</sup>, R'<sup>4</sup>, R'<sup>5</sup>, Z, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, m, q, R''<sup>2</sup>, R''<sup>3</sup>, A'', B, L'', R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup>, R<sup>e1</sup>, R<sup>e2</sup>, R<sup>f</sup>, R''<sup>4</sup>, R''<sup>5</sup>, X<sup>1</sup>, Q<sup>1</sup>, Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup>, Q<sup>4</sup>, Q<sup>5</sup>, Q<sup>6</sup>, Q<sup>7</sup>, Q<sup>8</sup>, Q<sup>9</sup>, Q<sup>10</sup>, Q<sup>11</sup>, Q<sup>a</sup>, Q<sup>b</sup>, Q<sup>c</sup>, Q<sup>d</sup>, Q<sup>e</sup>, Q<sup>f</sup>, r и p имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (2a), (2b), (3a) или (3b), где переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (2a), (2b), (3a), (3b) или (4), где переменные определены выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (3a) или (3b), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (3a), (3b) или (4), где переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (2a), (2b), (3a) или (3b), где переменные определены выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (2a), (2b), (3a), (3b) или (4), где переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (2a), (2b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (3a), (3b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (2a), (2b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (3a), (3b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (2a), (2b) или (4), в которой переменные имеют значения, указанные выше.

ингибитор казеинкиназы 1 имеет общую формулу (1a), (1b), (2a), (2b) или (4), где переменные имеют значения, указанные выше.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (3a) или (3b) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где  $X^2$ ,  $Q'^1$ ,  $Q'^2$ ,  $Q'^3$ ,  $Q'^4$ ,  $Q'^5$ , и  $Q'^6$  и другие переменные определены выше. Ингибиторы СК1 этого класса сами по себе известны в данной области, их структура и синтез более подробно описаны, например, в EP2949651, Bischof et al., *Amino Acids* (2012) 43:1577-1591 DOI: 10.1007/s00726-012-1234-x, García-Reyes et al., *J. Med. Chem.* 2018, 61, 4087–4102, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00095, и Richter et al., *J. Med. Chem.*, DOI: 10.1021/jm500600b. Когда ингибитор СК1 имеет общую формулу (3a),  $X^2$  предпочтительно представляет собой  $-CH_2-$ ,  $-CH_2CH_2-$ ,  $-CH(Ph)-$ , или  $-NH-$ , наиболее предпочтительно  $-CH_2-$ ;  $Q'^1$  предпочтительно представляет собой  $-CF_3$ , галоген или  $C_{1-6}$  алкил, более предпочтительно  $-CF_3$ ;  $Q'^2$ ,  $Q'^3$ ,  $Q'^4$ , и  $Q'^5$  предпочтительно независимо выбраны из H, галогена и  $C_{1-5}$ алкокси. Более предпочтительно, когда ингибитор СК1 имеет общую формулу (3a),  $X^2$  представляет собой  $-CH_2-$ , а  $Q'^1$  представляет собой  $-CF_3$ .

В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (3a). В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (3b). Предпочтительными ингибиторами СК1 общей формулы (3b) являются соединения 17-23 на Схеме 1 у García-Reyes et al., соединения в таблице 1 у Bischof et al. И соединения в таблице 1 у Richter et al. Особенно предпочтительными ингибиторами СК1 общей формулы (3b) являются соединения 17-23 на схеме 1 García-Reyes et al. Особенно предпочтительными ингибиторами СК1 общей формулы (3b) являются соединения, указанные в таблице 1 у Bischof et al. Особенно предпочтительными ингибиторами СК1 общей формулы (3b) являются соединения в таблице 1 Richter et al.

Ингибиторы СК1 этого класса содержат 3-гетероиндольное ядро. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 относится к классу, включающему 3-гетероиндольное ядро ядра. Ингибиторы СК1 с 3-гетероиндольным ядром, более предпочтительно, имеют бензимидазольное ядро, бензотиазольное ядро или бензоксазольное ядро. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 содержит азольное ядро или включает имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро или включает 3-гетероиндольное ядро.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (4) или его изомеры или фармацевтически приемлемые соли, где  $q^1$ ,  $q^1$ ,  $q^3$ ,  $q^4$ ,  $q^3$ ,  $q^4$ ,  $s^1$ , и  $s^2$  определены выше. Ингибиторы СК1 этого класса сами по себе известны в данной области, их структура и синтез более подробно описаны, например, в Hirota et al., *PLoS Biol* 8 (12): e1000559. doi: 10.1371/journal.pbio.1000559 - и в Monastyrskiy et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2018 590-602 <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.020>. Когда ингибитор СК1 имеет общую формулу (4), он предпочтительно представляет собой SR-3029 или лонгдейзин, более предпочтительно лонгдейзин. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 общей формулы (4) не является SR-3029.

Ингибиторы СК1 этого класса содержат 6-аминопуриновое ядро. В предпочтительных вариантах осуществления этого аспекта ингибитор казеинкиназы 1 относится к классу, включающему ядро 6-аминопурина. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает азольное ядро или включает имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро или включает ядро 6-аминопурина. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает азольное ядро или 6-аминопуриновое ядро. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает ядро имидазо [1,2-b] пиридазина или ядро 6-аминопурина. В других предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 включает азольное ядро или включает имидазо [1,2-b] пиридазиновое ядро, или включает 6-аминопуриновое ядро, или включает 3-гетероиндольное ядро.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет общую формулу (1a), (2a), (3b) или (4), где

X представляет собой  $CR^1$ , а  $R^1$  в этом фрагменте  $CR^1$  представляет собой  $-S-(CH_2)_{0-3}CH_3$  или  $-(S=O)-(CH_2)_{0-3}CH_3$ , или где  $R^{3,3}$  вместе с атомом углерода, к которому он присоединен, представляет собой N, или где

если соединение имеет общую формулу (2a), то  $R^5$  и  $R^6$  могут вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образовывать  $-S-$  или  $-O-$ , предпочтительно  $-S-$ , или где

$R^7$  представляет собой  $-N^7r^7$ , или где

X или Y равно  $-O-$ ,

и где другие переменные такие, как описано выше.

Структуры типичных ингибиторов СК1 показаны в Таблице 3. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления ингибитор казеинкиназы 1 выбран из группы, состоящей из соединений A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, SR-3029, PF-670462 и PF-5006739. Соединение O также известно как TA-01. Более предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 выбран из группы, состоящей из соединений A, B, C, D, E, F, G, H, O, SR-3029, PF-670462 и PF-5006739. Еще более предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 выбран из группы, состоящей из соединений A, D, F, G, H, O, SR-3029, PF-670462 и PF-5006739. Еще более предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 выбран из группы, состоящей из соединений A, D, F, G, H, SR-3029, PF-670462 и PF-5006739. Наиболее предпочтительно ингибитор казеинкиназы 1 выбран из группы, состоящей из соединений A, D, F, G, H, SR-3029 и PF 5006739. Также весьма предпочтительно, чтобы ингибитором казеинкиназы 1 было соединение D. Также весьма предпочтительно, чтобы ингибитор казеинкиназы 1 был выбран из группы, состоящей из соединений A, B и H, более предпочтительно был представлен соединением H.

В других вариантах осуществления ингибитор СК1 представляет собой ингибирующее антитело, антисмысловый олигонуклеотид или олигонуклеотид, который предотвращает экспрессию СК1.

Известно, что различные изоформы казеинкиназы 1 выполняют разные функции. В

наборе известных изоформ СК1 $\delta$  и СК1 $\epsilon$  являются предпочтительными мишенями для ингибиторов СК1 согласно изобретению. Известно, что эти две изоформы тесно связаны друг с другом. Например, считалось, что СК1 $\delta$  и СК1 $\epsilon$  обычно избыточны по длине циркадного цикла и стабильности белка, но позже было обнаружено, что они имеют несколько разные функции (Etchegaray JP et al., 2009, DOI: 10.1128/MCB.00338-09). Из-за их физиологической важности и известной эффективности ингибиторов СК1 в предпочтительных вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы ингибирует по меньшей мере кazeинкиназу 1 $\delta$  или кazeинкиназу 1 $\epsilon$ . Необязательно, ингибитор кazeинкиназы специфичен для кazeинкиназы 1 $\delta$  или для кazeинкиназы 1 $\epsilon$ . Кроме того, в более предпочтительных вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы по меньшей мере ингибирует и, необязательно, является специфическим для кazeинкиназы 1 $\delta$ . В других более предпочтительных вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы по меньшей мере ингибирует и необязательно является специфическим для кazeинкиназы 1 $\epsilon$ . В других вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы по меньшей мере ингибирует и необязательно является специфическим в отношении кazeинкиназы 1 $\alpha$ . В других вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы по меньшей мере ингибирует и необязательно является специфическим в отношении кazeинкиназы 1 $\beta$ . В других вариантах осуществления ингибитор кazeинкиназы по меньшей мере ингибирует и необязательно специфичен для кazeинкиназы 1 $\gamma$ 1, 1 $\gamma$ 2, и/или 1 $\gamma$ 3. В этом контексте следует понимать, что ингибитор СК1 специфичен для конкретной изоформы, когда он, по крайней мере, частично ингибирует эту конкретную изоформу. Предпочтительно, он ингибирует эту конкретную изоформу более эффективно, чем другие изоформы.

Ингибиторы СК1, подходящие для использования в изобретении, предпочтительно имеют IC<sub>50</sub> кazeинкиназы не более 650 нМ, предпочтительно не более 500 нМ, более предпочтительно не более 400 нМ, даже более предпочтительно не более 300 нМ, еще более предпочтительно не более 250 нМ, еще более предпочтительно не более 200 нМ, наиболее предпочтительно не более 100 нМ. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет IC<sub>50</sub> по меньшей мере для кazeинкиназы 1 $\delta$  или кazeинкиназы 1 $\epsilon$  не более 450 нМ, более предпочтительно не более 400 нМ, даже более предпочтительно не более 350 нМ, более предпочтительно не более максимум 200 нМ, еще более предпочтительно максимум 100 нМ, наиболее предпочтительно максимум 50 нМ. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 имеет IC<sub>50</sub> кazeинкиназы 1 $\delta$  не более 350 нМ, предпочтительно не более 100 нМ, более предпочтительно не более 35 нМ, наиболее предпочтительно не более 25 нМ. Значения IC<sub>50</sub> для СК1 могут быть определены с использованием любого метода, известного в данной области, например, как описано в WO2011051858, WO2015119579, EP2949651 или US2005/0131012. Подходящие анализы могут использовать пептидный субстрат и метод считывания, например, с использованием анализа Kinase-Glo (Promega, часть # V672A).

#### Ингибиторы p38

Ингибиторы митоген-активируемых протеинкиназ p38, называемые здесь

ингибиторами p38, обычно известны в данной области. Предпочтительные p38 представляет собой малые молекулы. В контексте изобретения примеры предпочтительных ингибиторов p38 упомянуты здесь.

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 ингибирует p38- $\alpha$ . В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 ингибирует p38- $\beta$ . В более предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 ингибирует p38- $\alpha$  и p38- $\beta$ . В особенно предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 не ингибирует p38- $\gamma$ , или существенно не ингибирует p38- $\gamma$ , или ингибирует p38- $\gamma$  не более чем на 50%, предпочтительно не более чем на 20%, наиболее предпочтительно не более чем на 10%.

Известны и доступны различные ингибиторы p38, некоторые из которых находятся в стадии клинической разработки. Любой из них может быть использован. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 выбран из группы, состоящей из ARRY-797, VX-745, VX-702, RO-4402257, SCIO- 469, BIRB-796, SD-0006, PH-797804, AMG-548, LY2228820, SB-681323 и GW-856553 (лосмапимод). В других предпочтительных вариантах осуществления ингибиторы p38 выбраны из группы, включающей N- (4- (2-этил-4- (м-толил) тиазол-5-ил) пиридин-2-ил) бензамид; 2- (2,4-дифторфенил) -6- (1- (2,6-дифторфенил) уреидо) никотинамид; 6- (2,4-дифторфенокси) -8-метил-2 - ((тетрагидро-2H-пиран-4-ил) амино) пиридо [2,3-d] пиримидин-7 (8H) -он; 6- (2,4-дифторфенокси) -2 - ((1,5-дигидроксипентан-3-ил) амино) -8-метилпиридо [2,3-d] пиримидин-7 (8H) -он; (R) -6- (2- (4-фторфенил) -6- (гидроксиметил) -4,5,6,7-тетрагидропиразоло [1,5-a] пиримидин-3-ил) -2- (о-толил) ) пиридазин-3 (2H) -он; 6- (5- (циклопропилкарбамоил) -3-фтор-2-метилфенил) -N-неопентилникотинамид; 5- (2- (трет-бутил) -4- (4-фторфенил) -1H-имидазол-5-ил) -3-неопентил-3H-имидазо [4,5-b] пиридин-2-амин; 2- (6-хлор-5 - ((2R, 5S) -4- (4-фторбензил) -2,5-диметилпиперазин-1-карбонил) -1-метил-1H-индол-3-ил) -N, N-диметил-2-оксоацетамид; 1- (3- (трет-бутил) -1- (п-толил) -1H-пиразол-5-ил) -3- (4- (2-морфолиноэтокси) нафталин-1-ил) мочевины; 4 - ((5- (циклопропилкарбамоил) -2-метилфенил) амино) -5-метил-N-пропилпирроло [2,1-f] [1,2,4] триазин-6-карбоксамид; 3- (3-бром-4 - ((2,4-дифторбензил) окси) -6-метил-2-оксопиридин-1 (2H) -ил) -N, 4-диметилбензамид; 1- (3- (трет-бутил) -1- (п-толил) -1H-пиразол-5-ил) -3- (5-фтор-2 - ((1- (2-гидроксиэтил) -1H-индазол -5-ил) окси) бензил) мочевины; 8- (2,6-дифторфенил) -2 - ((1,3-дигидроксипропан-2-ил) амино) -4- (4-фтор-2-метилфенил) пиридо [2,3-d] пиримидин-7 (8H) -он; 5- (2,6-дихлорфенил) -2 - ((2,4-дифторфенил) тио) -6H-пиримидо [1,6-b] пиридазин-6-он; (5- (2,4-дифторфенокси) -1-изобутил-1H-индазол-6-ил) ((2- (диметиламино) этил) -12-азанил) метанон; и (R) -2 - ((2,4-дифторфенил) амино) -7- (2,3-дигидроксипропоксид) -10,11-дигидро-5H-добензо [a, d] [7] аннулен-5-он .

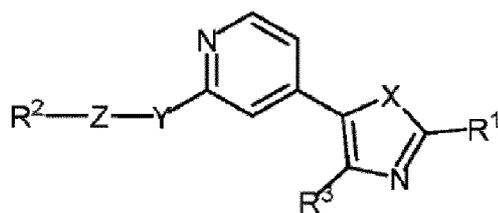
Примерами подходящих ингибиторов p38 являются ARRY-797 (CHEMBL1088750, CAS: 1036404-17-7), LOSMAPIMOD (CHEMBL1088752, CAS: 585543-15-3), AZD-7624 (CHEMBL9960, CAS: 1095004-78-6), DORAMAPIMOD (CHEMBL103667), NEFLAMAPIMOD (CHEMBL119385, CAS: 209410-46-8), TAK-715 (CHEMBL363648, CAS: 303162-79-0), TALMAPIMOD (CHEMBL514201, CAS: 309913-83-5), PAMAPIMOD

(CHEMBL1090089, CAS: 449811-01-2), VX-702 (CHEMBL1090090, CAS: 745833-23-2), PH-797804 (CHEMBL1088751, CAS: 586379-66-0), BMS-582949 (CHEMBL1230065, CAS: 623152-17-0), PF-03715455 (CHEMBL1938400, CAS: 1056164-52-3), DILMAPIMOD (CHEMBL2103838, CAS: 444606-18-2), SEMAPIMOD (CHEMBL2107779, CAS: 352513-83-8), RALIMETINIB (CHEMBL2364626, CAS: 862505-00-8), FX-005 (CHEMBL3545216, CAS: 2016822-86-7), ACUMAPIMOD (CHEMBL3545226, CAS: 836683-15-9), KC-706 (CHEMBL3545282, CAS: 896462-15-0), PG-760564 (CHEMBL3545398), RWJ-67657 (CHEMBL190333, CAS: 215303-72-3), RO-3201195 (CHEMBL203567, CAS: 249937-52-8), AMG-548 (CHEMBL585902, CAS: 864249-60-5), SD-0006 (CHEMBL1090173), SCIO-323 (CHEMBL1614702, CAS: 309913-51-7), R-1487 (CHEMBL1766582, CAS: 449808-64-4), AZD-6703 (CHEMBL2031465, CAS: 1083381-65-0), SC-80036 (CHEMBL3544930), GSK-610677 (CHEMBL3544968, CAS: 2016840-17-6), LY-3007113 (CHEMBL3544998), LEO-15520 (CHEMBL3545074), AVE-9940 (CHEMBL3545117, CAS: 1201685-00-8), PS-516895 (CHEMBL3545139), TA-5493 (CHEMBL3545201, CAS: 1073666-93-9), PEXMETINIB (ARRY614) (CHEMBL3545297, CAS: 945614-12-0), и SB-85635 (CHEMBL3545384).

В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 выбран из одной или нескольких формул pI, pII, pIII, pIV, pV, pVI, pVII, pVIII, pIX, pX, pXI, pXII и pXIII (соответствующих видов, описанных ниже), или стереоизомера, , обогащенного изотопами соединения, пролекарства, сольвата или фармацевтически приемлемой соли такового.

Соединения рода pI можно получить в соответствии с описанием US 7 276 527. Род pI характеризуется необязательно N-окисленными соединениями формулы (pI) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями таковых.

Формула pI:



в которой:

$R^1$  выбран из (i), (ii), (iii) или (iv): (i) водород, (ii) группа, выбранная из  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила,  $C_{6-14}$  арила и  $C_{7-16}$  аралкильной группы; где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил или аралкил необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей A, (iii)  $-(C=O)-R^5$   $-(C=O)-OR^5$   $-(C=O)-NR^5R^6$   $-(C=S)-NHR^5$ , или  $-SO_2-R^7$ , где:

$R^5$  представляет собой водород,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил,  $C_{6-14}$  арил или  $C_{7-16}$  аралкил. где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил или аралкил необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей A,

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

$R^7$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил,  $C_{6-14}$  арил или  $C_{7-16}$  аралкил. где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил или аралкил необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А

(iv) аминогруппа, необязательно замещенная выбранными заместителями из (a), (b) или (c): (a)  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил,  $C_{6-14}$  арил или  $C_{7-16}$  аралкил, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил или аралкил необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А; (b)  $-(C=O)-R^5$   $-(C=O)-OR^5$   $-(C=O)-NR^5R^6$   $-(C=S)-NHR^5$ , или  $-SO_2-R^7$ , и (c)  $C_{1-6}$  алкилиден, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А;

$R^2$  представляет собой  $C_{6-14}$  моноциклический или конденсированный полициклический арил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А;

$R^3$  представляет собой водород или  $C_{6-14}$  арил, где арил необязательно замещен еще одним заместителем, выбранным из группы заместителей А;

X представляет собой  $-S-$ , S (O) - или  $S(O)_2-$ ;

Y представляет собой связь,  $-O-$ ,  $-S-$  S (O) -, S (O) 2- или  $NR^e$ ,

где  $R^4$  представляет собой:

(a) водород; (b)  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил,  $C_{6-14}$  арил или  $C_{7-16}$  аралкил. где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил или аралкил необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А; (c)  $-(C=O)-R^5$   $-(C=O)-OR^5$   $-(C=O)-NR^5R^6$   $-(C=S)-NHR^5$ , or  $-SO_2-R^7$

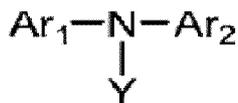
Z представляет собой связь,  $C_{1-15}$  алкилен,  $C_{2-16}$  алкенилен или  $C_{2-16}$  алкинилен; где алкилен, алкенилен или алкинилен необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из группы заместителей А;

и заместитель в группе заместителей А выбран из оксо, галогена,  $C_{1-3}$  алкилендиокси, нитро, циано, необязательно галогенированного  $C_{1-3}$  алкила, необязательно галогенированного  $C_{2-6}$  алкенила, карбокси  $C_{2-6}$  алкенила, необязательно галогенированного  $C_{2-6}$  алкинила, необязательно галогенированного  $C_{3-6}$  циклоалкила,  $C_{6-14}$  арила, необязательно галогенированного  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{1-6}$  алкоксикарбонил-  $C_{1-6}$  алкокси, гидрокси,  $C_{6-14}$  арилокси,  $C_{7-16}$  аралкилокси, меркапто, необязательно галогенированного  $C_{1-3}$  алкилтио,  $C_{6-14}$  арилтио,  $C_{7-16}$  аралкилтио, амино, моно-  $C_{1-3}$  алкиламино, моно- $C_{6-14}$  ариламино, ди-  $C_{1-3}$  алкиламино, ди- $C_{6-14}$  ариламино, формила, карбокси,  $C_{1-3}$  алкил- карбонила,  $C_{3-6}$  циклоалкилкарбонила,  $C_{1-3}$  алкоксикарбонила,  $C_{7-14}$  арилкарбонила,  $C_{7-16}$  аралкилкарбонила,  $C_{6-14}$  арилоксикарбонила,  $C_{7-16}$  аралкилоксикарбонила, карбамоила, тиокарбамоила, моно-  $C_{1-3}$  алкилкарбамоила, ди-  $C_{1-3}$  алкилкарбамоила,  $C_{6-14}$  арилкарбамоила,  $C_{1-3}$  алкилсульфонила,  $C_{6-14}$  арилсульфонила,  $C_{1-3}$  алкилсульфинила,  $C_{6-14}$  арилсульфинила, формиламино,  $C_{1-3}$  алкилкарбониламино,  $C_{6-14}$

арилкарбониламино, C<sub>1-3</sub> алкоксикарбониламино, C<sub>1-3</sub> алкилсульфониламино, C<sub>6-14</sub> арилсульфониламино, C<sub>1-3</sub> алкилкарбонилокси, C<sub>6-14</sub> арилкарбонилокси, C<sub>1-6</sub> алкоксикарбонилокси, моно- C<sub>1-3</sub> алкилкарбамоилокси, ди- C<sub>1-3</sub> алкилкарбамоилокси, C<sub>6-14</sub> арилкарбамоилокси, сульфо, сульфоамила, сульфинамоила и сульфинамоила.

Соединения рода рII можно получить в соответствии с описанием US 7,115,746. Род рII характеризуется формулой (рII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рII

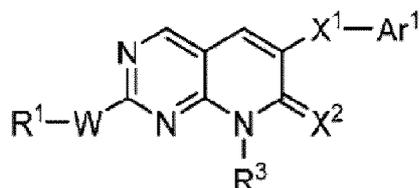


в которой:

определения переменных приведены в [00397] WO 2019/071147.

Соединения рода рIII могут быть получены в соответствии с описанием US 6 696 566. Род рIII характеризуется формулой (рIII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рIII

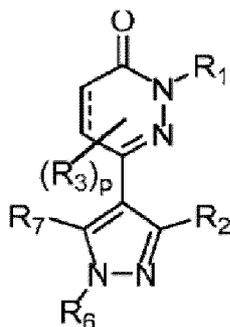


в которой:

определения переменных приведены в [00397] WO 2019/071147.

Соединения рода рIV можно получить в соответствии с раскрытием US 2009/0042856. Род рIV характеризуется формулой (рIV) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рIV

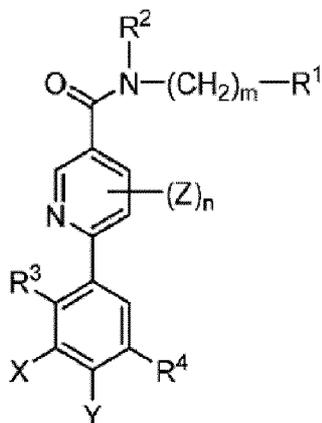


в которой:

определения переменных приведены в [00530] WO 2019/071147.

Соединения рода pV можно получить в соответствии с описанием US 7,125,898. Род pV характеризуется формулой (pV) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула pV

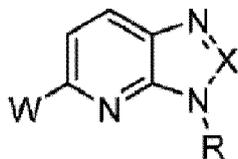


в которой:

определения переменных приведены в [00719] WO 2019/071147.

Соединения рода pVI можно получить в соответствии с описанием US 7,582,652. Род pVI характеризуется формулой (pVI) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула pVI

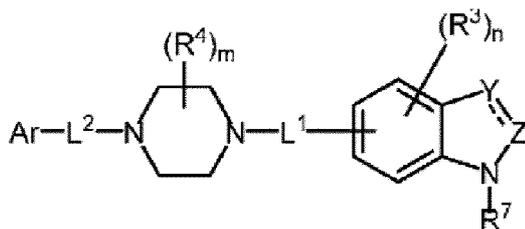


в которой:

определения переменных приведены в [00769] WO 2019/071147.

Соединения рода pVII можно получить в соответствии с описанием US 6867209. Род pVII характеризуется формулой (pVII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула pVII

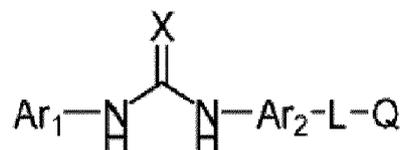


в которой:

определения переменных приведены в [00891] WO 2019/071147.

Соединения рода рVIII можно получить в соответствии с описанием US 6319921. Род рVIII характеризуется формулой (рVIII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рVIII

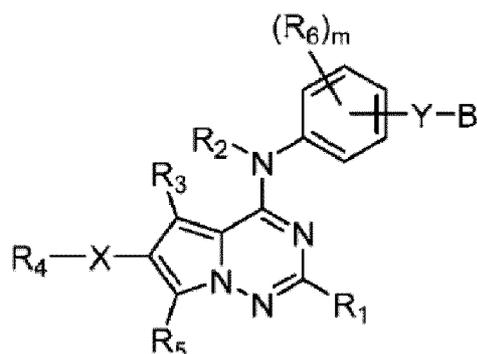


в которой:

определения переменных приведены в [00908] WO 2019/071147.

Соединения рода рIX можно получить в соответствии с раскрытием US 7,160,883, US 7,462,616 и US 7,759,343. Род рIX характеризуется формулой (рIX) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рIX

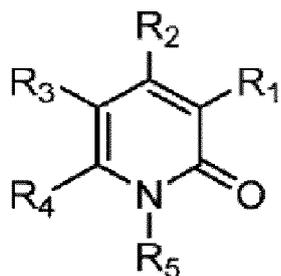


в которой:

определения переменных приведены в [001071] WO 2019/071147.

Соединения рода рX можно получить в соответствии с описанием US 20050176775. Род рX характеризуется формулой (рX) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рX

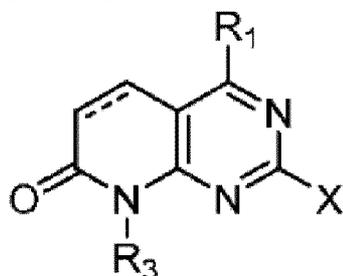


в которой:

определения переменных приведены в [001104] WO 2019/071147.

Соединения рода рХI можно получить в соответствии с раскрытием US 7,314,881, US 7,323,472 и US 8,058,282. Род рХI характеризуется формулой (рХI) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рХI



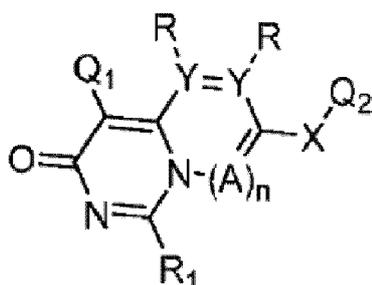
в которой:

определения переменных приведены в [001608] WO 2019/071147.

Соединения рода рХII можно получить в соответствии с описанием US 7,521,447.

Род рХII характеризуется формулой (рХII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рХII



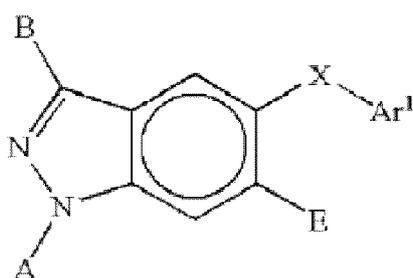
в которой:

определения переменных приведены в [001661] WO 2019/071147.

Соединения рода рХIII можно получить в соответствии с описанием US7521447.

Род рХIII характеризуется формулой (рХIII) или стереоизомерами, обогащенными изотопами соединениями, пролекарствами, сольватами и фармацевтически приемлемыми солями такового.

Формула рХIII



в которой:

определения переменных приведены в [001665] WO 2019/071147.

Предпочтительными ингибиторами р38 являются следующие:

1. Ингибиторы р38 общей формулы рI, перечисленные в параграфах с [00246] по [00294] WO2019/071147.
2. Ингибиторы р38 общей формулы рII, которые представляют собой 2- (2,4-дифторфенил) -6- (1- (2,6-дифторфенил) уреидо) никотинамид («VX-702»).
3. Ингибиторы р38 общей формулы рIII, перечисленные в параграфах с [00399] по [00496] WO2019/071147.
4. Ингибиторы р38 общей формулы рIV, перечисленные в параграфах с [00532] по [00618] WO2019/071147.
5. Ингибиторы р38 общей формулы рV, перечисленные в параграфах с [00721] по [00758] WO2019/071147.
6. Ингибиторы р38 общей формулы рVI, перечисленные в параграфах с [00771] по [00885] WO2019/071147.
7. Ингибиторы р38 общей формулы рVII, перечисленные в параграфах с [00893] по [00902] WO2019/071147, предпочтительно в параграфах с [00893] по [00900] и [00902].
8. Ингибиторы р38 общей формулы рVIII, перечисленные в параграфах [00910] - [001068] WO2019/071147, предпочтительно в параграфе [001068].
9. Ингибиторы р38 общей формулы рIX, перечисленные в параграфах [001072] - [001074] WO2019/071147, предпочтительно в параграфе [001074].
10. Ингибиторы р38 общей формулы рX, перечисленные в параграфах с [001106] по [001409] или с [001412] по [001588] WO2019/071147.
11. Ингибиторы р38 общей формулы рXI, перечисленные в параграфах с [001610] по [001644] WO2019/071147.
12. Ингибиторы р38 общей формулы рXII, перечисленные в параграфах [001662] и [001663] WO2019/071147, предпочтительно в [001663].
13. Ингибиторы р38 общей формулы рXIII, перечисленные в параграфах с [001667] по [001698] WO2019/071147.
14. Лозмапимод является наиболее предпочтительным ингибитором р38.
15. Любой из ингибиторов р38, перечисленных в пп. 1-14 выше.

#### Другие ингибиторы СК1 и ингибиторы р38

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы вызывают деградацию целевого полипептида, например белка р38 или белка СК1. Например, ингибиторы включают химеры, нацеленные на протеолиз (PROTAC), которые индуцируют селективный внутриклеточный протеолиз целевых белков. PROTAC включают функциональные домены, которые могут быть ковалентно связаны белок-связывающими молекулами: один из них способен взаимодействовать с убиквитинлигазой E3, а другой связывается с целевым белком, предназначенным для деградации. Привлечение лигазы E3 к белку-мишени приводит к убиквитинированию и последующей деградации белка-

мишени протеосомой. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой PROTAC, который нацелен на белок p38 (например, p38- $\alpha$  и/или p38- $\beta$ ). В конкретных предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 представляет собой PROTAC, который нацелен на белок СК1 (например, СК1 $\delta$  и/или СК1 $\epsilon$ ). В конкретных предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 представляет собой PROTAC, который нацелен на белок СК1 (например, СК1 $\delta$  и/или СК1 $\epsilon$ ), а ингибитор p38 представляет собой PROTAC, который нацелен на белок p38 (например, p38- $\alpha$  и/или p38- $\beta$ ).

#### Композиция

В дополнительном аспекте изобретение предоставляет композицию, содержащую по меньшей мере один ингибитор СК1 и фармацевтически приемлемый наполнитель, для применения согласно изобретению. Такая композиция называется здесь композицией для применения согласно изобретению. Предпочтительные композиции для использования согласно изобретению представляют собой фармацевтические композиции. В предпочтительных вариантах осуществления композиция для применения согласно изобретению составлена для перорального, сублингвального, парентерального, внутрисосудистого, внутривенного, подкожного или трансдермального введения, необязательно для введения путем ингаляции; предпочтительно для перорального приема. Дополнительные характеристики и определения способов введения приведены в разделе, посвященном составу и применению.

Предпочтительные композиции содержат по меньшей мере два различных ингибитора, один из которых является ингибитором СК1, а другой - агентом, который ингибирует миогенное слияние и/или дифференцировку. Предпочтительные такие агенты определены здесь в другом месте.

Другие предпочтительные композиции содержат по меньшей мере один единственный агент, который является ингибитором СК1, а также ингибитором p38. Предпочтительные такие ингибиторы описаны здесь в другом месте.

#### Состав и введение

Композиции, содержащие соединения, как описано выше, могут быть приготовлены в виде лекарственных или косметических препаратов или в различных других средах, таких как продукты питания, для людей или животных, включая медицинские продукты питания и диетические добавки. «Лечебное питание» представляет собой продукт, предназначенный для специального диетического лечения заболевания или состояния, при котором существуют особые потребности в питании. В качестве примера, но без ограничения таковым, лечебные продукты питания могут включать витаминные и минеральные препараты, подаваемые через зонд для кормления (называемым энтеральным введением). «Пищевая добавка» должна означать продукт, который предназначен для дополнения рациона человека и обычно предоставляется в форме пилюли, капсулы, таблетки или подобного препарата. В качестве примера, но без ограничения таковым, пищевая добавка может включать один или несколько из

следующих ингредиентов: витамины, минералы, травы, растительные вещества; аминокислоты, диетические вещества, предназначенные для дополнения рациона за счет увеличения общего потребления с пищей, и концентраты, метаболиты, компоненты, экстракты или комбинации любого из вышеперечисленного. Пищевые добавки также могут быть включены в пищу, включая, помимо прочего, пищевые батончики, напитки, порошки, крупы, приготовленную пищу, пищевые добавки и конфеты; или другие функциональные продукты питания, предназначенные для укрепления здоровья или предотвращения или остановки прогрессирования дегенеративного заболевания, связанного с экспрессией или активностью DUX4.

Таким образом, рассматриваемые композиции могут быть смешаны с другими физиологически приемлемыми материалами, которые можно принимать внутрь, включая, помимо прочего, пищевые продукты. В дополнение или в качестве альтернативы композиции для использования, как описано в данном документе, можно вводить перорально в сочетании с (отдельным) приемом пищи.

Композиции можно вводить отдельно или в комбинации с другими фармацевтическими или косметическими средствами и их можно комбинировать с их физиологически приемлемым носителем. В частности, описанные здесь соединения могут быть составлены в виде фармацевтических или косметических композиций с добавками, такими как фармацевтически или физиологически приемлемые наполнители, носители и эксципиенты. Подходящие фармацевтически или физиологически приемлемые эксципиенты, носители и наполнители включают технологические агенты и модификаторы и усилители доставки лекарств, такие как, например, фосфат кальция, стеарат магния, тальк, моносахариды, дисахариды, крахмал, желатин, целлюлоза, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия, декстроза, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, поливинилпирролидинон, легкоплавкие воски, ионообменные смолы и т.п., а также комбинации любых двух или более таковых. Другие подходящие фармацевтически приемлемые наполнители описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences", " Mack Pub. Co., New Jersey (1991), and "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, " Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 20-е издание (2003 г.), 21-е издание (2005 г.) и 22-е издание (2012 г.), включенные в настоящий документ посредством ссылки.

Известно, что многие молекулы, ингибирующие СК1, также могут ингибировать p38. Митоген-активируемые протеинкиназы p38 представляют собой класс митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), которые реагируют на стрессовые стимулы, такие как цитокины, ультрафиолетовое облучение, тепловой и осмотический шок, и участвуют в дифференцировке клеток, секреции цитокинов, апоптозе и аутофагии. Известно, что стойкая активация пути p38 МАРК в мышечных сателлитных клетках (мышечных стволовых клетках) из-за старения нарушает регенерацию мышц. В предпочтительных вариантах осуществления ингибитор СК1 также является ингибитором p38.

Композиции для использования согласно изобретению могут быть изготовлены способами, хорошо известными в данной области техники; например, с помощью

обычного перемешивания, процессов растворения, гранулирования, изготовления драже, отмучивания, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации, которые могут приводить к получению липосомальных составов, коацерватов, эмульсий масло-в-воде, порошков наночастиц/микрочастиц или любой другой формы. Таким образом, композиции для применения в соответствии с изобретением могут быть составлены обычным способом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, содержащих наполнители и вспомогательные вещества, облегчающих переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Правильный состав зависит от выбранного пути введения.

Для инъекции ингибиторы СК1, их комбинации и композиции для применения согласно изобретению могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для введения через слизистые оболочки в составе используются пенетранты, подходящие для проницаемого барьера. Такие пенетранты обычно известны в данной области.

Пероральное и парентеральное введение можно использовать, если ингибиторы СК1 и их комбинации и композиции для применения составлены путем их комбинирования с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области техники, или при использовании их в качестве пищевой добавки. Такие стратегии позволяют составлять ингибиторы СК1, их комбинации и композиции для использования согласно изобретению в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий, суспензий и т.п. для перорального приема субъектом, подлежащим лечению. Препараты или фармакологические препараты для перорального применения могут быть получены с использованием твердого наполнителя, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения таблеток или ядер драже. Подходящими наполнителями являются, в частности, наполнители такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбитол; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и/или поливинилпирролидон (PVP). При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или соль таковой, такая как альгинат натрия. Кроме того, могут быть приготовлены совместные рецептуры с усилителями поглощения, известными в данной области техники.

Ядра драже имеют подходящие покрытия. Для этой цели могут использоваться концентрированные растворы сахаров, которые могут необязательно содержать гуммиарабик, тальк, ПВП, гель карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, раствор лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Полиметакрилаты можно использовать для обеспечения профилей высвобождения в

зависимости от pH, чтобы они могли проходить через желудок. К таблеткам или покрытиям драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций доз активного ингибитора СК1.

Ингибиторы СК1 и композиции, которые можно вводить перорально, включают капсулы с плотной посадкой, изготовленные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбитол. Капсулы с плотной посадкой могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими веществами, такими как крахмалы, и/или смазывающими веществами, такими как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, могут быть добавлены стабилизаторы. Все препараты для перорального введения должны быть предоставлены в дозировках, подходящих для такого введения.

Для буккального введения ингибиторы СК1 и комбинации и композиции таковых для применения согласно изобретению можно вводить в форме таблеток или пастилок, приготовленных обычным способом.

Ингибиторы СК1, их комбинации и композиции для применения согласно изобретению могут быть составлены для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Таким образом, также возможно нацелиться на конкретный орган, ткань, участок опухоли, очаг воспаления и т. д. Препараты для лечения инфекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовом контейнере, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать агенты для составления рецептур, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Этот состав является предпочтительным, потому что он обеспечивает специфическое воздействие на мышечную ткань.

Композиции для парентерального введения включают водные растворы композиций в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии могут быть приготовлены в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицерид, или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, увеличивающие вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Необязательно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость композиций, что позволяет приготовить высококонцентрированные растворы.

Альтернативно, один или несколько компонентов композиции могут быть в форме порошка для смешивания с подходящим носителем, например стерильной апиrogenной

водой, перед использованием.

Композиции или комбинации для применения согласно изобретению также могут быть составлены в виде ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, например, содержать обычные основы суппозиториев, такие как масло какао или другие глицериды.

В дополнение к рецептурам, описанным ранее, ингибиторы СК1, их комбинации и композиции для применения согласно изобретению также могут быть составлены в виде депо-препаратов. Такие препараты длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Таким образом, например, они могут быть составлены с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или как часть твердого или полутвердого имплантата, который способен или неспособен саморазлагаться в организме, или с ионообменными смолами, или один или несколько компонентов композиции могут быть составлены в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли. Примеры подходящих полимерных материалов известны специалисту в данной области и включают PLGA и полилактоны, такие как поликапроновая кислота.

Композиции или комбинации для использования согласно изобретению также могут включать подходящие твердые или гелевые носители или наполнители. Примеры таких носителей или наполнителей включают, без ограничения таковыми, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Композиции или комбинации для применения согласно изобретению также могут быть включены в трансдермальный пластырь. Предпочтительные трансдермальные пластыри для использования согласно изобретению выбираются из однослойного пластыря с лекарством в адгезиве, или многослойного пластыря с лекарством в адгезиве, или пластыря резервуара, или пластыря матрикса, или парового пластыря.

Композиции для применения согласно изобретению включают ингибиторы СК1 и комбинации и композиции таковых, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченных целей. Более конкретно, терапевтически эффективное количество означает количество соединения, эффективное для предотвращения, стабилизации, облегчения, устранения причин или симптомов заболевания или продления выживаемости, подвижности или обеспечения независимости субъекта, подвергаемого лечению. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного описания, представленного в данном документе. Для любых ингибиторов СК1, комбинаций и композиций таковых, используемых в изобретении, терапевтически эффективное количество или доза может быть первоначально оценена с помощью анализов на культуре клеток, например, как показано здесь в качестве примеров. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой

лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть подобраны индивидуально врачом с учетом состояния пациента. (См., Например, Fingl, et al., 1975, in “The Pharmacological Basis of Therapeutics” Ch. 1 p. 1). Количество вводимых ингибиторов СК1 и композиций, конечно, будет зависеть от субъекта, подлежащего лечению, от веса субъекта, тяжести заболевания, способа введения и заключения лечащего врача.

Композиция или комбинация для использования в соответствии с изобретением могут поставяться таким образом, чтобы ингибитор СК1 для использования в соответствии с изобретением и один или несколько других компонентов, как определено в данном документе, находились в одном и том же контейнере, либо в растворе, либо в суспензии, либо в порошковой форме. Композиция для применения согласно изобретению также может быть представлена всеми компонентами, предоставленными отдельно друг от друга, например, для смешивания друг с другом перед введением или для отдельного или последовательного введения. Например, композиция может включать контейнер, содержащий ингибитор СК1, и отдельный контейнер, содержащий ингибитор р38. Напротив, композиция также может содержать контейнер, содержащий в одном и том же контейнере как ингибитор СК1, так и ингибитор р38. Возможны различные варианты упаковки, которые известны специалистам в данной области, в зависимости, среди прочего, от пути и механизма введения. В свете способов введения, описанных выше, изобретение обеспечивает ингибитор казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению или комбинацию для применения согласно изобретению, или композицию для применения согласно изобретению, где таковые вводятся перорально, сублингвально, внутрисосудисто, внутривенно, подкожно, трансдермально или, необязательно, путем ингаляции; предпочтительно перорально.

«Эффективное количество» ингибитора СК1, комбинации или композиции представляет собой количество, которое при введении субъекту достаточно для уменьшения или устранения одного или нескольких симптомов заболевания или для замедления прогрессирования одного или нескольких симптомов заболевания, или для уменьшения тяжести одного или нескольких симптомов заболевания, или для подавления проявления заболевания, или для подавления проявления неблагоприятных симптомов заболевания. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

«Эффективное количество» этого вещества может быть объединено с материалами носителя для получения единичной лекарственной формы, и варьируется в зависимости от субъекта, которому вводят активный ингредиент, и конкретного способа введения. Выбранная стандартная дозировка обычно изготавливается и вводится для обеспечения желаемой конечной концентрации соединения в крови.

Эффективное количество (т.е. эффективная общая суточная доза), предпочтительная для взрослых, здесь определяется как общая суточная доза от около 0,01 до 2000 мг, или от около 0,01 до 1000 мг, или от около 0,01 до 500 мг, или от около 5 до 1000 мг, или от около 20 до 800 мг, или от около 30 до 800 мг, или от около 30 до 700

мг, или от около 20 до 700 мг, или от около 20 до 600 мг, или от около 30 до 600 мг, или от около 30 до 500 мг, или от около 30 до 450 мг или от около 30 до 400 мг, или от около 30 до 350 мг, или от около 30 до 300 мг, или от около 50 до 600 мг, или от около 50 до 500 мг, или от около 50 до 450 мг, или от около 50 до 400 мг или от около 50 до 300 мг, или от около 50 до 250 мг, или от около 100 до 250 мг, или от около 150 до 250 мг. В наиболее предпочтительном варианте эффективное количество составляет около 200 мг. В предпочтительных вариантах осуществления изобретение предоставляет ингибитор казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению или композицию для применения согласно изобретению, где ее вводят субъекту в количестве от 0,1 до 1500 мг/день, предпочтительно от 0,1 до 1000 мг/день, более предпочтительно от 0,1 до 400 мг/день, еще более предпочтительно от 0,25 до 150 мг/день, например, примерно 100 мг/день.

Альтернативно, эффективное количество соединения, предпочтительное для взрослых, предпочтительно вводится на кг веса тела. Таким образом, общая суточная доза, предпочтительно для взрослых, составляет от примерно 0,05 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,2 мг/кг до примерно 15 мг/кг или от примерно 0,3 мг/кг до примерно 15 мг/кг, от примерно 0,4 мг/кг до примерно 15 мг/кг, или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 14 мг/кг, или от примерно 0,3 мг/кг до примерно 14 мг/кг, или от примерно 0,3 мг/кг до примерно 13 мг/кг или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 13 мг/кг или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 11 мг/кг.

Общая суточная доза для детей предпочтительно составляет не более 200 мг. Более предпочтительно общая суточная доза составляет от около 0,1 до 200 мг, от около 1 до 200 мг, от около 5 до 200 мг, от около 20 до 200 мг, от около 40 до 200 мг или от около 50 до 200 мг. Предпочтительно общая суточная доза для детей составляет от около 0,1 до 150 мг, от около 1 до 150 мг, от около 5 до 150 мг, от около 10 до 150 мг, от около 40 до 150 мг или от около 50 до 150 мг. Более предпочтительно общая суточная доза составляет от около 5 до 100 мг, от около 10 до 100 мг, от около 20 до 100 мг, от около 30 до 100 мг, от около 40 до 100 мг или от около 50 до 100 мг. Еще более предпочтительно общая суточная доза составляет от около 5 до 75 мг, от около 10 до 75 мг, от около 20 до 75 мг, от около 30 до 75 мг, от около 40 до 75 мг или от около 50 до 75 мг.

Альтернативные примеры дозировок, пригодных для использования, представляют собой эффективное количество соединений для использования согласно изобретению в пределах дозового диапазона от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 300 мг/кг или от примерно 1,0 мкг/кг до примерно 40 мг/кг массы тела, или от около 1,0 мкг/кг до около 20 мг/кг массы тела, или от около 1,0 мкг/кг до около 10 мг/кг массы тела, или от около 10,0 мкг/кг до около 10 мг/кг массы тела, или от около 100 мкг/кг до около 10 мг/кг массы тела, или от около 1,0 мг/кг до около 10 мг/кг массы тела, или от около 10 мг/кг до около 100 мг/кг массы тела, или от примерно 50 мг/кг до примерно 150 мг/кг массы тела, или от примерно 100 мг/кг до примерно 200 мг/кг массы тела, или от примерно 150 мг/кг до примерно 250 мг/кг массы тела, или в пределах от примерно 200 мг/кг до примерно 300 мг/кг массы тела или в пределах от примерно 250 мг/кг до примерно 300 мг/кг массы тела.

Другие дозировки, пригодные для использования, составляют примерно 0,01 мг/кг массы тела, примерно 0,1 мг/кг массы тела, примерно 1 мг/кг массы тела, примерно 10 мг/кг массы тела, примерно 20 мг/кг массы тела, примерно 30 мг/кг массы тела, примерно 40 мг/кг массы тела, примерно 50 мг/кг массы тела, примерно 75 мг/кг массы тела, примерно 100 мг/кг массы тела, примерно 125 мг/кг массы тела, примерно 150 мг/кг массы тела, около 175 мг/кг массы тела, около 200 мг/кг массы тела, около 225 мг/кг массы тела, около 250 мг/кг массы тела, около 275 мг/кг массы тела или около 300 мг/кг массы тела.

Соединения или композиции для применения согласно настоящему изобретению можно вводить в виде однократной суточной дозы, или можно вводить общую суточную дозу в разделенных дозах два, три или четыре раза в день.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения «субъект», «индивидуум» или «пациент» понимается как индивидуальный организм, предпочтительно позвоночное животное, более предпочтительно млекопитающее, еще более предпочтительно примат и наиболее предпочтительно человек.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения человек является взрослым, например лицо 18 лет и старше. Кроме того, здесь подразумевается, что средний вес взрослого человека составляет 62 кг, хотя известно, что средний вес варьируется в зависимости от страны. В другом варианте осуществления изобретения средний вес взрослого человека составляет, следовательно, примерно 50-90 кг. Здесь подразумевается, что эффективная доза, как здесь определено, не ограничивается субъектами, имеющими средний вес. Предпочтительно, чтобы субъект имел ВМІ (индекс массы тела) от 18,0 до 40,0 кг/м<sup>2</sup>, а более предпочтительно от 18,0 до 30,0 кг/м<sup>2</sup>.

В качестве альтернативы субъектом лечения является ребенок, например человек в возрасте 17 лет и младше. Кроме того, лечиться может человек от рождения до полового созревания или от полового созревания до взрослого возраста. Здесь подразумевается, что половое созревание начинается у женщин в возрасте 10-11 лет, а у мужчин в возрасте 11-12 лет. Кроме того, объектом лечения может быть новорожденный (первые 28 дней после рождения), младенец (0-1 год), малыш (1-3 года), дошкольник (3-5 лет); ребенок школьного возраста (5-12 лет) или подросток (13-18 лет).

Для поддержания эффективного диапазона во время лечения, ингибитор СК1 или комбинацию или композицию можно вводить один раз в день или один раз каждые два, три, четыре или пять дней. Однако предпочтительно соединение вводится по крайней мере один раз в день. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к ингибитору казеинкиназы 1 для применения согласно изобретению или к композиции для применения согласно изобретению, где таковые вводят субъекту 4, 3, 2 или 1 раз в сутки и менее, желательно 1 раз в сутки. Общая суточная доза может вводиться как разовая суточная доза. Альтернативно соединение вводят по крайней мере два раза в день. Следовательно, соединение, как здесь определено, можно вводить один, два, три, четыре или пять раз в день. Таким образом, общая суточная доза может быть разделена на несколько доз (единиц), что приводит к введению общей

суточной дозы, как определено здесь. В предпочтительном воплощении соединение вводят два раза в день. Кроме того, понятно, что термины «два раза в день», «bid» и «bis in die» могут использоваться здесь взаимозаменяемо.

В предпочтительном варианте осуществления общая суточная доза делится на несколько доз в день. Эти отдельные дозы могут отличаться по количеству. Например, для каждой общей суточной дозы первая доза может содержать большее количество соединения, чем вторая доза, или наоборот. Однако предпочтительно соединение вводят в аналогичных или равных дозах. Следовательно, в наиболее предпочтительном воплощении соединение вводят два раза в день в двух одинаковых или равных дозах.

В следующем предпочтительном варианте осуществления изобретения общая суточная доза соединения, как определено здесь выше, вводится по меньшей мере в двух отдельных дозах. Интервал между введением по меньшей мере двух отдельных доз составляет по меньшей мере примерно 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов, предпочтительно интервал между по меньшей мере двух отдельных доз составляет по меньшей мере около 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов и более предпочтительно интервал между по меньшей мере двух отдельных доз составляет по меньшей мере около 8, 9, 10, 11 или 12 часов.

#### Использование

В одном аспекте изобретения предусмотрено применение либо ингибитора СК1 согласно изобретению, либо композиции согласно изобретению, либо комбинации согласно изобретению. Указанное применение предназначено для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4 у субъекта, нуждающегося в этом, и включает введение субъекту эффективной дозы ингибитора СК1 или комбинации или композиции по изобретению, где ингибитор СК1 или комбинация или композиция имеют значения, указанные в данном описании выше.

В одном варианте осуществления этого аспекта предусмотрено применение либо ингибитора СК1 согласно изобретению, либо композиции согласно изобретению, либо комбинации согласно изобретению. Указанное применение предназначено для лечения мышечной дистрофии или рака у субъекта, нуждающегося в этом, и включает введение субъекту эффективной дозы ингибитора СК1, композиции или комбинации по изобретению, где ингибитор СК1, композиция или комбинация представляют собой вещества, определенные ранее в данном документе. Дополнительные признаки и определения предпочтительно имеют значения, определенные в данном документе, в частности, для болезней или состояний, подлежащих лечению.

#### Метод

Один аспект изобретения обеспечивает способ снижения экспрессии DUX4 *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*, причем способ включает стадию контактирования клетки с ингибитором СК1, как определено ранее в данном документе, или с композицией или комбинацией, как определено ранее в данном документе. Один связанный аспект изобретения предоставляет способ *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* для стимулирования

миогенного слияния и/или дифференцировки, причем способ включает стадию контактирования клетки с ингибитором СК1, как определено ранее в данном документе, или с композицией или комбинацией, как определено ранее в данном документе. Предпочтительно указанный способ предназначен для лечения заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, такого как мышечная дистрофия или рак, наиболее предпочтительно указанное заболевание или состояние представляет собой фациоскапуло-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). Способ предпочтительно включает использование, как определено ранее в данном документе. Предпочтительные способы включают контактирование клетки с композицией ингибитора СК1, как определено ранее в данном документе. В контексте изобретения приведение клетки в контакт с ингибитором СК1 или комбинацией или композицией может включать добавление такого ингибитора СК1, комбинации или композиции в среду, в которой культивируется клетка. Контакт клетки с ингибитором СК1 или комбинацией или композицией может также включать добавление такого ингибитора СК1, комбинации или композиции к среде, буферу или раствору, в котором клетка суспендирована или который покрывает клетку. Другие предпочтительные способы контактирования с клеткой включают инъекцию в клетку ингибитора СК1, комбинации или композиции или воздействие на клетку материала, содержащего ингибитор СК1, комбинацию или композицию согласно изобретению. Дополнительные способы введения определены здесь в другом месте. Предпочтительными клетками являются клетки, о которых известно, что они экспрессируют DUX4, клетки, предположительно экспрессирующие DUX4, или клетки, о которых известно, что они поражены заболеванием или состоянием, как определено ранее в данном документе.

В одном варианте осуществления этого аспекта способ представляет собой метод *in vitro*. В дополнительном варианте осуществления этого аспекта способ представляет собой метод *ex vivo*. В другом варианте осуществления этого аспекта способ представляет собой метод *in vivo*. В предпочтительном воплощении этого аспекта способ представляет собой способ *in vitro* или *ex vivo*.

В вариантах осуществления этого аспекта клетка может быть клеткой образца, полученного от субъекта. Такой образец может быть образцом, полученным ранее от субъекта. В вариантах осуществления этого аспекта образцы могут быть ранее получены от человека. В вариантах осуществления этого аспекта образцы могут быть получены от субъекта, не являющегося человеком. В предпочтительном варианте этого аспекта получение образца не является частью способа согласно изобретению.

В предпочтительных вариантах осуществления способ согласно изобретению представляет собой способ снижения экспрессии DUX4 у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает стадию введения эффективного количества ингибитора СК1, как определено ранее в данном документе, или композиции, как определено ранее в данном документе, или комбинации, как определено ранее в данном документе. В более предпочтительных вариантах осуществления способ предназначен для лечения

заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, предпочтительно мышечной дистрофии или рака, наиболее предпочтительно указанное заболевание или состояние представляет собой фасциально-плечевую мышечную дистрофию (FSHD). Дополнительные признаки и определения предпочтительно имеют значения, определенные в данном документе.

#### Общие определения

В этом документе и в формуле изобретения глагол «содержать» и его спряжения используются в неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, не упомянутые специально, не исключаются. Кроме того, глагол «состоять» может быть заменен на «состоять по существу из», что означает, что комбинация или композиция, как определено в данном документе, может содержать дополнительный компонент(ы), чем те, которые конкретно определены, и указанный дополнительный компонент(ы) не изменяет уникальности изобретения. Кроме того, ссылка на элемент неопределенным артиклем «а» или «an» не исключает возможности наличия более одного элемента, если только контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Таким образом, неопределенный артикль «а» или «an» обычно означает «по крайней мере один».

Когда структурная формула или химическое название понимается специалистом как имеющий хиральные центры, но хиральность не указана, для каждого хирального центра предполагаются все три формы вещества: рацемическая смесь, чистый R-энантиомер и чистый S энантиомер. Предпочтительными изомерами являются таутомеры и стереоизомеры.

Всякий раз, когда параметр вещества обсуждается в контексте данного изобретения, предполагается, что, если не указано иное, параметр определяется, измеряется или проявляется в физиологических условиях. Физиологические условия известны специалисту в данной области и включают системы водных растворителей, атмосферное давление, значения pH от 6 до 8, температуру в диапазоне от комнатной температуры до примерно 37° C (от примерно 20° C до примерно 40° C), и подходящую концентрацию буферных солей или других компонентов.

Использование вещества в качестве лекарственного средства, как описано в этом документе, также можно интерпретировать как использование указанного вещества при производстве лекарственного средства. Аналогичным образом, всякий раз, когда вещество используется для лечения или в качестве лекарственного средства, его также можно использовать для производства лекарственного средства для лечения. Продукты для использования в качестве лекарственного средства, описанные здесь, могут использоваться в способах лечения, где такие способы лечения включают введение продукта для использования. Ингибиторы СК1 или композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно предназначены для использования в способах или применениях согласно настоящему изобретению.

В данной заявке под экспрессией понимается транскрипция гена в

функциональную мРНК, приводящую к полипептиду, такому как фермент или фактор транскрипции, или, например, полипептид DUX4. Полипептид может проявлять действие или иметь активность. В этом контексте повышенная или пониженная экспрессия полипептида может рассматриваться как повышенный или пониженный уровень мРНК, кодирующей указанный полипептид, повышенный или пониженный уровень или количество молекул полипептида, или повышенная или пониженная общая активность указанных молекул полипептида. Предпочтительно повышенная или пониженная экспрессия полипептида приводит к повышенной или пониженной активности указанного полипептида, соответственно, что может быть вызвано повышенными или пониженными уровнями или количествами полипептидных молекул. Более предпочтительно снижение экспрессии DUX4 представляет собой уменьшение транскрипции гена DUX4, дестабилизацию или деградацию мРНК DUX4, уменьшение количества молекул полипептида DUX4, снижение активности молекулы полипептида DUX4, дестабилизацию или деградацию полипептида DUX4 или любое сочетание из вышеизложенного. Дестабилизированная мРНК приводит к снижению экспрессии кодируемого ею полипептида, возможно, и не может привести к экспрессии кодируемого ею полипептида. Дегрированной мРНК разрушается и не может привести к экспрессии кодируемого ею полипептида. Дестабилизированный полипептид проявляет меньший эффект или имеет более низкую активность, чем тот же полипептид, который не был дестабилизирован, возможно, он не проявляет никакого эффекта или не имеет активности. Дестабилизированный полипептид может быть денатурирован или неправильно свернут. Дегрирующий полипептид разрушается и не проявляет эффекта, либо не проявляет активности.

В контексте этого изобретения уменьшение или увеличение параметра, подлежащего оценке, означает изменение по меньшей мере на 5% значения, соответствующего этому параметру. Более предпочтительно, уменьшение или увеличение значения означает изменение по меньшей мере на 10%, даже более предпочтительно по меньшей мере на 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 90% или 100%. В последнем случае может случиться так, что больше не существует обнаруживаемого значения, связанного с параметром.

Слово «около», «примерно» или «приблизительно», когда оно используется в сочетании с числовым значением (например, примерно 10), предпочтительно означает, что значение может быть заданным значением (из 10) более или менее 1% от значения.

Каждый вариант осуществления, как определено в данном документе, может быть объединен вместе с другими, если не указано иное. Изобретение было описано выше со ссылкой на ряд вариантов осуществления. Квалифицированный специалист может представить себе тривиальные варианты некоторых элементов вариантов осуществления. Они включены в объем защиты, как определено в прилагаемой формуле изобретения. Все цитируемые патентные и литературные ссылки полностью включены в настоящий

документ посредством ссылки.

### **Краткое описание чертежей**

**Фигура 1** - (A): Иллюстрация иммуноцитохимического окрашивания DUX4 в мышечных трубках FSHD от 2 разных доноров после 3 дней дифференцировки. Кластеры DUX4-положительных ядер четко окрашиваются, в то время как DUX4-отрицательные ядра не окрашиваются. Гистограммы показывают интенсивность иммунофлуоресцентных сигналов (возрастающая интенсивность по оси X) после окрашивания DUX4 и вторичным антителом (вверху) или только вторичным антителом (внизу); стрелки вверху показывают фоновый сигнал (стрелка влево) или конкретный сигнал DUX4 (стрелка вправо); (B): Иллюстрация окрашенной DUX4 миотрубки FSHD после 3 дней дифференцировки. Пунктирная обводка является результатом примененных настроек фильтра, которые исключают фон от вторичного контроля антител. Обратите внимание, что настройки порога запрещают обнаружение более слабого сигнала DUX4 в ядрах, более удаленных от основного ядра в поле зрения.

**Фигура 2** - Анализ изображений включает идентификацию ядер, идентификацию мышечной трубки, обнаружение ядер внутри или за пределами границ мышечной трубки (используется для расчета индекса слияния), положительных ядер и кластеров DUX4, определение площади миотрубки, ширины миотрубки и длины скелета мышечной трубки.

**Фигура 3** - Проверка первичного скринингового анализа в 384-луночном формате. Показаны три независимых эксперимента, иллюстрирующие окно анализа, полученное с использованием анализа количественного определения количества ядер, экспрессирующих DUX4, в дифференцирующих первичных мышечных трубках после 3 дней в среде для дифференцировки. Окно анализа определяется сигналом DUX4 и фоновым сигналом вторичного антитела (представляющим сигнал при полном отсутствии DUX4).

**Фигура 4** - (A): Схематическое изображение протокола скринингового анализа. Миобласты высеивали в день -1, и среду меняли на среду для дифференцировки в нулевой день. Клеткам давали возможность дифференцироваться в течение 3 дней. Соединения добавляли за 15 ч до фиксации. (B): корреляция дублированных результатов первичного скрининга аннотированной библиотеки соединений с использованием 2 разных считываний для экспрессии DUX4 (количество DUX4-положительных ядер и интенсивность DUX4) и 2 разных считываний для мониторинга потенциальной токсичности (индекс слияния, количество ядер). Критические пороги совпадений (высокая надежность) обозначены пунктирной линией, а верхние правые квадранты содержат составы совпадений для различных считываний. Оси диаграмм рассеяния симметричны.

**Фигура 5** - Кривые «концентрация-ответ» для различных ингибиторов СК1 для различных показателей. Количество ядер DUX4, интенсивность DUX4, индекс слияния и общее количество ядер измеряли после 15 часов воздействия соединения. (A): результаты для PF-670462; (B): результаты для PF-5006739; (C): результаты для соединения 3; (D): результаты для соединения 4; (E): результаты для соединения 5; (F): результаты для

соединения 6; (G): результаты для соединения 7; структурные формулы приведены в примере 5.

**Фигура 6** - График разброса результатов одного эксперимента по проверке достоверности показаний количества ядер DUX4 (слева), интенсивности DUX4 (в центре) и индекса слияния (справа). Первичные мышечные трубки FSHD выращивали в среде для пролиферации, после чего среду заменяли средой для дифференцировки, и клеткам давали возможность дифференцироваться в течение 3 дней. Показания оценивались, как описано в Примере 2. Самые внешние лунки обозначены белыми ромбами, вторые внешние лунки - серыми кружками, а все внутренние лунки - черной звездочкой. Из графиков видно, что индекс слияния в самых внешних лунках ниже по сравнению с внутренними скважинами. Кроме того, показания DUX4 ниже во внешних лунках, что свидетельствует о том, что уменьшение индекса слияния подразумевает риск получения ложноположительных показаний.

**Фигура 7** - (A): схематическое изображение протокола анализа. Миобласты высевали в день -1, и среду меняли на среду для дифференцировки в нулевой день. Клеткам давали возможность дифференцироваться в течение 3 дней. Соединения добавляли за 15 или 72 часа до фиксации. Для 15-часового лечения соединения вводят, когда дифференциация уже значительно прогрессировала. В случае 72-часовой обработки соединения инкубировали во время фазы полной дифференцировки. На других панелях показаны кривые зависимости от концентрации для ингибиторов ВЕТ (B) или для агонистов бета2-адренорецепторов (C, D, E, F) для различных параметров. Количество ядер DUX4, интенсивность DUX4, индекс слияния и общее количество ядер оценивали через 15 или 72 часа обработки. (B): (+) JQ1; (C): формотерол; (D): сальбутамол; (E): салметерол; (F): микрофотографии мышечных трубок после 72 часов в среде для дифференцировки при воздействии агониста бета2-адренорецепторов (формотерола); (G): результаты как для 15-часового, так и для 72-часового воздействия ингибитора СК1 (PF-670462).

**Фигура 8** - Кривые «концентрация-ответ» (n=3) для различных ингибиторов р38 для различных параметров в первичной клеточной линии FSHD. Количество ядер DUX4, интенсивность DUX4, индекс слияния и общее количество ядер измеряли после 72 часов воздействия соединения. (A): результаты для Асумаримод; (B): результаты для AMG548; (C): результаты для VIRB795; (D): результаты для BMS-582949; (E): результаты для лосмапимода; (F): результаты для LY2228820; (G): результаты для памапимода; (H): результаты для пексметиниба; (I): результаты для PH797804; (J): результаты для R1487; (K): результаты для SB-681323; (L): результаты для SCIO469; (M): результаты для VX702; (N): результаты для VX745.

**Фигура 9** - Кривые «концентрация-ответ» для ингибитора р38 лосмапимода для слияния и подсчета клеток в первичной клетке от здорового донора. Индекс слияния сильно ингибируется лосмапимодом.

**Фигура 10** - Эксперименты были выполнены стандартным анализом на первичных

клетках FSHD с 72-часовой обработкой соединением. (A): Зависимый от концентрации эффект вследствие увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода или ингибиторов СК1 № 4, № 5 или № 8 на индекс слияния; (B): Микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов обработки растворителем или ингибитором СК1 № 4; (C): Микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов обработки различными концентрациями лосмапимода в отсутствие (наверху) или в присутствии (внизу) ингибитора СК1 №4; (D): Зависимый от концентрации эффект за счет увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода в отсутствие или в присутствии ингибитора СК1 №4 на индекс слияния. Эффект одного ингибитора СК1 показан для сравнения; (E): Микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов обработки растворителем или ингибитором СК1 № 5; (F): Микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов лечения различными концентрациями лосмапимода в отсутствие (наверху) или в присутствии (внизу) ингибитора СК1 №5; (G): эффект на индекс слияния, зависящий от концентрации в порядке увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода в отсутствие или в присутствии ингибитора СК1 №5. Эффект одного ингибитора СК1 показан для сравнения; (H): Микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов обработки растворителем или ингибитором СК1 № 8; (I): микроскопические изображения первичных клеток FSHD в стандартном анализе после 72 часов обработки лосмапимодом в различных концентрациях в отсутствие (наверху) или в присутствии (внизу) ингибитора СК1 №8; (J): зависимый от концентрации эффект на индекс слияния в порядке увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода в отсутствие или в присутствии ингибитора СК1 № 8. Эффект одного ингибитора СК1 показан для сравнения; (K): эффект фиксированной концентрации лосмапимода (1,25 мкМ) либо в отсутствие, либо в присутствии возрастающих концентраций ингибитора СК1 № 4; (L): эффект фиксированной концентрации лосмапимода (1,25 мкМ) либо в отсутствие, либо в присутствии возрастающих концентраций ингибитора СК1 № 5; (M): Влияние фиксированной концентрации лосмапимода (1,25 мкМ) в отсутствие или в присутствии возрастающих концентраций ингибитора СК1 № 8.

**Фигура 11** - Эксперименты были выполнены стандартным анализом на первичных клетках FSHD с 72-часовой обработкой соединения. (A): зависящий от концентрации эффект на считывание DUX4 за счет увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода либо в отсутствие, либо в присутствии ингибитора СК1 №4; (B): зависящий от концентрации эффект на считывание DUX4 за счет увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода либо в отсутствие, либо в присутствии ингибитора СК1 №5; (C): зависящий от концентрации эффект на считывание DUX4 за счет увеличения концентрации ингибитора р38 лосмапимода либо в отсутствие, либо в присутствии ингибитора СК1 №8.

### **Примеры**

***Пример 1 - Первичные мышечные клетки FSHD экспрессируют DUX4 в небольшой фракции миоядер***

Авторам изобретения удалось создать чувствительный метод обнаружения DUX4 в первичных мышечных трубках и использовать его для создания анализа с высоким разрешением (a high-content assay) для количественной оценки экспрессии эндогенного DUX4. Этот метод был разработан в качестве проверенной платформы фенотипического скрининга для автоматического обнаружения и количественной оценки эндогенной экспрессии DUX4. Механизмы, лежащие в основе репрессии DUX4, могут включать многие взаимодействующие белки, что благоприятствует такому фенотипическому подходу. Кроме того, он не зависит от пути/мишени (и, следовательно, не зависит от гипотез) и предоставляет дополнительную информацию о токсичности клеток или вмешательстве в дифференцировку мышц.

Сообщалось о значительных различиях в уровнях экспрессии DUX4 между клетками, полученными от разных доноров. Поэтому линии мышечных клеток, полученные от разных доноров, были тщательно охарактеризованы, и для первичного скрининга была выбрана оптимальная клеточная линия. Окрашивание миобластов MyoD подтвердило прочную миогенность всех клеточных линий (Rudnicki et al., 1993; cell 75 (7): 1351-9). После оптимизации параметров была установлена процедура обнаружения DUX4, которую можно было применить в скрининговом анализе, в результате которого был получен ожидаемый образец DUX4 в клетках FSHD, но не в мышечных трубках здоровых доноров. Как показано на Фиг. 1, он включает ядерную локализацию DUX4 только с несколькими положительными клетками и градиент интенсивности через DUX4-положительные ядерные кластеры, как также описано Rickard et al., (2015, DOI: 10.1093/hmg/ddv315).

***Пример 2 - Скрининговый анализ для выявления репрессии DUX4***

Считывание количественного анализа было разработано на основе компьютерного анализа изображений (script-based image analysis). Клетки окрашивали согласно примеру 1, также используя DAPI для обнаружения миоядер и антитело против тяжелой цепи миозина (МНС) для визуализации образования мышечных трубок. Для анализа изображений был разработан автоматизированный сценарий (script), позволяющий обнаруживать ядра, границы миотрубок и сигналы DUX4, при этом сценарий также обнаруживает артефакты для уменьшения ложноположительных сигналов. Сценарий позволял выполнять несколько определенных считываний, включая количество положительных ядер DUX4 и кластеров ядер, индекс слияния, площадь миотрубки, ширину миотрубки и длину скелета миотрубки (см. Фигура 2). Кроме того, общее количество ядер было включено в качестве меры потери клеток или токсичности соединения. Скрипт был проверен путем оценки эндогенной экспрессии DUX4 в первичных мышечных трубках, и результаты соответствовали литературным значениям, при этом количество ядер, экспрессирующих DUX4, составляло <0,5%.

Анализ был усовершенствован для целей скрининга. Качество анализа зависело от

линии донорских клеток. Число положительных ядер DUX4 было характерным для каждой линии донорских клеток и было постоянным между экспериментами. Для миниатюризации анализа до 384-луночного формата были выбраны наиболее эффективные клеточные линии с точки зрения количества ядер, экспрессирующих DUX4, воспроизводимости и Z-фактора, что позволяло проводить автоматический скрининг больших библиотек соединений. Линия клеток с повторами 2 D4Z4 была выбрана для первичного скрининга, а линия клеток с повторами 6 D4Z4 была выбрана для более поздней проверки. Первичный скрининговый анализ имел Z-фактор 0,6, что доказывает его превосходное качество (Zhang et al., 1999, doi: 10.1177/108705719900400206; см. Фигура 3).

Библиотека соединений, содержащая приблизительно 5000 аннотированных соединений, была проверена анализом с высоким содержанием/разрешением (high-content assay). Для этого первичные миобласты высевали в 384-луночные планшеты, после чего питательную среду заменяли средой для дифференцировки. После 3 дней дифференцировки клетки обрабатывали соединениями библиотеки (в двух экземплярах на разных планшетах для скрининга) в течение 15 часов, после чего их фиксировали и окрашивали антителами против DUX4, антителами против тяжелой цепи миозина (MHC) и DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол). На основе скрипта-сценария анализа были получены данные об экспрессии DUX4 (количество DUX4-положительных ядер или интенсивность DUX4) и о потенциальной токсичности (индекс слияния и количество ядер). Результаты показаны на Фиг. 4. Большинство из примерно 200 совпадений было подтверждено в эксперименте с использованием того же анализа в 5 повторях. Эти соединения были выбраны для дальнейшего профилирования зависимости реакции от концентрации.

Половина этих совпадений была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР. На основе экспрессии мРНК DUX4 и нижестоящих генов-мишеней Trim43 и ZScan4 с использованием в качестве эталона генов hGUSB, GAPDH, hRPL27 установлена очень хорошая корреляция между репрессией DUX4 в иммуноцитохимическом анализе (уровень белка) и анализе RT-PCR (мРНК уровень). Это говорит о том, что подавляющее большинство попаданий имеют восходящий способ действия, то есть они действуют путем ингибирования экспрессии DUX4 (в отличие от ускорения деградации DUX4).

ОТ-ПЦР выполняли, как описано Lemmers et al. (2010, DOI: 10.1126/science.1189044), с использованием олигонуклеотидов, заказанных в Applied Biosystems (Фостер-Сити, США), по возможности, используя наборы для анализа (для hGAPDH (приложение): AssayID Hs02758991\_g1; для hTRIM43 (приложение): Assay ID Hs00299174\_m1; для hMYH2\_tv1-2 (приложение): AssayID Hs00430042\_m1). Другие олигонуклеотиды показаны в Таблице 1.

*Таблица 1 - праймеры и зонды для использования в ПЦР*

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
hDUX4 прямой	CCCGGCTGACGTGCAA	1

hDUX4 обратный	AGCCAGAATTTACGGAAGAAC	2
hDUX4 проба/зонд	AGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCC	3
hGUSB прямой	TTCCCTCCAGCTTCAATGACA	4
hGUSB обратный	CCACACCCAGCCGACAA	5
hGUSB проба/зонд	AGGACTGGCGTCTGCGGCA	6
hRPL27 прямой	TGTCCTGGCTGGACGCTACT	7
hRPL27 обратный	GAGGTGCCATCATCAATGTTCTT	8
hRPL27 проба/зонд	CGGACGCAAAGCTGTCATCGT	9
hZSCAN4 прямой	AGGCAGGAATTGCAAAGACTTT	10
hZSCAN4 обратный	AATTTTCATCCTTGCTGTGCTTTT	11
hZSCAN4 проба/зонд	TAGGATCTTTCACTCATGGCTGCAACCA	12
hMYOG прямой	GCTCACGGCTGACCCTACA	13
hMYOG обратный	CACTGTGATGCTGTCCACGAT	14
hMYOG проба/зонд	CCCACAACCTGCACTCCCTCACCT	15

**Пример 3 - Ингибиторы СК1 действуют как репрессоры DUX4**

Утвержденный анализ был использован для скрининга аннотированной библиотеки соединений, содержащей приблизительно 5000 соединений, для выявления новых механизмов действия на репрессию DUX4. Эта библиотека содержала соединения с аннотированной фармакологией, включающей не только первичную фармакологию соединений, но также потенциально известную полифармакологию. Первичный скрининг позволил получить множественные совпадения, выявив соединения, которые снижали количество положительных ядер DUX4. Хиты были дополнительно профилированы путем построения кривых концентрация-ответ. Применяя биоинформатический подход к набору данных скрининга и профилирования, изобретатели неожиданно обнаружили, что соединения с аннотацией СК1 были значительно обогащены в популяции фенотипически активных соединений, то есть в группе соединений, вызывающих репрессию DUX4. Интересно, что ни одно из исходных соединений с аннотацией СК1 не имело СК1 в качестве своей основной фармакологической мишени, и каждое соединение имело другие высокоэффективные мишени из других семейств белков. Таким образом, биоинформатический анализ был важен для идентификации ассоциации между репрессией СК1 и DUX4.

Профилированные соединения были отмечены как фенотипически активные, когда они показали зависящий от концентрации эффект на DUX4 (ингибирование или

активация). Из этого числа соединения, которые показали ингибирование индекса слияния или общего числа ядер более чем на 10%, были исключены, если эффект на эти показания не был по крайней мере в 5 раз менее сильным, чем эффект на DUX4. Таким образом, из 4790 уникальных соединений 188 соединений были классифицированы как фенотипически активные, 162 из которых были ингибиторами DUX4.

Для фенотипически активных соединений исходные целевые аннотации были дополнены дополнительной общедоступной информацией (литература, патентные заявки, базы данных поставщиков и т. д. ). Были рассмотрены все человеческие белки и ортологи, не относящиеся к человеку, для которых может быть установлено отображение на протеоме человека. Затем каждое из 4790 соединений оценивали по этим целевым аннотациям, классифицируя каждую цель как активную или неактивную для данного соединения. Для фенотипически активных соединений аннотированные мишени были классифицированы как активные, если эффективность соединения в отношении мишени была  $\leq 10$  раз чем фенотипическая эффективность, в противном случае цель была классифицирована как неактивная. Этот анализ показал, что приблизительно 201 цель была связана с фенотипической активностью при уровне ложного обнаружения 0,05. Обогащение соединениями, аннотированными как ингибиторы СК1, обнаружено в группе фенотипически активных соединений.

**Пример 4 - Изоформы СК1 экспрессируются в первичных мышечных клетках FSHD**

Для подтверждения целевой экспрессии как в здоровых мышечных клетках, так и в мышечных клетках FSHD, использовали метод секвенирования РНК для определения экспрессии различных изоформ СК1 в первичных мышечных трубках от 4 разных доноров FSHD и от 4 разных здоровых доноров. Результаты показывают экспрессию всех изоформ СК1 как в FSHD, так и в здоровых мышечных клетках. Наивысшая экспрессия показана для - СК1  $\alpha$ , СК1  $\delta$  и СК1  $\epsilon$  (см. Таблицу 2).

*Таблица 2 - экспрессия изоформ казеинкиназы 1 в 4 здоровых первичных клеточных линиях и в 4 первичных клеточных линиях FSHD, как определено секвенированием РНК дифференцированных мышечных трубок*

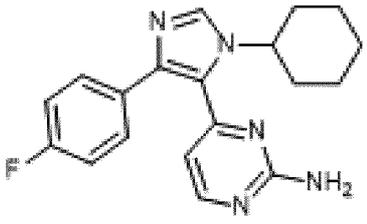
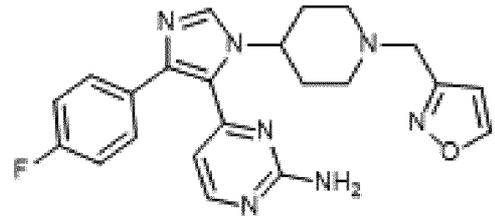
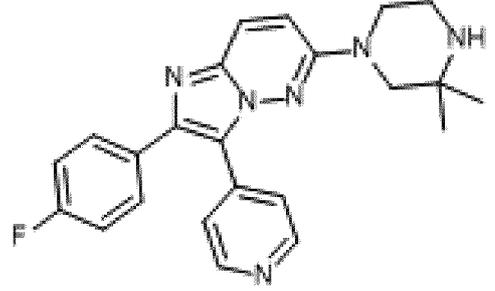
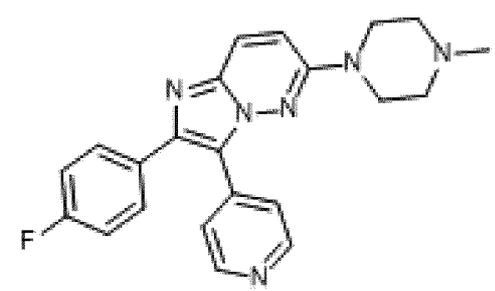
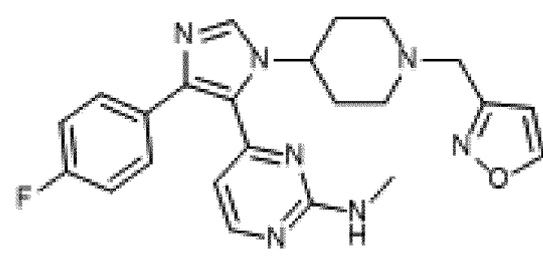
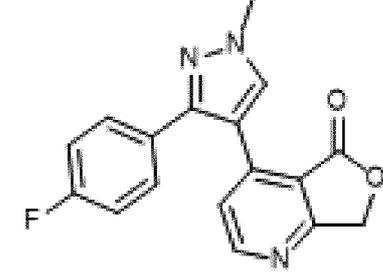
	CSNK1A1	CSNK1D	CSNK1E	CSNK1G1	CSNK1G2	CSNK1G3
FSHD	134	159.1	160.1	49.9	81.8	37.9
FSHD	122.5	138.4	136.8	4.2	79.1	32.7
FSHD	176.7	170.6	120.5	69.8	65.8	41.3
FSHD	118.2	134	105.6	41.8	63.5	38.1
Здоровый	138.9	168.5	188	45.8	75.9	35.8
Здоровый	143.3	174.1	200.7	49.6	81.8	36.3
Здоровый	139.2	192.8	176.1	51.9	71.4	33.2
Здоровый	119.1	132.4	122.4	40.6	65.9	40.1

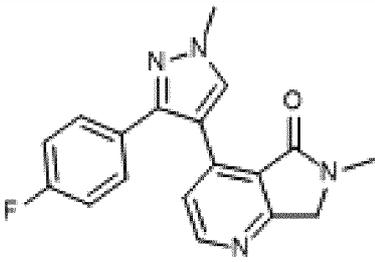
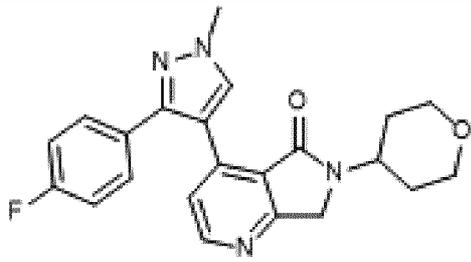
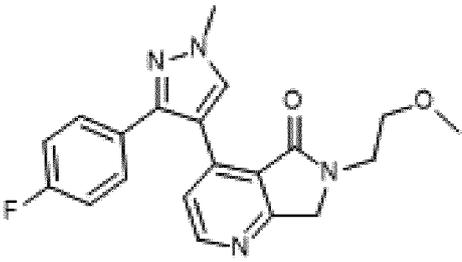
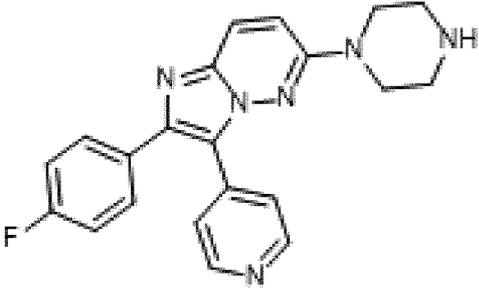
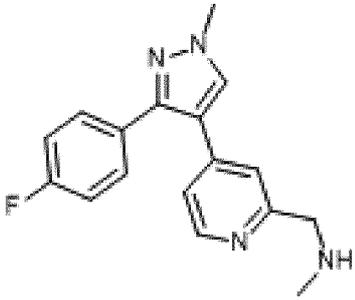
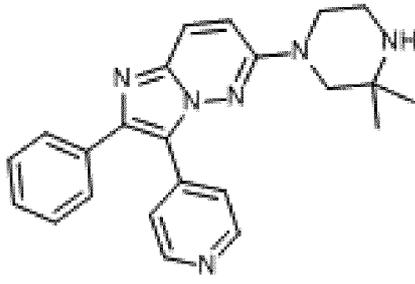
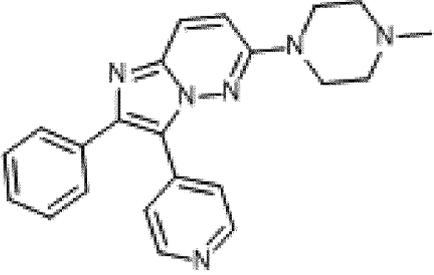
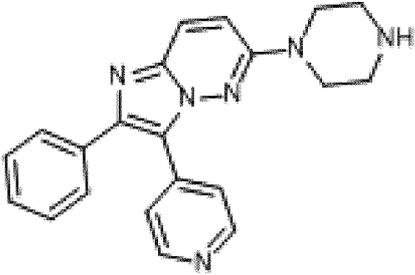
**Пример 5 - Ингибирование СК1 репрессирует DUX4**

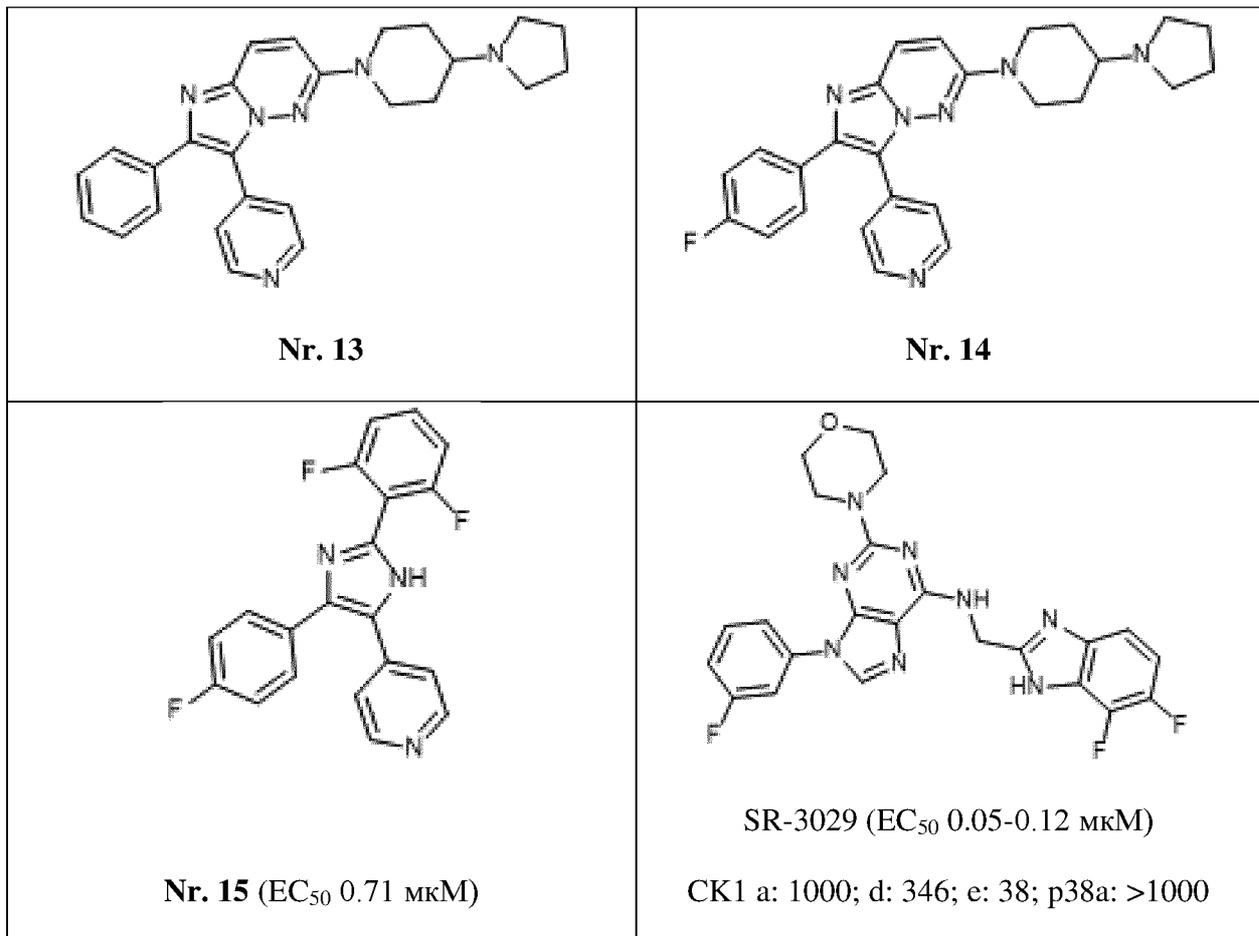
Репрессию DUX4 ингибиторов СК1 анализировали в соответствии с протоколом Примера 2, проиллюстрированным на Фиг. 4А. В Таблице 3 показаны структуры ингибиторов СК1, которые используются на Фиг. 5. Соединения инкубировали с

первичными клетками FSHD в течение 15 часов, как показано стрелкой на Фиг. 4А. Результаты показаны на Фиг. 5, а в Таблице 3 показаны значения половинной максимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ). В Таблице 3 также показаны определенные значения  $IC_{50}$  в нМ для СК1 $\alpha$ , СК1 $\delta$ , СК1 $\epsilon$ , and p38 $\alpha$ , обозначенных как СК1a, d, e и p38a, соответственно.

Таблица 3 - Типичные ингибиторы СК1 для использования согласно изобретению вместе с половинными максимальными эффективными концентрациями ( $EC_{50}$ ) для репрессии DUX4, полученными в 15-часовом протоколе лечения.

 <p>PF-670462 (<math>EC_{50}</math> 0.43 мкМ)</p> <p>СК1 a: 320; d: 29.1; e: 99.8; p38a: 32.4</p>	 <p>PF-5006739 (<math>EC_{50}</math> 0.31 мкМ)</p> <p>СК1 a: 123; d: 19.8; e: 26.8; p38a: 74.3</p>
 <p>Nr. 1 (<math>EC_{50}</math> 0.04 мкМ)</p> <p>СК1 a: 29.5; d: 18.5; e: 12.4; p38a: 13.2</p>	 <p>Nr. 2 (<math>EC_{50}</math> 2 мкМ)</p>
 <p>Nr.3 (<math>EC_{50}</math> 1.1-1.4 мкМ)</p>	 <p>Nr.4 (<math>EC_{50}</math> 1.4 мкМ)</p> <p>СК1 a: 644; d: 33.1; e: 51.6; p38a: 569</p>

 <p><b>Nr.5</b> (EC<sub>50</sub> 1.9-3.1 μM)</p> <p>CK1 a: 592; d: 30.7; e: 83.6; p38a: 1110</p>	 <p><b>Nr.6</b> (EC<sub>50</sub> 1.5-2.6 μM)</p> <p>CK1 a: 561; d: 18; e: 72.4; p38a: 677</p>
 <p><b>Nr.7</b> (EC<sub>50</sub> 1.7-4.5 μM)</p> <p>CK1 a: 2590; d: 41.8; e: 92.1; p38a: 712</p>	 <p><b>Nr. 8</b> (EC<sub>50</sub> 0.01-0.046 μM)</p> <p>CK1 a: 22; d: 16.5; e: 9.41; p38a: 14.8</p>
 <p><b>Nr. 9</b> (EC<sub>50</sub> 3.1-5.5 μM)</p> <p>CK1 a: 1760; d: 57.7; e: 89; p38a: 3070</p>	 <p><b>Nr. 10</b></p>
 <p><b>Nr. 11</b></p>	 <p><b>Nr. 12</b></p>



Выбранные соединения свинца также тестировали *in vivo* на модели ксенотрансплантата мыши. С этой целью человеческие первичные миобласты FSHD инъецировали в мышцу Tibialis Anterior мыши. Эти человеческие клетки затем дифференцировались в мышечные трубки, во время которых происходит дерепрессия DUX4. Выбранное соединение с хорошими фармакокинетическими свойствами, обеспечивающее воздействие выше EC<sub>50</sub>, наблюдаемого *in vitro*, вызывало репрессию экспрессии мРНК DUX4 в этой модели ксенотрансплантата на животных, как было установлено с помощью ОТ-ПЦР и гистологического исследования.

***Пример 6 - Пониженный индекс слияния миотрубок коррелирует с пониженными сигналами DUX4***

В эксперименте по проверке достоверности анализа изобретатели определили (им показалось это интересным), что таковое напрямую отражало считывание счетчика DUX4 из анализа, демонстрируя, что небольшие эффекты на слияние могут иметь прямое влияние на количество DUX4, обнаруживаемое в анализе (Фиг.6).

***Пример 7 - Ингибиторы CK1 не ингибируют слияние мышечных трубок***

Поскольку экспрессия DUX4 увеличивается при дифференцировке пролиферирующих миобластов FSHD в многоядерные миотрубки *in vitro* (Balog et al., 2015 Epigenetics.2015; 10 (12): 1133-42), ингибирование дифференцировки может приводить к ложноположительному эффекту репрессии DUX4.

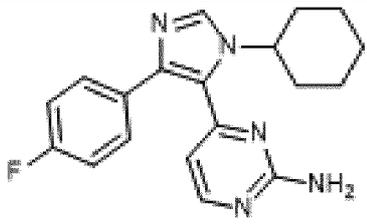
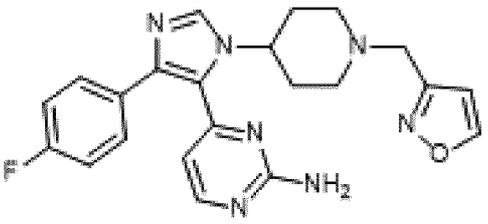
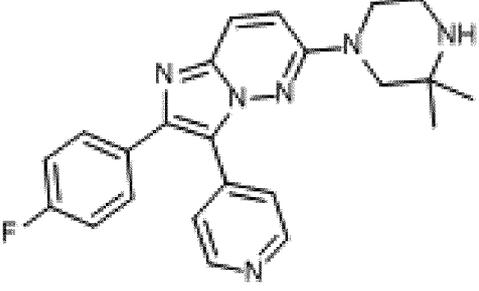
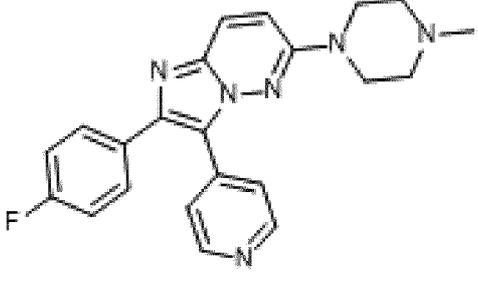
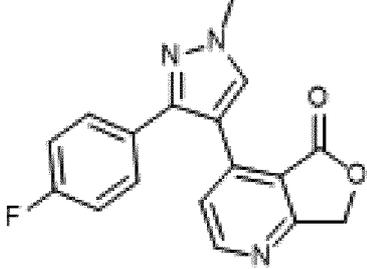
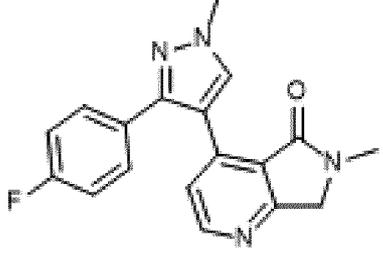
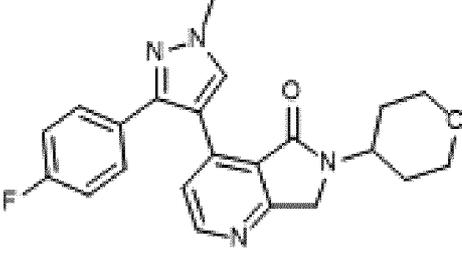
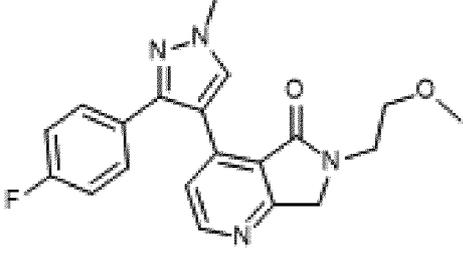
Ингибиторы бромо- и экстратерминальных доменов (BET), такие как

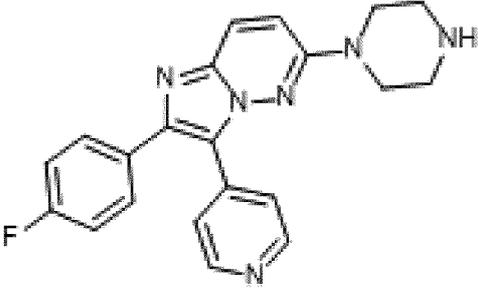
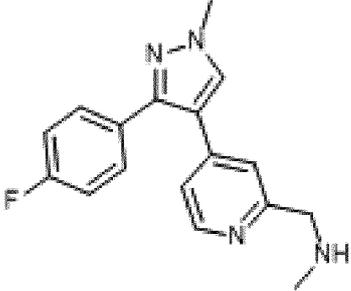
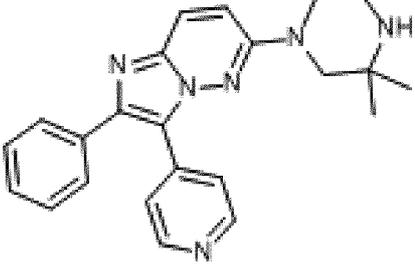
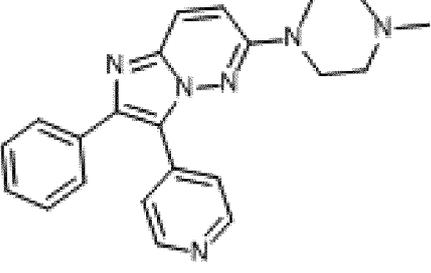
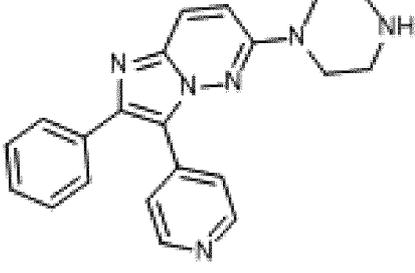
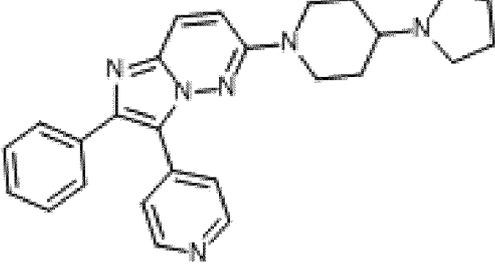
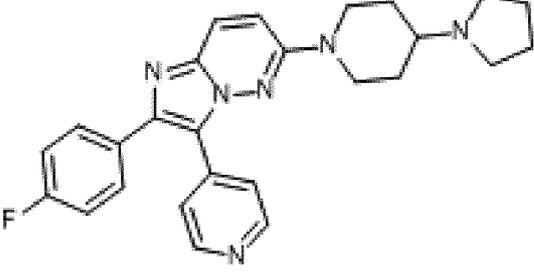
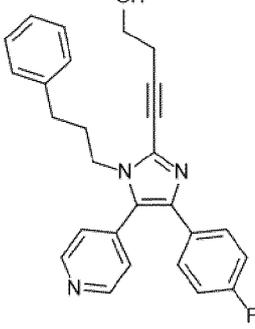
неселективный ингибитор (+)JQ1 или BRD4-селективный ингибитор RVX-208, могут ингибировать экспрессию DUX4 в иммортализованных дифференцированных культурах миотрубок (см. US2015087636A1). Было показано, что когда дифференцирующиеся мышечные трубки подвергались действию (+)JQ1 в начале процесса дифференцировки, то есть с момента, когда ростовая среда была заменена на среду дифференцировки, экспрессия тяжелой цепи миозина (MYH2, маркер дифференцировки) была снижена, что позволяет предположить, что ингибитор также влияет на процесс дифференцировки. Оба (+)JQ1 и RVX-208 были оценены в фенотипическом анализе, описанном в этой заявке. Сообщалось также, что агонисты бета2-адренорецептора подавляют экспрессию DUX4 в дифференцирующихся мышечных трубках (Campbell et al., 2017), а совсем недавно было показано, что для подавления слияния миотрубок (Chen et al., 2019, doi.org/10.1186/s13287-019-1160-x; Kim et al., 2019, doi.org/10.1080/19768354.2018.1561516). Мы оценили влияние как ВЕТ-ингибиторов, так и агонистов бета2-адренорецепторов на процесс слияния и сравнили с эффектом ингибитора СК1.

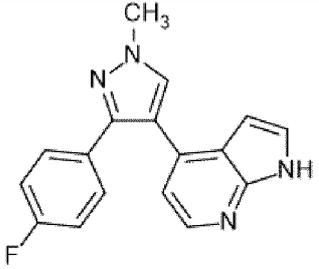
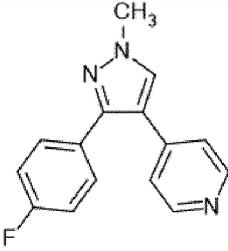
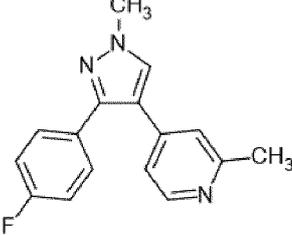
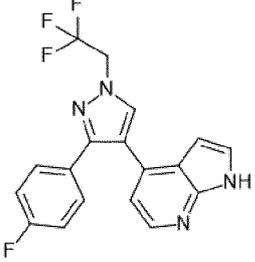
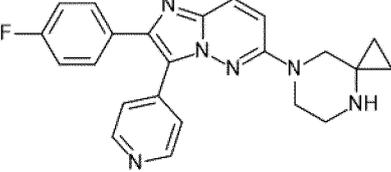
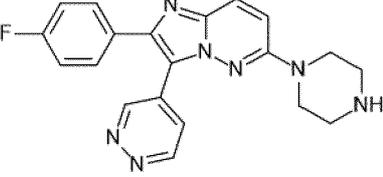
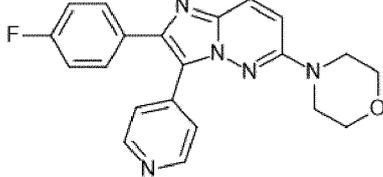
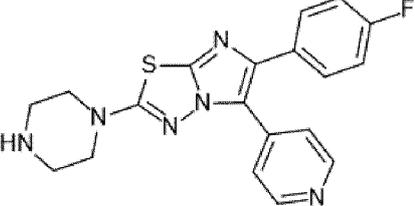
На Фигуре 7А показана экспериментальная установка Примера 2. Соединения вводят либо за 15 часов до фиксации, что напоминает исходный протокол скрининга, либо за 72 часа до фиксации (серая стрелка). В последнем случае соединения присутствуют на протяжении всего процесса дифференциации. Авторы изобретения обнаружили, что раннее введение ВЕТ-ингибитора (+)JQ1 (Фиг. 7В) и агонистов бета2-адренорецептора (Фиг. 7С, D, E) ингибирует процесс слияния и дифференцировку миобластов в мышечные трубки. На Фигуре 7F показано, что после обработки агонистом бета2-адренорецепторов (формотеролом) образования мышечной трубки не наблюдается. Это может привести к ложному положительному результату при оценке сигнала DUX4. Ингибитор ВЕТ RVX-208 не оказывал никакого эффекта на экспрессию DUX4, независимо от времени обработки (не показано). В то время как индекс слияния, по-видимому, не изменился в 15-часовой временной точке, за 15 часов эти соединения повлияли на процесс слияния мышечной трубки, как определено с помощью ОТ-ПЦР, показывающей ингибирование экспрессии маркера поздней дифференцировки тяжелой цепи миозина (Myh; не показано; праймеры были из набора hMYH2, описанного выше).

Как показано в Примере 5, ингибирование СК1 подавляет DUX4. Этот эффект возникает без ингибирования слияния миотрубок ни через 15 часов, ни через 72 часа обработки соединением (Фиг. 7G). В Таблице 4 показаны значения половинных максимальных эффективных концентраций (EC<sub>50</sub>) множества ингибиторов СК1 при ингибировании DUX4 в 72-часовом протоколе обработки соединением. В Таблице 4 также показаны определенные значения IC<sub>50</sub> в нМ для СК1 $\alpha$ , СК1 $\delta$ , СК1 $\epsilon$ , и p38 $\alpha$ , обозначенных как СК1 a, d, e и p38a, соответственно.

*Таблица 4 - Титичные ингибиторы СК1 для применения согласно изобретению вместе с половинными максимальными эффективными концентрациями (EC<sub>50</sub>). Значения EC<sub>50</sub> DUX4 были получены в 72-часовом протоколе обработки.*

 <p>PF-670462 (EC<sub>50</sub> 0.76 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 320; d: 29.1; e: 99.8; p38a: 32.4</p>	 <p>PF-5006739 (EC<sub>50</sub> 0.62 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 123; d: 19.8; e: 26.8; p38a: 74.3</p>
 <p><b>1</b> (EC<sub>50</sub> 0.04 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 29.5; d: 18.5; e: 12.4; p38a: 13.2</p>	 <p><b>2</b> (EC<sub>50</sub> 0.34 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 65; d: 29; p38a: 23</p>
 <p><b>Nr. 4</b> (EC<sub>50</sub> 4.8 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 644; d: 33.1; e: 51.6; p38a: 569</p>	 <p><b>Nr. 5</b> (EC<sub>50</sub> 6.7 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 592; d: 30.7; e: 83.6; p38a: 1110</p>
 <p><b>Nr. 6</b> (EC<sub>50</sub> 8.1 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 561; d: 18; e: 72.4; p38a: 677</p>	 <p><b>Nr. 7</b> (EC<sub>50</sub> 5.0 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 2590; d: 41.8; e: 92.1; p38a: 712</p>

 <p><b>Nr. 8</b> (<math>EC_{50}</math> 0.01-0.06 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 22; d: 16.5; e: 9.41; p38a: 14.8</p>	 <p><b>Nr. 9</b> (<math>EC_{50}</math> 6.4 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 1760; d: 57.7; e: 89; p38a: 3070</p>
 <p><b>Nr. 10</b> (<math>EC_{50}</math> 0.01 <math>\mu</math>M)</p>	 <p><b>Nr. 11</b> (<math>EC_{50}</math> 0.25 <math>\mu</math>M)</p>
 <p><b>Nr. 12</b> (<math>EC_{50}</math> 0.05 <math>\mu</math>M)</p>	 <p><b>Nr. 13</b> (<math>EC_{50}</math> 0.31 <math>\mu</math>M)</p>
 <p><b>Nr. 14</b> (<math>EC_{50}</math> 0.39 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 270; d: 45; p38a: 42</p>	 <p>RWJ 67657 (<math>EC_{50}</math>: 0.78 <math>\mu</math>M)</p> <p>CK1 a: 1830; d: 115; p38a: 15.9</p>

 <p><b>Nr. 16</b> (DUX4 EC<sub>50</sub>: 1.2 мкМ) CK1 a: 196; d: 16.9; p38a: 17.9</p>	 <p><b>Nr. 17</b> (EC<sub>50</sub>: 2.9 мкМ) CK1 a: 873; d: 36.1; p38a: 63.2</p>
 <p><b>Nr. 18</b> (EC<sub>50</sub>: 8.2 мкМ) CK1 a: 636; d: 46.5; p38a: 312</p>	 <p><b>Nr. 19</b> (EC<sub>50</sub>: 4.9 мкМ) CK1 a: 4020; d: 80.7; p38a: 449</p>
 <p><b>Nr. 20</b> (EC<sub>50</sub>: 2.2 мкМ) CK1 a: 186; d: 55.5; p38a: 50.3</p>	 <p><b>Nr. 21</b> (EC<sub>50</sub>: 0.1 мкМ) CK1 a: 61.4; d: 58.5; p38a: 28.9</p>
 <p><b>Nr. 22</b> (EC<sub>50</sub>: 1.1 мкМ) CK1 a: 194; d: 57.7; p38a: 411</p>	 <p><b>Nr. 23</b> (EC<sub>50</sub>: 2.4 мкМ) CK1 a: &gt;10000; d: 2090; p38a: 1250</p>
 <p><b>Nr. 24</b> (EC<sub>50</sub>: 0.48 мкМ) CK1 a: 331; d: 55.7; p38a: 21.7</p>	

**Пример 8 - Профиль ингибирования ингибиторов CK1**

Соединения PF-670462, PF-5006739, соединение E, соединение F, соединение D, соединение H, соединение A и SR3029 были проанализированы на их способность ингибировать CK1  $\alpha$ , CK1  $\delta$ , CK1  $\epsilon$ , и p38, и их одновременное подавление DUX4. Таблицы 5 и 6 показывают результаты ингибирования.

*Таблица 5 - ингибирование CK1 и p38 ингибиторами CK1 в нМ. Значения DUX4 EC50 были получены в 15-часовом протоколе лечения.*

IC <sub>50</sub> EC <sub>50</sub>	PF- 670462	PF- 5006739	5	6	4	8	1	SR- 3029
CK1 $\alpha$	320	123	592	561	644	33	30	>10k
CK1 $\delta$	29	20	31	18	33.1	22	19	346
CK1 $\epsilon$	100	27	84	72	51.6	16	12	381
p38	32	74	1110	677	569	25	13	>10k
DUX4	470 (n=4)	820 (n=12)	1890 (n=4)	2590 (n=2)	1410 (n=2)	10 (n=2)	50 (n=2)	50

*Таблица 6 - ингибирование CK1 и p38 ингибиторами CK1 в нМ. Значения DUX4 EC50 были получены в 72-часовом протоколе обработки.*

IC <sub>50</sub> EC <sub>50</sub>	CK1 $\alpha$	CK1 $\delta$	CK1 $\epsilon$	p38 $\alpha$	DUX4
PF-670462	320	29	100	32	760
PF-5006739	123	20	27	74	620
1	29	18	12	13	40
2	65	29		23	340
4	644	33	52	569	4800
5	592	31	84	1110	6700
6	561	18	72	677	8100
7	2590	42	92	712	5000
8	22	16	9	15	10
9	1760	58	89	3070	6400
10	Na	Na	Na	Na	10
11	Na	Na	Na	Na	250
12	Na	Na	Na	Na	50
13	Na	Na	Na	Na	310
14	270	45	Na	42	390
15	1830	115	Na	16	780
16	196	17	Na	18	1200
17	873	36	Na	63	2900
18	636	46	Na	312	8200
19	4020	81	Na	449	4900
20	186	55	Na	50	2200
21	61	58	Na	29	100
22	194	58	Na	411	1100
23	>10000	2090	Na	1250	2400
24	331	58	Na	22	480

**Пример 9 - Ингибиторы p38 ингибируют слияние первичных миобластов от доноров FSHD**

Поскольку экспрессия DUX4 увеличивается в зависимости от *in vitro* дифференцировки пролиферирующих миобластов FSHD в многоядерные миотрубки (Balog et al., 2015 Epigenetics.2015; 10 (12): 1133-42) ингибирование дифференцировки

может приводить к ложноположительному эффекту репрессии DUX4. Недавно было описано, что p38 ингибирует экспрессию мРНК DUX4, не влияя на маркеры миогенной дифференцировки MYOG и MYH2 (WO2019/071144 и WO2019/071147). Поскольку экспрессия этих маркеров не обязательно коррелирует со слиянием, мы проанализировали серию ингибиторов p38 в анализе с высоким содержанием (high content assay) и количественно оценили их влияние на экспрессию DUX4 и слияние мышечных трубок. Поскольку лосмапимод не оказывал никакого влияния на DUX4 ни на индекс слияния, когда его добавляли в течение последних 15 часов дифференцировки перед фиксацией (не показано), все эксперименты проводились путем введения соединений, когда среду роста заменяли средой для дифференцировки, 72 ч до фиксации клеток. Как показано на Фигуре 8, все протестированные ингибиторы p38 (лосмапимод, BMS-582949, пексметиниб или ARRY-614, BIRB796, SCIO469, PH797804, памапимод, LY2228820, R1487, SB-681323, VX-745, акумуляпимод, VX702) ингибировали индекс слияния, в значительной степени скрывающий эффекты DUX4, если таковые имелись. При использовании лосмапимода этот ингибирующий эффект на индекс слияния был подтвержден в первичной мышечной клетке FSHD от другого донора (не показано).

*Таблица 7. Значения IC<sub>50</sub> различных соединений p38 на p38a, CK1a и CK1d*

Соединение	p38 (нМ)	CK1a/CK1d (нМ)
Акумуляпимод	22	>10,000 / >10,000
AMG548	7	>10,000/452
BIRB795	99	>10,000 / >10,000
BMS-582949	65	>10,000 / >10,000
Лосмапимод	26	>10,000 / >10,000
LY2228820	14	>10,000/2780
Памапимод	16	>10,000 / >10,000
пексметиниб	17	>10,000 / >10,000
PH797804	7	>10,000 / >10,000
R1487	13	>10,000/9430
SB-681323	11	>10,000 / >10,000
SCIO469	16	>10,000 / >10,000
VX702	25	>10,000 / >10,000
VX745	29	>10,000 / >10,000

**Пример 10 - Ингибиторы P38 ингибируют слияние первичных миобластов здоровых доноров.**

Как показано на Фиг. 9, ингибирующее действие ингибиторов p38 не ограничивалось клеточными линиями FSHD. Первичную мышечную клетку здорового донора обрабатывали, как описано в Примере 2, за исключением того, что ей позволяли

дифференцироваться в течение пяти дней, а не 3 дней, для учета более продолжительного времени дифференцировки (время для достижения максимального индекса слияния). Лосмапимод добавляли при замене ростовой среды на среду для дифференцировки. В этих условиях лосмапимод явно ингибировал индекс слияния, что отражало ингибирование формирования многоядерных мышечных трубок.

***Пример 11. Ингибиторы СК1 защищают от ингибирования слияния, вызываемого ингибиторами р38 в первичных мышечных трубках.***

Как показано в Примерах 9 и 10, а также на Фиг. 10А, обработка дифференцирующихся первичных мышечных трубок ингибитором р38 (протокол 72 часа) предотвращает формирование ими многоядерных слитых мышечных трубок. Авторы изобретения обнаружили, что, когда клетки обрабатывают ингибитором р38 в присутствии ингибитора СК1, который сам по себе не ингибирует слияние мышечных трубок (Фиг.10 А, В, D, F), вредное воздействие на слияние можно, по крайней мере частично, предотвратить. На Фигуре 10А показано сравнение действия лосмапимода и различных ингибиторов СК1 на слияние при различных концентрациях. Когда миотрубки дифференцируются в присутствии увеличивающихся концентраций лосмапимода, либо отдельно, либо в присутствии соединения Nr.4, Nr.5 или Nr.8, из микроскопических изображений видно, что в присутствии соединения Nr.4, Nr.5 или Nr.8 образование мышечной трубки все еще не повреждено, и также не повреждено при более высоких концентрациях лосмапимода (Фигура 10 С, F, I). Аналогичным образом, Фиг. 10 (D, G, J) показывает, что лосмапимод обладает зависимым от концентрации ингибированием слияния мышечной трубки. Однако в присутствии ингибитора СК1 ингибирование слияния мышечных трубок лосмапимодом, по крайней мере частично, предотвращается. Это также очевидно из эксперимента, в котором одна комбинация ингибитора р38 лосмапимода сочетается с увеличивающимися концентрациями ингибитора СК1 (Фиг.10 К, L, M). Ингибирование слияния лосмапимодом зависит от концентрации ингибиторов СК1.

***Пример 12. Ингибирующий потенциал DUX4 ингибитором СК1 сохраняется в присутствии ингибитора р38.***

Когда ингибитор СК1 сочетается с увеличивающимися концентрациями лосмапимода, он не только защищает от ингибирования слияния мышечных трубок, но также сохраняет свою способность ингибировать DUX4 (Фиг. 11А, В, С). Более того, обработка первичных мышечных трубок FSHD комбинацией ингибитора СК1 и ингибитора р38 вызывает более сильное снижение DUX4, чем обработка только ингибитором СК1 (рис. 11А, В). Это менее очевидно для соединения Nr.8, поскольку оно уже вызывает почти максимальное ингибирование DUX4 в отсутствие ингибитора р38 (Фиг. 11С).

***Пример 13. Двойные ингибиторы СК1/р38 подавляют экспрессию DUX4, не влияя на формирование мышечной трубки.***

Защитный эффект ингибирования СК1 на слияние мышечных трубок также ясно

видно из профилей ингибиторов СК1, которые также ингибируют p38 (Таблица 6). Как показано для PF-670462 на Фиг. 7G2, эти двойные ингибиторы репрессируют DUX4 без ингибирования индекса слияния, демонстрируя, что они не влияют на формирование мышечной трубки.

### *Литература*

Balog et al., 2015 Epigenetics. 2015; 10(12):1133-42; Bergerat et al., 2017, DOI: 10.1016/j.prp.2016.11.015; Van den Boogaard et al., 2016, DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.03.013; Brockschmidt et al., 2008, DOI: 10.1136/gut.2007.123695; Campbell et al., 2017, DOI: 10.1186/s13395-017-0134-x; Chebib and Jo, 2016, DOI: 10.1002/cncy.21685; Eide EJ, Virshup DM, 2001, DOI:10.1081/CBI-100103963; Etchegaray JP et al., 2009, DOI:10.1128/MCB.00338-09; Geng et al., 2012, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.11.013; Kowaljow et al., 2007, DOI: 10.1016/j.nmd.2007.04.002; Lang et al., 2014, DOI: 10.14205/2310-8703.2014.02.01.1; Lemmers et al., 2010, DOI: 10.1126/science.1189044; Lilljebjörn & Fioretos, 2017, DOI: 10.1182/blood-2017-05-742643; Oyama et al., 2017 DOI: 10.1038/s41598-017-04967-0; Paz et al., 2003, DOI: 10.1093/hmg/ddg226; Rickard et al., 2015, DOI: 10.1093/hmg/ddv315; Rudnicki et al., 1993; cell 75(7):1351-9; Sharma et al., 2016, DOI:10.4172/2157-7412.1000303; Snider et al., 2010, DOI: 10.1371/journal.pgen.1001181; Stadler et al., 2013, DOI: 10.1038/nsmb.2571; Tawil et al., 2014, DOI: 10.1186/2044-5040-4-12; Vanderplanck et al., 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0026820; Wallace et al., 2011, DOI: 10.1002/ana.22275; Yao et al., 2014, DOI: 10.1093/hmg/ddu251; Yasuda et al., 2016, doi: 10.1038/ng.3535; Young et al., 2013, doi:10.1371/journal.pgen.1003947; Zhang et al., 1999, doi:10.1177/108705719900400206; Zhang et al., 2017, DOI:10.1038/ng.3691

WO2011051858/WO2012085721/WO2015119579/EP2949651/WO2009016286/US2005/0131012/WO2015195880/WO2014081923/US20140221313/ US2015087636A1

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Ингибитор казеинкиназы 1 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4, у субъекта, где субъект страдает воспалением мышц.

2. Ингибитор казеинкиназы 1 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4 у субъекта, где ингибитор казеинкиназы 1 предназначен для стимуляции миогенного слияния и/или дифференцировки, предпочтительно, где субъект страдает мышечным воспалением.

3. Ингибитор казеинкиназы 1 для применения по п.1 или 2, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, предпочтительно, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию, наиболее предпочтительно фациоскапуло-плечевую мышечную дистрофию (FSHD).

4. Ингибитор казеинкиназы 1 для применения по любому из пп.1-3, где ингибитор казеинкиназы ингибирует по меньшей мере казеинкиназу 1δ.

5. Комбинация ингибитора казеинкиназы 1 и ингибитора p38 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с экспрессией DUX4 у субъекта.

6. Комбинация для применения по п.5, где субъект страдает мышечным воспалением.

7. Комбинация для применения по п.5, где ингибитор казеинкиназы 1 предназначен для стимуляции миогенного слияния и/или дифференцировки, предпочтительно, где субъект страдает мышечным воспалением.

8. Комбинация для применения по любому из пп. 5-7, где ингибитор казеинкиназы 1 и ингибитор p38 представляют собой два разных вещества.

9. Комбинация для применения по любому из пп. 5-7, где ингибитор казеинкиназы 1 и ингибитор p38 являются одним и тем же веществом.

10. Комбинация для применения по любому из пп. 5-9, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой мышечную дистрофию или рак, предпочтительно где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, является мышечной дистрофией, наиболее предпочтительно фациоскапуло-плечевой мышечной дистрофией (МЛД).

11. Комбинация для применения по любому из пп. 5-10, где указанное заболевание или состояние, связанное с экспрессией DUX4, представляет собой FSHD.

12. Комбинация для применения по любому из пп. 5-11, где:

а) ингибитор p38 ингибирует по меньшей мере p38α, и/или

б) ингибитор казеинкиназы ингибирует по меньшей мере казеинкиназу 1δ.

13. Ингибитор казеинкиназы 1 для применения по любому из пп. 1-4 или комбинация для применения по любому из пп. 5-12, где экспрессия DUX4 снижена по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80% или более.

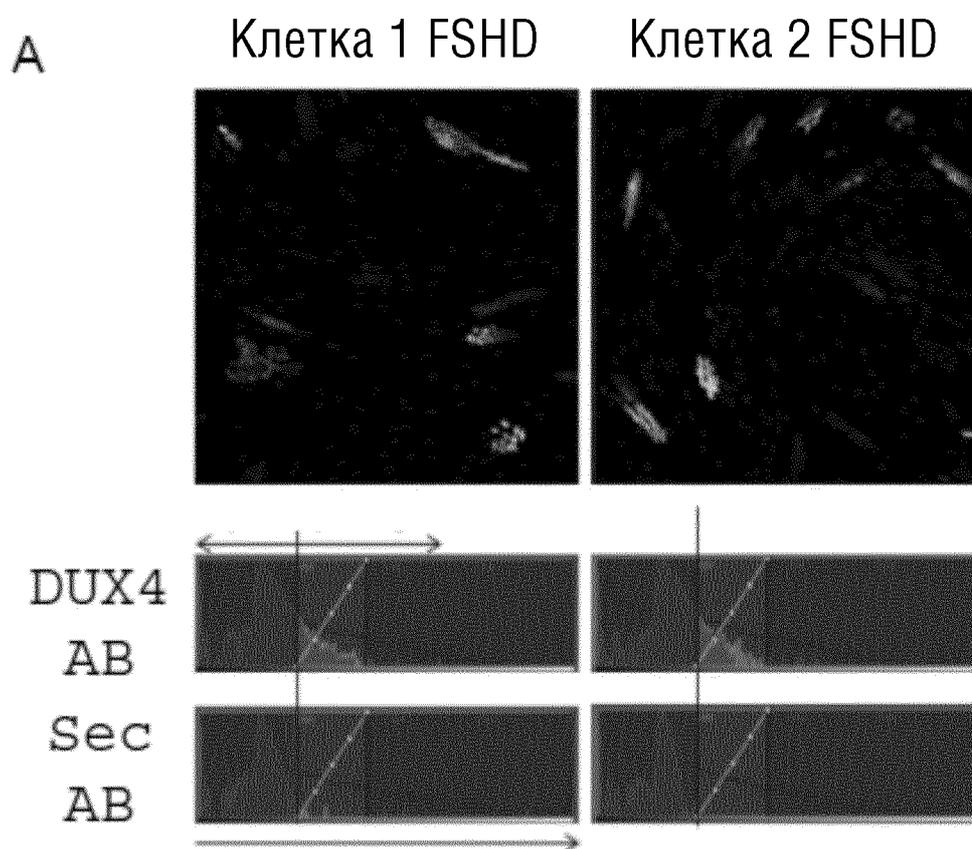
14. Способ *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* для стимулирования миогенного слияния

и/или дифференцировки, включающий стадию контактирования клетки с ингибитором казеинкиназы 1, как определено в любом из пп. 1-4, или с комбинацией, как определено в любом из пп. 5-12.

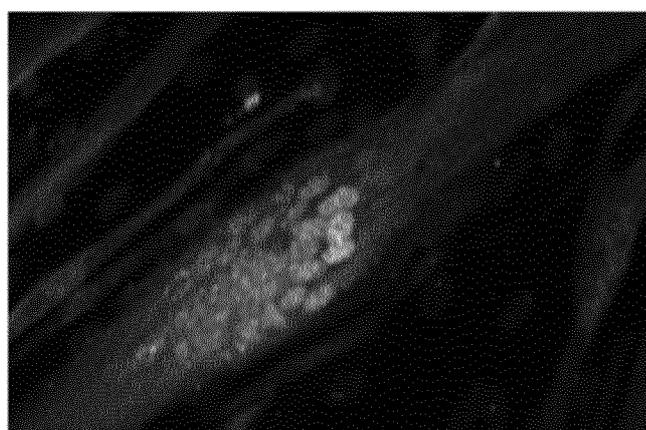
15. Способ снижения экспрессии DUX4 у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает стадию введения эффективного количества ингибитора казеинкиназы 1, как определено в любом из пп. 1-4, или комбинации, как определено в любом из пп. 5-12, где субъект страдает воспалением мышц, и при этом предпочтительно субъект страдает мышечной дистрофией, связанной с экспрессией DUX4, при этом наиболее предпочтительно мышечной дистрофией является FSHD.

По доверенности

ФИГ.1

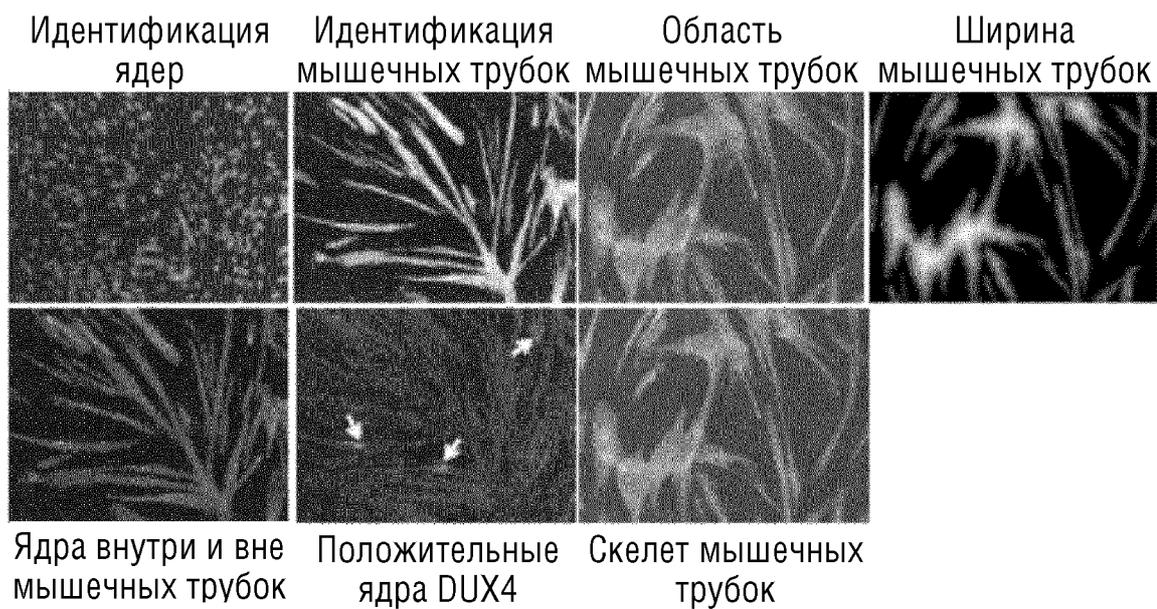


B

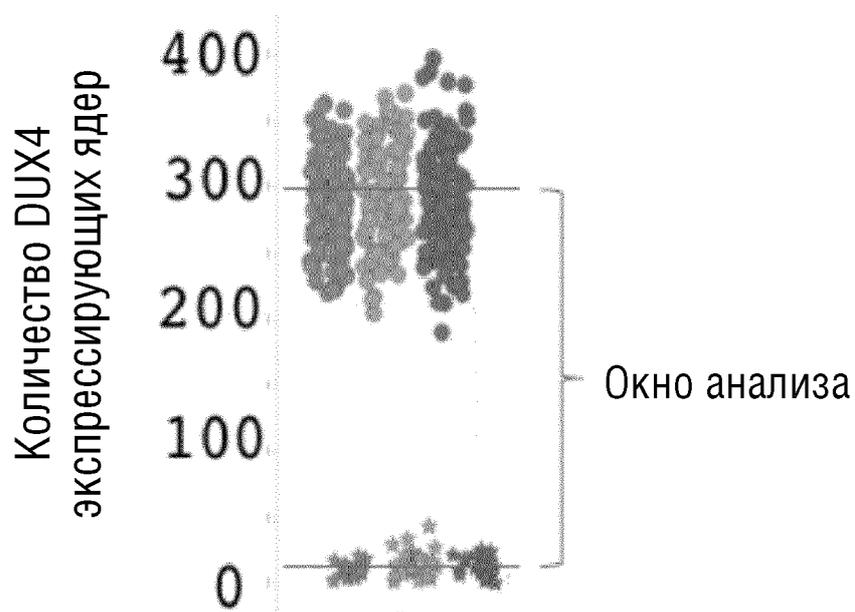


100 мкМ

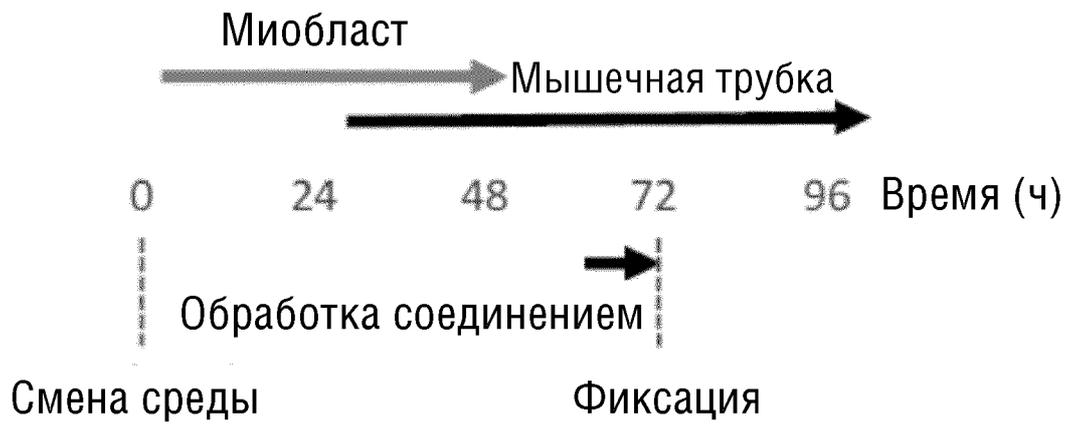
ФИГ.2



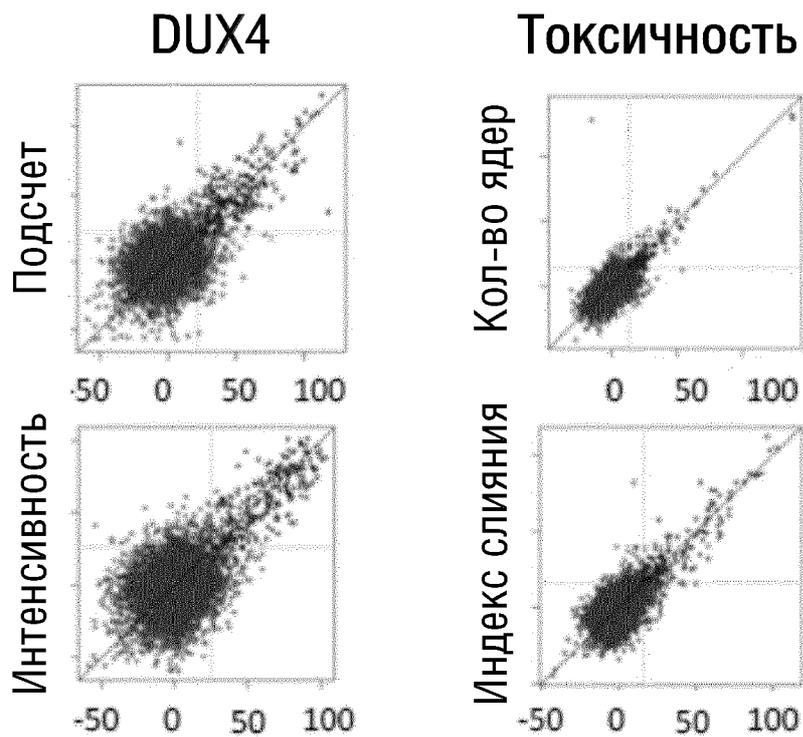
ФИГ.3



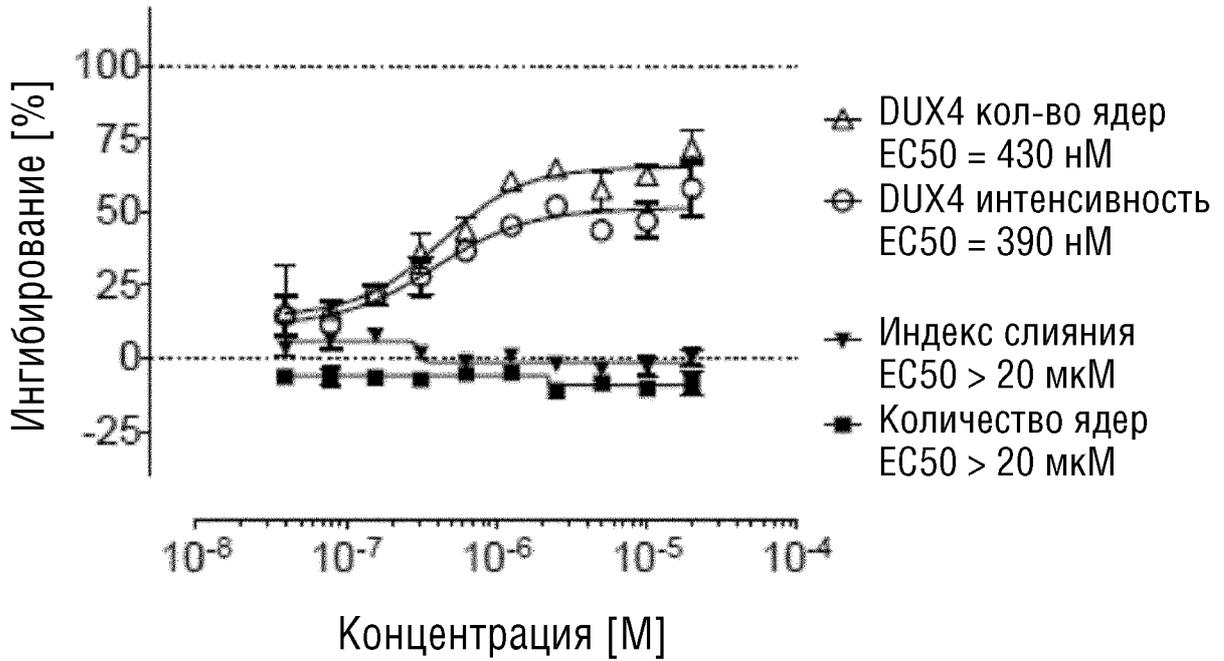
ФИГ.4А



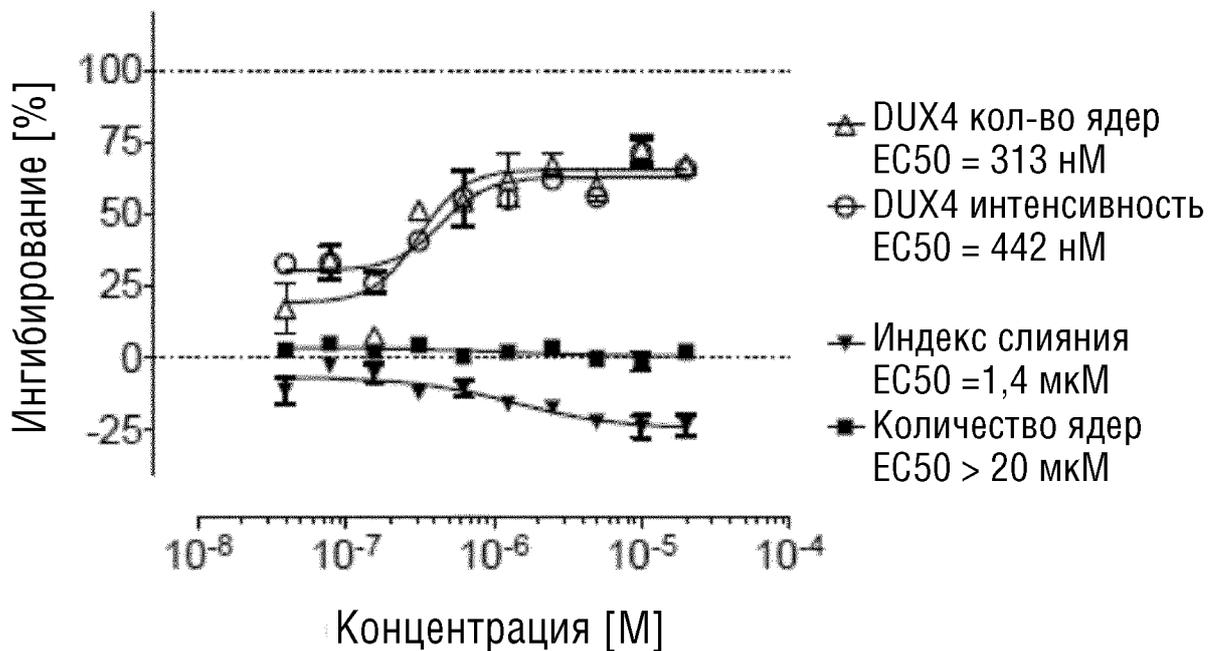
ФИГ.4В



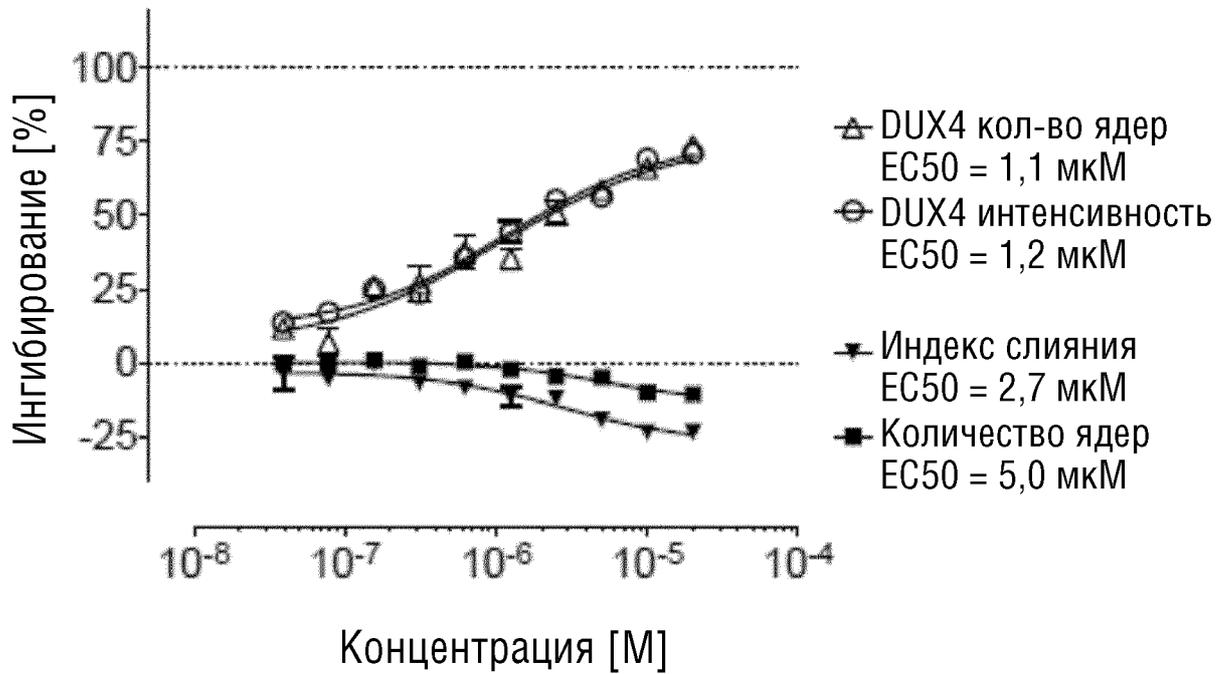
ФИГ.5А



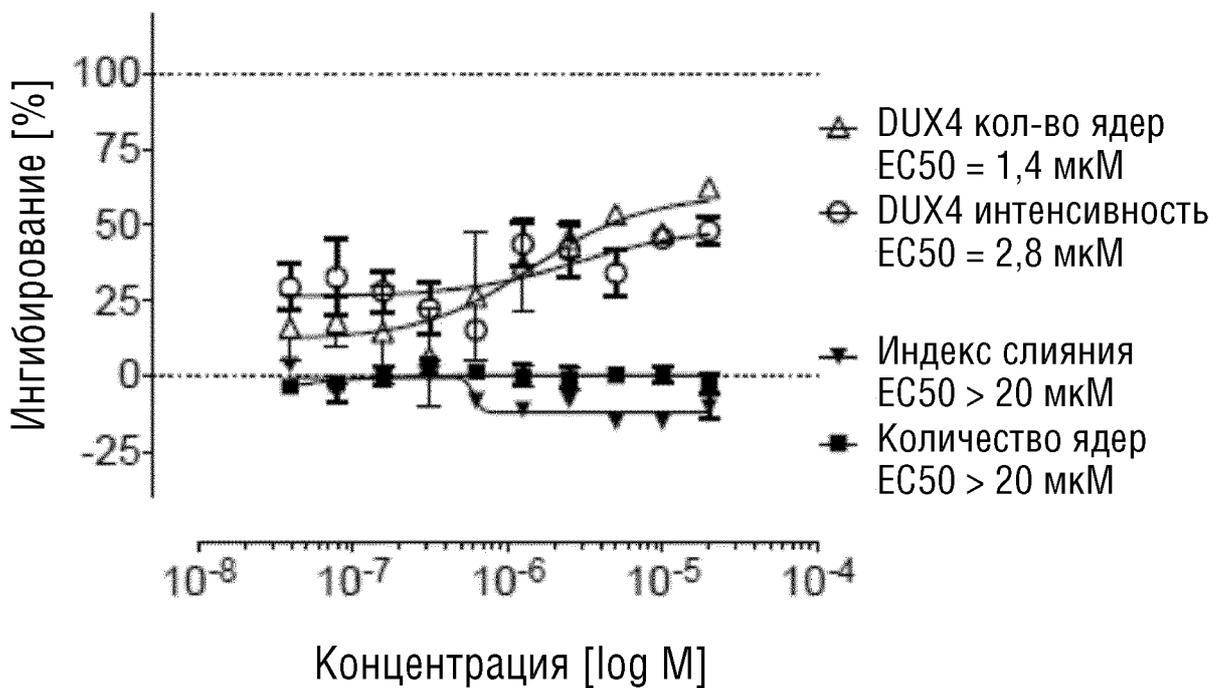
ФИГ.5В



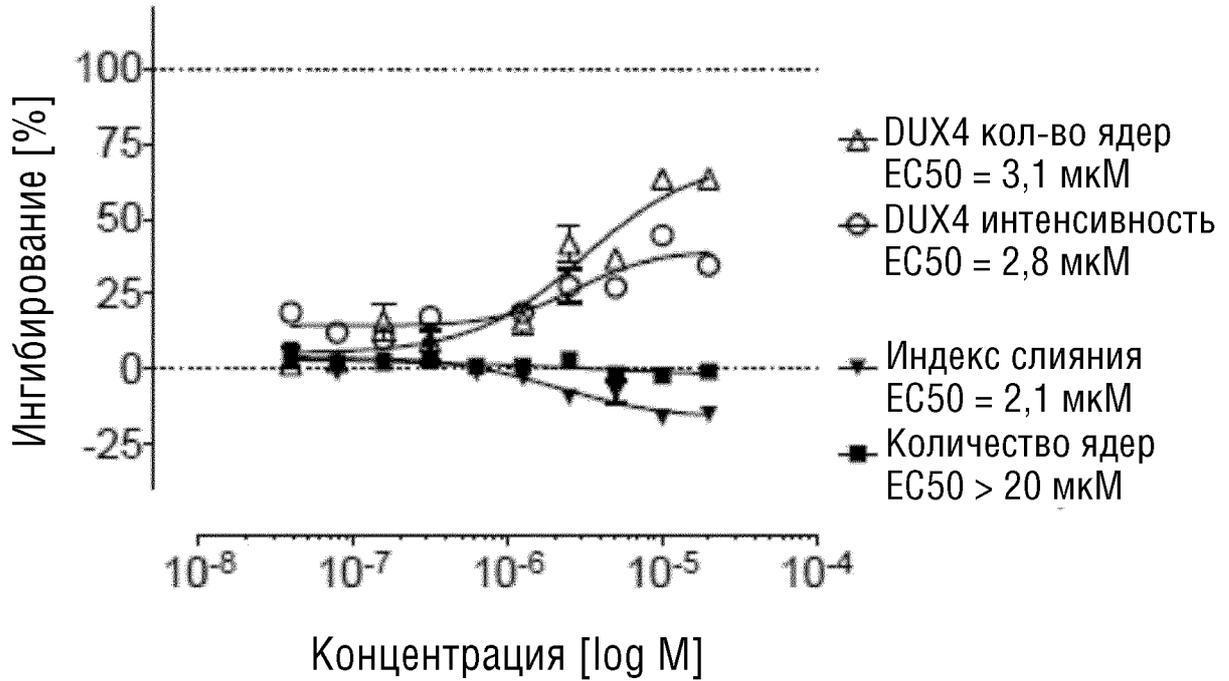
ФИГ.5С



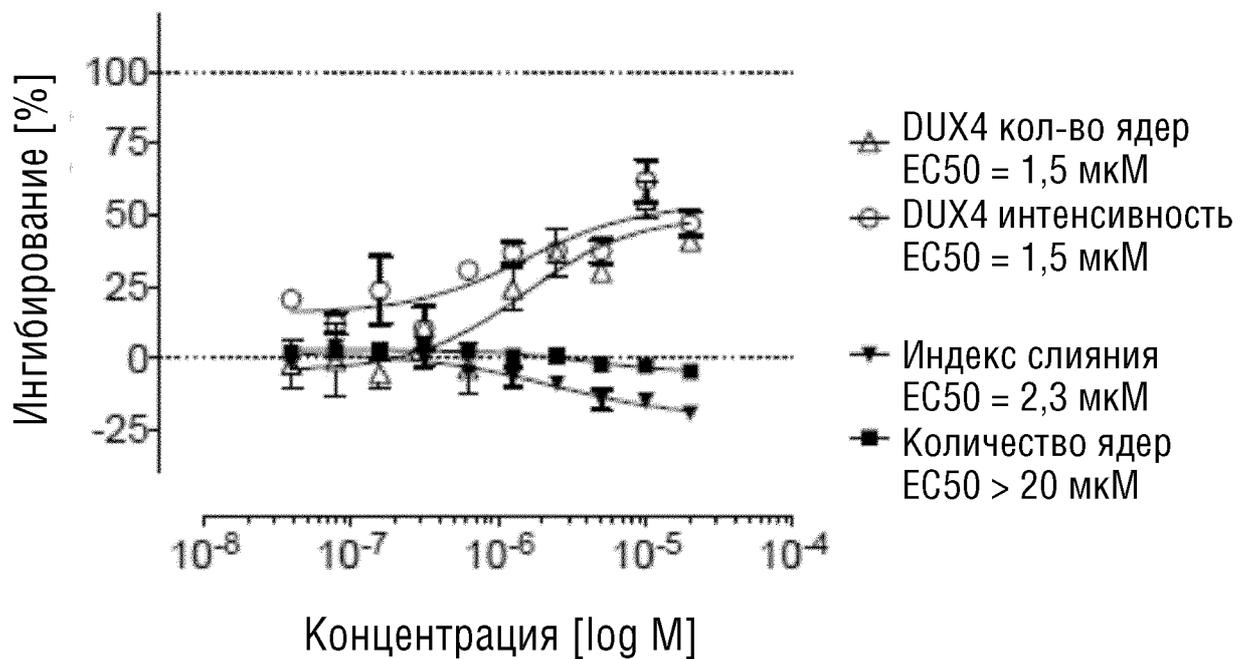
ФИГ.5D



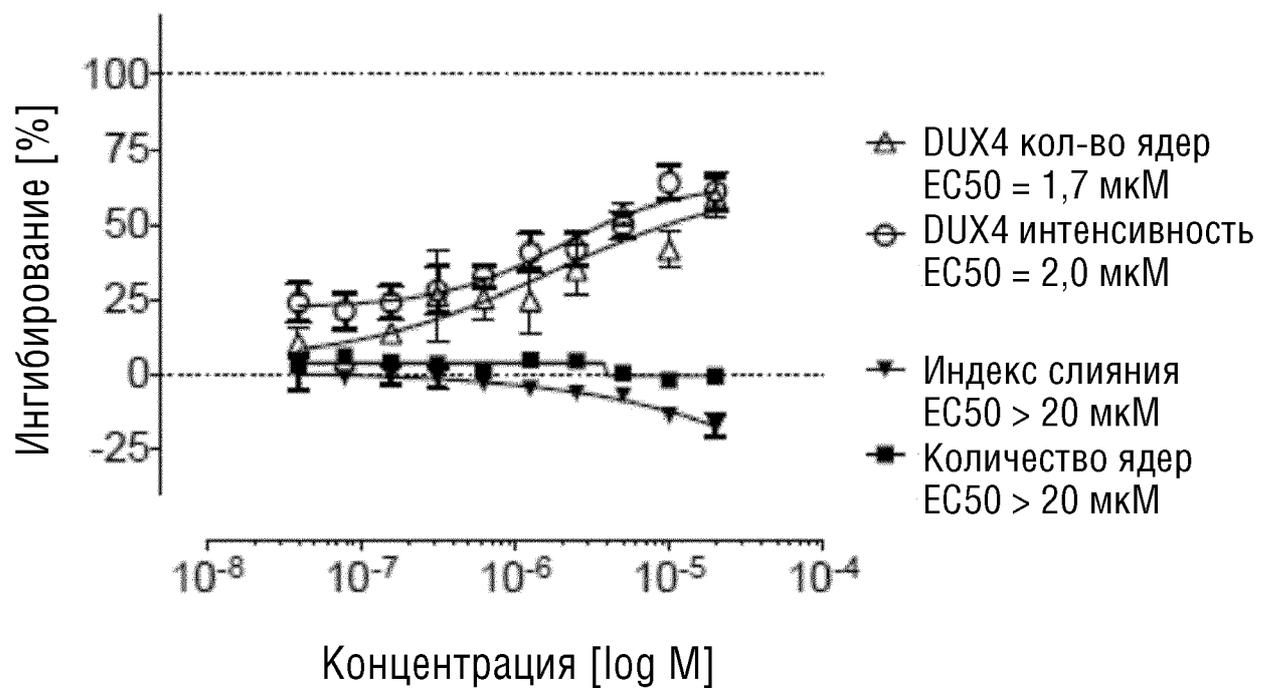
ФИГ.5Е



ФИГ.5F

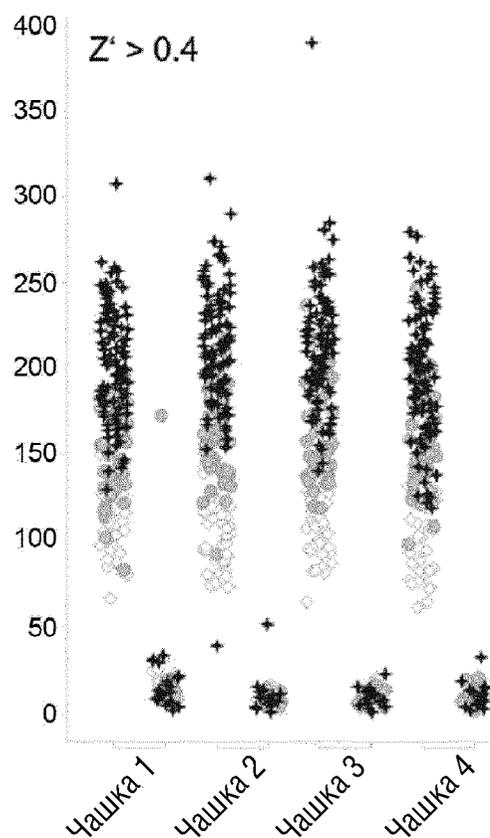


ФИГ.5G



# ФИГ.6

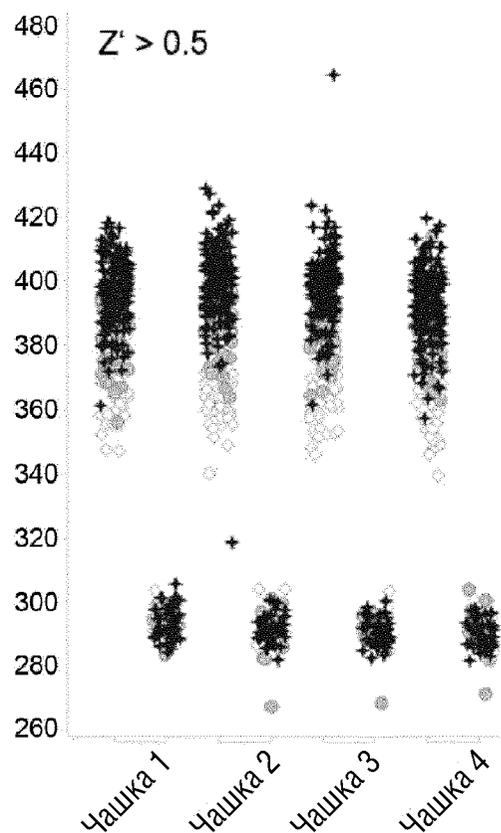
## DUX4-ПОЗИТИВ. ЯДРА



3 дня

Черные звездочки:  
внутренние лунки

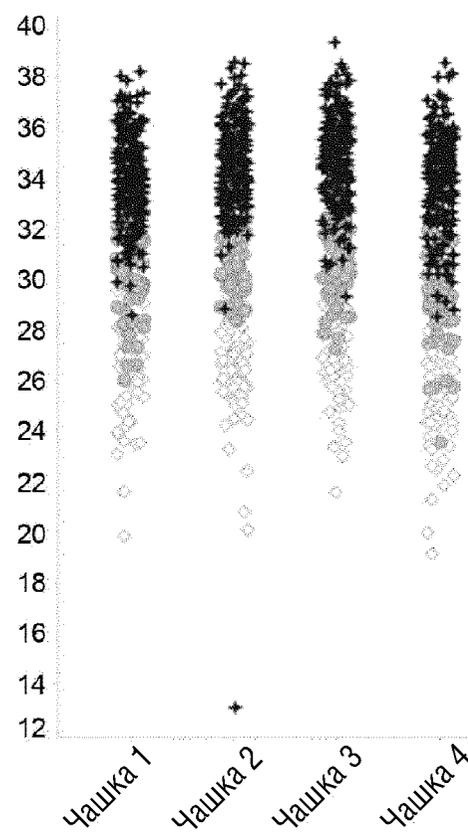
## DUX4-ИНТЕНСИВНОСТЬ



3 дня

Серые круги:  
2-е внешние лунки

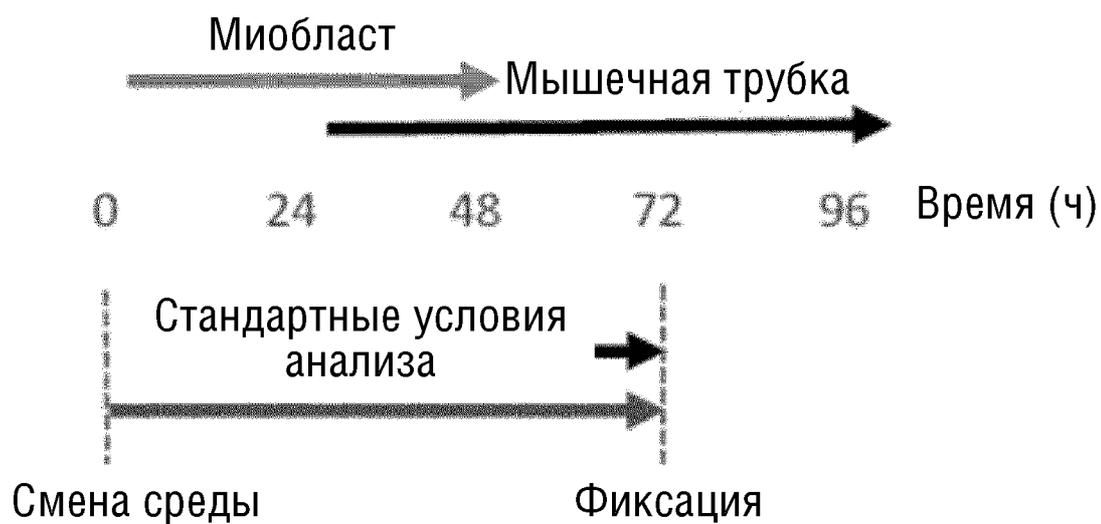
## ИНДЕКС СЛИЯНИЯ



3 дня

Белые ромбы:  
1-е внешние лунки

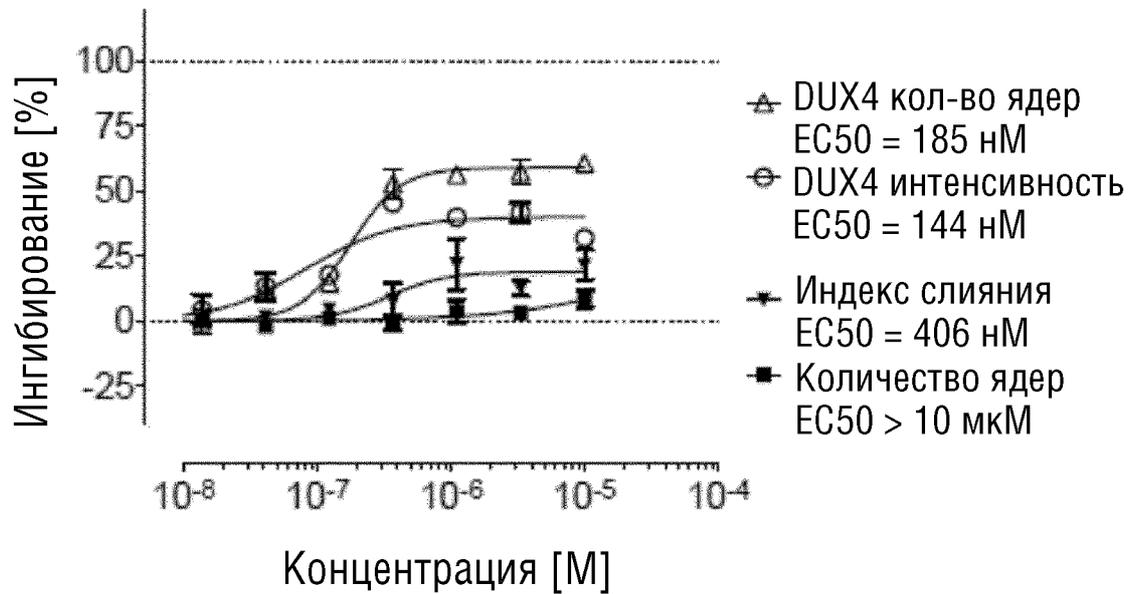
ФИГ.7А



10/31

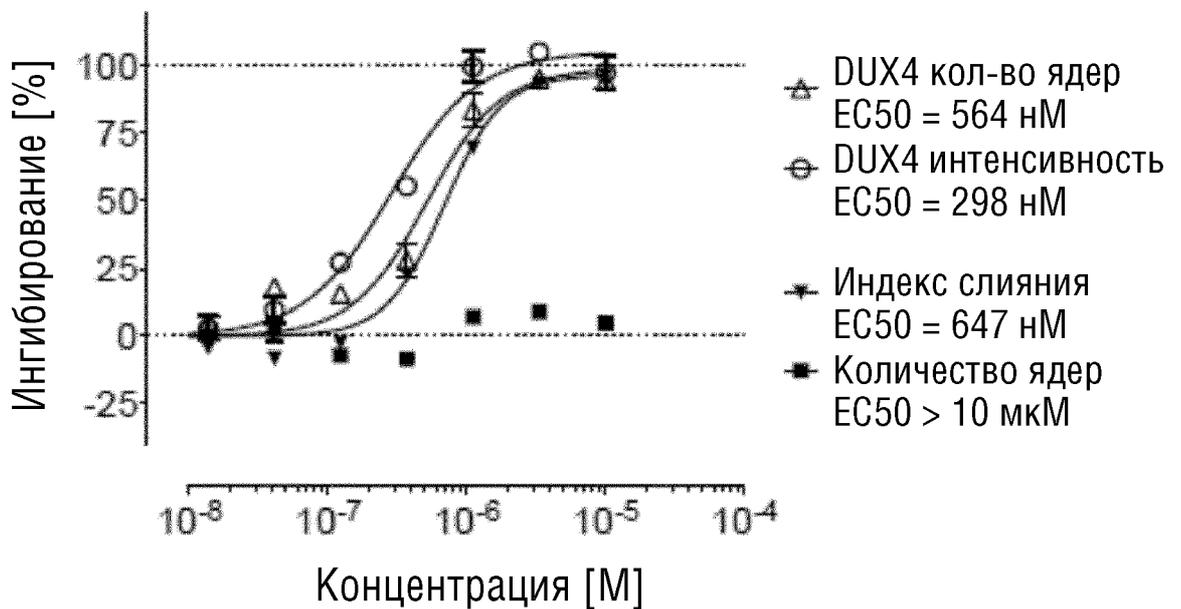
ФИГ.7В1

JQ1 - 15 ч



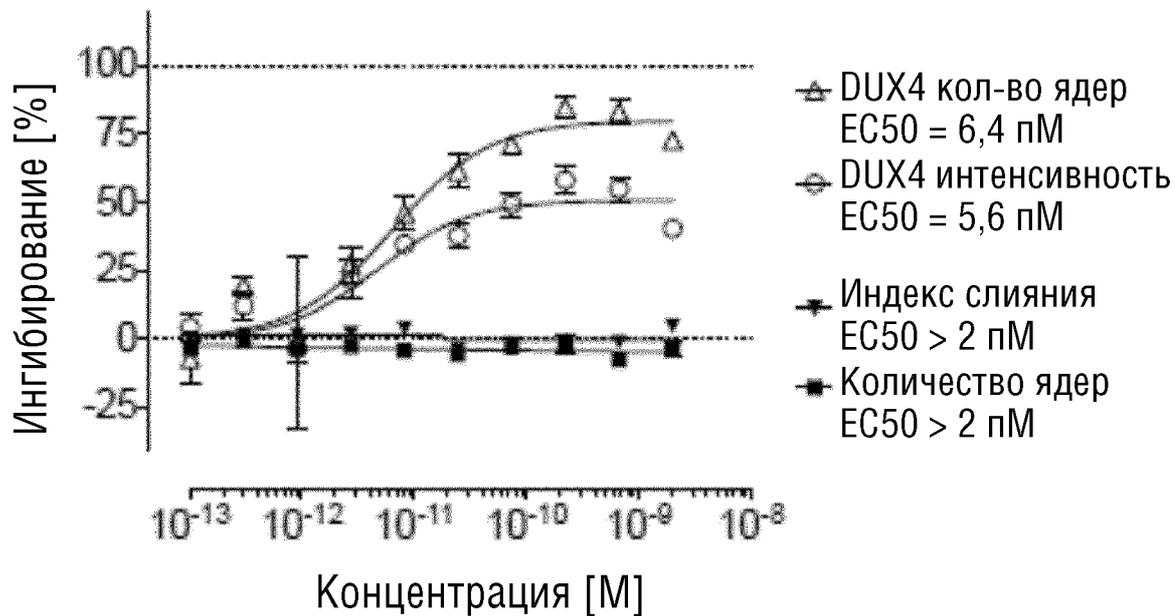
ФИГ.7В2

JQ1 - 72 ч



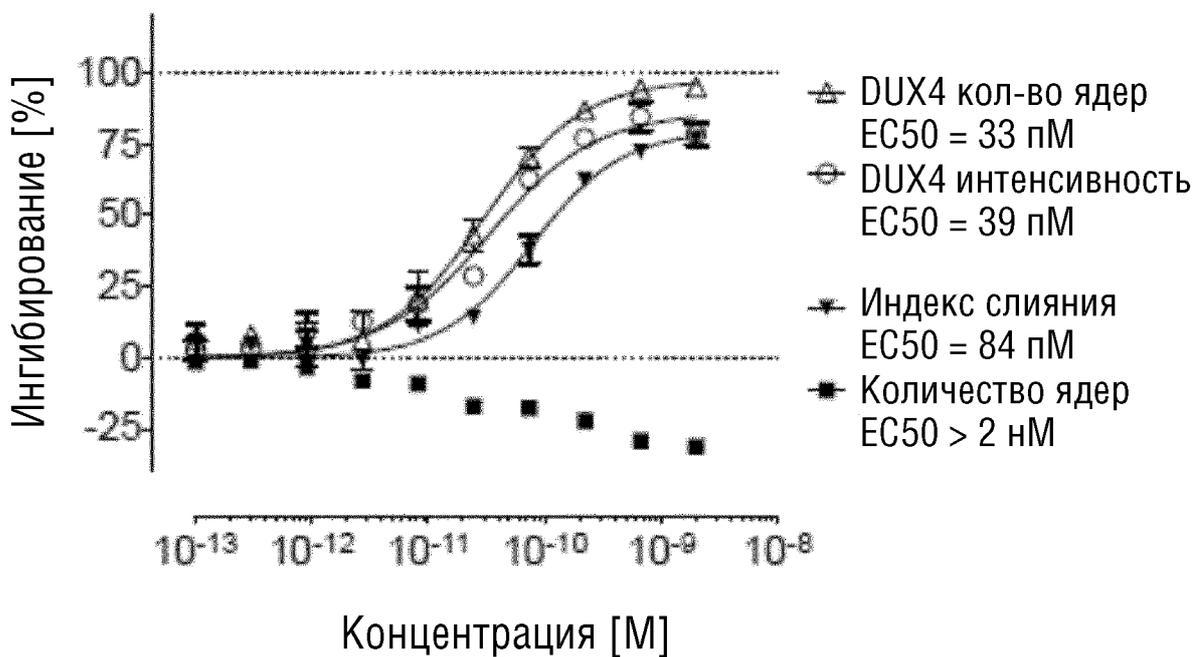
ФИГ.7С1

Формотерол - 15 ч



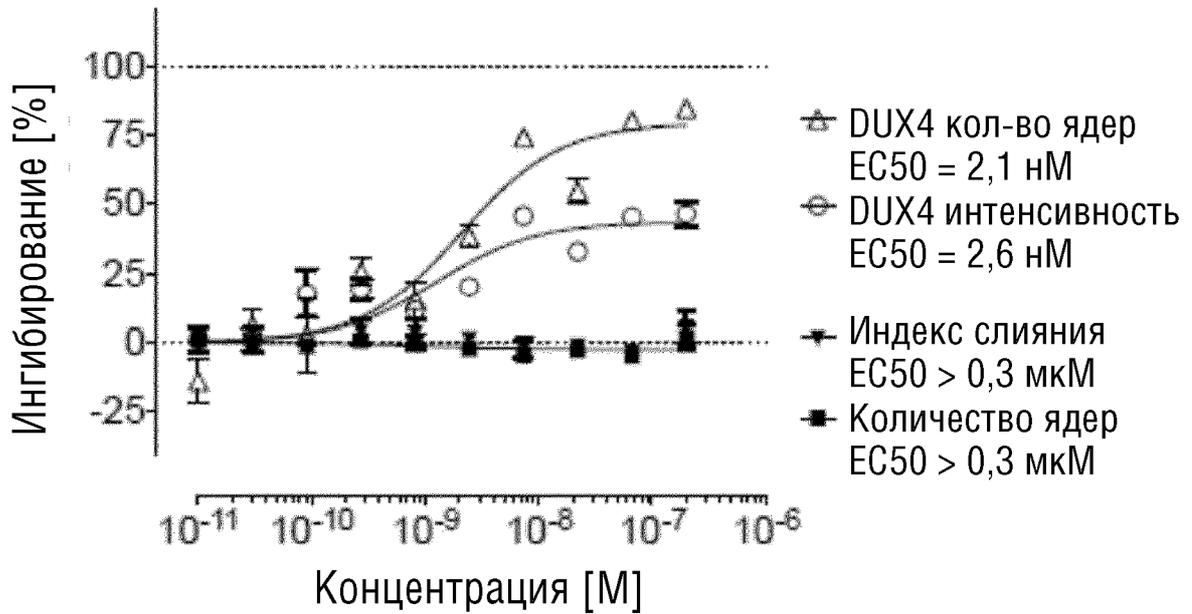
ФИГ.7С2

Формотерол - 72 ч



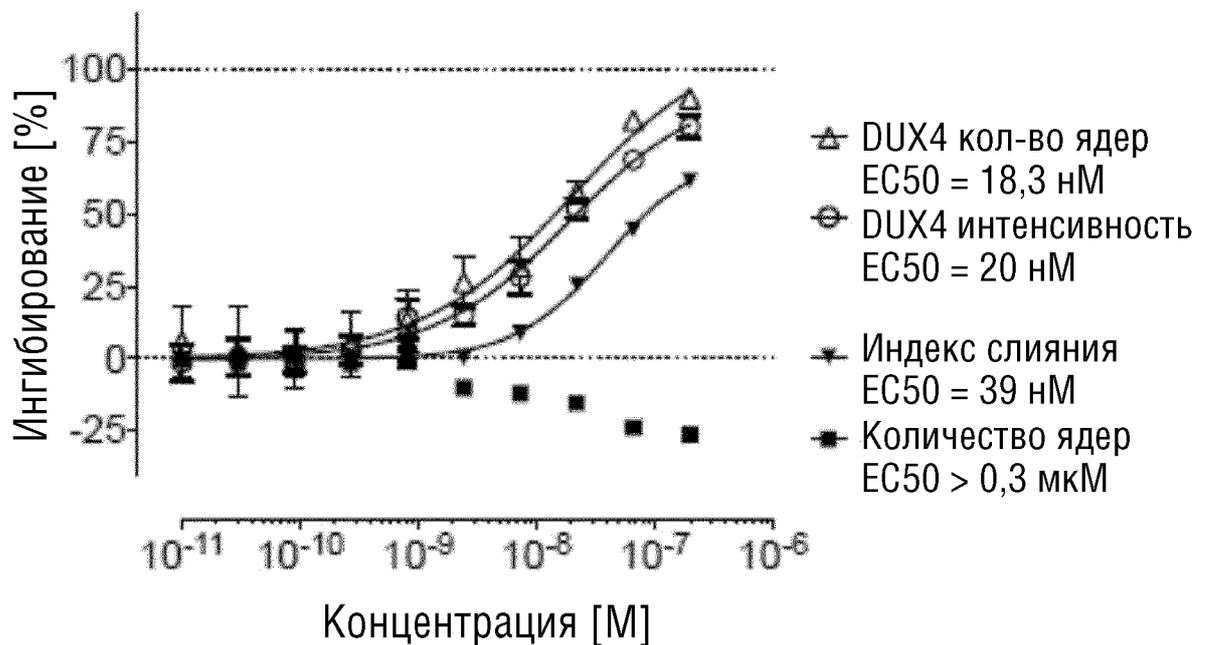
ФИГ.7D1

Сальбутамол - 15 ч



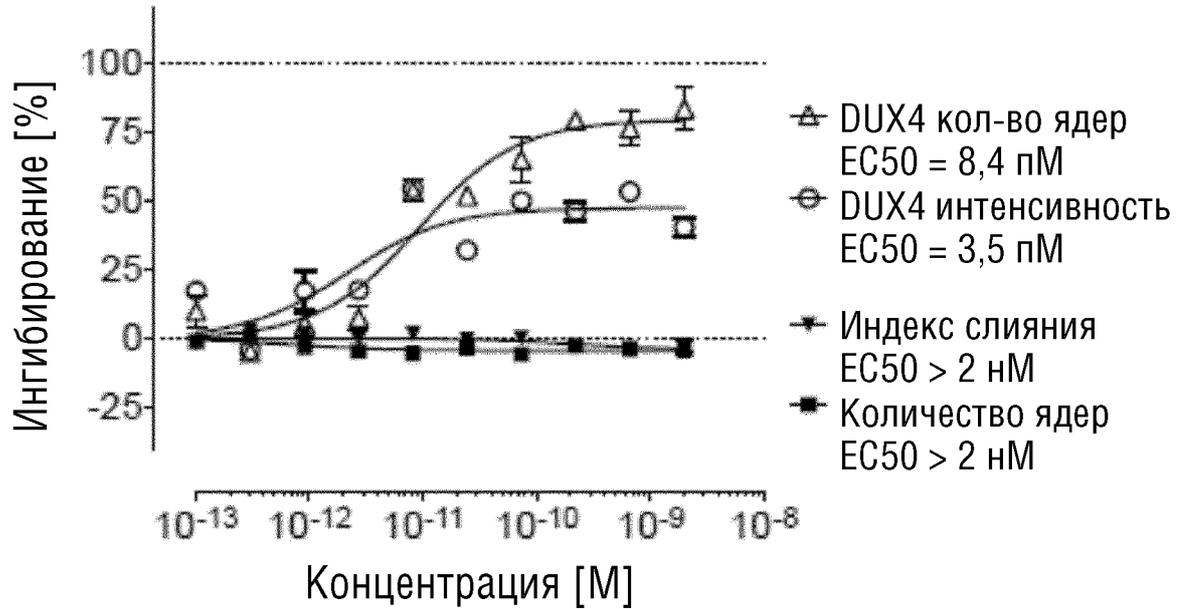
ФИГ.7D2

Сальбутамол - 72 ч



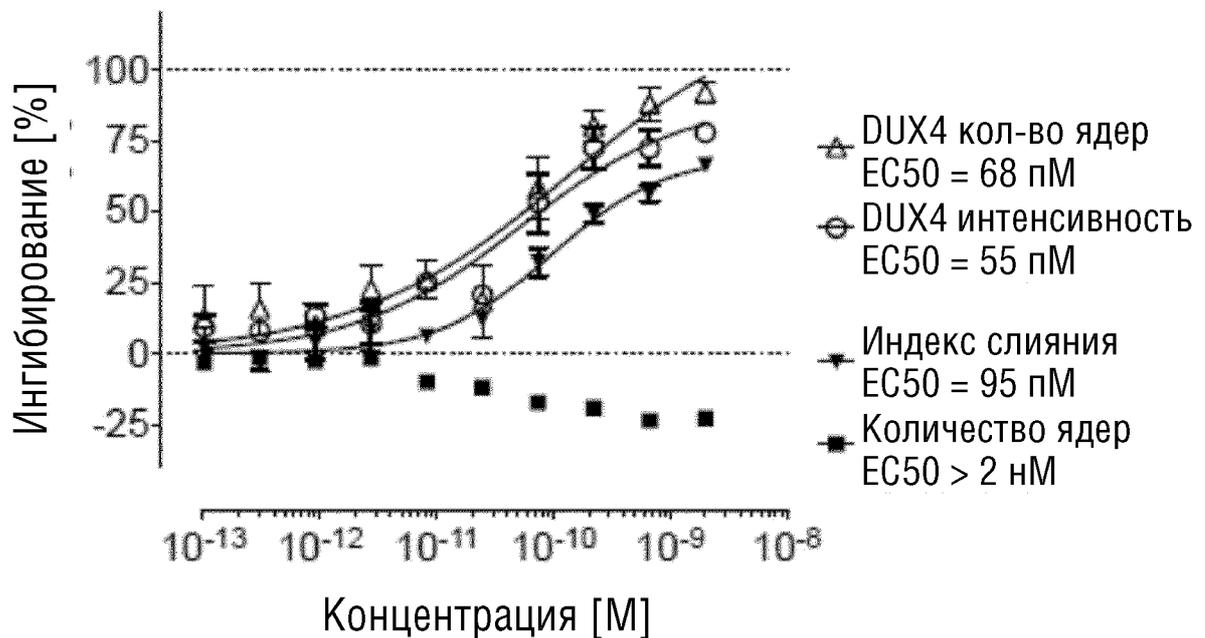
ФИГ.7Е1

Салметерол - 15 ч

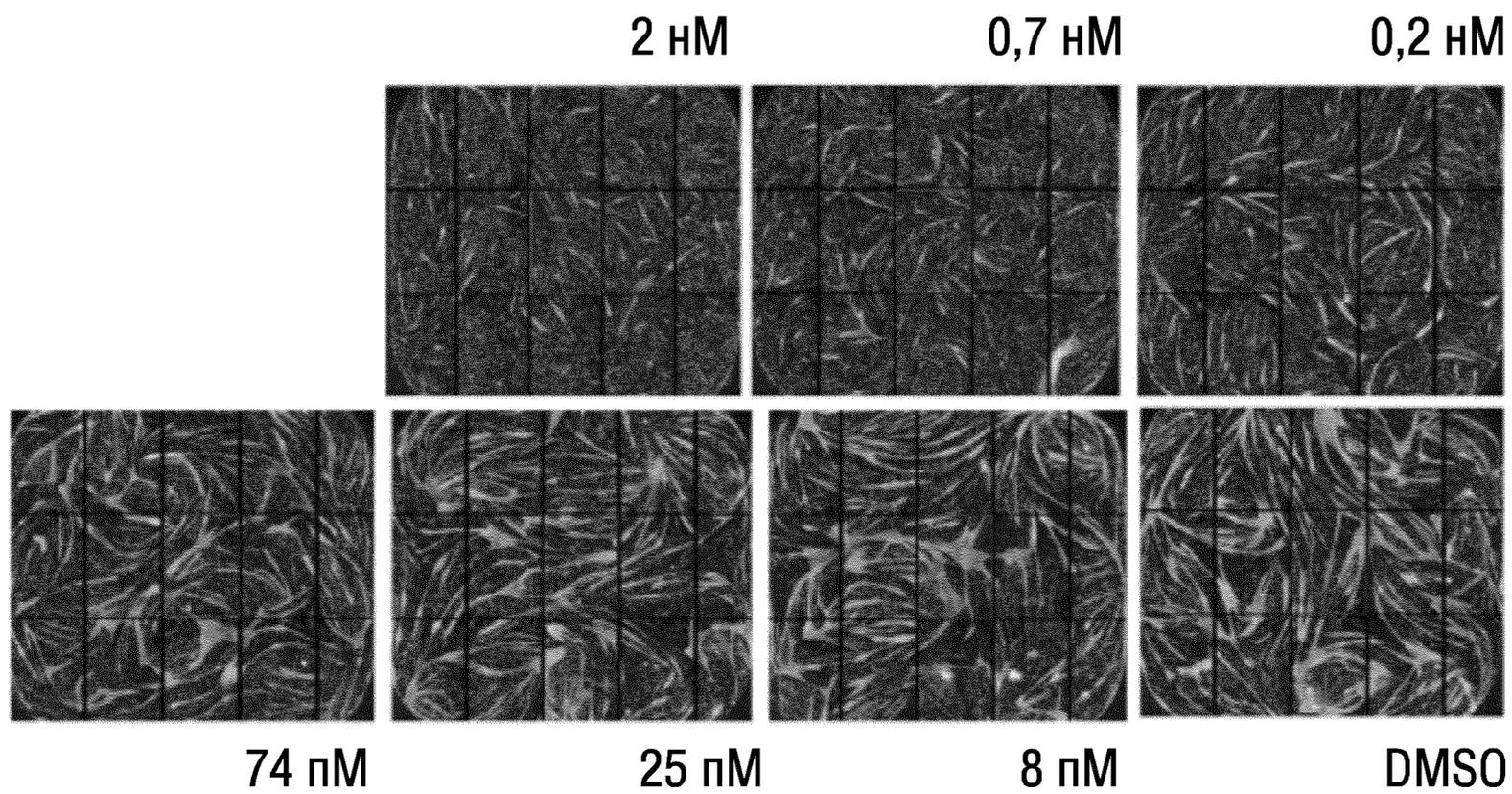


ФИГ.7Е2

Салметерол - 72 ч

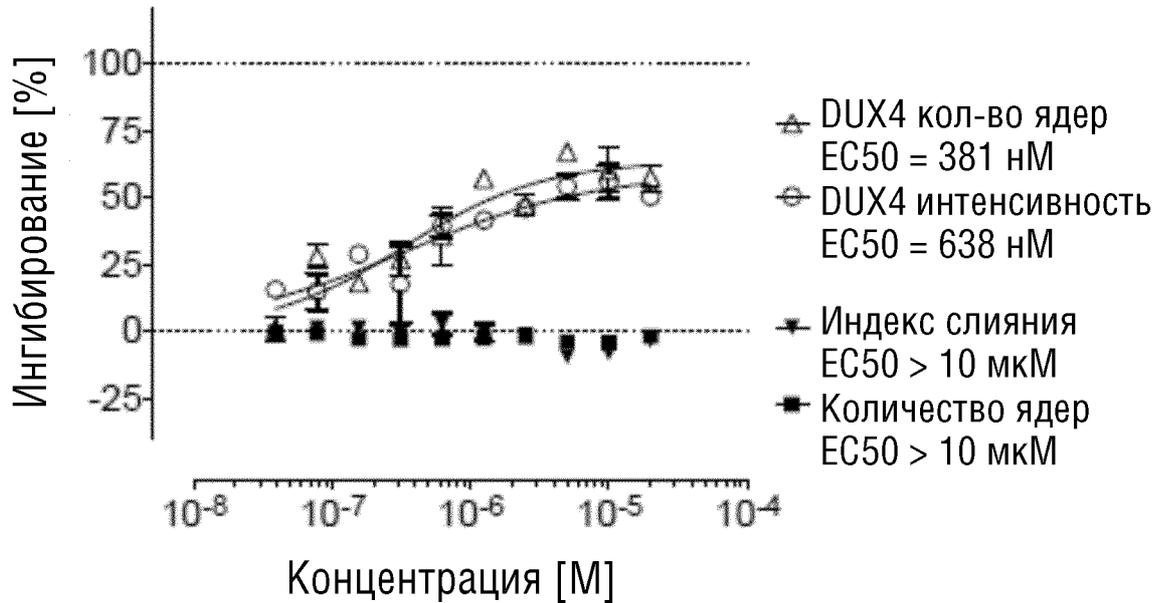


ФИГ.7F



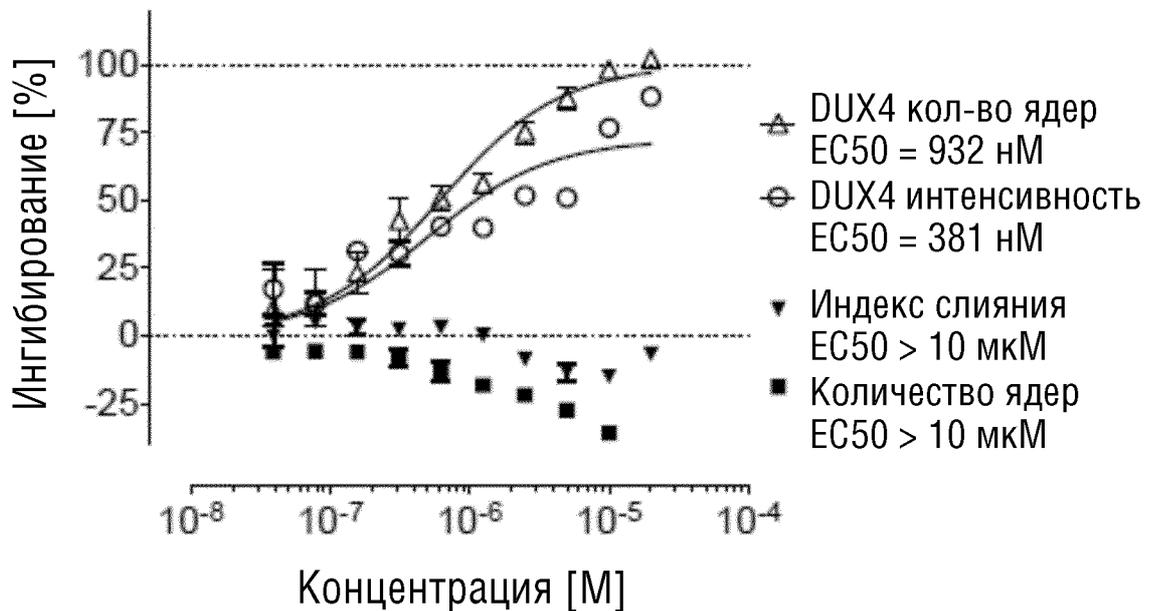
## ФИГ.7G1

PF-670462 - 15 ч



## ФИГ.7G2

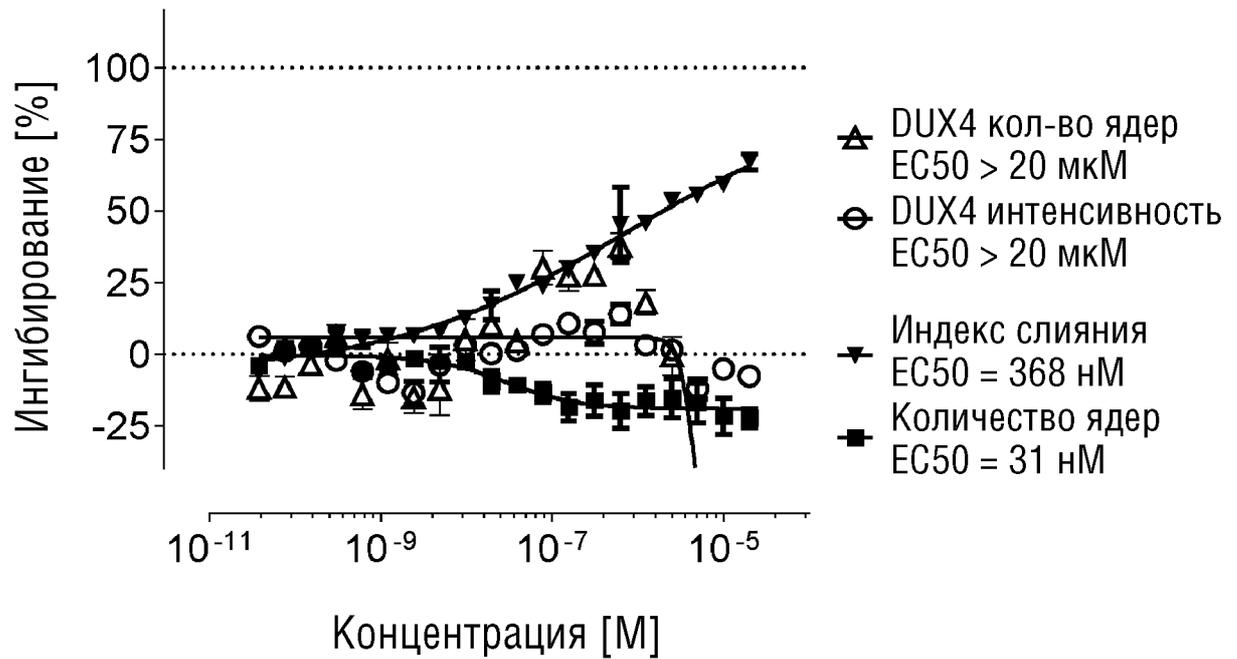
PF-670462 - 72 ч



ФИГ.8

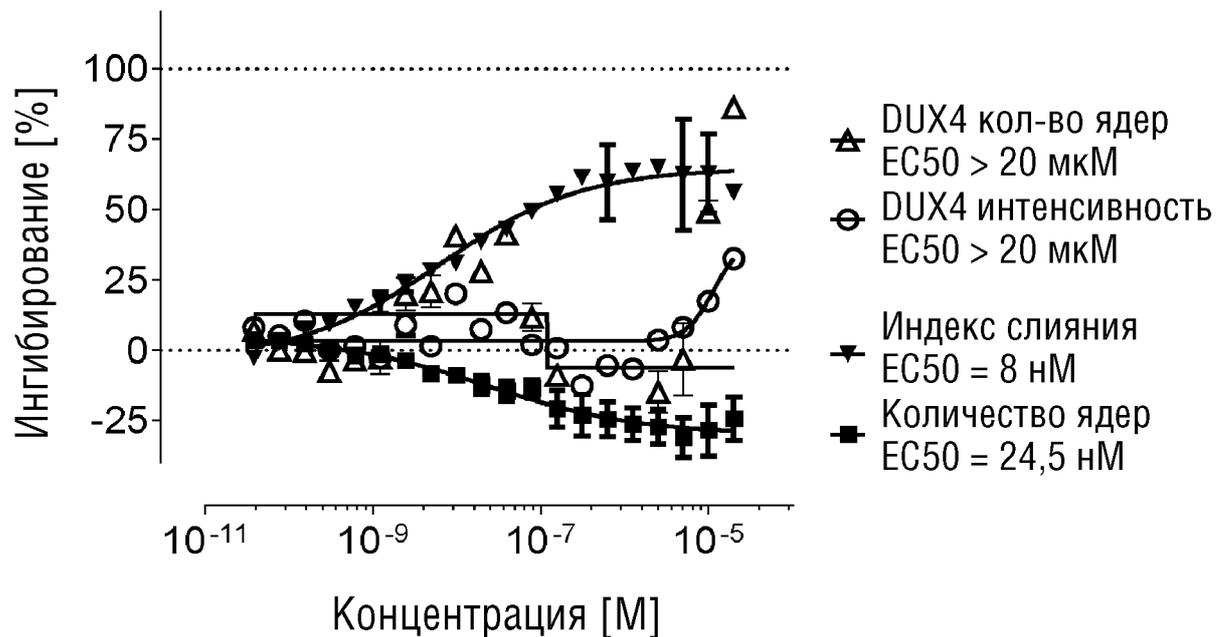
А

## Асумаримод



В

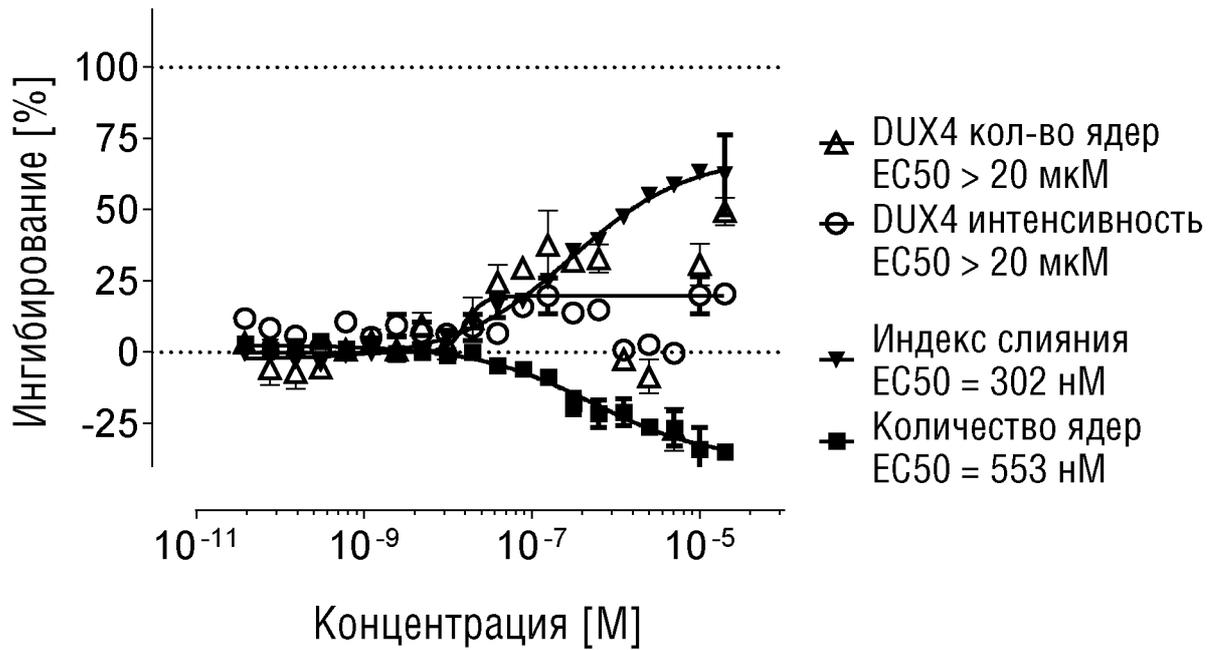
## AMG548



ФИГ.8

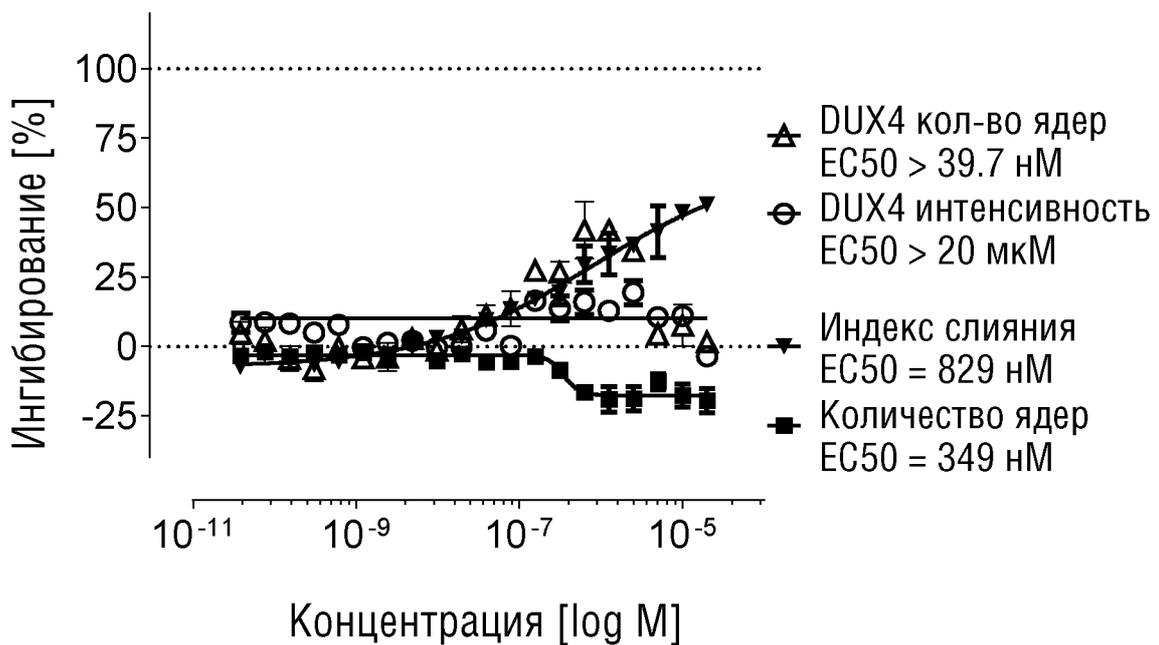
с

BIRB795



D

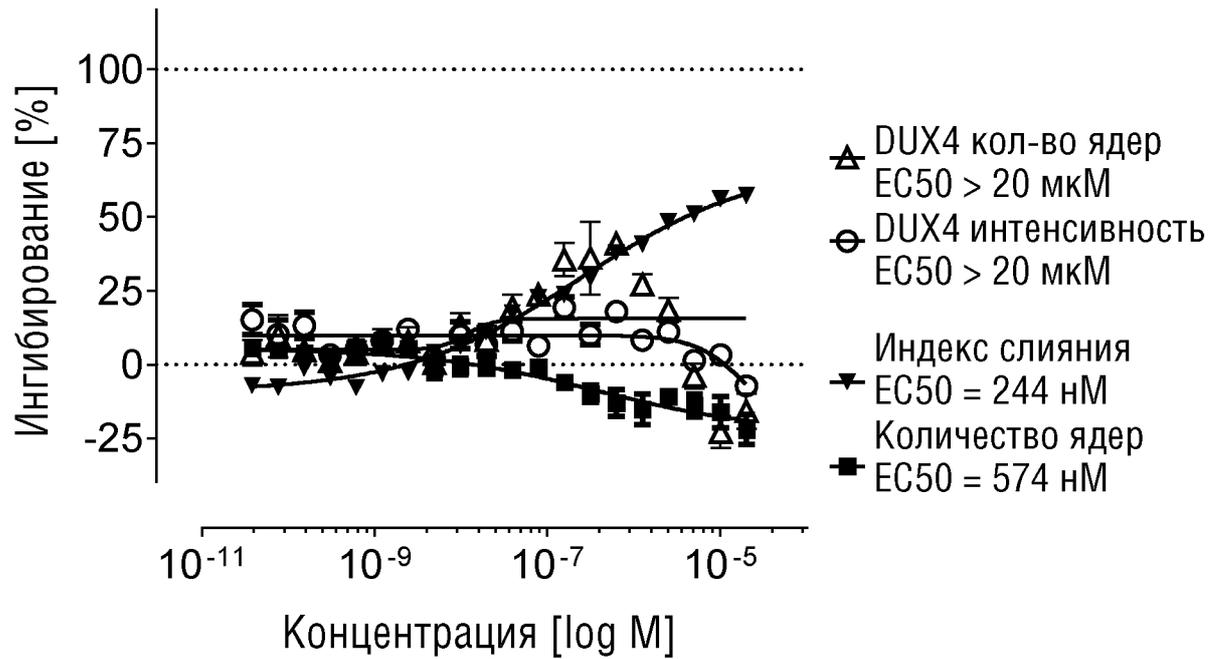
BMS-582949



ФИГ.8

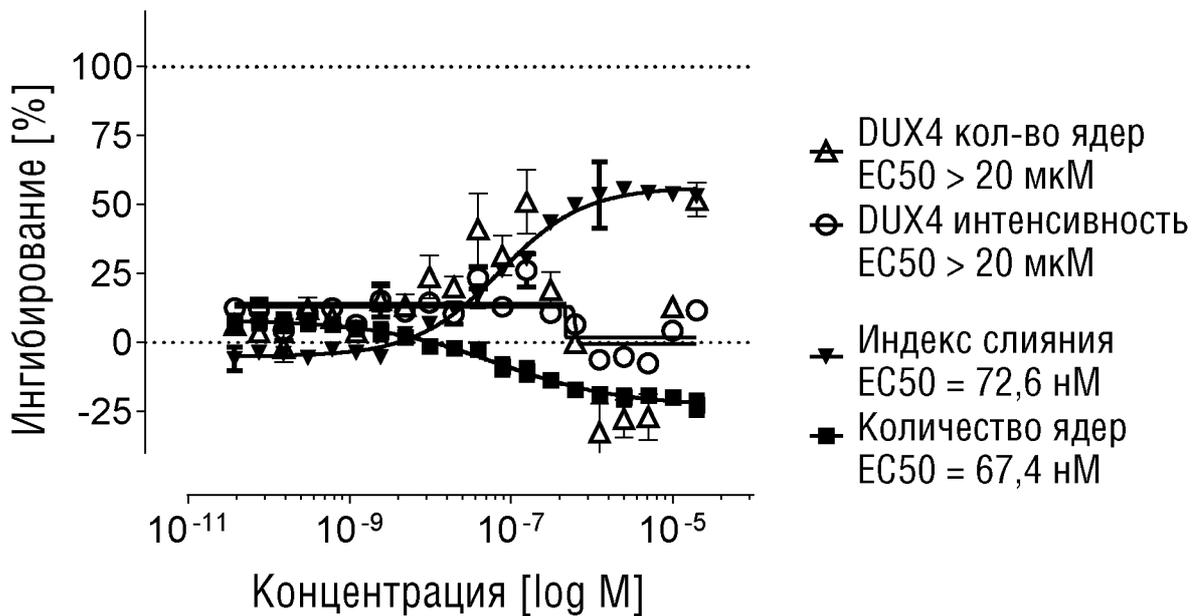
E

Лосмапимод



F

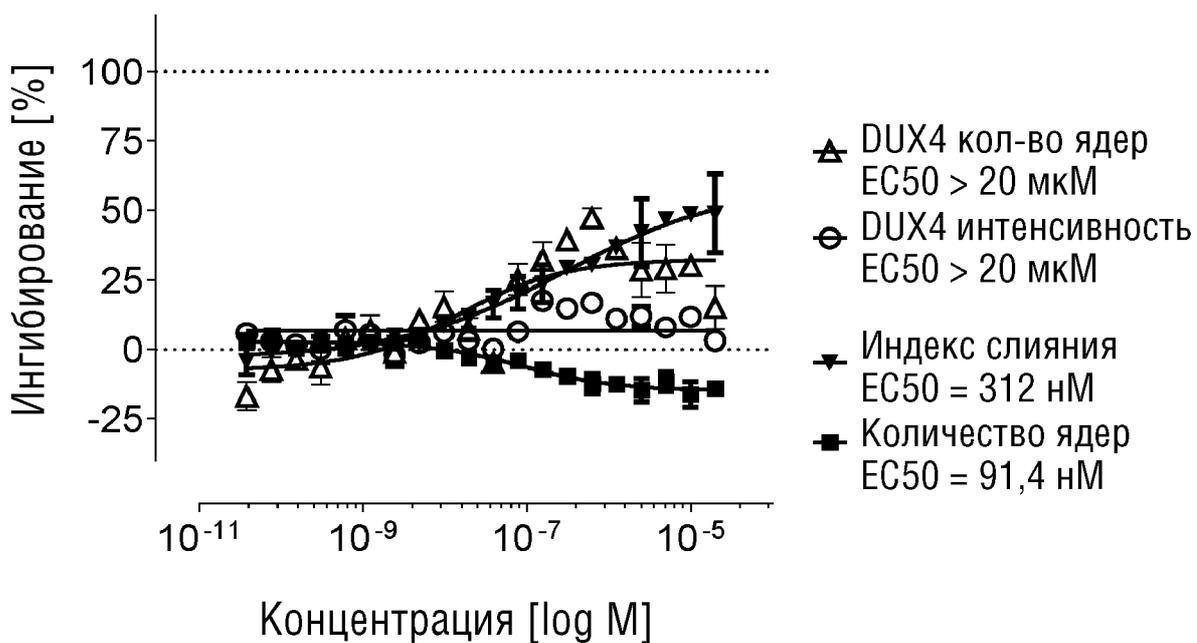
LY2228820



ФИГ.8

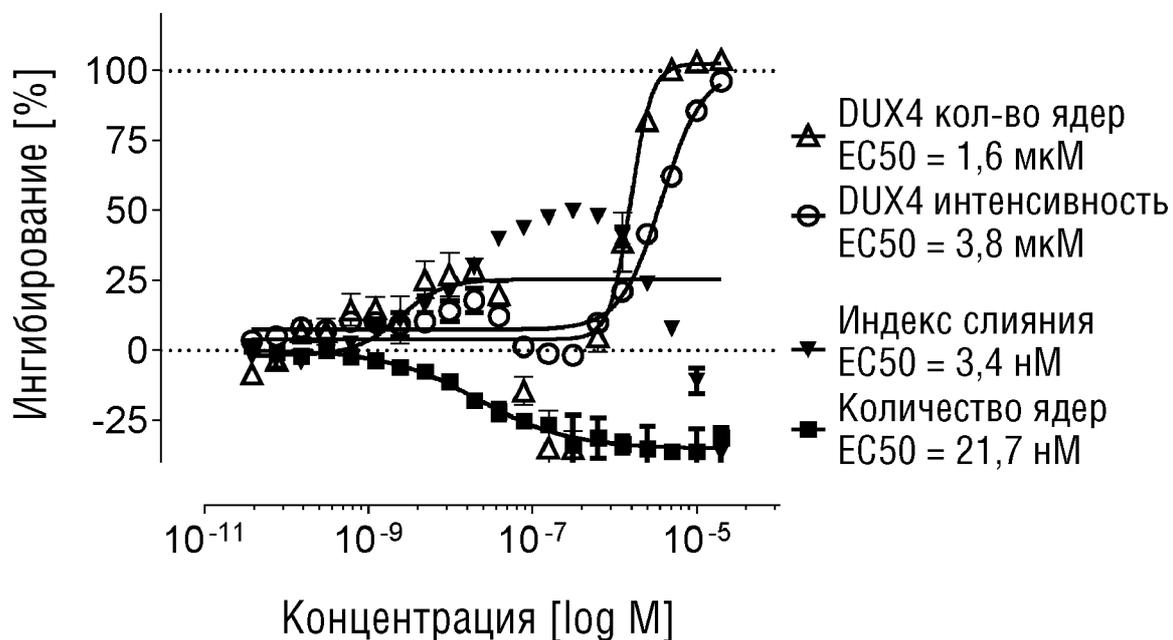
G

## Памапимод



H

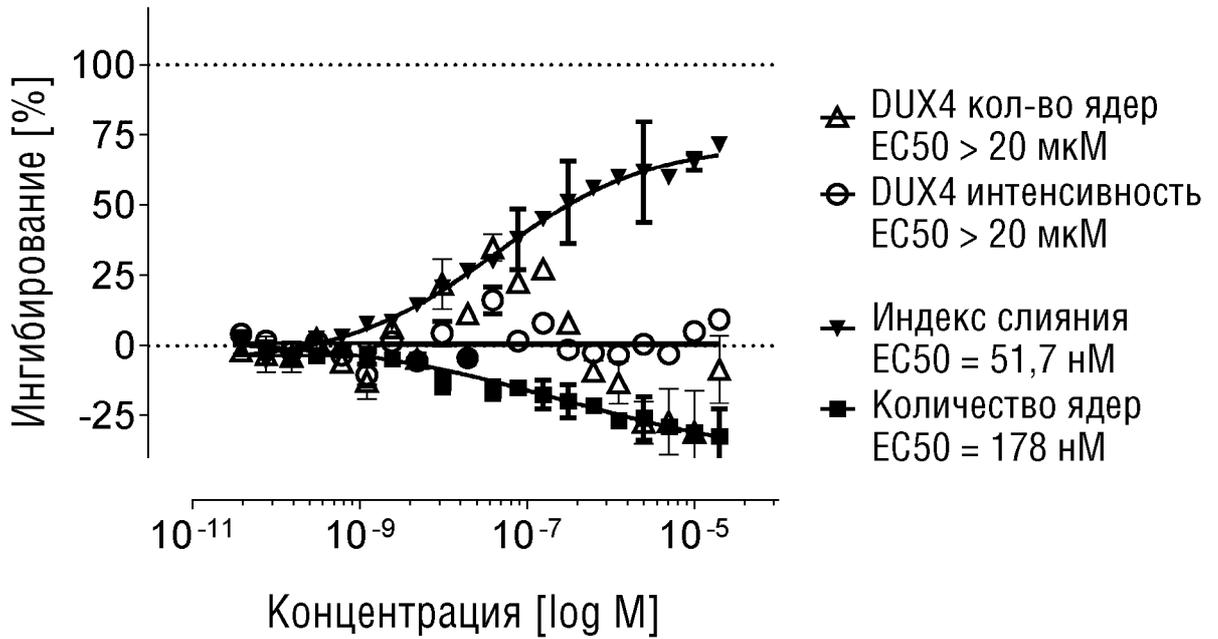
## Пексметиниб



ФИГ.8

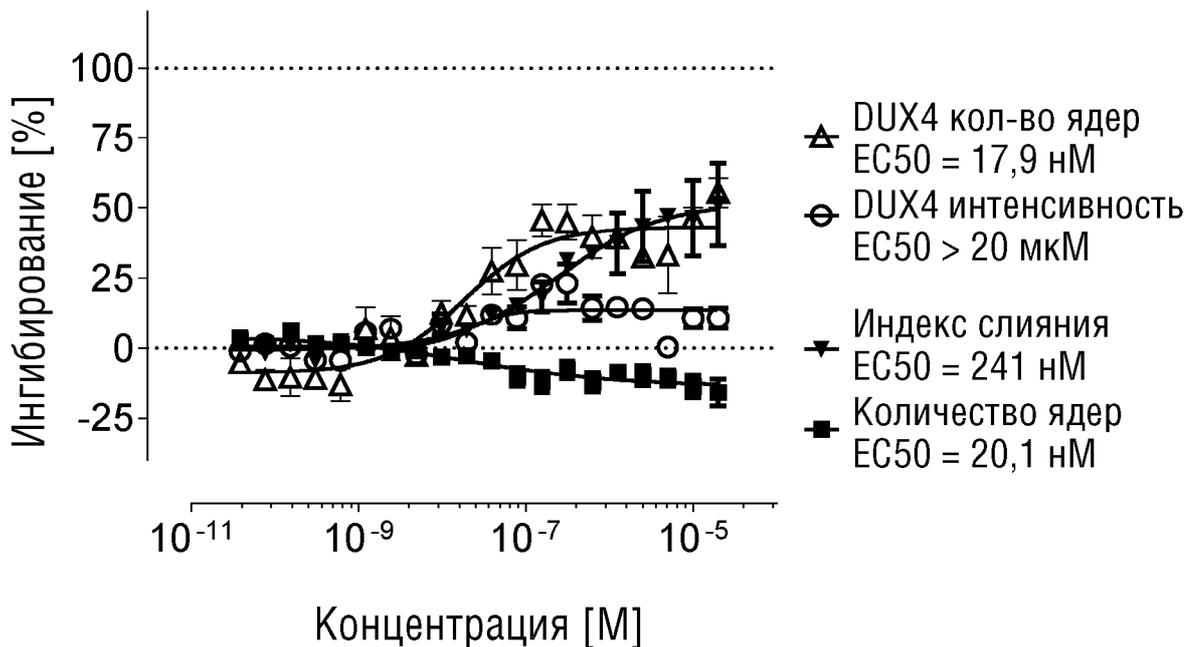
I

PH797804



J

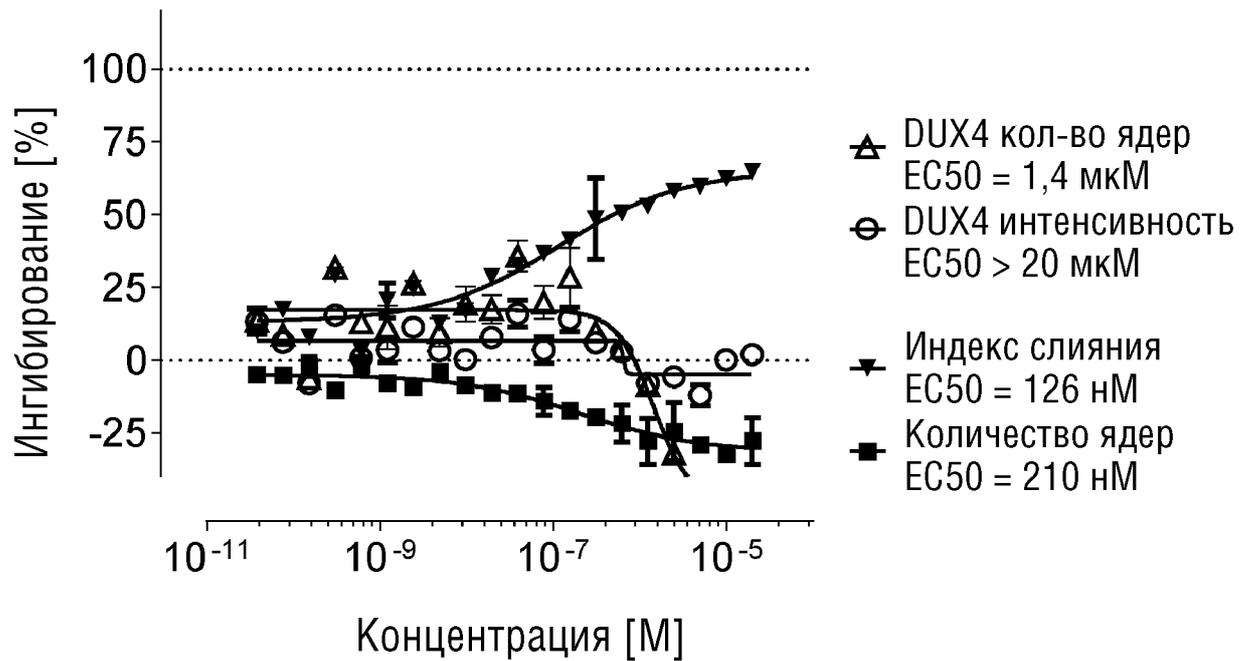
R1487



## ФИГ.8

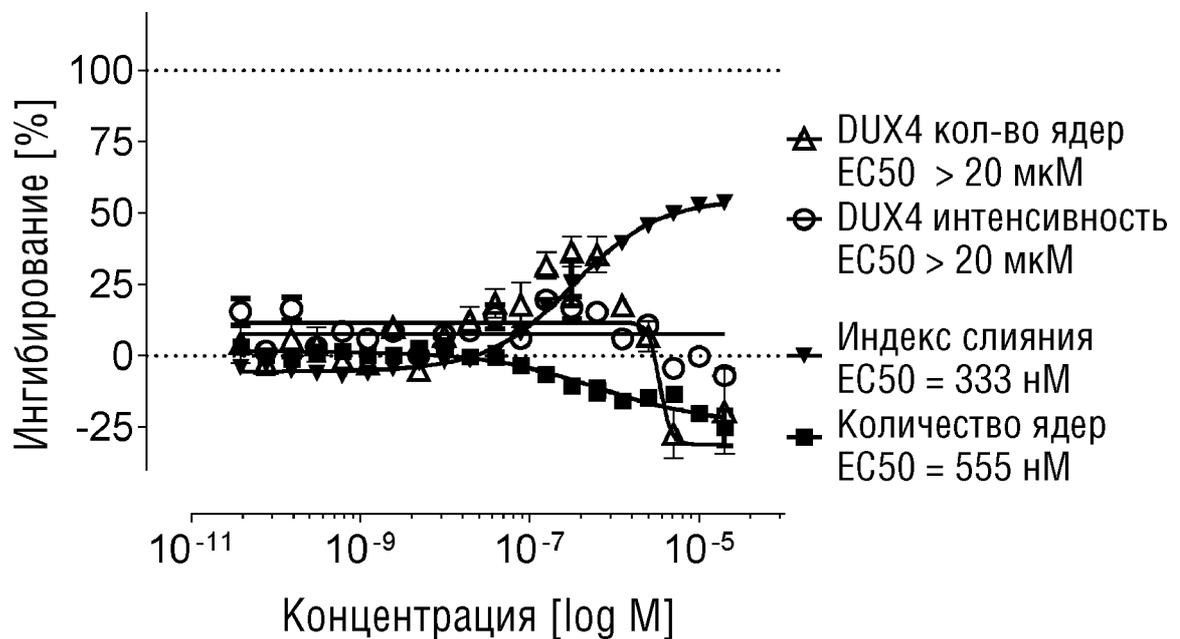
К

SB-681323



L

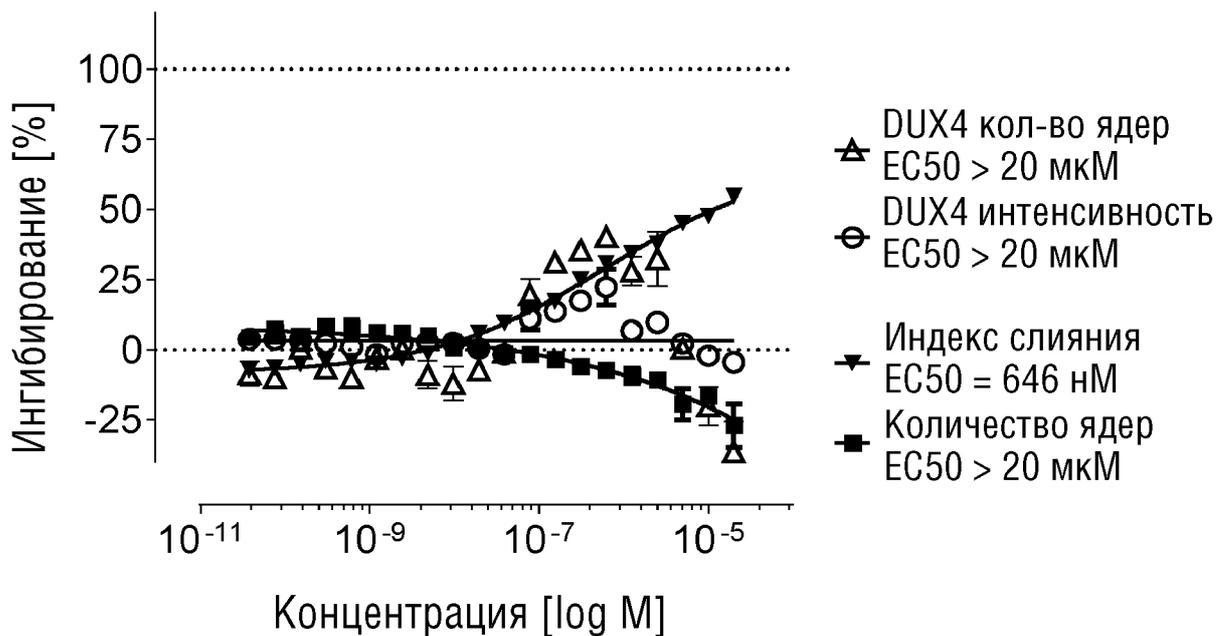
SCIO469



## ФИГ.8

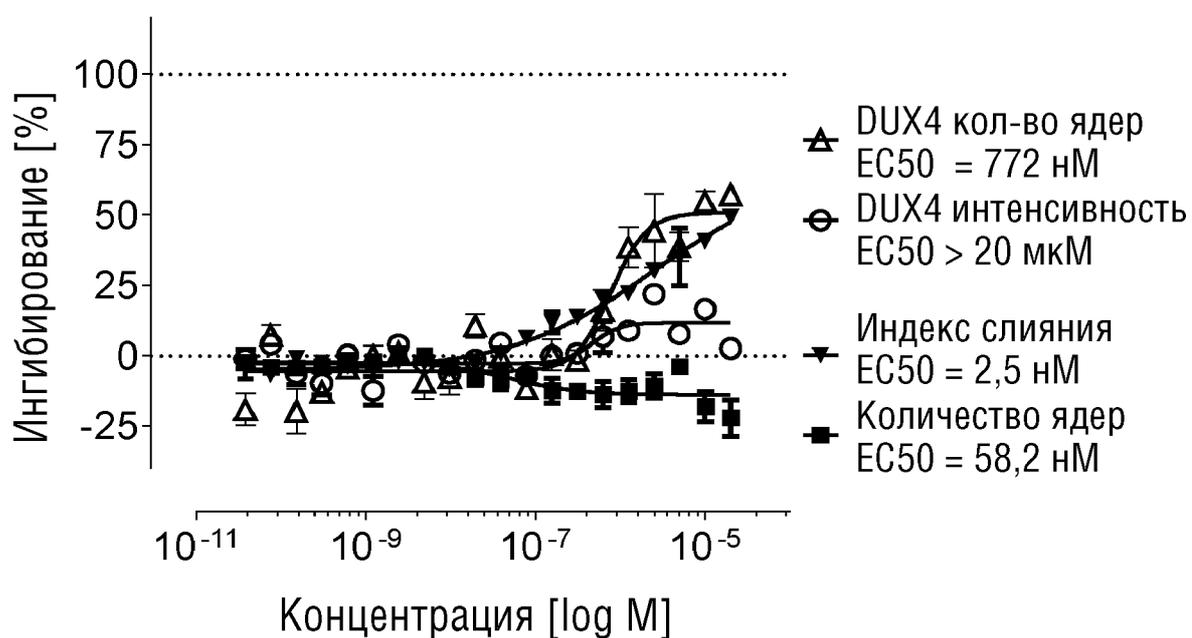
M

VX702

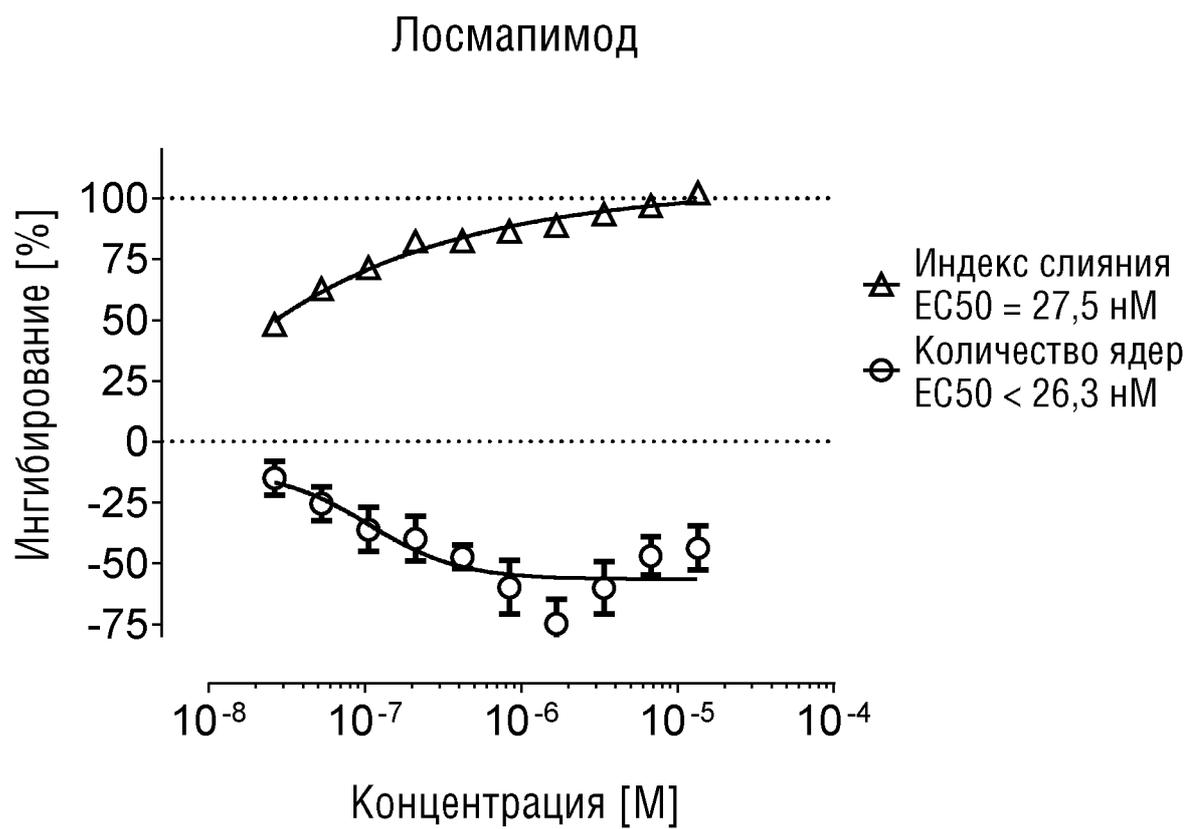


N

VX745

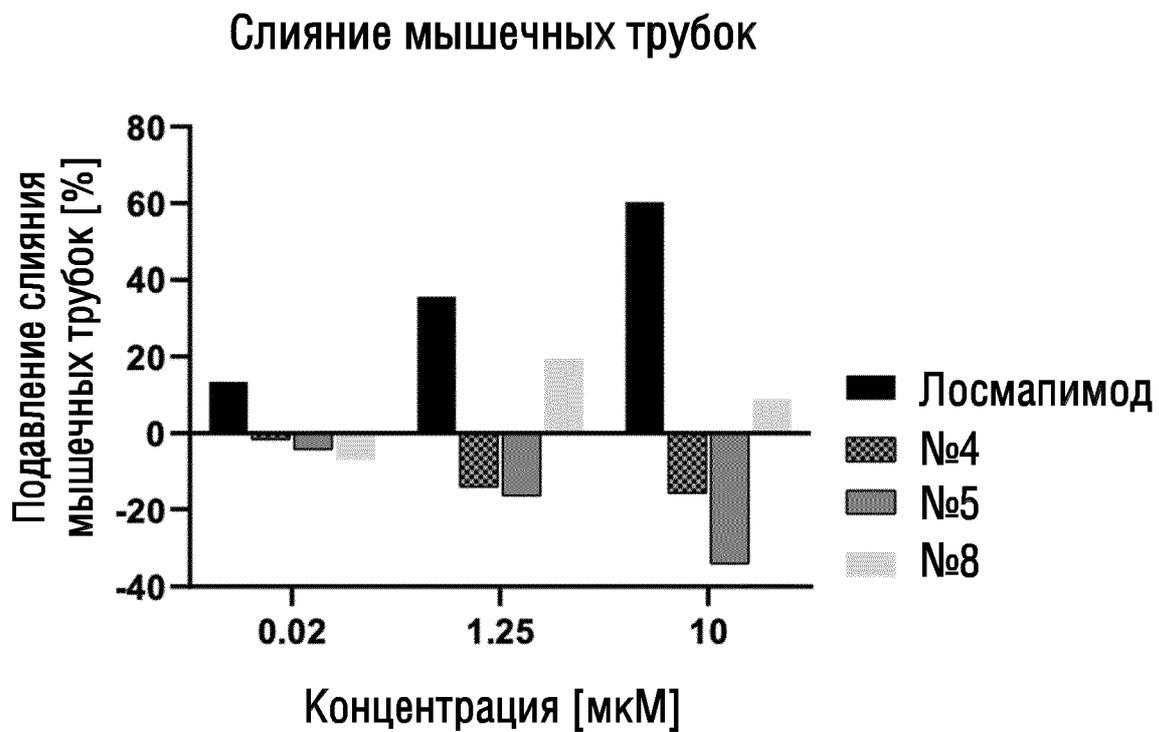


ФИГ.9



ФИГ.10

А



В

DMSO [0,1%]

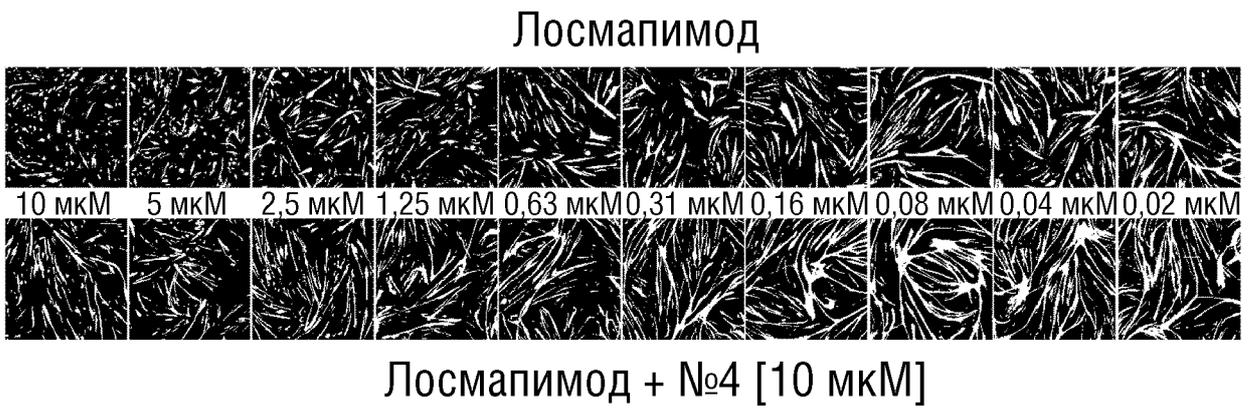


№4 [10 мкМ]



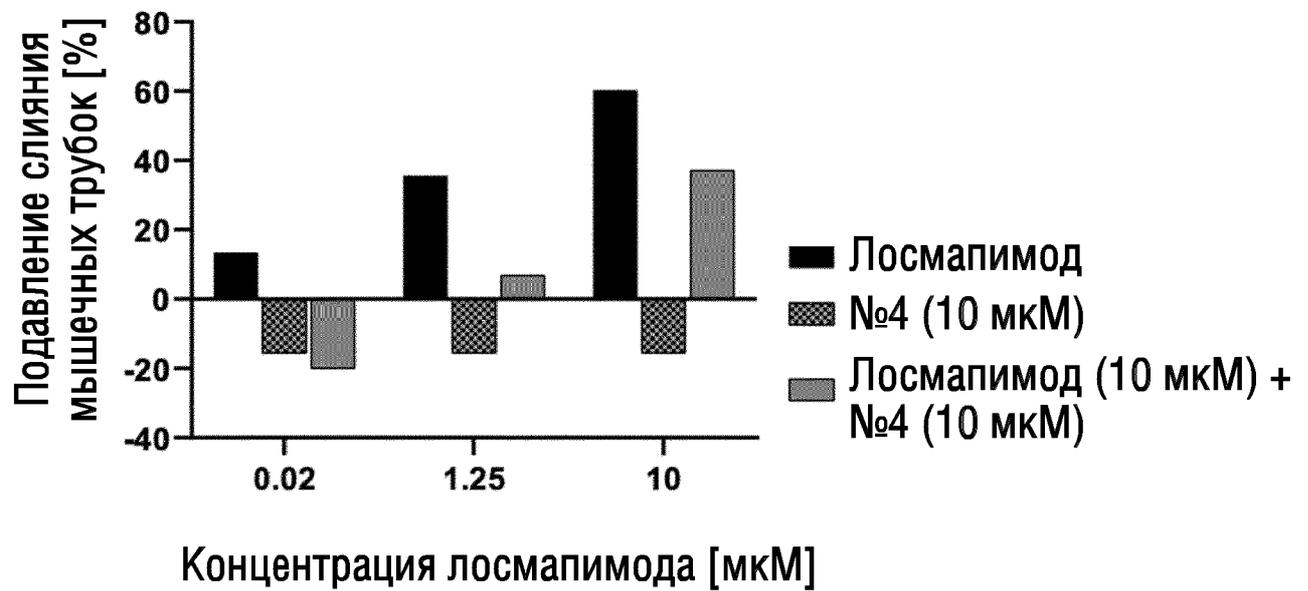
ФИГ.10

C



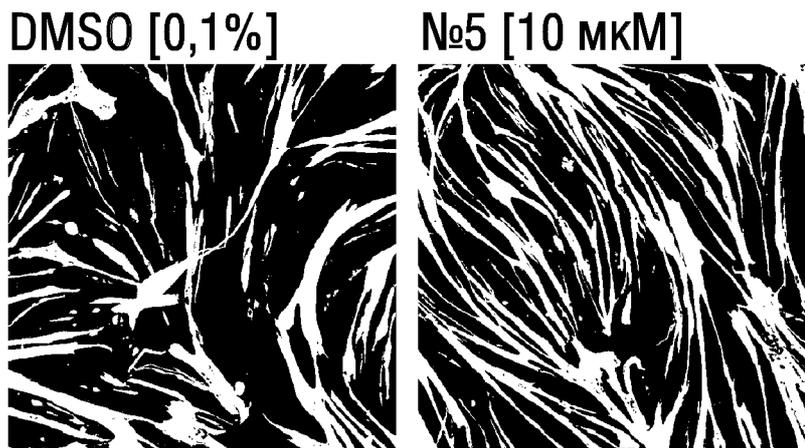
D

## Слияние мышечных трубок



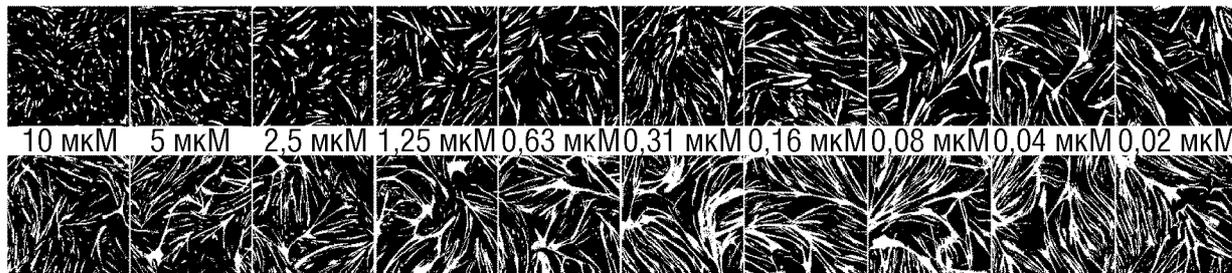
# ФИГ.10

Е



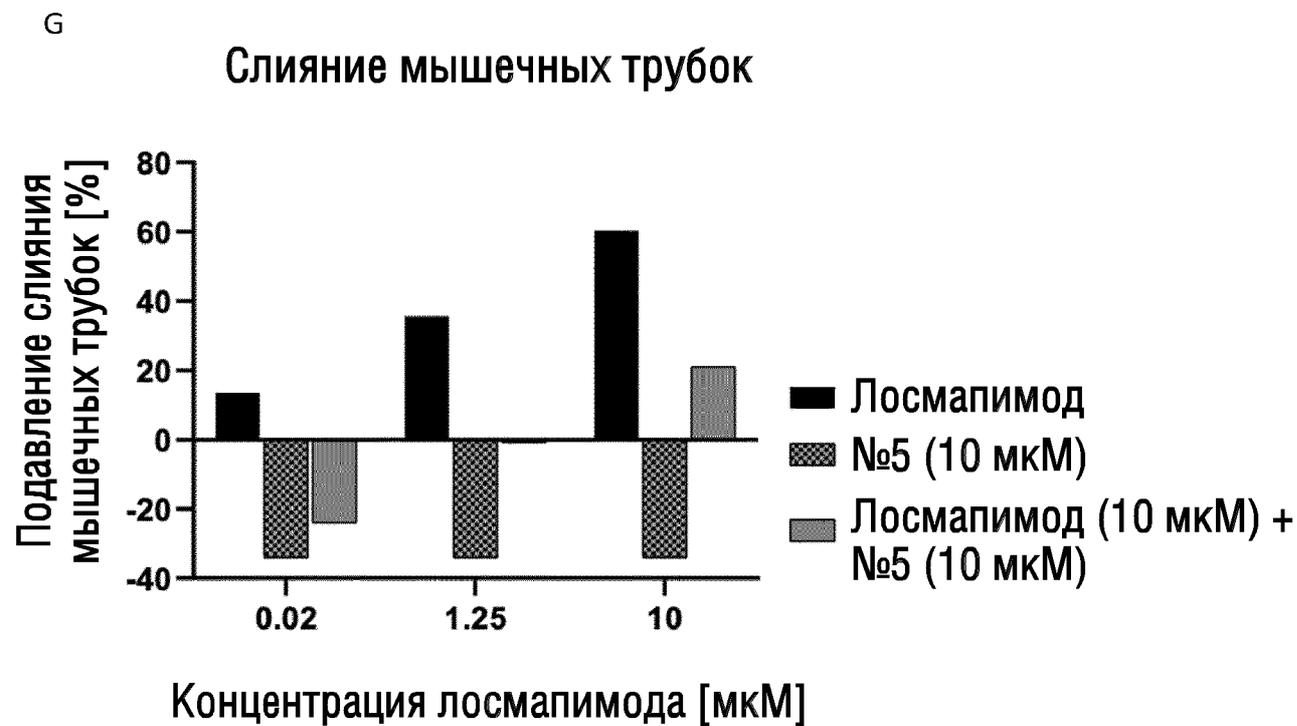
Ф

## Лосмапимод



## Лосмапимод + №5 [10 мкМ]

ФИГ.10



Н

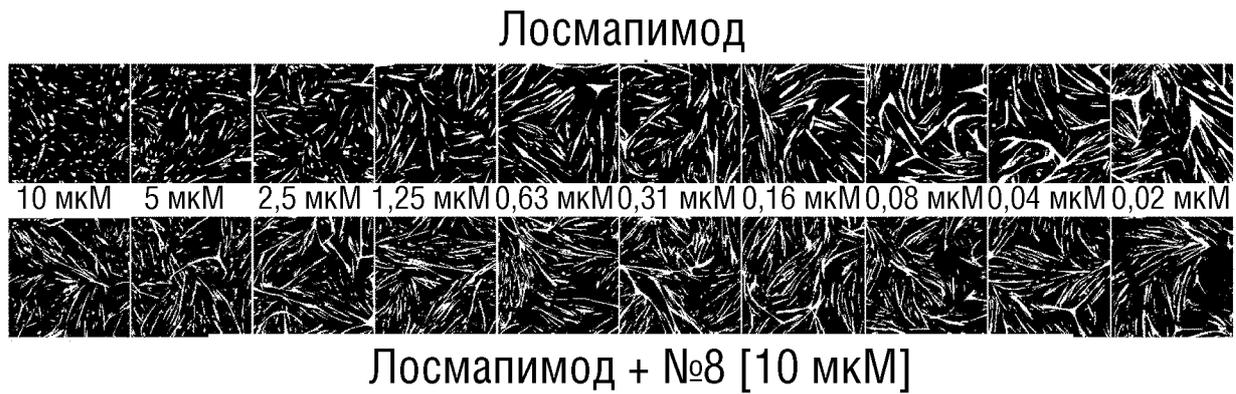
DMSO [0,1%]

№8 [10 мкМ]



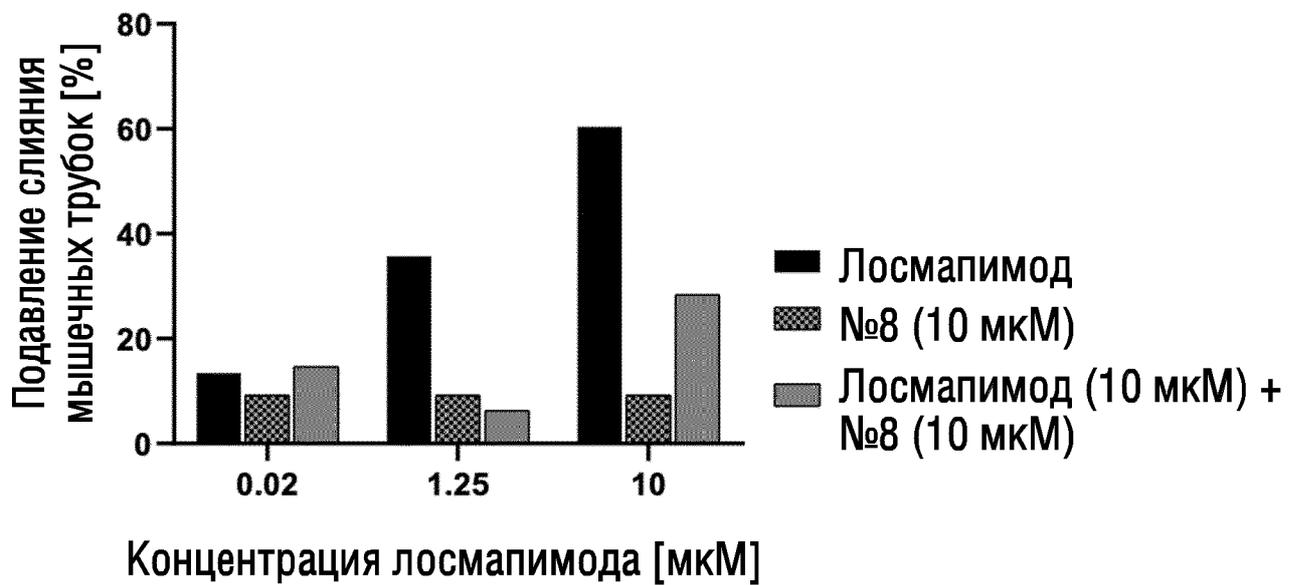
ФИГ.10

I

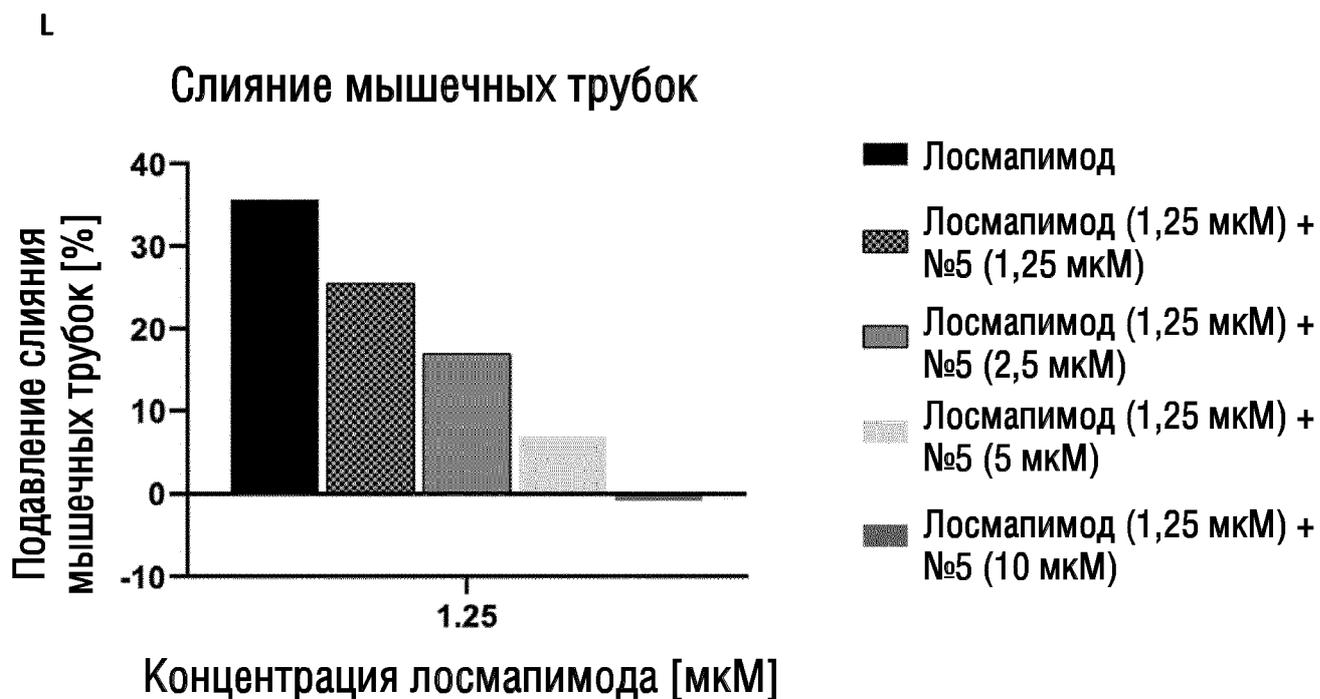
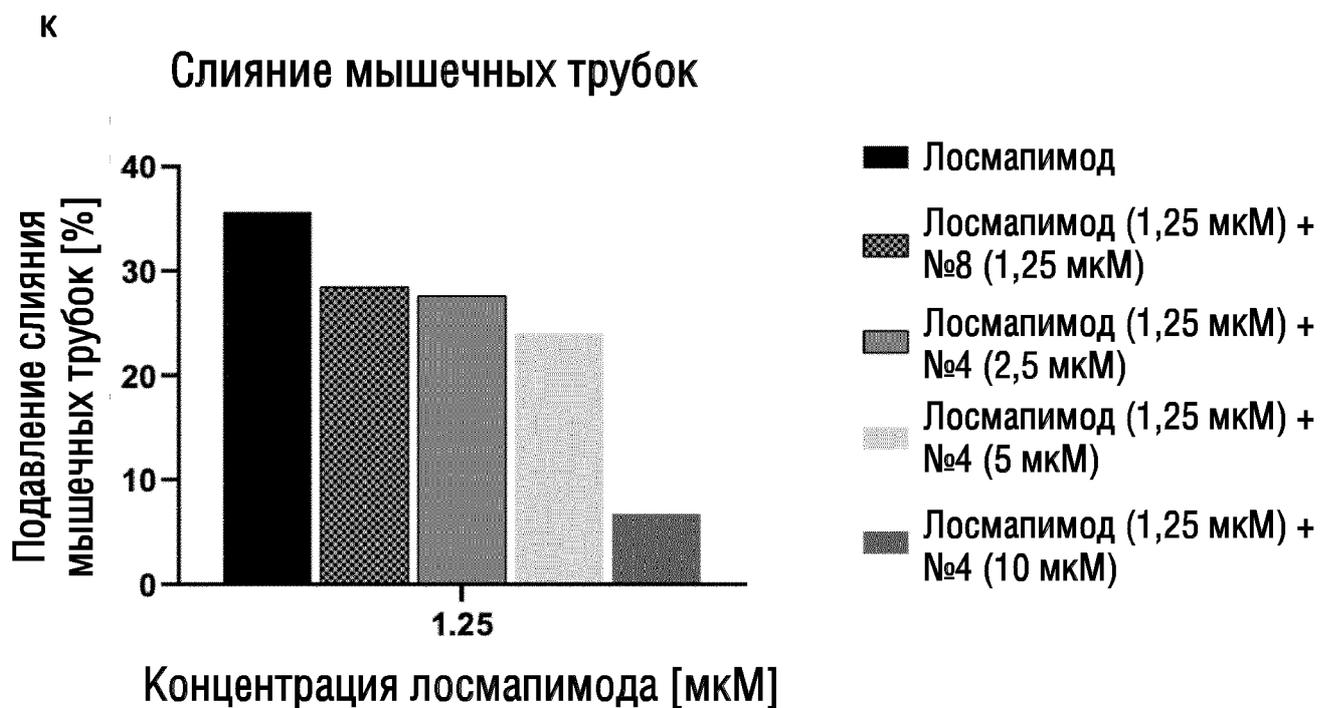


J

## Слияние мышечных трубок



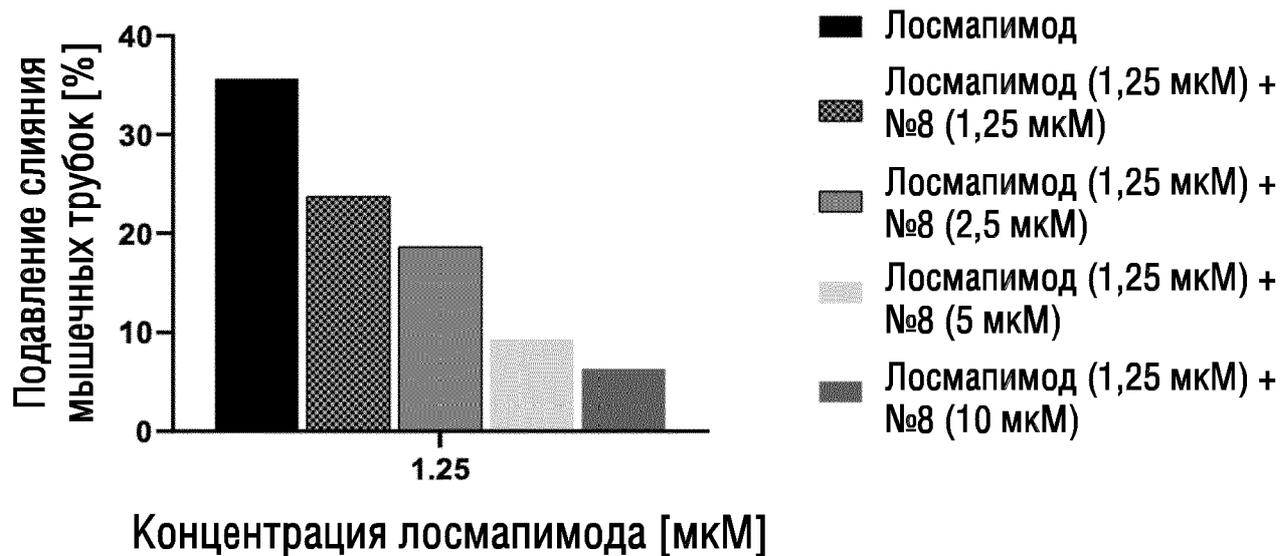
ФИГ.10



ФИГ.10

М

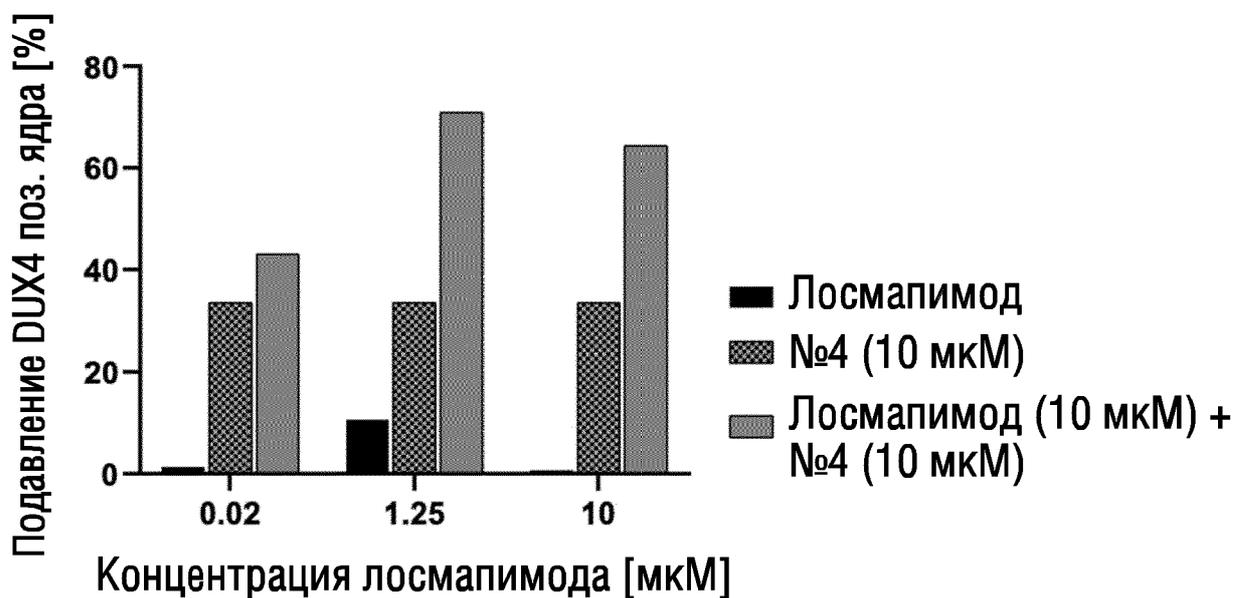
## Слияние мышечных трубок



ФИГ.11

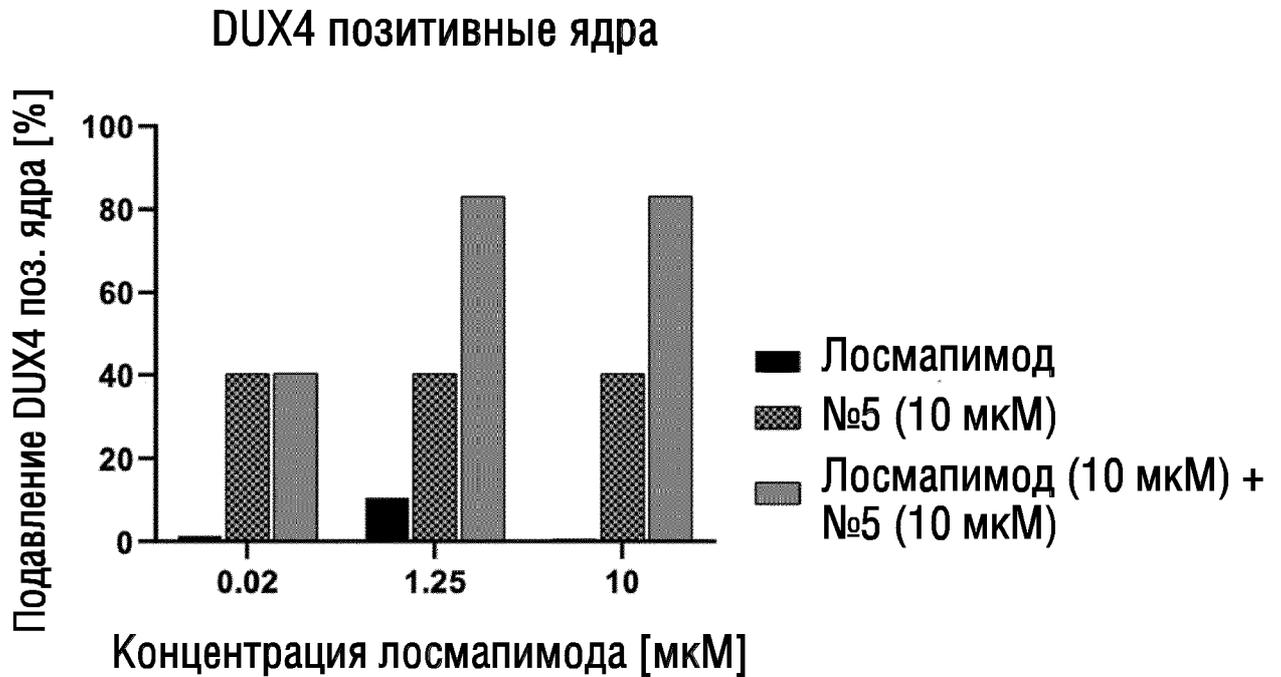
А

## DUX4 позитивные ядра



ФИГ.11

B



C

