

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

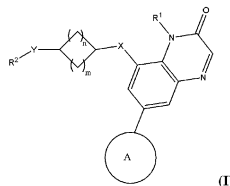
(11) **042641**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.09</p> <p>(21) Номер заявки
202091707</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2019.01.16</p> | <p>(51) Int. Cl. C07D 403/12 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 241/44 (2006.01)
C07D 491/048 (2006.01)
C07D 498/08 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) **ХИНОКСАЛИНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБЫ И НАБОРЫ
ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

- | | |
|---|-------------------------------------|
| <p>(31) 62/618,385</p> <p>(32) 2018.01.17</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2020.12.02</p> <p>(86) PCT/US2019/013785</p> <p>(87) WO 2019/143677 2019.07.25</p> | <p>(56) WO-A1-2014159690</p> |
|---|-------------------------------------|
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**
- (72) Изобретатель:
**Махаджан Судипта, Вайнберг Марк
Сол, Д'Астольфо Диего Себастьян,
Коттрелл Кевин М., Моррис Марк А.,
Максвелл Джон Патрик (US)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

- (57) В изобретении предложены соединения, способы редактирования целевой геномной области (областей), способы репарации разрыва ДНК через путь HDR, способы ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК, проходящей через путь NHEJ, и способы модификации экспрессии гена (генов) или белка (белков), которые включают введение в одну или нескольких клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и ингибитора ДНК-протеинкиназы (ДНК-РК), которые описаны в изобретении. Предложены также наборы и композиции для редактирования гена-мишени, которые содержат систему редактирования генома и ингибитор ДНК-РК, которые описаны в изобретении.

**B1****042641****042641****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка претендует на приоритет предварительной заявки на патент США № 62/618385, поданной 17 января 2018 г., полное содержание которой включено сюда посредством ссылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен электронным способом в формате ASCII и полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Файл ASCII, созданный 16 января 2019 г., имеет название 14390-687 Sequence listing_ST25.txt, и имеет размер 4 кбайт.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится в целом к соединениям, композициям, способам и наборам для повышения эффективности редактирования генома путем введения ингибитора ДНК-протеинкиназы (ДНК-ПК), и к системе редактирования генома в клетке (клетках).

Предпосылки создания изобретения

Для обеспечения системной инженерии генетических вариаций необходимы точные способы нацеливания на геном. В последние несколько лет применение систем редактирования генома, и, в частности, систем технологии редактирования генома на основе CRISPR-эндонуклеаз, росло экспоненциально. В качестве эффективного инструмента редактирования генома для направленной модификации генома человека использовалась бактериальная врожденная иммунная система CRISPR-Cas9 типа II (Wiedenheft, В. 2012; Hsu, P.D. et al. 2014). Недавно были описаны системы редактирования генома CRISPR-Cpf. Редактирование генома, основанное на эндонуклеазе CRISPR, частично зависит от путей негомологичного соединения концов (NHEJ) и гомологичной направленной репарации (HDR), направленных на восстановление разрывов двойной цепи ДНК. Для клеток механизм репарации NHEJ более предпочтителен, чем HDR.

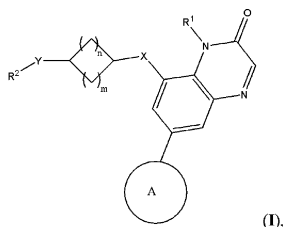
Хотя в некоторых сообщениях показано, что при NHEJ эффективность достижения инсерций или делеций (инсерций/делеций) составляет до 70%, однако достижение эффективности при HDR остается сложной задачей, и ее эффективность составляет менее 1%.

Соответственно существует потребность в повышении эффективности редактирования генома, в частности, эффективности HDR.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение может улучшить эффективность HDR путем подавления ферментов NHEJ, таких как ДНК-ПК, за счет использования ингибиторов ДНК-ПК.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к соединению, представленному структурной формулой (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, или его сокристаллу,

где m и n независимо равны 1 или 2;

X представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C₁-C₄-алкил;

Y представляет собой связь, O или NR, где R представляет собой H или C₁-C₄-алкил;

R¹ представляет собой C₁-C₄-алкил;

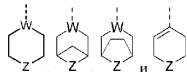
R² представляет собой 5- или 6-членное арильное или гетероарильное кольцо, содержащее один или два гетероатома, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где арильное и гетероарильное кольцо могут быть замещены 0, 1, 2 или 3 заместителями R³, независимо выбранными из группы, состоящей из CN, галогена, C₁-C₄-алкила, C₃-C₆-циклоалкила, C₁-C₄-галогеналкила, C₁-C₄-алкокси, C₁-C₄-галогеналкокси, C(=O)NHR¹, и 5- или 6-членное гетероциклоалкильное или гетероарильное кольцо, где каждое кольцо содержит 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из N, O и S; где R¹ представляет собой C₁-C₄-алкил; или где две группы R³, соединенные с соседними атомами углерода арильного или гетероарильного кольца, могут образовывать конденсированное 5- или 6-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S; или COOR⁴, где R⁴ представляет собой C₁-C₄-алкил или бензил.

Каждый из C₁-C₄-алкила, C₁-C₄-галогеналкила, C₁-C₄-алкокси и C₁-C₄-галогеналкокси может быть дополнительно замещен OR⁵ или NR⁶R⁷.

Каждый из R⁵, R⁶ и R⁷ независимо представляет собой H, C₁-C₄-алкил или C₃-C₆-циклоалкил.

R⁶ и R⁷, и атом азота, к которому они присоединены, могут образовывать насыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое может содержать 0 или 1 дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S, и где кольцо может быть дополнительно замещено C₁-C₄-алкилом.

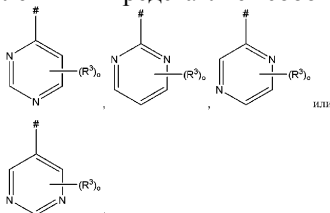
Кольцо А выбирают из группы, состоящей из



W представляет собой N или CR³; и Z представляет собой O или S; где R³ представляет собой H или C₁-C₄-алкил.

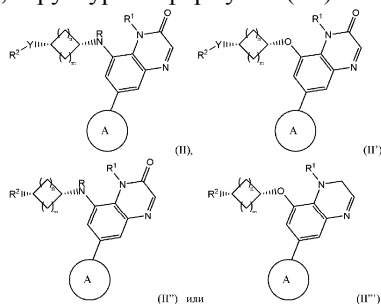
В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к соединению, представленному структурной формулой (I), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристаллу, где R² представляет 5- или 6-членное ароматическое или гетероароматическое кольцо, содержащее один или два гетероатома, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где ароматическое или гетероароматическое кольцо может быть замещено 0, 1 или 2 заместителями R³, независимо выбранными из группы, состоящей из CN, галогена, C₁-C₄-алкила, C₁-C₄-галогеналкила и C₁-C₄-галогеналкил-C₁-C₄-алкокси, C₁-C₄-галогеналкокси и C(=O)NHR¹, где R¹ представляет собой C₁-C₄-алкил; или где две группы R³, соединенные с соседними атомами углерода ароматического или гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S; или COOR⁴, где R⁴ представляет C₁-C₄-алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления R² представляет собой



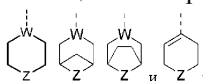
где # означает положение, где R² присоединен к остальной части соединения формулы (I); и o равно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) представлено структурной формулой (II), структурной формулой (II'), структурной формулой (II'') или структурной формулой (II''')

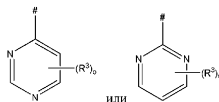


или его фармацевтически приемлемой солью или его сокристаллом.

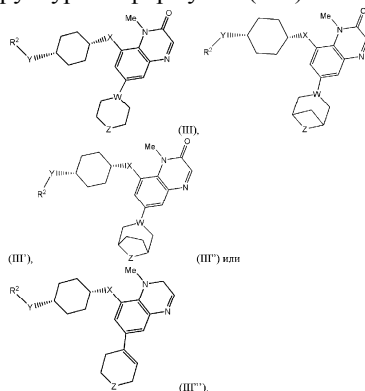
В некоторых вариантах осуществления кольцо А выбирают из группы, состоящей из



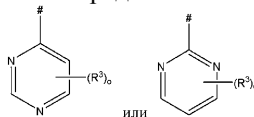
и R² представляет собой



В других вариантах осуществления соединения формулы (I) представлено структурной формулой (III), структурной формулой (III'), структурной формулой (III'') или структурной формулой (III''')



В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой сокристалл, который включает соединение, имеющее структуру формулы (I), формулы (II), формулы (II'), формулы (II''), формулы (II'''), формулы (III), формулы (III'), формулы (III'') или формулы (III'''), и сокристалл образован с кислотой, выбранной из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты.

Изобретение также относится к способу редактирования одной или нескольких целевых геномных областей, где способ включает введение в одну или несколько клеток, имеющих одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу редактирования одной или нескольких целевых геномных областей, где способ включает введение в одну или несколько клеток, имеющих одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла.

В некоторых вариантах осуществления изобретение также относится к способу репарации (восстановления) разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях с помощью пути гомологичной направленной репарации (HDR), где способ включает введение в одну или несколько клеток, имеющих одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла.

Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) целевых геномных областей, что приводит к разрыву ДНК, и где разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, через путь HDR.

Изобретение также относится к способу ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях через путь NHEJ, где способ включает введение в одну или несколько клеток, имеющих одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла.

Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) одной или нескольких целевых геномных областей, что приводит к разрыву ДНК, и где репарация разрыва ДНК через путь NHEJ ингибируется или подавляется.

Изобретение также относится к способу модификации экспрессии одного или более генов или белков, где способ включает введение в одну или несколько клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла.

Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) одной или нескольких целевых геномных областей гена-мишени (генов-мишеней), приводя к редактированию одной или нескольких целевых геномных областей, где редактирование модифицирует экспрессию ниже-расположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с целевым геном (генами).

В некоторых вариантах осуществления изобретения разрыв ДНК включает разрыв двойной цепи ДНК (DSB).

В некоторых вариантах осуществления соединения представляет собой сокристалл, который включает соединение, имеющее структуру формулы (I), формулы (II), формулы (II'), формулы (II''), формулы (II'''), формулы (III), формулы (III'), формулы (III'') или формулы (III'''), и сокристалл образован с кислотой, выбранной из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана схема анализов для редактирования гена.

На фиг. 2 представлен график, показывающий уровни редактирования генов в ВЕС, обработанных ингибитором ДНК-РК.

На фиг. 3А и 3В показаны графики, показывающие уровни редактирования генов в CD34⁺ клетках от двух различных доноров после обработки ингибитором ДНК-РК.

На фиг. 4 представлен график, показывающий уровни редактирования генов в iPSC, обработанных ингибитором ДНК-РК.

На фиг. 5 представлен график, показывающий кинетику редактирования гена в ВЕС ингибитором ДНК-РК при ЕСмах.

На фиг. 6 представлен график, показывающий кинетику редактирования гена в ВЕС ингибитором ДНК-РК при ЕС50.

На фиг. 7 представлена столбчатая диаграмма, показывающая уровни HDR для компонентов редактирования генов, доставляемых в ВЕС посредством опосредованной липидами трансфекции.

Подробное описание

Если не определено иначе, научные и технические термины, используемые в рамках данного описания, имеют обычные значения, которые понимаются специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатуры, используемые в отношении методик культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии и белковой и олиго- или полинуклеотидной химии и гибридизации, описанные здесь, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области техники. Для рекомбинации ДНК, синтеза олигонуклеотидов, культивирования тканевой культуры и трансформации (например, электропорации, липофекции) используются стандартные методы. Ферментативные реакции и методы очистки проводятся в соответствии с инструкциями производителя реагентов, или как обычно осуществляются в данной области, или как описано здесь. Описанные методики и процедуры, как правило, выполняются обычными способами, хорошо известными в данной области техники, или как описано в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются или обсуждаются здесь (см., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанными здесь, являются известными и широко используемыми в данной области техники. Для химических синтезов, химических анализов, получения фармацевтических препаратов, композиций, их доставки и для лечения пациентов используются стандартные методики. Как правило, химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS и справочником *Handbook of chemistry and Physics*, 75th ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в справочниках "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Smith, M.B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Термины, используемые в данном описании, если не указано иное, должны пониматься как имеющие значения, определенное здесь.

В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования целевых геномных областей в одной или нескольких клетках увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, где редактирование выполняют без использования соединения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность репарации разрыва ДНК в целевых геномных областях в одной или нескольких клетках через путь HDR увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, где редактирование выполняют без использования соединения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в целевых геномных областях в одной или нескольких клетках через путь NHEJ увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, где редактирование выполняют без использования соединения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность увеличена по меньшей мере в 2 раза, в 3 раза, 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз, в 20 раз, в 25 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз или в 100 раз по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, где редактирование выполняют без использования соединения.

В некоторых вариантах осуществления эффективность измеряют по частоте (вероятности события) целевой интеграции полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления эффективность измеряют по частоте (вероятности события) направленного мутагенеза. В некоторых вариантах осуществления направленный мутагенез включает точечные мутации, делеции и/или инсерции.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с целевым геном (генами), увеличена по сравнению с базовым уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением. Например, указанная экспрессия увеличена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или экспрессия имеет 1-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 2,5-кратное, 3-кратное, 3,5-кратное, 4-кратное, 4,5-кратное, 5-кратное или 10-кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия нижерасположенного гена (генов) и/или белка

(белков), ассоциированного с целевым геном (генами), уменьшена по сравнению с базовым уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением. Например, экспрессия гена уменьшена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена (генов) ниже и/или белка (белков), ассоциированного с геном-мишенью (генами-мишенями), в одной или нескольких клетках по существу отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка синхронизирована в фазе клеточного цикла S или G2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения одна или несколько клеток, которым вводят или которые контактируют с указанным соединением, имеют повышенную выживаемость по сравнению с одной или несколькими клетками, которым не было введено или которые не были приведены в контакт с указанным соединением.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят в одну или несколько клеток одновременно. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят в одну или несколько клеток последовательно. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома вводят в одну или несколько клеток перед соединением. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят в одну или несколько клеток перед системой редактирования генома.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток являются культивируемыми клетками. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток являются клетками *in vivo* в организме. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько клеток представляют собой клетки *ex vivo* из организма.

В некоторых вариантах осуществления организм представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления организм представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят одним и тем же путем. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома и соединение вводят разными путями. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома вводят внутривенно, а соединение вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления система для редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), системы на основе эффективной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas или систему CRISPR-Cpf.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas, и в которой система CRISPR-Cas включает: (a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент, который включает: (i) нацеливающую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую РНК; и (ii) активирующую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, способную к гибридизации с нацеливающей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую активирующую РНК; и (b) элемент белка Cas, который включает белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок Cas.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая РНК и активирующая РНК слиты в одну молекулу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cas представляет собой белок casp9 типа II. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никазу D10A, или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf, и система CRISPR-Cpf включает: (a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющий РНК-элемент, направляющую РНК, которая включает нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях; и (b) элемент белка Cpf, который включает белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляют одним или несколькими векторами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько векторов выбирают из ви-

русных векторов, плазмид или одноцепочечных ДНК (оцДНК).

В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы выбирают из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных, аденоассоциированных векторов и векторов на основе вируса простого герпеса.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляют с помощью синтетической РНК.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляют с помощью нанокомпозиции.

В некоторых вариантах осуществления предлагается набор или композиция для редактирования одной или нескольких целевых геномных областей. В некоторых вариантах осуществления набор или композиция включает систему редактирования генома; и соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемую соль или его сокристалл. В некоторых вариантах осуществления соединение в наборе или композиции представлено структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой солью или ее сокристаллом, где каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород или дейтерий.

В некоторых вариантах осуществления изобретения система для редактирования генома представлена в виде набора или композиции, и указанная система представляет собой систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома в наборе или композиции представляет собой систему на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR в наборе или композиции представляет собой систему CRISPR-Cas или систему CRISPR-Cpf.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR в наборе или композиции представляет собой систему CRISPR-Cas, и в которой система CRISPR-Cas включает: (а) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент, который включает: (i) нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую РНК; (ii) и активирующую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с нацеливающей РНК, или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую активирующую РНК; и (b) элемент белка Cas, который включает белок Cas или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок Cas.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cas в наборе или композиции представляет собой белок Casp9 типа II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения белок Cas9 в наборе или композиции представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никакую D10A, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR в наборе или композиции представляет собой систему CRISPR-Cpf, и в которой система CRISPR-Cpf включает: (а) нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую РНК; и (b) элемент белка Cpf, который включает Cpf-белок или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок Cpf.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома в наборе или композиции включена или упакована в один или несколько векторов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один или несколько векторов выбирают из вирусных векторов, плазмид или оцДНК. В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы выбирают из группы, включающей ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса.

В некоторых вариантах осуществления соединение в наборе или композиции включает соединение, выбранное из табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления соединение в наборе или композиции представляет собой сокристалл, который включает соединение, имеющее структуру формулы (I), формулы (II), формулы (II'), формулы (II''), формулы (II'''), формулы (III), формулы (III'), формулы (III'') или формулы (III'''), и сокристалл образован с кислотой, выбранной из адипиновой кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты, янтарной кислоты или бензойной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления соединение в наборе или композиции представляет собой сокристалл, который включает (а) соединение, выбранное из табл. 1, и (b) адипиновую кислоту.

Другие признаки, задачи и преимущества изобретения станут очевидными из подробного описания, которое следует далее. Однако следует понимать, что подробное описание, наряду с указаниями вариан-

тов осуществления и аспектов изобретения, дано только в качестве иллюстрации, а не для ограничения изобретения. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники исходя из подробного описания.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, композициям и наборам для редактирования целевого генома, например, путем коррекции мутации. Такие способы, композиции и наборы могут повышать эффективность редактирования генома посредством использования ингибитора ДНК-РК.

Система редактирования генома может стимулировать или индуцировать разрыв (разрывы) ДНК, такой как DSB в требуемом локусе генома (или целевой геномной области). Создание разрыва ДНК предполагает использование клеточных ферментов для репарации места разрыва либо пути, подверженным ошибкам NHEJ, либо через свободный от ошибок путь HDR. В случае NHEJ разрыв ДНК восстанавливается путем слияния двух концов разрыва ДНК в серии ферментативных процессов, в которых задействованы гетеродимер Ku70/80 и ферменты, зависимые от ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-РК). Механизм репарации включает присоединение и выравнивание двух концов ДНК, резекции, удлинения и лигирования ((Rouet et al.; Dexeimer T. DNA repair pathways and mechanisms. В: Mathews L, Cabarcas S, Hurt E, editors. DNA repair of cancer stem cells. Dordrecht: Springer; 2013, p. 19-32.), что приводит к образованию небольших мутаций типа инсерции или делеции в месте разрыва. Инсерции или делеции, введенные в кодирующую последовательность гена, могут вызывать образование либо преждевременного стоп-кодона, либо мутации в рамке считывания, что приводит к продуцированию нефункциональных, укороченных белков. Механизм пути HDR менее понятен, и он включает другой набор белков для репарации, таких как Rad51, которые стимулируют инвазию цепей с помощью матрицы репарации донорами на основе инсерций или замены генов. Следовательно, HDR позволяет вводить экзогенную ДНК-матрицу для получения желаемого результата редактирования ДНК в геноме, и HDR может быть мощной стратегией для моделирования трансляционного заболевания и редактирования терапевтического генома для восстановления функции генов.

Из двух путей репарации ДНК, путь NHEJ, происходит с гораздо более высокой частотой (высокой вероятностью события), и сообщается, что эффективность более чем 70% может быть достигнута даже в нейронах (Swiech et al., "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9", Nat Biotechnol. 2015 Jan; 33(1): 102-62014). Однако коррекция гена HDR происходит с очень низкой частотой (низкой вероятностью события), и во время фазы S и G2, когда происходит репликация ДНК, и когда доступны сестринские хроматиды, действующие в качестве матриц для репарации (Heyer et al., Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annual Review of Genetics 44:113-139, 2010). Поскольку репарация по пути NHEJ происходит в течение всего клеточного цикла, конкурируя и превосходя путь репарации HDR во время фазы S и G2, то направленная инсерция по пути HDR остается сложной задачей и является объектом продолжающихся исследований.

ДНК-протеинкиназа (ДНК-РК) играет важную роль в различных процессах репарации ДНК. ДНК-РК участвует в репарации двухцепочечной ДНК путем активации пути соединения негомологичных концов (NHEJ). Предполагается, что NHEJ протекает через три стадии: распознавание DSB, процессинг ДНК для удаления нелигируемых концов или других форм повреждения концов, и, наконец, лигирование концов ДНК. Распознавание DSB осуществляется путем связывания гетеродимера Ku с укороченными ДНК-концами с последующим рекрутингом двух молекул субъединиц ДНК-зависимой каталитической протеинкиназы (ДНК-РКcs или ДНК-РК) к соседним сторонам DSB; это служит для защиты разорванных концов до тех пор, пока не будут рекрутированы дополнительные ферменты для процессинга. Недавние данные подтверждают гипотезу о том, что ДНК-РКcs фосфорилирует фермент для процессинга, такой как Artemis, а также сам подготавливает концы ДНК для дополнительного процессинга. В некоторых случаях для синтеза новых концов до стадии лигирования может потребоваться ДНК-полимераза. Аутофосфорилирование ДНК-РКcs, как полагают, индуцирует конформационное изменение, которое открывает центральную ДНК-связывающую полость, высвобождает ДНК-РКcs из ДНК и способствует окончательному ре-лигированию концов ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, композициям и наборам для улучшения редактирования генов, в частности для повышения эффективности репарации разрыва (разрывов) ДНК через путь HDR, или для повышения эффективности ингибирования или подавления репарации разрыва (разрывов) ДНК через путь NHEJ, в системах редактирования генома, включая HDR-репарацию на основе CRISPR, в клетках. Не будучи связанными какой-либо конкретной теорией, считается, что система редактирования генома, вводимая в клетку (клетки), взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) гена-мишени, что приводит к разрыву ДНК или вызывает разрыв ДНК; такой разрыв ДНК восстанавливается несколькими путями репарации, например - HDR, и ингибитор ДНК-РК, вводимый в клетку (клетки), ингибирует, блокирует или подавляет путь NHEJ репарации, и частота (вероятности события) или эффективность пути HDR репарации ДНК могут быть увеличены или промотированы.

Взаимодействие между системой редактирования генома с нуклеиновой кислотой (кислотами) гена-мишени может представлять собой гибридизацию по меньшей мере части системы редактирования ге-

нома с нуклеиновой кислотой (кислотами) гена-мишени или любое другое распознавание нуклеиновой кислоты (кислот) гена-мишени посредством системы редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления такое взаимодействие представляет собой взаимодействие белок-ДНК или гибридизацию между парами оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам редактирования одной или нескольких целевых геномных областей в клетке (клетках) путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК. Редактирование может происходить одновременно или последовательно. Редактирование одной или нескольких целевых геномных областей включает любой вид генетических манипуляций или конструирования генома клетки. В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или нескольких целевых геномных областей может включать инсерции, делеции или замены геномных областей в клетке (клетках). Геномные области содержат генетический материал в клетке (клетках), такой как ДНК, РНК, полинуклеотиды и олигонуклеотиды. Геномные области в клетке (клетках) также содержат геномы митохондрий или хлоропластов, содержащихся в клетке (клетках).

В некоторых вариантах осуществления инсерции, делеции или замены могут быть либо в кодирующей, либо некодирующей геномной области, в интронных или экзонных областях, или любых их комбинаций, включая их перекрывающиеся или неперекрывающиеся сегменты. Используемый здесь термин "некодирующая область" относится к геномным областям, которые не кодируют аминокислотную последовательность. Например, некодирующие области включают интроны. Кодированные области относятся к геномным областям, кодирующим аминокислотную последовательность. Например, кодирующие области включают экзоны.

В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или нескольких целевых геномных областей может происходить в любой одной или нескольких целевых областях в геноме клетки (клеток). В некоторых вариантах осуществления редактирование одной или нескольких целевых геномных областей может происходить, например, в экзоне, интроне, сайте инициации транскрипции, в промоторной области, энхансерной области, сайленсерной области, разделительной области, антирепрессоре, посттрансляционном регуляторном элементе, сигнале полиаденилирования (например, минимальный поли А), консервативной области, сайте связывания фактора транскрипции или в любых их комбинациях.

В некоторых вариантах осуществления введение в клетку (клетки) ингибитора ДНК-РК и системы редактирования генома приводит к повышению эффективности редактирования целевого генома по сравнению с условиями, когда ингибитор ДНК-РК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки). В некоторых вариантах осуществления увеличенная эффективность редактирования равна приблизительно 1-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 10-кратному, 15-кратному, 20-кратному, 25-кратному, 30-кратному, 40-кратному, 50-кратному или 100-кратному увеличению по сравнению с состоянием, когда ингибитор ДНК-РК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки) или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК. Эффективность редактирования генома может быть измерена с помощью любого способа, известного в данной области, например, любым способом, который устанавливает частоту (вероятность события) целевой интеграции полинуклеотидов или путем измерения частоты (вероятности события) направленного мутагенеза. Целевые интеграции полинуклеотида могут также приводить к изменению или замещению последовательности в геноме, хромосоме или интересующей области в клеточном хроматине. Целевые интеграции полинуклеотида могут привести к направленным мутациям, включая, без ограничения, точечные мутации (т.е. преобразования одной пары оснований в другую пару оснований), замены (т.е. преобразования множества пар оснований в другую последовательность одинаковой длины), инсерций одной или нескольких пар оснований, делеций одной или нескольких пар оснований, и любой комбинации вышеуказанных изменений последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления способы редактирования одной или нескольких целевых геномных областей в клетке (клетках) включают введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка (клетки) синхронизирована в фазе клеточного цикла S или G2. Синхронизация клетки (клеток) в фазе клеточного цикла S или G2 может быть достигнута любым способом, известным в данной области. В качестве неограничивающего примера агенты, которые могут быть использованы для синхронизации клетки (клеток) в фазе клеточного цикла S или G2, включают афидолин, диоксимочевину, ловастатин, мимеотозин, носодазол, тимидин или любые их комбинации (см. Lin et al. "Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery", *Elife*. 2014 Dec 15; 3). В некоторых вариантах агенты для синхронизации клеток можно вводить в любое время во время процесса редактирования гена. В некоторых вариантах клетка (клетки) может быть синхронизирована в фазе клеточного цикла S или G2 до, во время или после введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления способы редактирования одной или нескольких целевых геномных областей в клетке (клетках) путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК приводят к повышенному выживанию клеток по сравнению с условиями, когда сис-

тему редактирования генома и ингибитор ДНК-ПК не вводили в клетку (клетки), или по сравнению с условиями, когда только система редактирования гена приведена в контакт или введена в клетку (клетки), но без ингибитора ДНК-ПК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях через путь HDR. Введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводит к разрыву ДНК целевой области генома, и затем происходит восстановление разрыва ДНК, по меньшей мере частично, по пути HDR. Эти способы приводят к увеличению количества репараций, опосредованных HDR (например, по пути HDR) в одной или нескольких целевых геномных областях, что приводит к большей эффективности репарации опосредованной HDR по сравнению с условиями, когда ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки). В некоторых вариантах осуществления изобретения увеличенная эффективность репарации ДНК, опосредованной HDR, равна приблизительно 1-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 10-кратному, 15-кратному, 20-кратному, 25-кратному, 30-кратному, 40-кратному, 50-кратному или 100-кратному увеличению по сравнению с состоянием, когда ингибитор ДНК-ПК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки) или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-ПК. Эффективность редактирования генома может быть измерена с помощью любого способа, известного в данной области, например, любым способом, который устанавливает частоту (вероятность события) целевой интеграции полинуклеотидов или путем измерения частоты (вероятность события) направленного мутагенеза.

В некоторых вариантах способы, описанные здесь, обеспечивают репарацию разрыва ДНК путем повышения эффективности пути HDR.

Путь HDR может быть "каноническим" или "альтернативным". "HDR" (гомологичная направленная репарация) относится к специализированной форме репарации ДНК, которая происходит, например, во время репарации двухцепочечных разрывов или ника ДНК в клетке (клетках). HDR двухцепочечных разрывов обычно основывается на гомологии нуклеотидной последовательности, используя для этого "донорную" молекулу для репарации матрицы "мишени" (например, с разрывом двойной цепи), и может привести к переносу генетической информации от донора к мишени. Каноническая HDR двухцепочечных разрывов обычно основана на BRCA2 и RAD51, и обычно используют донорную молекулу дцДНК. Неканоническая или "альтернативная" HDR представляет собой механизм HDR, который подавляется BRCA2, RAD51 и/или функционально связанными генами. В альтернативной HDR в качестве донорной молекулы может использоваться оцДНК или дцДНК с ником (см., например, WO 2014/172458).

В некоторых вариантах осуществления способы репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях через путь HDR путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводят к повышенному выживанию клеток по сравнению с условиями, когда систему редактирования генома и ингибитор ДНК-ПК не вводят в клетку (клетки), или по сравнению с условиями, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования гена, без ингибитора ДНК-ПК.

Некоторые варианты осуществления представляют способы ингибирования или подавления опосредованной NHEJ репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях в клетке (клетках). В некоторых вариантах осуществления ингибирование или подавление опосредованной NHEJ репарации разрыва ДНК осуществляют путем ингибирования или подавления пути NHEJ. Путь NHEJ может представлять собой либо классический ("канонический"), либо альтернативный путь NHEJ (alt-NHEJ, или опосредованное микрогомологией соединение концов (ММЕJ)). Пусть NHEJ или alt-NHEJ подавляется в клетке (клетках) путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК.

Классический путь репарации NHEJ представляет собой путь репарации двухцепочечной ДНК, при котором лигируют концы двухцепочечного разрыва без обширной гомологии. Классическая репарация NHEJ предусматривает использование нескольких факторов, включая гетеродимер KU70/80 (KU), XRCC4, лигазу IV и каталитическую субъединицу ДНК-протеинкиназ (ДНК-ПКcs) Alt-NHEJ представляет собой другой путь репарации разрывов двойной цепи. В alt-NHEJ используется микрогомологичная последовательность из 5-25 пар оснований во время выравнивания разорванных концов перед соединением разорванных концов. Alt-NHEJ в значительной степени не зависит от гетеродимера KU70/80 (KU), XRCC4, лигазы IV, каталитической субъединицы ДНК-протеинкиназ (ДНК-ПКcs), RAD52 и ERCC1 (см. Bennardo et al., "Alternative-NHEJ is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair", PLOS Genetics, June 27, 2008).

В некоторых вариантах осуществления способы ингибирования или подавления опосредованной NHEJ репарации ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях в клетке (клетках) путем ингибирования или подавления пути NHEJ, хотя введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК приводит к повышенной эффективности ингибирования или подавления опосредованной NHEJ репарации разрыва ДНК по сравнению с клеткой (клетками), в которую не вводили систему редактирования генома и ингибитор ДНК-ПК, или по сравнению с состоянием, когда в клетку

(клетки) вводили систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК. В некоторых вариантах осуществления увеличенная эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК через путь NHEJ за счет контактирования клетки (клеток) с ингибитором ДНК-РК и системой редактирования генома равна приблизительно 1-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 10-кратному, 15-кратному, 20-кратному, 25-кратному, 30-кратному, 40-кратному, 50-кратному или 100-кратному увеличению по сравнению с состоянием, когда ингибитор ДНК-РК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки) или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК. Эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК через путь NHEJ может быть измерена любым способом, известным в данной области, например, путем определения частоты (вероятности события) целевой интеграции полинуклеотидов или путем измерения частоты (вероятности события) направленного мутагенеза.

В некоторых вариантах осуществления способы ингибирования или подавления опосредованной NHEJ репарации ДНК разрушают в одной или нескольких целевых геномных областях в клетке (клетках) путем ингибирования или подавления пути NHEJ, хотя введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК приводит к повышенному выживанию клеток по сравнению с условиями, когда систему редактирования генома и ингибитор ДНК-РК не вводили в контакт или введены в клетку (клетки), или по сравнению с условиями, когда только система редактирования гена приведена в контакт или введена в клетку (клетки) без ингибитора ДНК-РК.

Разрыв ДНК может представлять собой двухцепочечный разрыв (DSB, разрыв двойной цепи) или два одноцепочечных разрыва (например, ДНК с двумя никами). DSB может быть затупленным или иметь 5'- или 3'- "липкие концы", если цепи расщепляются слишком далеко друг от друга, и "липкие концы" будут отжигаться по отдельности, и существовать в виде двух ников, а не одного DSB.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы модификации экспрессии одного или более генов (гена-мишени (генов-мишеней)) и/или соответствующих белков или последующих белков путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать, например, инсерции, делеции, замены, модификации или нарушения в целевой геномной области (областях) гена-мишени (генов-мишеней) клетки (клеток), что приводит к модифицированной экспрессии гена-мишени (генов-мишеней). В некоторых вариантах осуществления инсерция, делеция, замена, модификация или нарушение могут привести к направленной экспрессии конкретного белка или группы белков или последующих белков. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать инсерции, делеции или замены в некодирующих областях или кодирующих областях. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать инсерции, делеции, замены, модификации или нарушения в промоторной области, энхансерной области и/или любом другом регуляторном элементе гена, включая экзон, интрон, сайт инициации транскрипции, сайленсерную область, разделительную область, антирепрессор, посттрансляционный регуляторный элемент, сигнал полиаденилирования (например, минимальный поли А), консервативную область, сайт связывания фактора транскрипции или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома может создавать инсерции, делеции, замены, модификации или разрушения в более чем одной целевой области одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК может обеспечить направленную экспрессию модифицированного гена в клетке (клетках). Такая целевая экспрессия модифицированного гена может приводить к экспрессии конкретных белков и последующих белков.

В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия расположенного ниже гена и/или последующего белка увеличена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или экспрессия имеет 1-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 2,5-кратное, 3-кратное, 3,5-кратное, 4-кратное, 4,5-кратное, 5-кратное или 10-кратное увеличение по сравнению с состоянием, когда ингибитор ДНК-РК и систему редактирования генома не вводят в клетку (клетки), или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия расположенного ниже гена и/или последующего белка уменьшена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по сравнению с состоянием, когда ингибитор ДНК-РК и система редактирования генома не вводят в клетку (клетки), или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК.

Клетка для способов, описанных здесь, может представлять собой любую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку позвоночного. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка позвоночного представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах клетка позвоночного является клеткой человека.

Клетка может быть клеткой любого вида на любой стадии развития. В некоторых вариантах клетка может представлять собой дифференцированную клетку, тотипотентную стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку, эмбриональную стволовую клетку, эмбриональную зародышевую клетку, зрелую стволовую клетку, клетку-предшественник, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку

или любую их комбинацию. Дифференцированная клетка представляет собой специализированную клетку, которая выполняет определенную функцию в ткани. Тотипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку эмбриона, плода или взрослого человека, которая может делиться в течение длительных периодов и обладает способностью дифференцироваться в любой тип клеток организма из любого из трех зародышевых слоев. Плюрипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку эмбриона, плода или взрослого человека, которая может делиться в течение длительных периодов и обладает способностью дифференцироваться в любой тип клеток организма, за исключением внеэмбриональной ткани или плаценты. Эмбриональная стволовая клетка представляет собой недифференцированную стволовую клетку, которая находится во внутренней клеточной массе эмбриона и обладает способностью дифференцироваться в любой тип клетки любого из трех зародышевых слоев. Эмбриональная зародышевая клетка представляет собой эмбриональную клетку, которая может вызвать рост репродуктивных клеток, таких как сперматозоиды или яичные клетки. Зрелая стволовая клетка является недифференцированной клеткой, которая находится в дифференцированной ткани, способная самовосстанавливаться и может дифференцироваться в любую из клеток ткани, в которой она находится. Предшественник или клетка-предшественник представляет собой частично дифференцированную клетку, которая обычно может дифференцироваться только в один вид клетки (например, унипотентная клетка). Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка представляет собой разновидность плюрипотентной стволовой клетки, которая образуется из взрослых дифференцированных или частично дифференцированных клеток (см., например, WO/2010/017562).

Используемые здесь формы единственного числа также включают множественное значение, если контекст ясно не указывает иное. Например, термин "клетка" подразумевает также множество клеток, включая их смеси. Например, указания "одна или несколько клеток" и "клетка" используемые в данном описании, являются взаимозаменяемыми. Аналогично, указания "одна или несколько целевых геномных областей" и "целевая геномная область (области)" в настоящем описании также используются взаимозаменяемо.

Термины, которые являются равнозначными, используются здесь взаимозаменяемо. Термин "приблизительно" или "примерно", применяемый к одному или нескольким интересующим значениям, относится к значению, которое аналогично указанному опорному значению. В некоторых вариантах термин "приблизительно" или "примерно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного базового значения, если не указано иное или не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, таких как дезоксирибонуклеотиды (ДНК), либо рибонуклеотиды (РНК), либо их аналоги. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или еще неизвестную. Следующие примеры являются неограничивающими примерами полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локусы), определенные с помощью анализа сцепления, экзоны, интроны, информационная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, короткие интерферирующие РНК (siRNA), короткошпилочная РНК (shRNA), микро-РНК (miRNA), рибозимы, кДНК рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Если они присутствуют, то модификации нуклеотидной структуры могут быть выполнены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом-меткой. Термин "оцДНК" означает одноцепочечную молекулу ДНК. Термин "оцОДН" (ssODN) означает одноцепочечные олигодезоксинуклеотиды.

Термин "встречающийся в природе нуклеотид", используемый здесь, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды" включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и тому подобное. Термин "олигонуклеотидные связи", упоминаемые здесь, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфоранилотиоатные, фосфораниладилатные, фосфонамидатные и т.п. Олигонуклеотид может включать метку для обнаружения, если это желательно.

Термин "синтетическая РНК" относится к РНК, которая является сконструированной или не встречающейся в природе.

Используемый здесь термин "дикий тип" представляет собой термин, известный специалистам в данной области, и означает обычную форму организма, штамма, гена или характеристики, которые встречаются в природе, в отличие от мутантных или вариантных форм.

Термины "не встречающийся в природе" или "генно-инженерный" используются взаимозаменяемо и указывают участие человека. Эти термины, когда они относятся к молекулам нуклеиновой кислоты или полипептидам, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, по меньшей мере, по существу не содержит по меньшей мере одного компонента, с которым они не связаны в природе, и не присутствуют в формах, встречающихся в природе.

Выражение "комплементарность" относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородную связь (связи) с другой нуклеиновой кислотой с помощью традиционного механизма Уотсона-Крика или с использованием других нетрадиционных типов связывания. Процент комплементарности указывает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, спаривание оснований по Уотсону-Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 остатков, что составляет 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% комплементарности). "Полностью комплементарная" последовательность означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты образуют водородные связи с одинаковым количеством смежных остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин "по существу комплементарный" относится к степени комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в жестких/строгих условиях.

Используемый здесь термин "экспрессия" относится к процессу, с помощью которого полинуклеотид транскрибируется с матрицы ДНК (такой как мРНК или другого транскрипта РНК), и/или к процессу, посредством которого транскрибированная мРНК затем транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды могут вместе обозначаться как "генный продукт". Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, то экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, и он может содержать модифицированные аминокислоты или он может прерываться не-аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; например, образование дисульфидных связей, гликозилирование, липидизацию, ацетилирование, фосфорилирование или любую другую манипуляцию, такую как конъюгация с компонентом-меткой. В данном описании термин "аминокислота" включает природные и/или не природные или синтетические аминокислоты, включая глицин, а также D и L оптические изомеры, и аминокислотные аналоги и пептидомиметики.

Термин "агент" используется здесь для обозначения химического соединения, небольшой молекулы, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, изготовленного из биологических материалов.

Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения позвоночного, такого как млекопитающее, или человека. Млекопитающие включают, без ограничения, мышей, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних животных.

Термины "лечение", "облегчение состояния" или "улучшение состояния" используются здесь взаимозаменяемо. Эти термины относятся к способу получения полезных или желательных результатов, включая, без ограничения, терапевтический эффект и/или профилактический эффект. Под терапевтической пользой подразумевается любое терапевтически релевантное улучшение или воздействие на один или несколько заболеваний, состояний или симптомов при лечении. Для профилактического эффекта композиции могут быть введены субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома, или индивидууму, сообщившему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже если заболевание, состояние или симптом могут еще не проявляться. Эти термины также означают лечение заболевания у млекопитающего, например у человека, включая: (а) ингибирование заболевания, т.е. остановку или предотвращение его развития; (б) ослабление заболевания, т.е. регрессию болезненного состояния; или (с) лечение заболевания.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству агента, которое является достаточным для достижения полезных или желательных результатов. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от одного или более из: субъекта и заболевания, подлежащего лечению, массы и возраста субъекта, тяжести заболевания, способа введения и т.п., которые могут быть легко определены специалистом в данной области. Этот термин также относится к дозе, которая будет обеспечивать получение изображения для обнаружения любым из способов визуализации, описанных здесь. Конкретная доза может изменяться в зависимости от одного или более из: конкретного выбранного агента, режима дозирования, который необходимо соблюдать, независимо от того, вводят ли его в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, подлежащей визуализации, и системы физической доставки, которая переносит агент.

Используемый здесь термин "введение" относится к контактированию, инъецированию, распределению, доставке или направлению геномной системы редактирования и/или ингибитора ДНК-РК в клет-

ку или субъекту. В некоторых вариантах введение представляет собой контакт клетки (клеток) с геномной системой редактирования и/или ингибитором ДНК-РК. В некоторых вариантах введение представляет собой доставку геномной системы редактирования и/или ингибитора ДНК-РК в клетку (клетки). В некоторых вариантах введение представляет собой направление геномной системы редактирования и/или ингибитора ДНК-РК в клетку (клетки). В некоторых вариантах введение представляет собой инъекцию системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-РК в клетку (клетки). Введение может происходить в условиях *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Введение геномной системы редактирования и ингибитора ДНК-РК в клетку (клетки) можно проводить одновременно или последовательно.

Термин "приобретенный" в отношении состояния или заболевания, как он используется здесь, означает нарушение или состояние, которое развивается постфетально, в отличие от врожденного расстройства, которое присутствует при рождении. Врожденное нарушение может предшествовать приобретенному расстройству.

Термин "врожденное" или "наследственное" состояние или заболевание представляет собой генетическое нарушение, обнаруженное в геноме субъекта, который присутствует у субъекта с рождения. Используемый здесь термин "геном" включает весь генетический материал в ядре и цитоплазме, а также включает митохондриальный геном и рибосомный геном. Врожденное или унаследованное состояние/заболевание может проявиться в любое время в течение жизни субъекта, например с рождения или во взрослом возрасте.

Термин "генетическое заболевание" или "генетическое нарушение" включает наследственные или приобретенные мутации в геноме субъекта, которые вызывают или могут вызвать заболевание.

Термины "полиморфизмы" или "генетические вариации" означают разные формы гена в генетическом локусе.

"Вирусный вектор" представляет собой рекомбинантно полученный вирус или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, который должен быть доставлен в клетку-хозяина в условиях *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Примеры вирусных векторов включают ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, векторы на основе вируса простого герпеса, химерные вирусные векторы и т.п. В некоторых вариантах осуществления, где перенос гена опосредован ретровирусным вектором, векторная конструкция относится к полинуклеотиду, содержащему ретровирусный геном или его часть.

Некоторые варианты настоящего изобретения относятся к векторным системам, содержащим один или несколько векторов или векторов как таковых. Векторы могут быть сконструированы для экспрессии транскриптов CRISPR (например, транскриптов нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Например, транскрипты CRISPR могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia Coli*, клетках насекомых (используя бакуловирусные векторы экспрессии), дрожжевых клетках или в клетках млекопитающих.

Клетки могут представлять собой первичные клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), эмбриональные стволовые клетки (hES), стволовые клетки взрослых, клетки-предшественники или клеточные линии. "Первичные клетки" представляют собой клетки, взятые непосредственно из живой ткани и помещенные в условия *in vitro* для роста. Первичные клетки имеют небольшое количество удвоений популяции и имеют ограниченный срок жизни для удвоений популяции в условиях *in vitro*. "Стволовые клетки", "зрелые эмбриональные стволовые клетки" и "индуцированные плюрипотентные стволовые клетки" представляют собой неспециализированные и недифференцированные клетки, способные самообновляться и обладающие потенциалом дифференцироваться в клетки различных типов со специализированной функцией. "Клеточные линии" могут включать клеточные культуры, происходящие из одного типа клеток или из набора клеток одного типа, которые могут бесконечно пролиферировать. Неограничивающие примеры клеточных линий млекопитающих могут включать клетки CD34, клетки 293, клетки HEK, клетки CHO, клетки BHK, клетки CV-1, клетки Jurkat, клетки HeLa или любые их варианты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор способен управлять экспрессией одной или нескольких последовательностей в клетках млекопитающих с использованием экспрессирующего вектора млекопитающего. Примеры экспрессирующих векторов млекопитающих включают pCDM8 и pMT2PS. Функции управления экспрессирующими векторами при использовании их в клетках млекопитающих обычно обеспечиваются одним или несколькими регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы получают из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, обезьяньего вируса 40 и других, раскрытых здесь и известных в данной области техники. Другие промоторы могут включать, например, промотор EF1 или промотор EF1 альфа. Для других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и для эукариотических клеток: см., например, главы 16 и 17 в Sambrook, et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Используемый здесь термин "метка" или "меченый" относится к включению детектируемого маркера, например, путем включения радиоактивной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных остатков, которые могут быть обнаружены маркированным авидином (например, стрептави-

дином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть детектирована оптическими или колориметрическими методами). В некоторых случаях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы здесь. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, бета-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металлов, метки эпитопов). Для уменьшения потенциальных стерических затруднений в некоторых вариантах метки прикреплены с помощью спейсеров различной длины. Термин "фармацевтический агент или лекарственное средство", используемый здесь, относится к химическому соединению или композиции, способной индуцировать желаемый терапевтический эффект при правильном введении пациенту.

Используемый здесь термин "по существу чистый" означает, что указанный объект является преобладающим в числе присутствующих (т.е. на молярной основе он более распространен, чем любые другие отдельные виды в композиции). В некоторых вариантах осуществления по существу очищенная фракция представляет собой композицию, в которой целевой объект содержится в количестве по меньшей мере приблизительно 50% (на молярной основе) от всех присутствующих макромолекулярных соединений.

Как правило, по существу чистая композиция содержит более чем приблизительно 80% всех макромолекулярных соединений, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах по существу чистая композиция содержит более чем приблизительно 85%, 90%, 95% и 99% всех макромолекулярных соединений из числа компонентов, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах целевое соединение очищено по существу до полной гомогенности (примесные частицы не обнаруживаются в композиции обычными способами детектирования), и композиция состоит по существу из одного макромолекулярного соединения.

Система редактирования генома.

Могут использоваться различные типы систем геномной инженерии. Термины "система редактирования генома", "система редактирования гена" и т.п., которые используются здесь взаимозаменяемо, относятся к системе или технологии, которая редактирует целевой ген или его функцию или его экспрессию. Система редактирования генома содержит по меньшей мере один эндонуклеазный компонент, обеспечивающий расщепление целевой геномной области (областей) или последовательности-мишени (мишеней); и по меньшей мере один элемент, нацеливающий на геном, который вводит или нацеливает эндонуклеазный компонент в целевую геномную область (области). Примеры ДНК-нацеливающего элемента включают ДНК-связывающий домен (например, ДНК-связывающий белок цинкового пальца или домен связывания ДНК TALE), направляющие РНК-элементы (например, направляющую РНК CRISPR) и направляющие ДНК-элементы (например, направляющая ДНК NgAgo). Программируемые элементы нацеливания на геном и эндонуклеазы обеспечивают точное редактирование генома путем введения разрывов ДНК, таких как двухцепочечные разрывы (DSB) в определенных геномных локусах. DSB впоследствии задействуют эндогенный аппарат репарации для нехомологичного соединения концов (NHEJ) или для гомологически направленной репарации (HDR) в области DSB, чтобы опосредовать редактирование генома. "Эндонуклеазный компонент" включает эндонуклеазу или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую такую эндонуклеазу.

Термин "эндонуклеаза" относится к любому мутантному, вариантному или сконструированному ферменту, способному катализировать гидролиз (расщепление) связи между нуклеиновыми кислотами в молекуле ДНК или РНК. Эндонуклеазы могут распознавать и расщеплять молекулу ДНК или РНК на целевых геномных областях. Примеры эндонуклеазы включают хоуминг-эндонуклеазу; фермент рестрикции, такой как FokI; химерную нуклеазу цинкового пальца (ZFN), полученную в результате слияния сконструированных доменов цинкового пальца с каталитическим доменом фермента рестрикции, такого как FokI; Cas-ферменты и Cpf-ферменты. Химические эндонуклеазы, в которых химический или пептидный агент расщепления конъюгирован либо с полимером нуклеиновых кислот, либо с другой ДНК, распознающей конкретную последовательность-мишень, нацеливая тем самым активность расщепления на конкретную последовательность, включены в понятие "эндонуклеаза". Примеры химических эндонуклеаз включают синтетические нуклеазы, такие как конъюгаты ортофенантролина, молекулы, расщепляющей ДНК, и триплексобразующие олигонуклеотиды (TFO).

Под "вариантом" подразумевают рекомбинантный белок, полученный путем замены по меньшей мере одного остатка в аминокислотной последовательности родительского белка на другую аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазы, такие как ZFN, TALEN и/или мегануклеазы, содержат домен расщепления и/или полудомен расщепления. Домен расщепления может быть гомологичным или гетерологичным по отношению к ДНК-связывающему домену, например, может быть использован домен связывания ДНК цинкового пальца и домен расщепления из нуклеазы или ДНК-

связывающего домена мегануклеазы и домен расщепления из другой нуклеазы. Гетерологичные домены расщепления могут быть получены из любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Примерами эндонуклеаз, из которых может быть получен домен расщепления, являются, без ограничения, эндонуклеазы рестрикции и эндонуклеазы хоминга (см., например, WO 2013/130824). Известны дополнительные ферменты, которые расщепляют ДНК (например, нуклеаза S1; нуклеаза золотистых бобов; панкреатическая ДНКаза I; микрококковая нуклеаза; эндонуклеаза дрожжей (см. также also Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Один или более из этих ферментов (или их функциональных фрагментов) можно использовать в качестве источника доменов расщепления и полудоменов расщепления.

Полудомен расщепления может быть получен из любой нуклеазы или ее части, как указано выше, которая требует димеризации для расщепляющей активности. В некоторых вариантах осуществления для расщепления необходимы два слитых белка, если слитые белки содержат полудомены расщепления. В некоторых вариантах осуществления может быть использован один белок, содержащий два полудомена расщепления. В некоторых вариантах осуществления два полудомена расщепления могут происходить из одной и той же эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов). В некоторых вариантах осуществления каждый полудомен расщепления может происходить из разных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, сайты-мишени для двух слитых белков предпочтительно расположены по отношению друг к другу таким образом, что связывание двух слитых белков с их соответствующими сайтами-мишенями размещает полудомены расщепления в пространственной ориентации по отношению друг к другу так, чтобы полудомены расщепления образовывали функциональный домен расщепления, например, путем димеризации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, ближние края целевых сайтов разделены 5-50 нуклеотидами, 5-8 нуклеотидами или 15-18 нуклеотидами. Следует отметить, что между двумя сайтами-мишенями может находиться любое целое число нуклеотидов или пар нуклеотидов (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или более). В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления находится между сайтами-мишенями.

Эндонуклеазы рестрикции (рестрикционные ферменты) присутствуют во многих видах и способны специфически связываться с ДНК (в сайте узнавания) и расщеплять ДНК в сайте связывания или вблизи него. Некоторые рестрикционные ферменты (например, типа IIS) расщепляют ДНК в сайтах, удаленных от сайта узнавания, и имеют отдельные домены связывания и расщепления. Например, фермент типа IIS FokI катализирует двухцепочечное расщепление ДНК; см., например, патенты США № 5356802; 5436150 и 5487994; а также Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31, 978-31, 982.

В некоторых вариантах осуществления, эндонуклеазный компонент содержит слитый белок (белки), который включает домен расщепления (или полудомен расщепления) по меньшей мере из одного фермента рестрикции типа IIS и одного или нескольких доменов связывания с цинковым пальцем, которые могут быть сконструированы методами геной инженерии. Примером фермента рестрикции типа IIS, домен расщепления которого отделен от домена связывания, является FokI. Этот конкретный фермент активен в виде димера (Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10570-10575). Часть фермента FokI, используемого в таких слитых белках, считается полудоменом расщепления. Таким образом, для целенаправленного двухцепочечного расщепления и/или целевой замены клеточных последовательностей с использованием слияния цинкового пальца или TALE-FokI, для восстановления каталитически активного домена расщепления могут быть использованы два слитых белка, каждый из которых содержит полудомен расщепления FokI. Альтернативно, можно также использовать одну молекулу полипептида, содержащую домен связывания цинкового пальца и два полудомена расщепления FokI.

Примеры ферментов рестрикции типа IIS описаны в международной публикации WO 07/014275, включенной в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительные рестрикционные ферменты также содержат отдельные домены связывания и расщепления, и они также рассматриваются в рамках изобретения; см., например, Roberts Et al. (2003) *Nucleic Acids Res* 31: 418-420.

В некоторых вариантах осуществления домен расщепления содержит один или несколько сконструированных полудоменов расщепления (также называемых мутантными доменами димеризации), которые минимизируют или предотвращают гомодимеризацию, как описано, например, в публикациях патентов США №№ 20050064474 и 20060188987, а также в WO 2013/130824. Примеры сконструированных полудоменов расщепления FokI, которые образуют облигарные гетеродимеры, включают пару, в которой первый полудомен расщепления включает мутации в аминокислотных остатках в положениях 490 и 538 гена FokI, а второй полудомен расщепления включает мутации в аминокислотных остатках 486 и 499 (см., например, публикации патентов США № 2008/0131962 и 2011/0201055). Сконструированные полудомены расщепления, описанные здесь, могут быть получены с использованием любого подходящего метода, например, посредством сайт-направленного мутагенеза полудоменов расщепления дикого типа (FokI), как описано в публикациях патентов США № 20050064474 и № 20080131962.

Термин "редактирование", "правка", "коррекция" и т.п., относятся к любому типу инженерного конструирования, изменяющего, модифицирующего или модулирующего конструирования (который в каждом случае включает, без ограничения, нокаут гена, мечение гена, разрушение гена, мутацию гена, ин-

серцию гена, делецию гена, активацию гена, сайленсинг гена или нокин гена).

В контексте настоящего описания понятие "генетическая модификация", "редактирование генома", "модификация генома", "модификация гена" и "редактирование гена", относиться к любому добавлению гена, делеции, нокауту, нокину, мечению, мутированию, активации, сайленсингу гена, модификации гена и/или разрушению нуклеотидов клетки. Клетка в этом контексте может находиться в условиях *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Термины "целевая область генома", "ген-мишень", "ДНК-мишень", "целевая последовательности ДНК", "целевая последовательность", "целевая нуклеотидная последовательность", "сайт-мишень", "мишень", "сайт интереса", "сайт узнавания", "сайт узнавания полинуклеотида", "последовательность узнавания", "сайт расщепления" и т.п. означают полинуклеотидную последовательность, которая распознается и расщепляется системой редактирования генома. Эти термины относятся к отдельному участку ДНК, предпочтительно участку генома, в котором разрыв (расщепление) ДНК должен быть индуцирован системой редактирования генома.

Вышеуказанное редактирование, включая генно-инженерное конструирование, изменение, модификацию и модуляцию, может происходить одновременно или последовательно, может быть использована любая система редактирования генома, известная в данной области. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo.

Каждая из систем на основе мегануклеазы, на основе ZFN и на основе TALEN содержит по меньшей мере один ДНК-связывающий домен или нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты (кислот), кодирующую ДНК-связывающий домен, и обеспечивает специфическое нацеливание на или распознавание целевой геномной области (областей) посредством взаимодействий белок-ДНК. Система на основе CRISPR содержит по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты (кислот), кодирующую направляющий РНК-элемент, и обеспечивает специфическое нацеливания или распознавание целевой геномной области (областей) посредством образования пар оснований непосредственно с ДНК целевой геномной области (областей). Система на основе NgAgo содержит по меньшей мере один направляющий ДНК-элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты (кислот), кодирующую направляющий ДНК-элемент, и обеспечивает специфическое нацеливание или распознавание целевой геномной области (областей) посредством образования пар оснований непосредственно с ДНК целевой геномной области (областей).

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему на основе мегануклеазы. В системе на основе мегануклеазы используют мегануклеазы, которые являются эндонуклеазами с большими (>14 пар оснований) сайтами узнавания, и их ДНК-связывающие домены также ответственны за расщепление последовательностей-мишеней. ДНК-связывающий домен мегануклеазы может иметь двухцепочечную последовательность ДНК-мишени длиной от 12 до 45 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза представляет собой либо димерный фермент, где каждый домен мегануклеазы находится на мономере, либо мономерный фермент, содержащий два домена на одном полипептиде. Не только мегануклеазы дикого типа, но также различные варианты мегануклеазы были получены с помощью белковой инженерии для того, чтобы охватить множество уникальных комбинаций последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения также могут быть использованы химерные мегануклеазы с сайтом узнавания, состоящим из полусайта мегануклеазы А и полусайта белка В. Конкретными примерами таких химерных мегануклеаз являются домены белков I-DmoI и I-CreI. Примеры мегануклеаз включают эндонуклеазы хоминга из семейства LAGLIDADG.

Мегануклеаза LAGLIDADG может представлять собой I-SceI, I-ChuI, I-CreI, I-CsmI, PI-SceI, PI-TliI, PI-MtuI, I-CeuI, I-SceII, I-SceIII, HO, PI-CivI, PI-CtrI, PI-AaeI, PI-BsuI, PI-DhaI, PI-DraI, PI-MavI, PI-MchI, PI-MfuI, PI-MflI, PI-MgaI, PI-MgoI, PI-MinI, PI-MkaI, PI-MleI, PI-MmaI, PI-MshI, PI-MsmI, PI-MthI, PI-MtuI, PI-MxeI, PI-NpuI, PI-PfuI, PI-RmaI, PI-SpbI, PI-SspI, PI-FacI, PI-MjaI, PI-PhoI, PI-TagI, PI-ThyI, PI-TkoI, PI-TspI или I-MsoI; или может быть функциональным мутантом или его вариантом, гомодимерным, гетеродимерным или мономерным. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG представляет собой производное I-CreI. В некоторых вариантах мегануклеаза LAGLIDADG имеет по меньшей мере 80% сходство с природной мегануклеазой LAGLIDADG I-CreI. В некоторых вариантах мегануклеаза LAGLIDADG имеет по меньшей мере 80% сходство с остатками 1-152 природной мегануклеазы LAGLIDADG I-CreI. В некоторых вариантах мегануклеаза LAGLIDADG может состоять из двух мономеров, имеющих по меньшей мере 80% сходство с остатками 1-152 природной мегануклеазы LAGLIDADG I-CreI, соединенных вместе линкерным пептидом или без линкера.

"Мегануклеаза LAGLIDADG" относится к хоминг-эндонуклеазе из семейства LAGLIDADG, как определено в Stoddard et al (Stoddard, 2005), или к сконструированному варианту, содержащему полипептид, имеющий по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или большую идентичность или сходство с указанной природной хоминг-эндонуклеазой. Такие сконструированные полипептиды LAGLI-

DADG могут быть получены из мономерных или димерных мегануклеаз. При получении из димерных мегануклеаз такие сконструированные мегануклеазы LAGLIDADG могут быть одноцепочечными или димерными эндонуклеазами.

Под обозначением "I-CreI" подразумевается природная мегануклеаза дикого типа I-CreI, имеющая последовательность с номером доступа Ig9y в базе данных PDB.

Функции распознавания и расщепления ДНК мегануклеаз обычно представлены в одном домене. В отличие от мегануклеаз, ДНК-связывающие домены систем на основе ZFN и TALEN отличаются от эндонуклеазы функцией расщепления. Система на основе ZFN включает по меньшей мере один белок цинкового пальца или его вариант, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок цинкового пальца или его вариант в качестве ДНК-связывающего домена; и эндонуклеазный элемент, такой как нуклеаза цинкового пальца (ZFN) или домен расщепления FokI. Белок цинкового пальца (ZFP) является не встречающимся в природе белком, и он сконструирован для связывания с выбранным целевым местом (см., например, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20: 135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; патенты США №№ 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; и публикации патентов США №№ 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061).

Сконструированный домен связывания цинкового пальца может иметь новую специфичность связывания по сравнению с природным белком цинкового пальца. Способы конструирования включают, без ограничения, рациональную конструкцию и различные типы выбора. Рациональная конструкция включает, например, использование баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и отдельные аминокислотные последовательности цинковых пальцев, где каждая триплетная или квадрупольная нуклеотидная последовательность ассоциирована с одной или несколькими аминокислотными последовательностями цинковых пальцев, которые связываются с конкретной триплетной или квадрупольной последовательностью (см., например, патенты США №№ 6453242 и 6534261, включенные в данное описание во всей их полноте посредством ссылки).

Различные виды способов отбора могут быть использованы для описанных здесь способов. Примеры способов отбора, включая фаговый дисплей и двухгибридные системы, описаны в патентах США №№ 5789538; 59255523; 6007988; 6013453; 6410248; 6140466; 6200759 и 6242568; а также в WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 и GB 238237. Кроме того, как раскрыто в этих и других ссылках, домены цинковых пальцев и/или белки, содержащие несколько цинковых пальцев ("многопальцевые белки") могут быть связаны вместе с использованием любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры длиной из 5 или более аминокислот; см. также патенты США №№ 6479626; 6903185 и 7153949 в отношении примеров линкерных последовательностей длиной из 6 или более аминокислот. Описанные здесь белки могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. Выбор целевых сайтов; ZFP и способы конструирования и получения слитых белков (и полинуклеотидов, кодирующих их) известны специалистам в данной области и подробно описаны в патентах США №№ 61400815; 789538; 6453242; 6534261; 5925523; 6007988; 6013453; 6200759; в публикациях заявок WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496.

Кроме того, как раскрыто в этих и других ссылках, домены цинкового пальца и/или многопальцевые белки могут быть связаны вместе с использованием любых подходящих линкерных последовательностей, включая, например, линкеры длиной из 5 или более аминокислот в длину; см. также патенты США №№ 6479626; 6903185 и 7153949 в отношении примеров линкерных последовательностей длиной из 6 или более аминокислот. Описанные здесь белки могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными белками цинковых пальцев.

Транскрипционная система на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), относится к системе редактирования генома, которая использует один или несколько активирующих транскрипцию эффекторных (TALE)-ДНК-связывающих доменов и эндонуклеазного элемента, такого как домен расщепления FokI. TALE-ДНК-связывающий домен содержит один или несколько повторяющихся звеньев TLE, каждое из которых имеет длину из 30-38 (например, 31, 32, 33, 34, 35 или 36) аминокислот. В TALE-ДНК-связывающем домене может использоваться полноразмерный белок TALE, его фрагмент или вариант. TALE-ДНК-связывающий домен может быть слит или связан с доменом эндонуклеазы посредством линкера.

Термины "система на основе CRISPR", "система редактирование генома на основе CRISPR", "CRISPR-редактирование генома", "CRISPR-редактирование гена", "редактирование генома на основе эндонуклеазы CRISPR" и т.п. выражения используются здесь взаимозаменяемо, и все они относятся к системе редактирования генома, которая содержит один или несколько элементов направляющей РНК и один или несколько элементов эндонуклеазы, направляемых РНК. Направляющий РНК-элемент содержит нацеливающую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементар-

ную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую РНК. РНК-направляющий эндонуклеазный элемент содержит эндонуклеазу, которую направляют или вводят в целевую геномную область (области) за счет направляющего РНК-элемента; или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую такую эндонуклеазу. Примерами такой системы, основанной на CRISPR, является система CRISPR-Cas или система CRISPR-Cpf.

Как используется в настоящем описании, термины "направляющий РНК-элемент", "направляющая РНК", "направляющая РНК молекула" и "искусственная направляющая РНК" (обозначение на английском - gRNA) используются взаимозаменяемо и относятся к полинуклеотидной последовательности, содержащей направляющую на мишень РНК, которая гибридизуется с целевой нуклеиновой последовательностью, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющую РНК. Направляющая РНК содержит направляющий домен, который включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в целевой геномной области мишени. Выражение "по существу комплементарный" означает степень комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в жестких условиях.

Направляющий РНК-элемент может дополнительно включать активирующую РНК, которая способна к гибридизации с нацеливающей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую активирующую РНК (РНК-активатор). Активирующая РНК и нацеливающая РНК могут быть отдельными элементами, или они могут быть слиты в одну нуклеиновую кислоту через линкерную петлевую последовательность для образования одной молекулы направляющей РНК. Молекула направляющей РНК может содержать несколько доменов. В частности, такая РНК может содержать в направлении от 5':3': нацеливающий домен (который является комплементарным целевой нуклеиновой кислоте); первый домен комплементарности; связывающий домен; линкерный домен; второй домен комплементарности (который является комплементарным первому домену комплементарности); проксимальный домен; и необязательно хвостовой домен (см. WO 2015/048557).

"Первый домен комплементарности", который имеет значительную комплементарность по отношению ко второму домену комплементарности, может образовывать дуплексорную область, по меньшей мере, в некоторых физиологических условиях.

"Линкерный домен" служит для связывания первого домена комплементарности со вторым доменом комплементарности в мономолекулярной направляющей РНК. Линкерный домен может связывать первый и второй домены комплементарности ковалентно или нековалентно.

"Проксимальный домен" может иметь длину из 3-25 или 5-20 нуклеотидов. Проксимальный домен может иметь гомологию со встречающимся в природе проксимальным доменом или быть производным от него.

"Хвостовой домен" может отсутствовать или иметь длину из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Хвостовой домен может включать последовательности, которые являются комплементарными друг другу, и которые, по меньшей мере, в некоторых физиологических условиях могут образовывать дуплексорную область.

Направляющий РНК-элемент может образовывать комплекс с направляемой РНК эндонуклеазой эндонуклеазного элемента, такого как Cas-эндонуклеаза (комплекс направляющая РНК/нуклеаза). Примером комплекса направляющей РНК/нуклеазы является комплекс CRISPR, описанный ниже в отношении системы на основе CRISPR. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR включает направляемую РНК эндонуклеазу эндонуклеазной системы, которая образует комплекс с нацеливающей РНК. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR включает направляемую РНК эндонуклеазу эндонуклеазной системы, которая образует комплекс с нацеливающей РНК и активирующей РНК.

Нацеливающий домен нацеливающей РНК способствует специфическому нацеливанию или хомингу комплекса направляющей РНК/нуклеазы в отношении целевой нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий домен может состоять из 10-30 пар нуклеотидов, например 15-25, 18-22 или 20 пар нуклеотидов.

Способы конструирования нацеливающей РНК известны в данной области, включая методы селекции, конструирования структуры и проверки правильности нацеливающего домена; см., например, WO 2015/048577, Mali et al., 2013 SCIENCE 339(6121): 823-826; Hsu et al., 2013 NATBIOTECHNOL, 31(9): 827-32; Fu et al., 2014 NATBIOTECHNOL, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer et al., 2014 NAT METHODS 11 (2): 122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al., 2014 BIOTNFORMATICS PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014 BIOINFORMATICS Pub Med PMID: 24389662.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать РНК-направляемые эндонуклеазы, такие как фермент или белок Cas (например, белок Casp9 типа II) или фермент или белок Cpf (например,

белок Cpf1). В некоторых вариантах также может быть использована модифицированная версия такого фермента или белка Cas или Cpf1.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas. Система CRISPR-Cas включает: (а) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющий РНК-элемент, где направляющий РНК-элемент содержит нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях и активирующую РНК, включающую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизироваться с нацеливающей РНК; и (б) элемент белка Cas, содержащий белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas. Нацеливающая РНК и активирующая РНК могут быть представлены отдельно или слиты в одну РНК.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR включает системы CRISPR класса 1 и/или CRISPR класса 2. Для создания функциональной эндонуклеазы в системах CRISPR класса 1 используют несколько белков Cas вместе с РНК CRISPR (сРНК) в качестве нацеливающей РНК. В системах CRISPR класса 2 используют один Cas-белок и сРНК в качестве нацеливающей РНК. Системы CRISPR класса 2, включая систему на основе Cas9 типа II, содержат один белок Cas для опосредования расщепления, а не комплекс с несколькими субъединицами, которые используются в системах класса 1. Система на основе CRISPR также включает систему CRISPR класса II, типа V, в которой используется белок Cpf1 и сРНК в качестве нацеливающей РНК.

Белок Cas представляет собой двухцепочечную нуклеазу CRISPR (Cas). В некоторых вариантах осуществления система CRISPR-Cas содержит белок Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никазу D10A. Термин "белок Cas", также как и белок Cas9, включает белок Cas дикого типа или его функциональные производные (такие как укороченные варианты или варианты белка Cas дикого типа с нуклеазной активностью).

В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы белки Cas9 из видов, отличных от *S. pyogenes* и *S. thermophiles*. Дополнительные виды белка Cas9, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены из многих микроорганизмов, включая: *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium dolichum*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Eubacterium dolichum*, *gamma-proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria* sp., *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* sp., *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutells*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tistrella mobilis*, *Treponema* sp. или *Verminephrobacter eiseniae*.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько элементов системы на основе CRISPR получают из системы CRISPR типа I, типа II или типа III.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько элементов системы на основе CRISPR получают из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Prevotella* sp., *Acidaminococcus* sp. и *Lachnospiraceae* sp. В целом, система на основе CRISPR характеризуется элементами, которые стимулируют образование комплекса CRISPR в целевых геномных областях или сайте последовательности-мишени (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте формирования комплекса CRISPR последовательность-мишень представляет собой последовательность, в отношении которой конструируют направляющую последовательность, имеющую существенную комплементарность, где гибридизация между последовательностью-мишенью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность не обязательно необходима, если имеется достаточная комплементарность, чтобы вызвать гибридизацию и промотировать образование комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень находится в ядре или цитоплазме клетки (клеток). В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень может находиться в органелле эукариотической клетки (клеток), например, в митохондриях или хлоропласте.

Последовательность или матрица, которая может быть использована для рекомбинации в нацеливающий локус, включающий последовательность-мишени, называется "матрицей редактирования", "по-

линуклеотидом редактирования" или "последовательностью редактирования". Экзогенный матричный полинуклеотид может быть назван матрицей редактирования или донорной матрицей. В некоторых вариантах осуществления можно использовать искусственную одноцепочечную ДНК и двухцепочечную ДНК, или биологического происхождения. В качестве неограничивающего примера, подходящие матрицы редактирования включают оцОДН, дцОДН, продукты ПЦР, плазмиды и вирусы, включая AAV, аденовирус, ретровирус, лентивирус и т.п. Также можно использовать дополнительные матрицы редактирования. В некоторых вариантах рекомбинация представляет собой гомологичную рекомбинацию.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas9. Нацеливающая РНК системы CRISPR-Cas9 содержит нацеливающую РНК CRISPR (сРНК), и активирующая РНК системы CRISPR-Cas9 включает трансактивирующую РНК CRISPR (таРНК). В Cas-белковом элементе системы CRISPR-Cas9 используется белок Cas9. сРНК и таРНК могут быть отдельными, или они могут быть объединены в одну РНК-конструкцию линкерной петлевой последовательностью. Эта комбинированная РНК-конструкция называется однонаправляющей РНК (sgРНК; или направляющей РНК).

Что касается общей информации в отношении систем CRISPR-Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, включая способы, материалы, носители для доставки, векторы, частицы, AAV, их получение и применение, включая количественные показатели и методы приготовления композиций/препаратов, можно найти в патентах США №№ 8999641, 8993233, 8945839, 8932814, 8906616, 8895308, 8889418, 8889356, 8871445, 8865406, 8795965, 8771945 и 8697359; в публикациях патентов США US 2014-0310830, US 2014-0287938 A1, US 2014-0273234 A1, US2014-0273232 A1, US 2014-0273231, US 2014-0256046 A1, US 2014-0248702 A1, US 2014-0242700 A1, US 2014-0242699 A1, US 2014-0242664 A1, US 2014-0234972 A1, US 2014-0227787 A1, US 2014-0189896 A1, US 2014-0186958, US 2014-0186919 A1, US 2014-0186843 A1, US 2014-0179770 A1, US 2014-0179006 A1 и US 2014-0170753; в Европатентах EP 2784162 B1 и EP 2771468 B1; в Европейских патентных заявках EP 2771468 (EP 13818570.7), EP 2764103 (EP 13824232.6) и EP 2784162 (EP 14170383.5); и в PCT публикациях WO 2014/093661, WO 2014/093694, WO 2014/093595, WO 2014/093718, WO 2014/093709, WO 2014/093622, WO 2014/093635, WO 2014/093655, WO 2014/093712, WO2014/093701, WO2014/018423, WO 2014/204723, WO 2014/204724, WO 2014/204725, WO 2014/204726, WO 2014/204727, WO 2014/204728, WO 2014/204729 и WO2016/028682.

В некоторых вариантах осуществления система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf. "Система CRISPR-Cpf" включает: (а) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющий РНК-элемент, где направляющая РНК содержит нацеливающую РНК, имеющую нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности в локусе целевой нуклеиновой кислоты-мишени; и (б) Cpf-белковый элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую Cpf-белковый элемент.

Пример Cpf-белкового элемента включает нуклеазы Cpf1, такие как Cpf1 из *Francisella* (FnCpf1) и любые их варианты; см., например, Zetsche et al., "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system", *Cell*, 163(3): p. 759-71; и Fonfara et al., "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", *Nature* 532 (7600): p. 517-21. Предпочтительным PAM для Cpf1 является 5'-TTN, который отличается от такового для Cas9 (3'-NGG) как по геномному положению, так и по содержанию GC. В системе CRISPR-Cpf может не использоваться активирующая РНК (таРНК). Как Cpf1, так и его направляющие РНК обычно меньше, чем их аналоги SpCas9. Локус Cpf1 содержит смешанный альфа/бета-домен, RuvC-I, за которым следует спиральная область, RuvC-II и домен, подобный цинковому пальцу. Белок Cpf1 имеет RuvC- подобный эндонуклеазный домен, который похож на RuvC-домен Cas9. Более того, Cpf1 не имеет эндонуклеазного домена HNH, а N-конец Cpf1 не имеет выступа альфа-спирали для распознавания Cas9. Локусы Cpf1 кодируют белки Cas1, Cas2 и Cas4, которые более похожи на белки систем типов I и III, чем на белки системы типа II. Белки семейства Cpf1 можно найти у многих видов бактерий.

Без связи с конкретной теорией, считается, что в системе CRISPR-Cpf используется комплекс Cpf1-сРНК, который расщепляет ДНК- или РНК-мишень путем идентификации протоспейсерного прилегающего мотива 5'-YTN-3' (где "Y" представляет собой пиримидин и "N" представляет собой любое основание) или 5'-TTN-3', в отличие от PAM, богатого G, направленного на Cas9. После идентификации PAM Cpf1 вводит двухцепочечный разрыв 4- или 5-нуклеотидного выступа ДНК с концами, подобными липким концам.

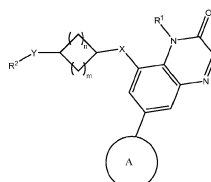
В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему на основе NgAgo. Система на основе NgAgo содержит по меньшей мере один направляющий ДНК-элемент или нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты (кислот), кодирующую направляющий ДНК-элемент; и ДНК-направляемую эндонуклеазу. Система на основе NgAgo использует ДНК в качестве направляющего элемента. Принцип ее работы подобен работе системы CRISPR-Cas9, но направляющий элемент представляет собой сегмент направляющей ДНК, а не направляющей РНК, используемой в системе CRISPR-Cas9. Примером ДНК-направляемой эндонуклеазы

является эндонуклеаза Argonaute (NgAgo) из *Natronobacterium gregoryi*; см., например, Feng Gao et al. "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute", *Nature Biotechnology*, (2016): doi:10.1038/nbt.3547.

Под терминами "линкер", "пептидный линкер" или "пептидный спейсер" подразумевается пептидная последовательность, которая позволяет соединять различные мономеры в слитый белок и принимать правильную конформацию для сохранения активности слитого белка, не изменяя активности ни одного из мономеров. Пептидные линкеры могут иметь различный размер, составляющий от 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 и до 50 аминокислот в качестве неограничивающего иллюстративного диапазона, или любого промежуточного значения в этом диапазоне.

Ингибиторы ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления используется соединение, представленное структурной формулой (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл,

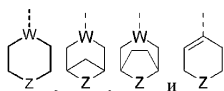
где m и n независимо равны 1 или 2;

X представляет собой O или NR ; где R представляет собой H или C_1 - C_4 -алкил. R может также представлять собой 2H (D или дейтерий). В соответствии с использованием в настоящем документе термины "дейтерий", " 2H " и " D " используются взаимозаменяемо;

R^1 представляет собой C_1 - C_4 -алкил.

R^2 представляет собой 5- или 6-членное ароматическое или гетероароматическое кольцо, содержащее один или два гетероатома, выбранных из группы, состоящей из N , O и S , где ароматическое или гетероароматическое кольцо могут быть замещены 0, 1 или 2 заместителями R^3 , независимо выбранными из группы, состоящей из CN , галогена, NO_2 , C_1 - C_4 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_4 -алкокси, C_1 - C_4 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1 - C_4 -алкил; или где две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода ароматического или гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O , N и S .

Альтернативно, R^2 может представлять собой $COOR^4$, где R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил. Кольцо A выбирают из группы, состоящей из



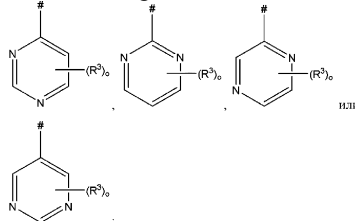
W представляет собой N или CR^3 ; Z представляет собой O или S и R^3 представляет собой H (или 2H) или C_1 - C_4 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



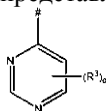
где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (I); и o равно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1-C_2 -алкила, C_1-C_4 -галогеналкила, C_1-C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^{1'}$, где $R^{1'}$ представляет собой C_1-C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

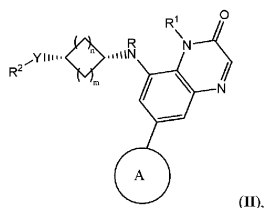
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (I) и средство для образования сокристаллов (CCF). В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения структурной формулы (I) составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения структурной формулы (I) составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение структурной формулы (I) и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение структурной формулы (I)) p :(CCF) q . В некоторых вариантах осуществления p приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления используется соединение формулы (II), представленное структурной формулой (II)



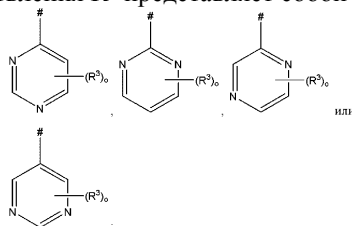
(II).

или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C_1-C_4 -алкил.

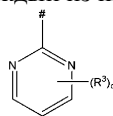
В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



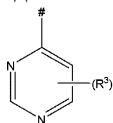
где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (II); и o равно 0, 1 или 2

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой



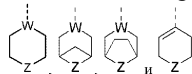
В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1-C_2 -алкила, C_1-C_4 -галогеналкила, C_1-C_2 -алкокси, C_1-C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^{1'}$, где $R^{1'}$ представляет собой C_1-C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления кольцо А выбирают из группы, состоящей из



В других вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

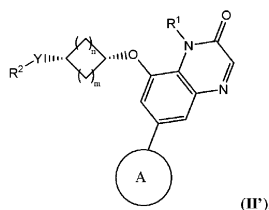
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (II).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II) и средство для образования сокристаллов (CCF). В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения для образования сокристаллов (CCF) и соединения структурной формулы (II) составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения структурной формулы (II) составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение структурной формулы (II) и CCF в соотношении, В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение структурной формулы (II) и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение структурной формулы (II)) p :(CCF) q . В некоторых вариантах осуществления p приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (II')



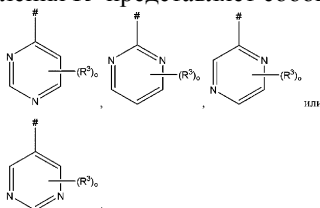
(II')

его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C_1 - C_4 -алкил.

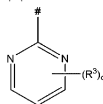
В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



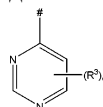
где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (II'); и o равно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой



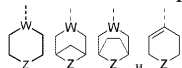
В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления кольцо A выбирают из группы, состоящей из



В других вариантах осуществления кольцо A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

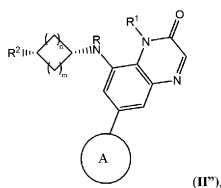
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (II').

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II').

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II') и средство для образования сокристаллов (CCF).

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения II' составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение II' и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение II') r :(CCF) q . В некоторых вариантах осуществления r приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления r равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

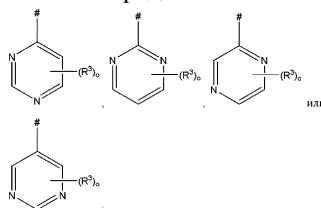
В некоторых вариантах осуществления используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (II'')



или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^1 представляет собой метил.

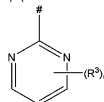
В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



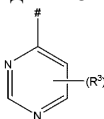
где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (II'); и o равно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R^2 представляет собой

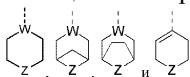


В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

В некоторых вариантах осуществления кольцо A выбирают из группы, состоящей из



В других вариантах осуществления кольцо A представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



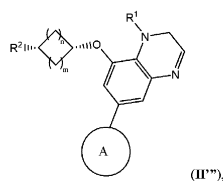
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (II").

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II").

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II") и средство для образования сокристаллов (CCF).

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения II" составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения II" составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение II" и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение II")_p:(CCF)_q. В некоторых вариантах осуществления р приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления р равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (II''')

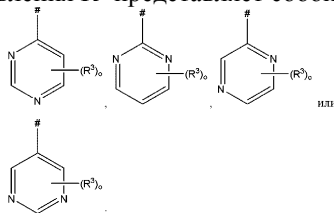


(II''')

или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R¹ представляет собой метил.

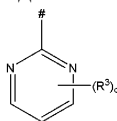
В некоторых вариантах осуществления R² представляет собой



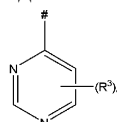
где # означает положение, где R² присоединен к остальной части соединения формулы (II'''); и o равно 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R² представляет собой



В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, и R² представляет собой



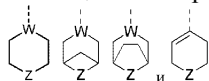
В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления каждый из m и n равен 2, Y представляет собой связь, R^1 представляет собой метил, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^{1'}$, где $R^{1'}$ представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

В некоторых вариантах осуществления кольцо А выбирают из группы, состоящей из



В других вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления кольцо А представляет собой



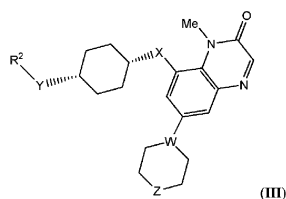
В некоторых вариантах осуществления изобретения используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (II''').

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II''').

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (II''') и средство для образования сокристаллов (CCF).

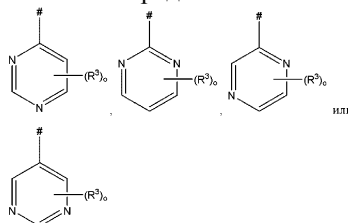
В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение между средством для образования сокристаллов (CCF) и соединения II'' составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение средства для образования сокристаллов (CCF) и соединения II''' составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение II''' и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение II''') p :(CCF) q . В некоторых вариантах осуществления p приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (III)



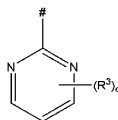
или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой

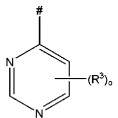


где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (III); и o равно 0, 1 или 2.

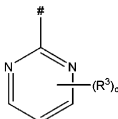
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O , и R^2 представляет собой



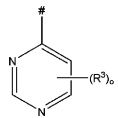
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O , и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой NH , X представляет собой O , и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой NH , X представляет собой O , и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O , R^2 представляет собой $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой NH , X представляет собой O , R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN , галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^{1'}$, где $R^{1'}$ представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O , N и S .

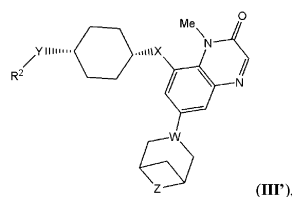
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (III).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III).

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III) и средство для образования сокристаллов (CCF).

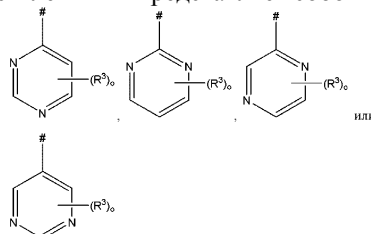
В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение между средством для образования сокристаллов (CCF) и соединения III составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между средством для образования сокристаллов (CCF) и соединения III составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение III и CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение III) p :(CCF) q . В некоторых вариантах осуществления p приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (III')



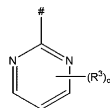
или его фармацевтически приемлемая соль или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой

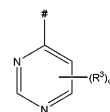


где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (III'); и o равно 0, 1 или 2

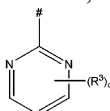
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



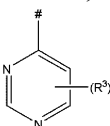
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой NH, X представляет собой O, R^2 представляет $COOR^4$ и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1-C_2 -алкила, C_1-C_4 -галогеналкила, C_1-C_2 -алкокси, C_1-C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1-C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (III').

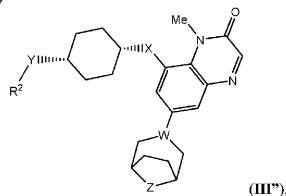
В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III').

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III') и средство для образования сокристаллов (CCF).

В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение между средством для образования сокристаллов (CCF) и соединения III' составляет приблизительно 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение между средством для образования сокристаллов (CCF) и соединения III' составляет приблизительно 1:2. В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает соединение III' и

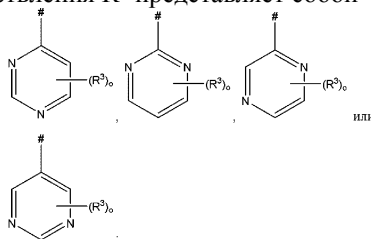
CCF в соотношении, определяемое формулой: (соединение III')_p:(CCF)_q. В некоторых вариантах осуществления p приблизительно равно 1 и q равно от приблизительно 0,4 до приблизительно 2,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно от приблизительно 0,9 до приблизительно 3,1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 2 и q равно приблизительно 1. В некоторых вариантах осуществления p равно приблизительно 1 и q равно приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (III'')



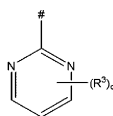
или его фармацевтически приемлемая соль или его сокристалл.

В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой

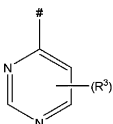


где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (III''); и o равно 0, 1 или 2.

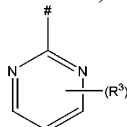
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



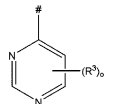
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1 - C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

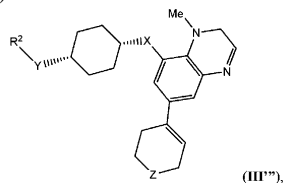
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соедине-

ния структурной формулы (III").

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III").

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III") и средство для образования сокристаллов (CCF).

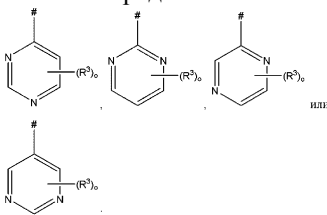
В некоторых вариантах осуществления изобретения используется соединение формулы (I), представленное структурной формулой (III")



(III'')

или его фармацевтически приемлемая соль, или его сокристалл.

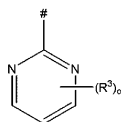
В некоторых вариантах осуществления R^2 представляет собой



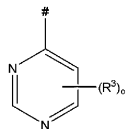
или

где # означает положение, где R^2 присоединен к остальной части соединения формулы (III''); и o равно 0, 1 или 2.

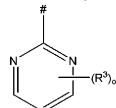
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



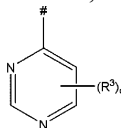
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, и R^2 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой связь, X представляет собой O, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах Y представляет собой NH, X представляет собой O, R^2 представляет собой $COOR^4$, и R^4 представляет собой C_1-C_4 -алкил или бензил.

В некоторых вариантах осуществления o равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1-C_2 -алкила, C_1-C_4 -галогеналкила, C_1-C_2 -алкокси, C_1-C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^1$, где R^1 представляет собой C_1-C_2 -алкил.

В некоторых вариантах осуществления две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S.

В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль соединения структурной формулы (III'').

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение структурной формулы (III'').

В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает соединение

структурной формулы (III') и средство для образования сокристаллов (CCF).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) выбирают из соединений №№ 1-37, представленных в табл. 1, или его фармацевтически приемлемой соли, или его сокристалла.

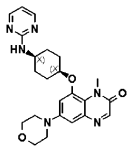
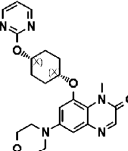
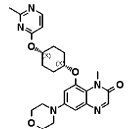
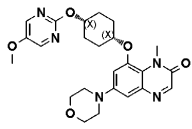
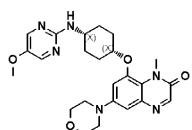
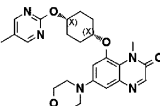
В некоторых вариантах осуществления используется фармацевтически приемлемая соль любых соединений №№ 1-37.

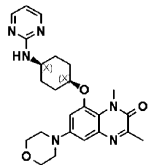
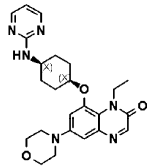
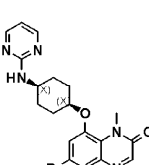
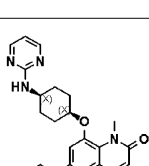
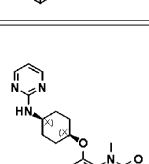
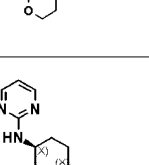
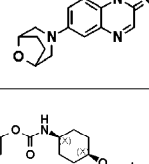
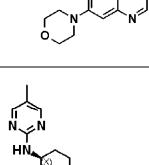
В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, который включает любые из соединений №№ 1-37.

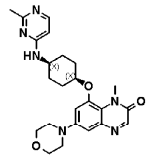
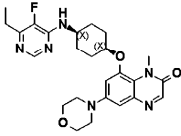
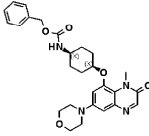
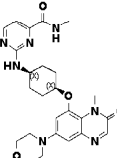
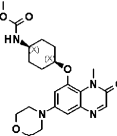
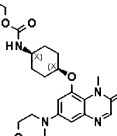
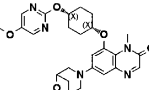
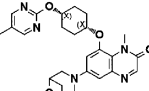
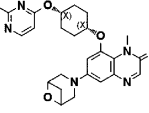
В некоторых вариантах осуществления используется сокристалл, включающий любые из соединений №№ 1-37 и средство для образования сокристаллов (CCF). В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту. В некоторых вариантах осуществления CCF представляет собой адипиновую кислоту.

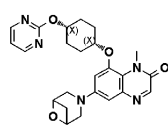
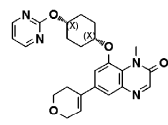
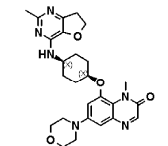
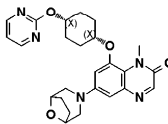
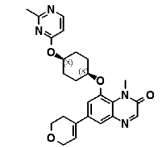
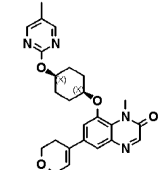
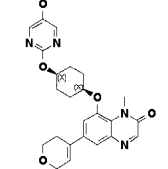
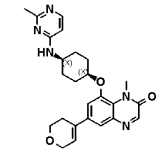
В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой соединение, выбранное из табл. 1, или его фармацевтически приемлемую соль или сокристалл.

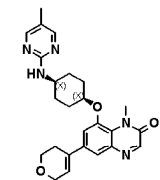
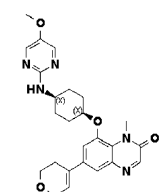
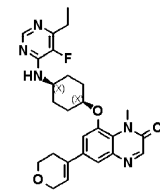
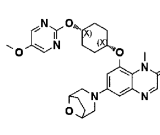
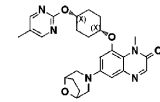
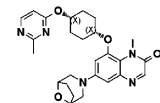
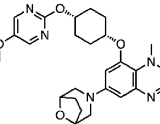
Таблица 1

Соединение №	Структура
1	
2	
3	
4	
5	
6	

7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	

15	
16	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	

26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	

34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

Раскрытые здесь соединения обязательно могут быть замещены одним или несколькими заместителями, показанные выше как иллюстративные, или заместителями, относящимися к проиллюстрированным классам, подклассам и видами. Следует иметь в виду, что указание "необязательно замещенный" используется как взаимозаменяемое с термином "замещенный или незамещенный". В целом, термин "замещенный", независимо от того, предшествует ли указание "необязательно" или нет, относится к замещению одного или нескольких водородных радикалов в данной структуре радикалом указанного заместителя. Если не указано иное, обязательно замещенная группа может иметь заместитель в каждом замещаемом положении группы. Когда более чем одно положение в данной структуре может быть замещено более чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, то в каждом положении заместитель может быть либо одинаковым, либо различным.

Если химически возможно или химически стабильно, описанная здесь молекулярная группа является незамещенной или замещенной (т.е. "необязательно замещенной"). Как описано здесь, когда термин "необязательно замещенный" предшествует перечню, то указанный термин относится ко всем замещаемым группам в этом перечне. Например, если группа X - "галоген; обязательно замещенный алкил или фенил"; то X может быть либо обязательно замещенным алкилом, либо обязательно замещенным фенилом. Аналогичным образом, если термин "необязательно замещенный" следует за перечнем, то указанный термин также относится ко всем замещаемым группам в предшествующем перечне, если не указано иное. Например: если X представляет собой галоген, C₁₋₄алкил, или фенил, где X представляет собой обязательно замещенный J^x, то в обоих случаях C₁₋₄алкил и фенил могут быть обязательно замещены J^x. Для специалиста в данной области очевидно, что такие группы, как H, галоген, NO₂, CN, NH₂, OH или OCF₃, не являются замещаемыми группами. Для специалиста также очевидно, что гетероариль-

ное или гетероциклическое кольцо, содержащее NH-группу, может быть необязательно замещено путем замены атома водорода на заместитель.

В некоторых вариантах осуществления группа (например, C₁₋₄алкил, C₃₋₅циклоалкил; гетероциклил, такой как оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил или морфолинил; арил, такой как фенил, или гетероарил) является незамещенной.

В некоторых вариантах осуществления группа (например, C₁₋₄алкил, C₃₋₅циклоалкил; гетероциклил, такой как оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил или морфолинил; арил, такой как фенил, или гетероарил) является замещенной. В некоторых вариантах осуществления группа включает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителей, если это позволяет валентность и химическая стабильность.

Комбинации заместителей, указанные в данном описании, предпочтительно являются такими, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. Термин "стабильный", используемый здесь, относится к соединениям, которые по существу не изменяются под воздействием условий их получения, обнаружения и, предпочтительно, их выделения, очистки и использования для одной или нескольких целей, раскрытых здесь. В некоторых вариантах осуществления стабильное соединение или химически возможное соединение представляет собой соединение, которое не изменяется по существу при хранении при температуре 40°C или ниже в отсутствие влаги или других химически активных условий в течение по меньшей мере одной недели.

Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению X означает, например, X +/-10%.

Термин "алкил" или "алкильная группа", используемый здесь, означает неразветвленную (т.е. прямую) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая полностью насыщена. Если не указано иное, алкильные группы содержат 1-8 атомов углерода (группы, представленные как "C₁₋₈алкил"). В некоторых вариантах осуществления алкильных группы содержат 1-4 атома углерода (группы, представленные как "C₁₋₄алкил"). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулярная группа, описанная как "C₀₋₄алкил" включает ковалентную связь (например, "C₀-алкил") или C₁₋₄алкильную цепь, как описано здесь. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, бутил, изопропил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил.

Термин "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклоалкил" или "гетероциклический" в контексте настоящего описания относится к моноциклической, бициклической или трициклической кольцевой системе, в которой по меньшей мере одно кольцо в системе содержит один или несколько гетероатомов, которые являются одинаковыми или различными, и которые являются полностью насыщенными или они содержат одно или несколько ненасыщенных звеньев, но не являются ароматическими, и они имеют единственную точку присоединения к остальной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления группа "гетероцикл", "гетероциклил", "гетероциклоалкил" или "гетероциклическая" группа имеет от трех до четырнадцати атомов в кольце, где один или несколько атомов в кольце представляют собой гетероатом, независимо выбранный из кислорода, серы, азота или фосфора, и каждое кольцо в системе содержит от 3 до 8 атомов. Примеры гетероциклических колец включают, без ограничения, следующие моноциклы: 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротиофенил, 3-тетрагидротиофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино, 2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 1-тетрагидропиперазинил, 2-тетрагидропиперазинил, 3-тетрагидропиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиперазинил, 3-пиперазинил, 4-пиперазинил, 5-пиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил и следующие бициклы: 3-1H-бензимидазол-2-он, 3-(1-алкил)-бензимидазол-2-он, индолинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, бензотиолан, бензодитиан и 1,3-дигидроимидазол-2-он.

Термин "гетероатом", используемый здесь, означает один или несколько атомов кислорода, серы, азота или фосфора, включая любую окисленную форму азота, серы или фосфора; кватернизованную форму любого основного азота; или замещаемый азот гетероциклического кольца, например N (как в 3,4-дигидро-2H-пирролиле), NH (как в пирролидиниле) или NR⁺ (как в N-замещенном пирролидине).

Термин "ненасыщенный", используемый здесь, означает, что остаток имеет одно или несколько ненасыщенных звеньев.

Термин "алкокси", "циклоалкил" или "тиоалкил", используемый здесь, относится к алкильной группе, как определено выше, присоединенной к основной углеродной цепи через атом кислорода ("алкокси") или серы ("тиоалкил").

Термины "галогеналкил", "галогеналкенил" или "галогеналкокси", используемые в данном описании, означают алкил, алкенил или алкокси, в некоторых случаях они могут быть замещены одним или несколькими атомами галогена. Термин "галоген" означает F, Cl, Br или I.

Термин "арил", используемый здесь отдельно или как часть более крупного фрагмента, как, например, "аралкил", "аралкокси" или "арилоксиалкил", относится к моноциклической, бициклической или трициклической карбоциклической кольцевой системе, содержащей в целом от шести до четырнадцати атомов в кольце, при этом указанная кольцевая система имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы, и по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, и при этом

каждое кольцо в системе содержит от 4 до 7 атомов в кольце. Термин "арил" может использоваться взаимозаменяемо с термином "арильное кольцо". Примеры арильных колец включают фенил, нафтил и антрацен.

Используемый здесь термин "гетероарил", используемый отдельно или как часть более крупного фрагмента, например такого как "гетероаралкил" или "гетероарилалкокси", относится к моноциклической, бициклической и трициклической кольцевой системе, имеющей в общей сложности от пяти до четырнадцать атомов в кольце, при этом указанная кольцевая система имеет единственную точку присоединения к остальной части молекулы, по меньшей мере одно кольцо в системе является ароматическим, по меньшей мере одно кольцо в системе содержит один или несколько гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода, сера или фосфор, и при этом каждое кольцо в системе содержит от 4 до 7 атомов в кольце. Термин "гетероарил" может использоваться взаимозаменяемо с термином "гетероарильное кольцо" или термином "гетероароматический". Дополнительные примеры гетероарильных колец включают следующие моноциклы: 2-фуранил, 3-фуранил, N-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил, 3-изоксазолил, 4-изоксазолил, 5-изоксазолил, 2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил, N-пирролил, 2-пирролил, 3-пирролил, 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, пиридазинил (например, 3-пиридазинил), 2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил, тетразолил (например, 5-тетразолил), триазолил (например, 2-триазолил и 5-триазолил), 2-тиенил, 3-тиенил, пиразолил (например, 2-пиразолил), изотиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, пиазинил, 1,3,5-триазинил и следующие бициклы: бензимидазолил, бензофурил, бензотиофенил, индолил (например, 2-индолил), пуринил, хинолинил (например, 2-хинолинил, 3-хинолинил, 4-хинолинил) и изохинолинил (например, 1-изохинолинил, 3-изохинолинил или 4-изохинолинил).

Если не изображено или не указано иное, то приведенные здесь структуры могут включать все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структур; например, конфигурации R и S для каждого асимметричного центра, (Z) и (E) изомеры с двойной связью, и (Z) и (E) конформационные изомеры. Отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси соединений находятся в объеме настоящего описания. Соединения, которые изображены с конкретными стереохимическими центрами, обычно с использованием заштрихованной или выделенной жирным шрифтом связи, являются стереохимически чистыми, но их абсолютная стереохимия не конкретизируется. Такие соединения могут иметь конфигурацию R или S. В тех случаях, когда определена абсолютная конфигурация, хиральный центр (центры) помечены на изображении как (R) или (S).

Если не указано иное, все таутомерные формы соединений, раскрытых здесь, находятся в объеме настоящего описания. Кроме того, если не указано иное, изображенные здесь структуры также включают соединения, которые различаются только наличием одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие указанные структуры, за исключением замены водорода дейтерием или тритием или замены углерода на углерод, обогащенный углеродом ^{13}C или ^{14}C , входят в объем настоящего описания. Такие соединения полезны, например, в качестве аналитических инструментов, зондов в биологических анализах или в качестве ингибиторов ДНК-РК с улучшенным терапевтическим профилем.

Фармацевтически приемлемые соли.

Также понятно, что некоторые соединения, раскрытые здесь, могут существовать в свободной форме или, если это уместно, в виде фармацевтически приемлемого производного. Фармацевтически приемлемое производное включает, без ограничения, фармацевтически приемлемые пролекарства, соли, сложные эфиры, соли таких сложных эфиров или любой другой аддукт или производное, которое при введении пациенту, нуждающемуся в лечении, способно обеспечить, прямо или косвенно, соединение, описанное здесь, или его метаболит или его остаток.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п.

Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, в S.M. Berge et al. *J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, 1977, подробно описаны фармацевтически приемлемые соли. В отношении фармацевтически приемлемых солей эта публикация включена в описание посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли раскрытых здесь соединений включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или образованные с использованием других методов, известных в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпро-

пионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, валерат и тому подобное. Другие примеры солей включают адипат, бензоат, цитрат, фумарат, малеат или сукцинат. Соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N^+(C_{1-4}\text{алкил})_4$.

В данное описание также включены кватернизированные формы любых основных азотсодержащих групп соединений, описанных здесь. Путем кватернизации могут быть получены продукты, растворимые или диспергируемые в воде или масле. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, соли с нетоксичными катионами аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, C_{1-8} сульфонат и арилсульфонат.

Сокристаллы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используется сокристалл, который включает соединение, описанное в настоящем документе (например, соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''')), и средство для образования кристаллов (CCF).

В некоторых вариантах осуществления соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''')), и CCF находятся в твердом состоянии (например, в кристаллическом). В некоторых вариантах осуществления соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''') и CCF связаны нековалентно (например, с помощью водородных связей).

В некоторых вариантах осуществления сокристалл соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''') и CCF (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота), является твердым при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления сокристалл соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''') и CCF (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота) связаны нековалентными связями. В некоторых вариантах осуществления нековалентные связи между соединением, представленным структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III''') и CCF (например, адипиновая кислота, лимонная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота или бензойная кислота) включают водородные связи и/или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения средство для образования кристаллов (CCF) представляет собой адипиновую кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту или бензойную кислоту.

В некоторых вариантах осуществления сокристалл представляет собой сокристалл, который описан в международной публикации WO 2015/058067, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает (5)-N-метил-8-(1-(2'-метил-[4,5'-бипиримидин]-6-ил)амино)пропан-2-ил)хинолин-4-карбоксамид. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой (+) энантиомер. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой (-) энантиомер.

В некоторых вариантах осуществления сокристалл включает (5)-N-метил-8-(1-(2'-метил-4,6'-дидейтеро-[4,5'-бипиримидин]-6-ил)амино)пропан-2-ил)хинолин-4-карбоксамид. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой (+) энантиомер. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой (-) энантиомер.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), (т.е., например, любое из соединений 1-37), и лимонную кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к сокристаллу, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), (т.е., например, любое из соединений 1-37), и фумаровую кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение,

представленное структурной формулой (I), формулы (II), формуле (II'), формуле (II''), формуле (II'''), формуле (III''), формуле (III'), формуле (III''') или формуле (III''') (например, любое из соединений 1-37) и малеиновую кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулы (II), формуле (II'), формуле (II''), формуле (II'''), формуле (III''), формуле (III'), формуле (III''') или формуле (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и янтарную кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и бензойную кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и адипиновую кислоту в качестве CCF.

В некоторых вариантах осуществления используют сокристалл, который включает соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и CCF, описанное выше, в выделенной чистой форме, или в виде смеси, такой как твердой композиции, полученной при смешивании с другими материалами, например, соединений, представленными структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), в свободной форме, или свободного CCF.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемые композиции, включающие сокристалл соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и первое CCF (например, описанное здесь) и один или более дополнительных свободных CCF, которые могут быть такими же или отличными от первого CCF. В некоторых вариантах осуществления композиция включает сокристалл соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), первое CCF, которое представляет собой адипиновую кислоту, и дополнительную адипиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления общее молярное соотношение соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и CCF (например, все CCF, включающее первое CCF (например, как описано здесь, и одно или несколько дополнительных свободных CCF) в таких композициях находится в интервале от приблизительно 1:0,55 до приблизительно 1:100. В некоторых вариантах осуществления общее молярное соотношение соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и CCF в таких композициях находится в интервале от приблизительно 1:0,55 до приблизительно 1:50. В некоторых вариантах осуществления общее молярное соотношение соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и CCF в таких композициях находится в интервале от приблизительно 1:0,55 до приблизительно 1:10. В некоторых вариантах общее весовое соотношение соединения формулы I и CCF в таких композициях находится в интервале от приблизительно 85:15 мас.% до приблизительно 60:40 мас.%. В некоторых вариантах осуществления общее весовое соотношение соединения представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III''), формулой (III'), формулой (III''') или формулой (III''') (т.е., например, любое из соединений 1-37), и CCF составляет приблизительно 65:35 мас.%.

Ингибиторы ДНК-РК для повышения эффективности редактирования генома.

Эффективность целевого редактирования генома может быть увеличена путем введения в клетку (клетки) одного или нескольких соединений (например, ингибиторов ДНК-РК), описанных здесь, и системы редактирования генома. Системы редактирования генома, пригодные для использования, включают, например, систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo. Способы, композиции и наборы по настоящему изобретению предусматривают ингибиторы ДНК-РК и/или систему редактирования генома с повышенной эффективностью редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования генома HDR увеличивается после введения в клетку (клетки) ингибитора ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему

редактирования генома на основе CRISPR. Система редактирования генома на основе CRISPR может представлять собой систему CRISPR-Cas или ее варианты. Система CRISPR-Cas может использовать любые эндонуклеазы Cas, такие как эндонуклеазы Cas9 и их варианты. Примеры эндонуклеаз Cas9 включают эндонуклеазы Cas9 или их варианты, такие как SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никаза CasD10A. Эндонуклеаза Cas может быть дикого типа, сконструированной, мутантной никазой или любыми их вариантами.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает последовательность CRISPR, транскрибируемую (та) последовательность, направляющую последовательность и Cas-эндонуклеазу или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает РНК, содержащую последовательность CRISPR (сРНК), РНК, содержащую транскрибируемую (та) последовательность (таРНК) и эндонуклеазу Cas или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает Последовательность CRISPR, направляющую последовательность и эндонуклеазу Cas или эндонуклеазу Cpf, или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf. Нуклеаза Cpf представляет собой эндонуклеазу класса 2 системы CRISPR-Cas. Cpf представляет собой одноцепочечную РНК-направляемую эндонуклеазу. Нуклеаза Cpf может представлять собой эндонуклеазу дикого типа, сконструированной эндонуклеазой или мутантом никазы, или быть любым их вариантом; см. например, Zetsche et al., "CPF1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", *Cell*, 163(3): 759-71. В некоторых вариантах нуклеаза Cpf является эндонуклеазой Cpf 1.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему на основе мегануклеазы. Для редактирования генома системой на основе мегануклеазы используются эндонуклеазы, специфические для последовательности, которые распознают большие сайты ДНК-мишени (например, как правило, приблизительно > 12 пар оснований); см. например, патент США № 9365964. Мегануклеазы могут расщеплять уникальные хромосомные последовательности без влияния на общую целостность генома. В некоторых вариантах осуществления изобретения мегануклеаза может представлять собой хоминг-эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения мегануклеаза может представлять собой интронную эндонуклеазу или интеиновую эндонуклеазу. Хоминг-эндонуклеазы могут принадлежать к семейству LAGLIDADG. Мегануклеазы могут быть дикого типа, сконструированными мегануклеазами или мутантами никазы.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена представляет собой систему на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN). ZFN представляет собой искусственный фермент рестрикции, сконструированный слиянием ДНК связывающего домена цинкового пальца и домена расщепления ДНК (см., например, патент США № 9145565).

В некоторых вариантах осуществления система для редактирования гена представляет собой активатор на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN). Системы TALEN представляют собой сконструированные рестрикторные ферменты, которые получают слиянием ДНК связывающего домена эффекторной ДНК с доменом расщепления ДНК (см., например, патент США № 5918535).

В некоторых вариантах осуществления изобретения система редактирования генов представляет собой систему на основе Argonaute. Системы редактирования генов на основе Argonaute включают эндонуклеазу, полученную из Argonaute, и 5'-фосфорилированную оцДНК. В некоторых вариантах осуществления фосфорилированная оцДНК может иметь длину из 10-40 нуклеотидов, 15-30 нуклеотидов или 18-30 нуклеотидов (например, приблизительно 24 нуклеотида). В некоторых вариантах эндонуклеазой Argonaute может быть любая эндонуклеаза. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу Argonaute получают из *Thermus thermophilus* (TtAgo), *Pyrococcus Furiosus* (PfAgo) или *Natrobacterium gregoryi* (NgAgo). В некоторых вариантах осуществления *Natrobacterium gregoryi* (NgAgo) представляет собой штамм 2 (т.е. *N. gregoryi* SP2). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Argonaute представляет собой NgAgo; см. например, Gao et al. "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute", *Nature Biotechnology*, May 2016.

Ингибиторы ДНК-РК могут представлять собой любой ингибитор ДНК-РК. Ингибитором ДНК-РК может быть любое соединение или вещество, которое вызывает ингибирование ДНК-РК. Ингибитор ДНК-РК может представлять собой соединение, небольшую молекулу, антитело или нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ингибиторами ДНК-РК являются соединения, представленные структурной формулой I или структурной формулой II. В некоторых вариантах осуществления ингибиторами ДНК-РК являются соединения, представленные структурной формулой I' или структурной формулой II'. В некоторых вариантах ингибитором ДНК-РК является любое из соединений 1-37. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК представляет собой сокристалл, который включает любое из соединений № 1-37 и адипиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК представляет собой любое из соедине-

ний № 1-37 или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления для повышения эффективности HDR редактирования генома может использоваться любой ингибитор NHEJ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NHEJ представляет собой любое из соединений № 1-37 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором NHEJ может быть любое соединение или вещество, которое вызывает ингибирование NHEJ. Примеры ингибитора NHEJ включают ингибиторы ДНК-РК. Ингибитором NHEJ может быть соединение, малая молекула, антитело или нуклеотидная последовательность. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы NHEJ представляют собой соединения, представленные структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'') или формулой (III'''), или их фармацевтически приемлемые соли, или их сокристаллы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NHEJ представляет собой любое из соединений № 1-37 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления увеличенная эффективность редактирования генома равно приблизительно 1-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 10-кратному, 15-кратному, 20-кратному, 25-кратному, 30-кратному, 40-кратному, 50-кратному или 100-кратному увеличению по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) не вводят ингибитор ДНК-РК и систему редактирования генома, или по сравнению с состоянием, когда в клетку (клетки) вводят только систему редактирования генома без ингибитора ДНК-РК.

Применение ингибиторов ДНК-РК, содержащих их композиции и наборов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы сенсibilизации клетки к терапевтическому агенту или сенсibilизации болезненного состояния, которое индуцирует повреждение ДНК, включающее стадию контактирования клетки с одним или несколькими ингибиторами ДНК-РК, описанными здесь, такими как соединения, представленные структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'') или формулой (III'''), или их фармацевтически приемлемыми солями, или их сокристаллами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предлагаются способы увеличения эффективности терапевтического режима лечения рака, включающие стадию введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества описанного здесь ингибитора ДНК-РК, такого как соединения, представленного структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'') или формулой (III'''), или его фармацевтически приемлемой соли, или его сокристалла. В одном аспекте терапевтический режим лечения рака включает лучевую терапию.

Описанные здесь ингибиторы ДНК-РК полезны в тех случаях, когда для усиления терапевтического эффекта такого лечения используют лучевую терапию. Кроме того, лучевая терапия часто назначают в качестве вспомогательной терапии при хирургическом лечении рака. Целью лучевой терапии во вспомогательной терапии является снижение риска рецидива и повышение выживаемости при контроле первичной опухоли. Вспомогательная лучевая терапия показана при ряде заболеваний, включая рак ободочной кишки, рака прямой кишки, рака легких, гастроэзофагеального рака и рака молочной железы, как описано ниже.

Другой противораковый химиотерапевтический агент может использоваться с ингибитором ДНК-РК, описанным здесь, в рамках терапевтического режима лечения рака, с лучевой терапией или без нее. Комбинация ингибитора ДНК-РК, раскрытого здесь, с другими агентами может усиливать химиотерапевтический эффект. Например, вместе с ингибитором ДНК-РК, описанным здесь, можно вводить этопозид или блеомицин, т.е. агенты, которые, как известно, вызывают разрыв цепи ДНК.

Кроме того, здесь описаны радиосенсibilизирующие опухолевые клетки, в которых используются ингибиторы ДНК-РК. Ингибитор ДНК-РК, который может "радиосенсibilизировать" клетку в контексте настоящего описания, определяется как молекула, предпочтительно молекула с низкой молекулярной массой, вводимая животным в терапевтически эффективном количестве для повышения чувствительности клеток к электромагнитному излучению и/или к способствовать лечению заболеваний, которые поддаются лечению электромагнитным излучением (например, рентгеновскими лучами). Заболевания, которые поддаются лечению с помощью электромагнитного излучения, включают неопластические заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли и раковые клетки.

Кроме того, предлагаются способы лечения рака у животного, включающие введение животному эффективного количества описанного здесь ингибитора ДНК-РК, такого как, например, соединения по изобретению. Изобретение также относится к способам ингибирования роста раковых клеток, включая процессы клеточной пролиферации, инвазивности и метастазирования в биологических системах. Способы включают использование соединения по изобретению в качестве ингибитора роста раковых клеток. Способы, предпочтительно, применяют для ингибирования или уменьшения роста раковых клеток, инвазивности, метастазирования или возникновения опухоли у живых животных, таких как млекопитающие. Соединения по изобретению могут быть использованы либо отдельно, либо в комбинации с использованием IR или одного или нескольких химиотерапевтических агентов для лечения рака или ингибирования роста раковых клеток. Способы по изобретению также легко адаптируются для использования в системах анализа, например, анализа роста раковых клеток и определения их свойств, а также для идентифи-

кации соединений, которые воздействуют на рост раковых клеток.

Опухоли или новообразования включают рост клеток ткани, где размножение клеток является неуправляемым и прогрессирующим. Некоторые такие новообразования являются доброкачественными, но другие называются "злокачественными", и они могут привести к гибели организма. Злокачественные новообразования или "рак" отличаются от доброкачественных новообразований тем, что в дополнение к проявлению агрессивной клеточной пролиферации они могут проникать в окружающие ткани и метастазировать. Кроме того, злокачественные новообразования отличаются тем, что они проявляют более высокую потерю дифференциации (более высокую "дифференцировку") и организацию по отношению друг к другу и окружающих их тканей. Это свойство также называется "анаплазией".

Новообразования, поддающиеся лечению по настоящему изобретению, также включают солидные опухоли, то есть карциномы и саркомы. Карциномы включают злокачественные новообразования, происходящие из эпителиальных клеток, которые инфильтрируются (вторгаются) в окружающие ткани и вызывают метастазы. Аденокарциномы представляют собой карциномы, происходящие из железистой ткани или из тканей, которые образуют железистые структуры. Другая широкая категория злокачественных опухолей включает саркомы, которые представляют собой опухоли, клетки которых заключены в фибриллярное или гомогенное вещество, такое как эмбриональная соединительная ткань. Изобретение также позволяет лечить злокачественные опухоли миелоидных или лимфоидных систем, включая лейкозы, лимфомы и другие злокачественные опухоли, которые обычно не присутствуют в качестве опухолевой массы, но распределены в сосудистых или лимфоретикулярных системах.

Активность ДНК-РК может быть связана с воздействиями на различные формы и виды рака, например, в онкологии взрослых и детей, с ростом солидных опухолей/злокачественных новообразований, с миксоидной и круглоклеточной карциномой, местно-распространенными опухолями, метастатическим раком, саркомами мягких тканей человека, включая саркому Юинга, метастазами рака, включая лимфатические метастазы, плоскоклеточным раком, в частности, раком головы и шеи, плоскоклеточным раком пищевода, раком полости рта, злокачественными новообразованиями клеток крови, включая множественную миелому, лейкемией, включая острый лимфоцитарный лейкоз, острый нелимфоцитарный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз и волосисто-клеточный лейкоз, эффузионными лимфомами (лимфомы в полостях тела), тимической лимфомой, раком легких, включая мелкоклеточную карциному легкого, кожной Т-клеточной лимфомой, лимфомой Ходжкина, неходжкинской лимфомой, раком коры надпочечников, АКТГ-продуцирующими опухолями, немелкоклеточным раком, раком груди, включая мелкоклеточную карциному и протоковую карциному, желудочно-кишечными видами рака, включая рак желудка, рак толстой кишки, колоректальный рак, полипы, связанные с колоректальной неоплазией, рак поджелудочной железы, раком печени, урологическими видами рака, включая рак мочевого пузыря, включая первичные поверхностные опухоли мочевого пузыря, инвазивную переходо-клеточную карциному мочевого пузыря и инвазивный рак мышцы мочевого пузыря, раком простаты, злокачественными новообразованиями женских половых путей, включая карциному яичников, первичные новообразования перитонеального эпителия, карциному шейки матки, рак эндометрия матки, рак влагалища, рак вульвы, рак матки и солидные опухоли в фолликуле яичника, злокачественными новообразованиями мужских половых путей, включая рак яичек и рак полового члена, раком почек, включая почечно-клеточную карциному, раком мозга, включая внутренние опухоли головного мозга, нейробластому, астроцитарные опухоли головного мозга, глиомы, инвазию метастатических опухолевых клеток в центральную нервную систему, раком костей, включая остеомы и остеосаркомы, раком кожи, включая злокачественную меланому, опухолевым ростом кератиноцитов кожи человека, плоскоклеточным раком, раком щитовидной железы, ретинобластомой, нейробластомой, перитонеальной эффузией, злокачественным плевральным выпотом, мезотелиомой, опухолью Вильмса, раком желчного пузыря, трофобластными новообразованиями, гемангиоперицитомой и саркомой Капоши. Способы повышения эффективности лечения этих и других форм рака охватываются настоящим изобретением.

Изобретение также относится к способу ингибирования активности ДНК-РК в биологическом образце, где способ включает контактирование биологического образца с соединением или композицией по изобретению. Термин "биологический образец", используемый здесь, означает образец вне живого организма и включает, без ограничения, клеточные культуры или их экстракты; биопсийный материал, полученный от млекопитающего или их экстракты; а также кровь, слюну, мочу, фекалии, сперму, слезы или другие жидкости организма или их экстракты. Ингибирование киназной активности, в частности активности ДНК-РК, в биологическом образце полезно для различных целей, известных специалисту в данной области. Примеры таких целей включают, без ограничения, хранение биологических образцов и биологические анализы. В одном варианте осуществления способ ингибирования активности ДНК-РК в биологическом образце ограничен нетерапевтическими способами.

Применение для редактирования генома.

Редактирование генома, при котором точно изменяются конкретные геномные области, обладает большим терапевтическим потенциалом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы редактирования одной или нескольких целевых геномных областей для репарации разрыва ДНК. В одной или не-

скольких целевых геномных областях с помощью пути HDR для ингибирования или подавления опосредованной NHEJ репарации разрыва ДНК в одном или нескольких целевых геномных клетках, и для модификации экспрессии одного или более генов или белков путем введения в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы модификации экспрессии одного или более генов или белков, включающие введение в одну или нескольких клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и описанный здесь ингибитор ДНК-РК, где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) одной или нескольких целевых геномных областей гена-мишени (генов-мишеней), приводя к редактированию одной или нескольких целевых геномных областей, и где редактирование модифицирует экспрессию нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с целевым геном (генами).

Система редактирования генома может представлять собой любую систему редактирования генома, которая может редактировать целевую геномную область в клетке (клетках). Примерные системы редактирования генома подробно описаны выше и могут включать, например, систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo. Редактирование одной или нескольких целевых геномных областей включает любой вид генетических манипуляций или генетического конструирования генома клетки. Редактирование одной или нескольких целевых геномных областей может включать инсерции, делеции или замены геномных областей в клетке (клетках), выполняемые одной или несколькими эндонуклеазами. Геномные области включают генетический материал в клетке (клетках), такой как ДНК, РНК, полинуклеотиды и олигонуклеотиды. Геномные области в клетке (клетках) также включают геномы митохондрий или хлоропластов, содержащихся в клетке (клетках).

Ингибитором ДНК-РК может быть любой ингибитор ДНК-РК. Ингибитором ДНК-РК может быть любое соединение или вещество, которое вызывает ингибирование ДНК-РК. Ингибитор ДНК-РК может представлять собой соединение, небольшую молекулу, антитело или нуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ингибиторами ДНК-РК являются соединения, представленные структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''). В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК представляет собой любое из соединений № 1-37. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК представляет собой сокристалл, который включает любое из соединений № 1-37 и адипиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления соотношение адипиновой кислоты и любого из соединений № 1-37 составляет приблизительно от 5 до 0,5, или имеет любое значение внутри этого интервала. В некоторых вариантах осуществления соотношение адипиновой кислоты и любого из соединений № 1-37 составляет от приблизительно 4 до 0,5, или имеет любое значение внутри этого интервала. В некоторых вариантах осуществления соотношение адипиновой кислоты и любого из соединений № 1-37 составляет от приблизительно 3 до 0,5, или имеет любое значение внутри этого интервала. В некоторых вариантах осуществления соотношение адипиновой кислоты и любого из соединений № 1-37 составляет от 2 до 0,5, или имеет любое значение внутри этого интервала. В некоторых вариантах осуществления соотношение адипиновой кислоты и любого из соединений № 1-37 составляет от приблизительно 2 до 1,0, или имеет любое значение внутри этого интервала. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NHEJ представляет собой соединение, представленное структурной формулой (I), формулой (II), формулой (II'), формулой (II''), формулой (II'''), формулой (III), формулой (III'), формулой (III'') или формулой (III'''), или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления представляются способы лечения субъекта, имеющего заболевание или состояние, нуждающегося в редактировании одной или нескольких целевых геномных областей в клетке (клетках) субъекта, включающие введение геномной системы редактирования и ингибитора ДНК-РК в одну или нескольких клеток.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные здесь, используются для модификации экспрессии гена, молекулы РНК, белка, группы белков или нижерасположенных по сигнальному пути белков. Такая модификация может быть использована для лечения заболевания, дисфункции, аномального гомеостаза организма, приобретенного или наследственного, либо вызванного процессом старения. Используемый здесь термин "модифицировать" или "модификация" включает модуляцию, усиление, уменьшение, увеличение, инсерцию, делецию, нокаут, нокинг и т.п.

Специалисту в данной области понятно, что заболевания, приобретенные или наследственные, или полученные иным образом, включают дисрегуляцию гомеостатических механизмов, включая вовлечение гена или функции белков. С этой целью специалист в данной области может использовать способы, предоставленные здесь, для модуляции, модификации, усиления, уменьшения или обеспечения другой функции гена у субъекта.

Модифицирующая экспрессия гена и последующая экспрессия белка в клетке (клетках) могут быть достигнуты описанными здесь способами, например путем специфического редактирования (например,

замены, инсерции, делеции или любых их комбинаций) последовательности нуклеиновой кислоты в любом месте, включая экзон, интрон, сайт инициации транскрипции, промоторную область, энхансерную область, сайленсерную область, разделительную область, антирепрессор, посттрансляционный регуляторный элемент, сигнал полиаденилирования (например, минимальный поли А), консервативную область, сайт связывания фактора транскрипции или любые их комбинации.

В некоторых вариантах способы, наборы и композиции, представленные здесь, используются для лечения субъекта, у которого имеется рак. Способ лечения субъекта, имеющего рак или состояние, связанное с раком, включает введение в клетку (клетки) субъекта ингибитора ДНК-РК и системы редактирования генома. Введение ингибитора ДНК-РК и системы редактирования генома могут быть выполнены *in vivo* или *ex vivo*.

Рак может относиться к любому типу рака. Рак включает солидные опухоли, такие как рак молочной железы, яичника, простаты, легкого, почек, желудка, толстой кишки, яичка, головы и шеи, поджелудочной железы, головного мозга, меланомы и других опухолей органов тканей и злокачественных опухолей клеток крови, таких как лимфомы и лейкозы, включая острый миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лимфоцитарный лейкоз и В-клеточные лимфомы. Злокачественные опухоли могут включать меланому, лейкоз, астоцитому, глиобластому, лимфому, глиому, лимфому Ходжкина, хронический лимфоцитарный лейкоз и рак поджелудочной железы, молочной железы, щитовидной железы, яичника, матки, яичка, гипофиза, почек, желудка, пищевода и прямой кишки.

В некоторых вариантах осуществления способы, наборы и композиции, представленные в настоящем документе, используются для лечения субъекта, страдающего одним или несколькими из следующих видов рака: острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома, рак, связанный со СПИДом, лимфома, связанная со СПИДом, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитомы, детский мозжечок или церебральный рак, базальноклеточная карцинома, рак желчных протоков, внепеченочная карцинома (холангиокарцинома), рак мочевого пузыря, опухоль костей, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома, глиома ствола головного мозга, опухоль головного мозга, астроцитомы мозжечка, опухоль головного мозга, церебральная астроцитомы/злокачественная глиома, опухоль головного мозга, эпендимомы, опухоль головного мозга, медуллобластома, опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга, глиома зрительного пути и глиома гипоталамуса/карциноиды, рак грудины, лимфома Беркитта, карциноидная опухоль, опухоли детского возраста, карциноидная опухоль, опухоли желудочно-кишечного тракта, первичная карцинома неизвестного происхождения, первичная лимфома центральной нервной системы, мозжечковая астроцитомы, опухоли детского возраста, церебральная астроцитомы/злокачественная глиома, опухоли детского возраста, рак шейки матки, детские раковые заболевания, хондросаркома, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хроническая миелолиферативная болезнь, рак толстой кишки, кожная Т-клеточная лимфома, опухоль Юинга в семействе опухолей Юинга, экстракраниальная герминогенная опухоль, внегонадная герминоклеточная опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, рак глаза, внутриглазная меланома, рак глаза, ретинобластома, рак желудка, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), опухоль зародышевых клеток: экстракраниальная, внегонадная или яичниковая, гестационная трофобластическая опухоль, глиома ствола мозга, глиома, астроцитомы головного мозга у детей, глиома, опухоли путей зрения и гипоталамуса у детей, карциноид желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (рак печени), лимфома Ходжкина, рак гортани, глиома гипоталамических путей и путей зрения у детей, внутриглазная меланома, островково-клеточная карцинома (эндокринная опухоль поджелудочной железы), саркома Капоши, рак почки (почечно-клеточный рак), рак гортани, лейкемии, лейкозы, острый лимфобластный лейкоз (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом), острый миелоидный лейкоз (также называемый острым миелогенным лейкозом), лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (также называемый хроническим лимфолейкозом), хронический миелогенный лейкоз (также называемый хроническим миелоидным лейкозом) волосатых клеток, рак губы и полости рта, липосаркома, рак печени (первичный), рак легких, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, лимфомы, лейкозы, связанные со СПИДом, лимфома Беркитта, кожная Т-клеточная лимфома, лимфомы Ходжкина, неходжкинская лимфома (старая классификация всех лимфом, кроме лимфомы Ходжкина), первичная макроглобулинемия центральной нервной системы, макроглобулинемия Вальденстрема, рак груди у мужчин, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости/остеосаркома, медуллобластома, меланома у детей, меланома, внутриглазной (глазной) рак, рак клеток Меркеля, мезотелиома, злокачественная мезотелиома взрослых, злокачественная мезотелиома у детей, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытой первичной формой, рак рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественная миелома/новообразование плазматических клеток, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз взрослых, острая миелома у детей, множественная миелома (рак костного мозга), миелолиферативные заболевания носовых пазух, хроническая параназальная микро-

ма, карцинома носоглотки, нейробластома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легкого, олигодендроглиома, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома кости, рак яичников, рак эпителия яичников (рак поверхностного эпителия яичников), эмбрионально-клеточная опухоль яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитомы, астроцитомы шишковидной железы, герминомы шишковидной железы, пинеобластома и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденома гипофиза, плазмноклеточная неоплазия/множественная миелома, плеврорлегочная бластома, первичная лимфома центральной нервной системы, рак простаты, рак прямой кишки, почечно-клеточная карцинома (рак почки), рак лоханки и мочеточника, переходно-клеточный рак, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнной железы, саркома, опухоли семейства Юинга, саркома Капоши, саркома мягких тканей, саркома матки, синдром Сезари, рак кожи (немеланома), рак кожи (меланома), карцинома кожи, клетка Меркеля, мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркома мягких тканей, плоскоклеточная карцинома (рак кожи, не относящийся к меланоме), плоскоклеточный рак шеи с скрытой первичной метастатической опухолью, рак желудка, супратенториальная примитивная нейроэктодермальная опухоль, Т-клеточная лимфома, рак кожи (грибковый микоз и синдром Сезари), рак яичек, рак горла, тимомы, тимомы и карцинома тимуса, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, гестацционная трофобластическая опухоль, неизвестная карцинома первичной локализации у взрослых, неизвестный рак первичной локализации, опухоли детского возраста, рак мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак, рак уретры, рак матки, рак эндометрия, саркома матки, рак влагалища, глиома зрительный путь и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема или опухоль Вильмса (рак почки).

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные целевые гены, ассоциированные с раком, включают следующие гены:

ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, A T1, AKT2, ALDH2, AL, AL017, APC, ARHGEF12, ARHG, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, AXIN1, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPRIA, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIP1, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, C2orf44, CAMTA1, CANT1, CARD11, CAR3, CBFA2T1, CBFA2T3, C.BFB, CBL, CBLB, CBLC, CCDC6, CCNB1P1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CD N2A, CD N2a(pl4), CD N2C, CDX2, CECPA, CEPI, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, Cin A, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, CNOT3, COL1 A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRT3, CTNBNB1, CYLD, D10S170, DAXX, DDB2, DDX1, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, DICER1, DNM2, DNMT3A, DUX4, EBF1, ECT2L, EGFR, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS 15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, EZR, FACL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, IANCA, EANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO1 1, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFR1OP, FGFR2, FGFR3, FTI, FIIT, FIP1L1, FLU, FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXPI, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, H3F3A, HICMOGT-1, HIEAB, HERPUD1, HIEY1, HPII, HIST1H3B, HIST1H4I, IILF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HIRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH, IGH, IGL, IKZF1, IL2, TL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIF5B, KIT, KLF4, KLF2, KRAS, KTN1, LAF4, LASPI, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LM02, LPP, LRIG3, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2KL, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MIF, MKL1, MLF1, MLIII, MLL, MLL2, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCPI, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYST4, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH 1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NSD1, NT5C2, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB 2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PIIF6, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG 1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNUTL1, POT1, POU2AF1,

POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, PRKAR1 A, PRO1073, PSIP2, PTCH, PTEN, PTPN11, RAB5EP, RAC1, RAD51L1, RAF1, RALGDS, RANBP17, RAPIGDSI, RARA, RBI, RBM15, RECQL4, REL, RET, RNF43, ROS1, RPL10, RPL22, RPL5, RPN1, RUNDC2A, RUNX1, RUNXBP2, SBDS, SDC4, SDH5, SDHB, SDHC, SDHD, SEPT6, SET, SETBP1, SETD2, SF3B1, SFPQ, SFRS3, SH2B3, SH3GL1, SIL, SLC34A2, SLC45A3, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMO, SOCS1, SOX2, SRGAP3, SRSF2, SSI8, SS18L1, SSH3BP1, SSI1, SSI2, SSI4, STAT3, STK11, STL, SUFU, SUI2, SYK, TAF15, TALI, TAL2, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TERT, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TEPT, TFRC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF6, TOP1, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA, TRAF7, TRB, TRD, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, USP6, VHL, VTUA, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WTX, WWTR1, XPA, XPC, XPO1, YWHAE, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2

или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, используются для лечения субъекта, который имеет наследственное нарушение. Способ лечения субъекта, имеющего генетическое заболевание или состояние или наследственное нарушение, включает введение в клетку (клетки) субъекта ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома. Введение ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома может быть выполнено *in vivo* или *ex vivo*.

Наследственное нарушение может быть результатом мутаций или дупликаций в хромосомных областях (например, из точечных мутаций, делеций, инсерций, сдвига рамки считывания, дупликаций или делеций хромосом). Наследственное заболевание может быть любым наследственным заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления изобретения наследственное заболевание представляет собой синдром делеций 22q11.2, синдром Ангельмана, болезнь Канавана, болезнь Шарко-Мари-Тута, дальтонизм, синдром кошачьего крика, синдром Дауна, мышечную дистрофию Дюшенна, гемохроматоз, гемофилию, синдром Клайнфельтера, нейрофиброматоз, фенилкетонурию, поликистоз почек, синдром Прадера-Вилли, серповидно-клеточную анемию, спинальную мышечную атрофию, спинномозговую атрофию, болезнь Тея-Сакса, синдром Тернера, гемоглобинопатию или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления наследственное нарушение представляет собой синдром делеций 1p36, синдром делеций 18p, недостаточность 21-гидроксилазы, 47-XXX (тройной X-синдром), 47-XXY (синдром Клайнфельтера), 5-ALA дегидратаза-недостаточную порфирию, недостаточность ALA дегидратазы, порфирию с недостаточностью 5-аминолевулиновой дегидратазы, синдром делеций 5p, синдром кошачьего крика (АКА 5p-синдром), телеангиоэктатическую атаксию (АКА А-Т), недостаточность альфа 1-антитрипсина (ААТ), ацерулоплазминемию, ахромогенез типа II (АСG2), хондроплазию (АСН), недостаточность кислотной бета-глюкозидазы, болезнь Гоше (любого типа, например, типа 1, типа 2, типа 3), акроцефалосиндактилию (болезнь Аперта), синдром Аперта, акроцефалосиндактилию (любого типа, например, типа 1, типа 2, типа 3, типа 5), синдром Пфайффера, акроцефалию, острую церебральную болезнь Гоше, острую перемежающуюся порфирию, (AIP) недостаточность АСУ2, болезнь Альцгеймера (AD), синдром Мюнке, аденоматозный коли-полипоз, семейный аденоматозный полипоз, аденоматозный полипоз ободочной кишки, семейный аденоматозный полипоз (ADP), недостаточность аденилсукцинатлиазы, нарушения надпочечников, адреногенитальный синдром, адренолейкодистрофию, синдром нечувствительности к андрогенам (AIS), алкаптонию (АКУ), ALA-дегидратазную порфирию, ALA-D-порфирию, недостаточность ALA-дегидратазы, синдром Аладжиля, альбинизм, алкаптонию, болезнь Александра, алкаптонию, алкаптонурический охроноз, алкаптонию, связанную с ингибитором альфа 1-протеиназы болезнь, связанную с альфа-1 эмфизему, недостаточность альфа-галактозидазы А, болезнь Фабри, синдром Альстрема, болезнь Александра (ALX), несовершенный амеогенез, недостаточность дегидратазы аминокислот, недостаточность аминокислоты 2, болезнь Канавана, болезнь Андерсона-Фабри, синдром нечувствительности к андрогенам, анемии, наследственную сидеробластную анемию, X-связанную сидеробластную анемию и/или семейную анемию, диффузную ангиокератому, ангиокератому *congruis diffusum*, ангиоматоз сетчатки, болезнь фон Гиппель-Линдау, резистентность к APC лейденского типа, тромбофилию по фактору V лейденского типа, синдром Аперта, недостаточность AR, синдром нечувствительности к андрогенам, болезнь Шарко-Мари-Тута (любой тип, например, CMT1, CMTX, CMT2, CMT4, тяжелое раннее начало CMT), арахнодактилию, синдром Марфана, ARNSHL, внесиндромную глухоту (аутосомно-рецессивную, аутосомно-доминантную, X-связанную или митохондриальную), наследственную прогрессирующую артроофтальмопатию, синдром Стиклера (например, COL2A1, COL11A1, COL11A2, COL9A1), врожденный множественный артрохалаз, синдром Элерса-Данлоса (например, по типу гипермобильности, по типу артрохалазии, по типу сосудистой патологии, по типу кифосколиоза, по типу дерматоспараксиса) недостаточность Asp, недостаточность Aspa, недостаточность аспартоацилазы, атаксию-телеангиэктазию, синдром аутизма-деменции-атаксии-потери целенаправленного использования рук, синдром Ретта, аутосомно-доминантный ювенильный ALS, аутосомный вело-кардио-фациальный синдром G/BBB, аутосомную рецессивную форму ювенильного ALS типа 3, боковой амиотрофический склероз (любого типа, например, ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS5, ALS6, ALS7, ALS8, ALS9, ALS10, ALS11, ALS12, ALS13, ALS14, ALS15, ALS16, ALS17, ALS18, ALS19, ALS20, ALS21, ALS22, FTDALS1, FTDALS2, FTDALS3,

FTDALS4, FTDALS4, IBMPFD2), аутомно-рецессивную бессиндромную потерю слуха, аутомно-рецессивное сенсоневральное нарушение слуха и зоба, синдром Пендредда, болезнь Александра (AxD), синдром Айерза, семейную легочную артериальную гипертензию, В-вариант гексозаминидазного Gm2-ганглиозидоза, болезнь Сандхоффа, связанное с VANF расстройство, нейрофиброматоз (любого типа, например, NF1, NF2, шванноматоз), синдром складчатой кожи Бира-Стивенсона, доброкачественный пароксизмальный перитонит, синдром Бенджамина, бета-талассемию, недостаточность ВН4, недостаточность тетрагидробиоптерина, двухсторонний слуховой нейрофиброматоз, недостаточность биотинидазы, рак мочевого пузыря, нарушения свертываемости крови, тромбофилию по фактору V лейденского типа, синдром Блоха-Сулцбергера, недержание пигмента, синдром Блума, болезни костей, болезнь Бурневилля, туберозный склероз, заболевание мозга, прионную болезнь, рак груди, синдром Бирта-Хогга-Дюбе, болезнь хрупкости костей, несовершенный остеогенез, синдром большого пальца ноги, синдром Рубинштейна-Тайби, бронзовый диабет, гемохроматоз, бронзовый цирроз, бульбоспинальную мышечную атрофию, X-связанную атрофию позвоночника и бульбарную мышечную атрофию, синдром Бургера-Груца, недостаточность липопротеинлипазы, семейный синдром CADASIL, хроническое гранулематозное заболевание CGD, кампомелическую дисплазию, синдром семейного рака, наследственный неполипозный колоректальный рак, рак груди, рак мочевого пузыря, недостаточность карбоксилазы, множественную позднюю недостаточность биотинидазы, синдром кошачьего крика, кардиофациальный синдром Кейлора, недостаточность церамидтригексозидазы, церебеллоретинальный ангиоматоз, семейную болезнь фон Гиппель-Линдау, церебральную артериопатию, синдром CADASIL, церебральную аутомно-доминантную атериопатию, синдром CADASIL, цереброатрофическую гипераммониемию, синдром Ретта, синдром цереброзидного липидоза, болезнь Шарко, синдром CHARGE, хондродистрофию, синдром хондродистрофии, хондродистрофию с нейросенсорной глухотой, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, несовершенный хондрогенез, синдром хореоатетозного членовредительства с гиперурикемией, синдром Леша-Найхана, классическую галактоземию, галактоземию, заячью губу и небо, синдром Стиклера (типа I или типа 2), синдром Коффина-Лоури (CLS), синдром Коккейна, синдром Коффина-Лоури, коллагенопатию типов II и XI, семейный неполипоз, наследственный неполипозный колоректальный рак, семейный рак толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, колоректальный рак, полную недостаточность HPRT, синдром Леша-Найхана, полную недостаточность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы, компрессионную невропатию, наследственную невропатию со склонностью к параличам от сдавливания, заболевание соединительной ткани, синдром конотрункальной аномалии лица, анемию Кули, бета-талассемию, болезнь накопления меди, болезнь Вильсона, болезнь транспорта меди, болезнь Менкеса, копропорфирию, наследственную копропорфирию, недостаточность копропорфириногенаксидазы, синдром Каудена, недостаточность CPX, краниофациальный дизартроз, синдром Крузона, краниофациальный дизостоз, синдром Крузона, болезнь Крона, фиброзноствозирование, синдром Крузона, синдром Крузона с акантокератодермией, дермоскелетный синдром Крузона, синдром Крузона с черным акантозом, синдром Коккейна (CS), синдром Каудена, синдром Куршмана-Баттен-Штайнерта, синдром складчатой кожи Бира-Стивенсона, синдром Бира-Стивенсона со складчатой кожей, недостаточность D-глицератдегидрогеназы, первичную гиперкальциурию, синдром пятнистого мегафиза, спондилоэпиметафизарную дисплазию по типу Штрудвика, деменцию по типу Альцгеймера (DAT), генетическую гиперкальциурию, болезнь Дента, мышечную дистрофию (например, типов Дюшенна и Беккера), глухоту с зобом, синдром Пендредда, синдром пигментного ретинита, синдром Ушера, болезнь недостаточности фенилаланингидроксилазы, дегенеративные нервные заболевания, синдром де Груши I, синдром де Груши, синдром Дежерина-Сотта, порфирию с недостаточностью дельта-аминолевулинатдегидратазы, деменцию, синдром CADASIL, демиелиногенную лейкодистрофию, болезнь Александра, синдром Элерса-Данлоса дерматоспарактического типа, дерматоспараксис, наследственные нарушения развития, дистальную наследственную двигательную нейропатию (dHMN), дистальную наследственную двигательную нейропатию (например, DHMN-V), недостаточность DHTR, синдром нечувствительности к андрогенам, диффузный глобальный склероз тела, болезнь Краббе, синдром Ди Джорджа, недостаточность рецепторов дигидротестостерона, синдром нечувствительности к андрогенам, дистальную наследственную моторную нейропатию, миотоническую дистрофию (типа I или типа 2), дистальную спинальную мышечную атрофию (любого типа, включая тип 1, тип 2, тип 3, тип 4, тип 5, тип 6), мышечную дистрофию Дюшенна/Беккера, карликовость (любого вида, например, хондропластическая дисплазия, ахондроплазия, танатофорическая дисплазия), синдром карликовости, атрофию сетчатки и глухоты, синдром Кокейна, дисмиелиногенную лейкодистрофию, болезнь Александра, дистрофическую миотонию, синдром сочетания пигментного ретинита, глухоты, олигофрении и спинномозжечковой атаксии, синдром Ушера, семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD), болезнь Альцгеймера (включая, например, тип 1, тип 2, тип 3 или тип 4), болезнь Экмана-Лобштейна, несовершенный остеогенез, тунельную невралгию, нейропатию, наследственную нейропатию со склонностью к параличу от сдавливания, эритропоэтическую протопорфирию (EPP), эритропластную анемию, бета-талассемию, эритро-печеночную протопорфирию, недостаточность эритроидной 5-аминолевулинатсинтазы, X-связанную сидеробластную анемию, рак глаза, ретинобластому ФА-атаксию Фридрайха, атаксию Фридрайха, FA, анемию Фанкони, лицевые травмы и расстройства, тром-

бофилию по фактору V лейденского типа, FALS, боковой амиотрофический склероз, семейную акустическую неврому, семейный аденоматозный полипоз, семейную болезнь Альцгеймера (FAD), семейный амиотрофический боковой склероз, боковой амиотрофический склероз, семейную вегетативную дистонию, семейную индуцированную жиром гипертриглицеридемию, семейную недостаточность липопротеинлипазы, семейный гемохроматоз, гемохроматоз, семейную недостаточность LPL, недостаточность липопротеинлипазы, семейный неполипозный рак толстой кишки, наследственный неполипозный колоректальный рак, семейный пароксизмальный полисерозит, семейный PCT, позднюю кожную порфирию, семейную чувствительную к сдавливанию нейропатию, наследственную нейропатию FP со склонностью к параличам от сдавливания, семейную первичную легочную гипертензию, семейную сосудистую лейкоэнцефалопатию, синдром CADASIL, FAP, семейный аденоматозный полипоз, FD, семейную дисавтономию, недостаточность феррохелатазы, ферропортиновую болезнь, гемохроматоз (любого типа, например, типа 1, типа 2A, типа 2B, типа 3, типа 4, неонатальный гемоплазмоплазмоз, врожденную атрансферринемию, GRACILE-синдром), синдром периодической лихорадки, семейную средиземноморскую лихорадку (FMF), синдром FG, связанный с FGFR3 коронарный стеноз, фибриноидную дегенерацию астроцитов, болезнь Александера, фибрино-кистозную болезнь поджелудочной железы, болезнь Фоллинга, синдром ломкой X хромосомы, X-синдром, ломкость костей, несовершенный остеогенез, синдром FRAXA, атаксию Фридрайха (FRDA), недостаточность G6PD, болезнь недостаточности галактокиназы, галактоземию, болезнь недостаточности галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, галактоземию, болезнь недостаточности галактозилцерамидазы, болезнь Краббе, галактозилцерамидный липидоз, болезнь Краббе, недостаточность галактозилцерамидазы, недостаточность галактозил-церефатина, недостаточность GALT, галактоземию, болезнь, подобная болезни Гоше, псевдо-болезнь Гоше, недостаточность GBA, генетические нарушения мозга, генетическую эмфизему, генетический гемохроматоз, гемохроматоз, неонатальный гигантоклеточный гепатит, неонатальный гемохроматоз, недостаточность GLA, глиобластому, глиобластому сетчатки, ретинобластому, глободноклеточную лейкодистрофию (GCL, GLD), болезнь Краббе, глободноклеточную лейкоэнцефалопатию, недостаточность глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидоз, глюкозилцереброзидный липидоз, недостаточность глюкозилцереброзидазы, недостаточность глюкозид-глюкозид-бета-глюкозидазы, глюкозид-глюкозид-бета-глюкозид-урициурицидоз, недостаточность глюкозид-глюкозид-глюкозидазы, глициновую энцефалопатию, неклеточную гиперглицинемию, гликолевую ацидурию, первичную гипероксалурию, ганглиозидоз GM2, болезнь Тея-Сакса, синдром зобо-глухоты, синдром Пендреда, синдром Грефе-Ушера, синдром Ушера, синдром Гронблада-Страндберга, псевдохроматохроматоз, синдром гемоэластической хромосомы, синдром Ушера, ихтиоз по типу арлекина, болезнь Hb S, гипохондроплазию (HCH), наследственную копропорфирию (HCP), пороки развития головы и головного мозга, нарушения слуха и глухота, проблемы слуха у детей, HEF2A, HEF2B, гематопорфирию, порфирию, недостаточность гемсинтетазы, гемохроматозы, связанную с гемоглобином M болезнь, метгемоглобинемию бета-глобинового типа, связанную с гемоглобином S болезнь, гемофилию, гепатоэритропоэтическую порфирию (HEP), недостаточность AGT печени, первичную гипероксалурию, синдром гепатоликулярной дегенерации, болезнь Вильсона, наследственную артро-офтальмопатию, синдром Стиклера, наследственный дистопический липидоз, наследственный гемохроматоз (HHC), гемохроматоз, наследственную геморрагическую телеангиэктазию (HHT), наследственную миопатию включенного тела, регенерацию скелетных мышц, наследственную железосодержащую анемию, X-связанную сидеробластную анемию, наследственную моторную и сенсорную нейропатию, наследственную моторную нейропатию типа V, наследственную дистальную моторную нейропатию, наследственные множественные экзостозы, наследственный неполипозный колоректальный рак, синдром наследственной периодической лихорадки, наследственный коли-полипоз, семейный аденоматозный полипоз, наследственную эмфизему легких, наследственную резистентность к активированному протеину C, тромбофилию по фактору V лейденского типа, наследственную сенсорную и вегетативную нейропатию III типа, наследственную дисавтономию, наследственную спастическую параплегию, инфантильный восходящий наследственный спастический паралич, наследственную атаксию позвоночника, атаксию Фридрайха, наследственный склероз позвоночника, атаксию Фридрайха, анемию Херрика, гетерозиготную OSMED, синдром Вайссенбахера-Цвеймюллера, гетерозиготную отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, недостаточность HexA, болезнь Тея-Сакса, недостаточность гексозаминидазы A, болезнь Тея-Сакса, недостаточность альфа-субъединицы гексозаминидазы (любой вариант, например, вариант A, вариант B), болезнь Тея-Сакса, связанный с HFE гемохроматоз, гемохроматоз, HGPS, прогерия, болезнь Гиппель-Линдау, болезнь фон Гиппель-Линдау, гемохроматоз (HLAH), дистальную наследственную моторную нейропатию (HMN V), наследственный неполипозный колоректальный рак (HNPCC), наследственную невропатию со склонностью к параличам от сдавливания (HNPP), гомоцистинурию, недостаточность оксидазы гомогентизиновой кислоты, гомогентизинурию, алкаптонурию, позднюю гомозиготную кожную порфирию, гепатоэритропоэтическую порфирию, первичную гипероксалурию (HP1), гипероксалурию (HP2), гиперфенилаланинемию (HPA), HPRT-гипоксантин-гуаниновую фосфорибозилтрансферазную недостаточность, синдром Леша-Найхана, HSN типа III, семейную вегетативную дистонию, семейную дисавтономию, (HSAN3), наследственную сенсорную нейропатию (любого типа, например, HSN-I, HSN-II, HSN-III),

семейную дисавтономию, дерматоспараксис человека, болезнь Хантингтона, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда, прогерию, неклассический тип гиперандрогенизм, связанный с недостаточностью 21-гидроксилазы, гиперхиломикронемия, семейную недостаточность липопротеинлипазы, семейную гиперглицинемию с кетоацидозом и лейкопенией, пропионовую ацидопротеидемию, гиперлипидотеинемию типа I, недостаточность липопротеинлипазы, семейную гипероксалурию, первичную гиперфенилаланинемию, гиперфенилаланинемию, гиперфенилаланинемию, гипохондроплазию, гипохондрогенез, гипохондроплазию, гипохромную анемию, X-связанную сидеробластную анемию, гипоксантингуаниновую фосфорибозилтрансферазную недостаточность (HPRT), синдром Леша-Найхана, инфантильный восходящий наследственный спастический паралич (IAHSP), синдром ICF, иммунонедостаточность, нестабильность центромеры и синдром лицевых аномалий, идиопатический гемохроматоз, гемохроматоз типа 3, идиопатический неонатальный гемохроматоз, неонатальный гемохроматоз, идиопатическую легочную гипертензию, нарушения иммунной системы, связанную с X-хромосомой тяжелую комбинированную иммунонедостаточность, недержание пигмента, инфантильную церебральную болезнь Гоше, инфантильную болезнь Гоше, инфантильный восходящий наследственный спастический паралич, иммунонедостаточность, наследственную эмфизему, наследственную склонность к параличам от сдавливания, наследственную невропатию со склонностью к параличам от сдавливания, синдром Инсли-Астля, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, синдром перемежающейся острой порфирии, острую перемежающуюся порфирию, синдром полипоза кишечника и кожной пигментации, синдром Пейтца-Егерса, пигментное недержание мочи (IP), нарушение накопления железа, гемохроматоз, синдром изодигитрической хромосомы 15, изодигитризм-15, отдельную глухоту, внесиндромную глухоту, синдром Джексона-Вейсса, синдром Жубера, ювенильный первичный боковой склероз (JPLS), ювенильный боковой амиотрофический склероз, ювенильную подагру, хореоатетоз, синдром умственной отсталости, синдром Леша-Найхана, синдром ювенильной гиперурикемии, синдром Леша-Найхана, синдром Джексона-Вейсса (JWS), спинальную и бульбарную атрофию, болезнь Кеннеди, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, спинальную и бульбарную мышечную атрофию Кеннеди, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, кератиновый гистиоцитоз, кератиновый липоидоз, кератиновый тезауризмоз, кетотическую глицинемию, пропионовую ацидемию, кетотическую гиперглицинемию, пропионовую ацидемию, болезни почек, гипероксалурию, болезнь Кугельберга-Веландера, спинальную мышечную атрофию, лакунарную деменцию, синдром CADASIL, ахондрогенез Лангера-Салдино, дисплазию Лангера-Салдино, болезнь Альцгеймера с поздним началом, болезнь Краббе с поздним началом (LOKD), болезнь Краббе, нарушения обучаемости, неспособность к обучению, периоральный лентигиноз, синдром Пейтца-Егерса, синдром Леша-Найхана, лейкодистрофии, лейкодистрофию с волокнами Розенталя, болезнь Александера, губчатую форму лейкодистрофии, синдром Ли-Фраумени (LFS), синдром Ли-Фраумени, недостаточность липазы D, недостаточность липопротеиновой липазы, недостаточность LIPD, недостаточность липопротеинлипазы, семейный церебролидидоз, ганглиозидный липидоз, инфантильный липидоз, болезнь Тау-Сакса, липоидный гистиоцитоз (кератинового типа), недостаточность липопротеинлипазы, семейные заболевания печени, галактоземию, болезнь Лу Герига, синдром Луи-Бара, атаксию-телеангиэктазию, синдром Линча, наследственный неполипозный колоректальный рак, недостаточность лизил-гидроксилазы, болезнь Джозефа Махадо, спиноцеребеллярную атаксию (любого типа, например, SCA1, SCA2, SCA3, SCA 18, SCA20, SCA21, SCA23, SCA26, SCA28, SCA29), рак груди у мужчин, рак груди, расстройства мужских половых органов, злокачественное новообразование груди, рак груди, злокачественные опухоли груди, рак груди, злокачественная опухоль мочевого пузыря, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак груди, синдром Марфана, синдром маркера X, синдром ломкой хромосомы X, синдром Мартина-Белла, синдром ломкой хромосомы X, синдром МакКьюна-Олбрайта, синдром МакЛеода, синдром MEDNIK, средиземноморскую анемию, бета-талассемию, мегаэпифизарную карликовость, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, синдром Менкеса, болезнь Менкеса, болезнь Менкеса, умственную отсталость с костно-хрящевыми аномалиями, синдром Коффина-Лоури, метаболические нарушения, метатропную карликовость типа II, дисплазию Книста, метатропную дисплазию типа II, дисплазию Книста, метгемоглобинемию (любого типа, например, врожденную, бета-глобинового типа, врожденную метгемоглобинемию типа II), синдром метилмалоновой ацидемии (MFS), МНАМ, синдром Коудена, микросиндром, микроцефалию, ММА, метилмалоновую ацидемию, болезнь Менкеса (АКА МК или MNK), синдром моносомии 1р36, заболевание двигательных нейронов, боковой амиотрофический склероз, боковой амиотрофический склероз, двигательные нарушения, синдром Моуэта-Вильсона, мукополисахаридоз (MPS I), муковисцидоз, мультиинфарктную деменцию, синдром CADASIL, множественную недостаточность карбоксилазы с поздним началом, недостаточность биотинидазы, синдром множественной гамартомы, синдром Коудена, множественный нейрофиброматоз, мышечную дистрофию (любого типа, включая, типы Дюшенна и Беккера), атрофическую миотонию, миотоническую дистрофию, дистрофическую миотонию, синдром Нэнса-Инсли, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, хондродисплазию Нэнси-Суини, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, NBIA1, связанную с пантотенаткиназой нейродегенерацию, синдром Нейла-Дингуолла, синдром Кокейна, нейробластому сетчатки, ретинобластому, нейродегенерацию с накоплением железа в головном мозге типа I, связанную с пантотенаткиназой нейродегенерацию, неврологические заболевания, нейромышечные заболе-

вания, наследственную дистальную двигательную невропатию, болезнь Ниманна-Пика, синдром Ноака, некототическую гиперглицинемию, глициноую энцефалопатию, ненеуропатическую болезнь Гоше, нефенилкетонурическую гиперфенилаланинемию, недостаточность тетрагидробиоптерина, внесиндромную глухоту, синдром Нуан, вариант Норрботтена болезни Гоше, охроноз, алкаптонурию, синдром Огдена, несовершенный остеогенез (НО), болезнь Ослера-Вебера-Ренду, наследственную геморрагическую телеангиэктазию, OSMED, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, несовершенный остеогенез, остеопсатироз, несовершенный остеогенез, врожденный остеосклероз, ото-спондило-мегаэпифизарную дисплазию, отоспондиломегаэпифизарную дисплазию, оксалоз, первичную гипероксалурию, первичную оксалурию, первичную гипероксалурию, ассоциированную с пантотенаткиназой нейродегенерацию, синдром Патау (трисомия 13), дефицит PBGD, острую перемежающуюся порфирию, дефицит PCC, пропионовую ацидемию, позднюю кожную порфирию (PCT), болезнь PDM, синдром Пендредда, периодическое заболевание, средиземноморскую лихорадку, семейный периодический перитонит, синдром периодического лентициноза, синдром Пейтца-Егерса, заболевания периферических нервов, семейную дисавтономию, периферический нейрофиброматоз, перонеальную мышечную атрофию, недостаточность пероксисомальной аланин:глиоксилатаминотрансферазы, гипероксалурию, первичный синдром Пейтца-Егерса, болезнь недостаточности фенилаланингидроксилазы, феохромоцитому, болезнь фон Гиппель-Линдау, синдром Пьера Робина с хондродисплазией плода, синдром Вайссенбахера-Цвеймюллера, пигментарной цирроз, гемохроматоз, синдром Пейтца-Егерса (PJS), ассоциированную с пантотенаткиназой нейродегенерацию (PKAN), PKU, фенилкетонурию, плюмбопорфирию, ALA-недостаточностную порфирию, PMA, поликистоз почек, полиостотическую фиброзную дисплазию, синдром МакКьюна-Олбрайта, семейный аденоматозный полипоз, гамартоматозный полипозный синдром, полипозно-кишечный синдром, синдром Пейтца-Егерса, недостаточность порфобилиногенсинтазы, порфирию с ALA-недостаточностью, порфириновое заболевание, недостаточность PPOX, пеструю порфирию, синдром Прадера-Лабхарта-Вилли, синдром Прадера-Вилли, пресенильную и старческую деменцию, первичную цилиарную дискинезию (PCD), первичный гемохроматоз, синдром первичной гиперурикемии, синдром Леша-Найхана, первичную старческую дегенеративную деменцию, мутацию EDS VII проколлагенового типа, прогерия, прогерия с синдромом Хатчинсона-Гилфорда, прогерия-подобный синдром, синдром Коккейна, прогероидный нанизм, синдром Коккейна, прогрессирующую хорею, хронические наследственные заболевания (по Хантингтону), болезнь Хантингтона, прогрессивно-деформирующий несовершенный остеогенез с нормальной склерой, несовершенный остеогенез (любого типа, например, типа I, типа II, типа III, типа IV, типа V, типа VI, типа VII, типа VIII), проксимальную миотоническую дистрофию (PROMM), пропионовую ацидемию, недостаточность пропионил-КоА-карбоксилазы, недостаточность белка C, недостаточность белка S, протопорфирию, недостаточность протопорфириногенаксидазы, смешанную порфирию, проксимальную миотоническую дистрофию, миотоническую дистрофию типа 2, проксимальную миотоническую миопатию, псевдобольше Гоше, эластическую псевдоксантому, психозиную гипертензию, легочную артериальную гипертензию, легочную гипертензию, эластическую псевдоксантому (PXE), эластическую псевдоксантому, ретинобластому (Rb), болезнь Реклингхаузена, рецидивирующий полисерозит, заболевания сетчатки, синдром глухоты с пигментным ретинитом, синдром Ушера, ретинобластому, синдром Ретта, RFALS типа 3, синдром Рикера, синдром Рикера-Дея, семейную дисавтономию, синдром Русси-Леви, синдром Рубинштейна-Тайби (RSTS), синдром Ретта (RTS), синдром Рубинштейна-Тайби, синдром Сака-Барабаса, болезнь SADDAN, семейную саркому с синдромом Ли и Фраумени, синдром Ли-Фраумени, синдром SBLA (саркома, грудь, лейкоциты и синдром надпочечников), синдром Ли-Фраумени, спинномозговую и бульбарную мышечную атрофию (SBMA), шванному, акустический двусторонний нейрофиброматоз типа II, синдром Шварца-Джампеля, Х-связанную тяжелую комбинированную иммунонедостаточность (SCIDX1), врожденную SED, врожденную спондилоэпифизарную дисплазию по типу Штрудвига, SED Штрудвига, спондилоэпиметафизарную дисплазию Штрудвига, врожденную спондилоэпифизарную дисплазию (SEDC), спондилоэпиметафизарную дисплазию (SEMD), SEMD по типу Штрудвига, старческое слабоумие, тяжелую ахондроплазию с задержкой в развитии и черным акантозом, болезнь SADDAN, синдром Шпринцена, синдром Х-связанной умственной отсталости по типу Сидериса, вызванный мутациями в гене PHF8, синдром скелет-кожа-мозг, нарушения пигментации кожи, спинальная мышечная атрофия (SMA), спондило-мета-эпифизарная дисплазия (SMED) (любого типа, например, типа Штрудвига, типа I), синдром Смита-Лемли-Опица, синдром Смита-Магениса, южно-африканскую генетическую порфирию, инфантильный восходящий наследственный спастический паралич, возникающий в младенческом возрасте восходящий наследственный спастический паралич, расстройства речи и общения, сфинголипидоз Тея-Сакса, болезнь Тея-Сакса, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, спинальную мышечную атрофию, дистальную спинальную мышечную атрофию типа V, наследственную дистальную двигательную невропатию, дистальную мышечную атрофию позвоночника с преобладанием верхних конечностей, наследственную дистальную двигательную невропатию, спиноцеребральную атаксию, врожденную спондилоэпифизарную дисплазию, спондилоэпифизарную дисплазию, коллаgenoпатию (любого типа, например, типов II и XI), спондилоэпиметафизарную дисплазию, спондилометафизарную дисплазию (SMD), спондилоэпиметафизарную дисплазию, губчатую дегенерацию центральной нервной системы, губчатую дегенерацию

мозга, губчатую дегенерацию белого вещества в младенчестве, спорадическую первичную легочную гипертензию, синдром SSB, болезнь стальных волос, болезнь Менкеса, болезнь Штейнерта, миотоническую дистрофию, синдром миотонической дистрофии Штейнерта, миотоническую дистрофию, синдром Стиклера, инсульт, синдром CADASIL, синдром Штрудвика, подострую нейропатическую болезнь Гоше, шведскую генетическую порфирию, острую перемежающуюся порфирию, острую перемежающуюся порфирию, дисплазию хряща по типу швейцарского сыра, дисплазию Кнейста, болезнь Тей-Сакса, TD-танатофорную карликовость, танатофорную дисплазию, TD с прямыми бедрами и черепом в форме трилистника, танатофорную дисплазию типа 2, мозжечково-кожную телеангиэктазию, атаксию-телеангиэктазию, синдром тестикулярной феминизации, синдром нечувствительности к андрогенам, недостаточность тетрагидриобиптерина, синдром тестикулярной феминизации, (TFM), синдром нечувствительности к андрогенам, промежуточную талассемию, бета-талассемию, большую талассемию, бета-талассемию, танатофорную дисплазию, тромбофилию лейденского типа из-за недостаточности кофактора активированного белка C, тромбофилия по фактору V лейденского типа, заболевание щитовидной железы, томакулезную невропатию, наследственную невропатию со склонностью к параличу при сдавливании, полную недостаточность HPRT, синдром Леша-Найхана, полную недостаточность гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы, синдром Леша-Найхана, синдром Тричера-Коллинза, триаду несовершенного остеогенеза, синдром тройной хромосомы X, синдром тройной X, трисомию 21, трисомию X, синдром Труазье-Ано-Шоффар, гемохроматоз, болезнь Тей-Сакса (TSD), комплекс туберозного склероза (TSC), туберозный склероз, синдром Тернера, синдром Нунана, болезнь недостаточности UDP-галактоза-4-эпимеразы, галактоземию, болезнь недостаточности UDP-глюкоза-4-эпимеразы, галактоземию, недостаточность UDP-глюкоза-6-эпимеразы-1-фосфат-уридилтрансферазы, галактоземию, недифференцированную глухоту, внесиндромную глухоту, недостаточность UPS, острую перемежающуюся порфирию, рак мочевого пузыря и мочевой системы, рак мочевого пузыря, недостаточность UROD, недостаточность уропорфириногендекарбоксилазы, недостаточность уропорфириногенсинтазы, острую интермиттирующую порфирию, синдром Ушера, недостаточность UDP-гексозо-1-фосфат-уридилтрансферазы, галактоземию, синдром Ван Богерта-Бертраана, синдром Ван дер Хива, велокардиофациальный синдром, синдром VHL, болезнь фон Гиппель-Линдау, нарушение зрения и слепота, синдром Альстрема, болезнь фон Богарта-Бертраана, болезнь фон Гиппель-Линдау, болезнь фон Рекленхаузена-Аппельбаума, гемохроматоз, болезнь фон Реклингхауза, нейрофиброматоз типа I, болезнь Вролика, несовершенный остеогенез, синдром Ваарденбурга, синдром Варбурга-Шо-Феделиуса, микросиндром, болезнь Вильсона (БВ), синдром Вейсенбахера-Цвеймюллера, болезнь Верднига-Хоффмана, спинальную мышечную атрофию, синдром Вильсона, болезнь Вильсона, синдром Вольфа-Хиршхорна, периодическую болезнь Вольфа, синдром Вейсенбахера-Цвеймюллера (WZS), пигментную ксеродермию, X-связанную умственную отсталость и макроорхидизм, синдром ломкой X-хромосомы, X-связанную первичную гиперурикемию, синдром Леша-Найхана, X-связанную тяжелую комбинированную иммунонедостаточность, X-связанную сидеробластную анемию, X-связанную спинально-бульбарную атрофию мышц, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, X-связанную ацидурию с ферментопатией, синдром Леша-Найхана, X-SCID, X-связанную тяжелую комбинированную иммунонедостаточность, X-связанную сидеробластную анемию (XLSA), X-SCID, X-связанную тяжелую комбинированную иммунонедостаточность, X-связанную сидеробластную анемию (XLSA), XSCID, X-связанную тяжелую комбинированную иммунонедостаточность, синдром XXX, синдром тройной хромосомы X, синдром XXXX, синдром XXXXX, синдром XXXXX, синдром ХХУ, трисомию ХХУ, синдром Клайнфельтера, синдром ХУУ, нарушения с триплетным повтором или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления специфический посттранскрипционный контрольный модулятор нацелен на модуляцию, модификацию, увеличение или уменьшение активности путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования. Например, посттранскрипционные регулирующие модуляторы могут включать PARN, PAN, CPSF, CstF, PAP, PABP, PAB2, CFI, CFII, РНК-трифосфатазу, РНК-глюцилтрансферазу, РНК-метилтрансферазу, SAM-синтазу, убиквитин-конъюгирующий фермент E2R, SR-белки (SFRS1 - SFR11), hnRNP-белки (например, HNRNPA0, HNRNPA1, HNRNPA1L1, HNRNPA1L2, HNRNPA2, HNRNPA2B1, HNRNPAB, HNRNPB1, HNRNPC, HNRNPCL1, HNRNPD, HNRPDL, HNRNPF, HNRNHP1, HNRNHP2, HNRNHP3, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPLL, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HNRNPUL1, HNRNPUL2, HNRNPUL3, ADAR, Mex 67, Mtr2, Nab2, геликазы Dead-box, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, GEF, GCN2, PKR, HRI, PERK, eEF1, eEF2, GCN, eRF3, ARE-специфические связывающие белки, EXRN1, DCP1, DCP2, RCK/p54, CPEB, eIF4E, микро РНК и миРНК, DICER, белки Ago, белки распада, опосредованного антисмысловой мРНК, UPF3A, UPF3B, eIF4A3, MLN51, Y14/MAGOH, MG-1, SMG-5, SMG-6, SMG-7 или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активности генетических путей, связанных с клеточным циклом, модулируют, усиливают или уменьшают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования. Примеры путей и генов, связанных с клеточным циклом, включают ATM, PMS2, FAS-L, MRE11, MLH1, FasR, NBS1, MSH6, Trail-L, RAD50, MSH2, Trail-R, 53BP1, RFC, TNF-Ct, P53, PCNA, TNF-R1, CHKE, MSH3, FADD, E2F1, гомомлог MutS, TRADD, PML, гомомлог MutL, R1P1, FANCD2, экзонуклеазу, MyD88, SMC1, ДНК, полимеразу дельта, IRAK, BLM1, (POLD1,

POLD2, POLD3, NIL, BRCA1 и POLD4-гены, ИКК, субъединицы кодирующей H2AX), NFK β , ATR, топоизомеразу 1, Ikb α , RPA, топоизомеразу 2, IAP, ATRIP, RNaseH1, каспазу 3, RAD9, лигазу 1, каспазу 6, RAD1, ДНК, полимеразу 1, каспазу 7, HUS, ДНК, полимеразу 3, каспазу 8, RAD17, примазу, каспазу 10, RFC, геликазу, HDAC1, одноцепочечную связывающую CHK1, HDAC2, белки TLK1, цитохром C, CDC25, Bx1-xL, STAT3, STAT5, DFF45, Vcl-2, ENDO-G, PI2K, Akt, калпаин, Bad, Bax - убиквитин-опосредованного протеолиза, гипоксии, пролиферации клеток, HIF-loc, MAPK, E1, HERC1, TRAF6, HIF- β , MAPKK, E2, UBE2Q, MEKK1, Refl, MAPKKK, E3, UBE2R, COP1, HSP90, c-Met, UBLE1A, UBE2S, PIFH2, VEGF, HGF, UBLE1B, UBE2U, cIAP, PAS, ER, S1/2, UBLE1C, UBE2W, PIAS, ARNT, ATK, UBE2A, UBE2Z, SYVN, VHL, PKCs, UBE2B, AFC, LLC, N, NHLRC1, HLF, паксиллин, UBE2C, UBE1, AIRE, EPF, FAK, UBE2A, E6AP, MGRN1, VDU2, аддуцин, UBE2E, UBE3B, BRCA1, SUMORESUME, PYK1, UBE2F, Smurf, FANCL, SENP1, RB, UBE2G1, Itch, MIDI, кальциневрин, A, RBI, UBE2G2, HERC2, Cdc20, RACK1, Raf-1, UBE2I, HERC3, Cdh1, PTB, A-Raf, UBE2J1, HERC4, Apcl, Hur, B-raf, UBE2J2, UBE4A, Apc2, PHD2, MEK1/2, UBE2L3, UBE4B, Apc3, SSAT2, ERK1/2, UBE2L6, CHIP, Apc4, SSAT1, Ets, UBE2M, CYC4, Apc5, GSK3, Elk1, UBE2N, PPR19, Apc6, CBP, SAP1, UBE20, UIP5, Apc7, FOXO4, cPLA2, WWPI, Mdm2, Apc8, F1H-1, WWP2, Parkin, Apc9, TRIP, 12, Trim32, Ape, 10, NEED4, Trim37, Ape, 11, ARF-BP1, SIAH-1, Ape, 12, EDD1, PML, путь выживания клетки, путь задержки клеточного цикла, SMADI, P21, SMAD5, B AX, SAMD8, MDR, LEF1, DRAIL, IGFBP3, TCF3, GADD45, TCF4, P300, HAT1, P13, Akt, GF1 или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активности связанных с ангиогенезом генов модулируют, усиливают или уменьшают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку (клетки). Иллюстративные гены и генетические пути, связанные с ангиогенезом, а также состояния, относящиеся к ангиогенезу, включают VEGF, VEGFR2, SHC, E2F7, VEGFB, VEGFR3, P13, VEGFC, Nrp1, PIP3, EGFDIP3, DAG, GRB2, SOS, Akt, PB, PKC, Ras, RAF1, DAG, eNOS, NO, ERK1, ER2, cPLA2, ME1, MEK2 или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активности связанных с митохондриальной функцией генетических путей и/или генов модулируют, усиливают или уменьшают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку (клетки). Иллюстративные связанные с митохондриальной функцией гены и генетические пути включают малат-дегидрогеназу-аминотрансферазу, гидратазу, деацилазу, дегидрогеназу, карбоксилазу, мутазу, окисление лейцином жирных кислот изолейциновой реакцией окисления (ферментативный путь окисления), аминотрансферазу, разветвление цепи OCTM2, FATP1-6-аминотрансферазу 2, аминотрансферазу 2, митохондриальную CPT-1, САСТТ-изобутил-КоА, 2-метилбутил-КоА, CPT-II-дегидрогеназу, SCAD (разветвление цепи, MCAD-кето-кислота, VLCAD-дегидрогеназу, ETF-DH-комплекс), альфа-ETF-гидратазу, бета-ETF-HMG-КоА-лиазу, 2-метил-3-ОН-SCHAD-бутирил-КоА, LCHAD-дегидрогеназу, MTP-3-оксотиолазу, LKAT, DECR 1, HMGCS2, HMGCL или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения активности связанных с повреждением ДНК или геномной нестабильностью генетических путей и/или генов модулируют, усиливают или уменьшают. Примеры связанных с повреждением ДНК или геномной нестабильностью генетических путей и/или генов включают 53BP1, BLM, MBD2, ДНК лигазы 4, MDC1, H2AX, XLF, SMC1, 53BP1, Rad50, P53, Artemis, Rad27, TdT, APE1, PMS2, APE2, UvrA, RecA, MLH1, NEIL1, UvrB, SSB, MSH6, NEIL2, UvrC, Mrell, MSH2, NEIL3, XPC, Rad50, RFC, XRCC1, Rad23B, Nbsl, PCNA, PNKP, CEN2, CtIP, MSH3, Tdpl, DDB1, RPA, MutS, APTX, XPE, Rad51, MutL, ДНК полимеразы β , CSA, Rad52, ДНК полимеразы 5, CSB, Rad54, ДНК топоизомеразы 1, TFT1H, BRCA1, топоизомеразу 2, PCNA, XPB, BRCA2, RNaseH1, FEN1, XPD, Exol, лигазу 1, RFC, XPA, BLM, ДНК полимеразы 1, PAR 1, RPA, TopIlla, DNA, Lig1, XPG, GEN1, примазу, Lig3, ERCC1, геликазу Yen1, UNG, XPF, Slx1, SSBs, MUTY ДНК полимеразы δ , Slx4, SMUG ДНК полимеразы s, Mus8, MBD4, Emel, Dss1, ASH1L, SETD4, DQT1L, SETD5, EHMT1, SETD6, EHMT2, SETD7, EZH1, SETD8, EZH2, SETD9, MLL, SETDB1, MLL2, SETDB2, MLL3, SETMAR, MLL4, SMYD, 1, MLL5, SMYD2, NSD, 1, SMYD3, PRDM2, SMYD4, SET, SMYD5, SETBP1, SUV39H1, SETD 1A, SUV39H2, SETD 1B, SUV420H1, SETD2, SUV420 H2, SETD3 или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие факторы транскрипции млекопитающих, модулируют, усиливают, ослабляют или вводят в клетку. Примеры факторов транскрипции человека включают

AFF4, AFF3, AFF2, AFF1, AR, TFAP2B, TFAP2D, TFAP2C, TFAP2E, TFAP2A, JARID2, KDM5D, ARID4A, ARID4B, KDM5A, ARID3A, KDM5B, KDM5C, ARID5B, ARID3B, ARID2, ARID5A, ARID3C, ARID1A, ARID1B, HIF1A, NPAS1, NPAS3, NPAS4, MLXIPL, ARNTL2, MXD1, AHR, TFE3, HES2, MNT, TCF3, SREBF1, TFAP4, TCF5, LYL1, USF2, TFEC, AHR, MLX, MYF6, MYF5, SIM1, TFE3, HAND1, HES1, ID2, MYCL1, ID3, TCF21, MXI1, SOHLH2, MYOG, TWIST1, NEUROG3, BHLHE41, NEUROD4, MXD4, BHLHE23, TCF15, MAX, ID1, MYOD1, ARNTL, BHLHE40, MYCN, CLOCK, HEY2, MYC, ASCL1, TCF12, ARNT, HES6, FERD3L, MSGN1, USF1, TAL1, NEUROD1, TCF23, HEYL, HAND2, NEUROD6, HEY1, SOHLH1, MESP1, PTF1A, ATOH8, NPAS2, NEUROD2, NHLH1, ID4, ATOH1, ARNT2, HES3, MLXIP, ASCL3, KIAA2018, OLIG3, NHLH2, NEUROG2, MSC, HES7, ATOH7, BHLHA15, BHLHE22, NEUROG1, FIGLA, ASCL2, OLIG1, TAL2, MITF, SCXB, HELT, ASCL4, MESP2, HES4, SCXA, TCF4, HES5, SREBF2, BHLHA9, OLIG2, MXD3, TWIST2, LOC388553, C13orf38-SOHLH2, CEBPE, XBP1, BATF3, CREB5, CEBPG, ATF3, ATF7, CEBPB, CEBPD, CEBPA, CBFb, CAMTA2, CAMTA1, EBF4, EBF3, EBF1, EBF2, NR2F6, NR2F1, NR2F2, GRHL2, TFPC2L1, GRHL1, TFPC2, UBP1, GRHL3, YBX2, CSDE1, CSDA, YBX1, LIN28A, CARHSP1, CSDC2, LIN28B, NFIX, NFIC, NFIB, NFIA, CUX2, ONECUT2, CUX1, ONECUT1, SATB1, ONECUT3, SATB2, DMRT3, DMRT1, DMRTC2, DMRTA2, DMRTB1, DMRT2, DMRTA1, E2F2, E2F1, E2F3, TFDP2, E2F8, E2F5, E2F7, E2F6, TFDP3, TFDP1, E2F4, NR1H3, NR1H2, ETV1, ETV7, SPI1, ELF4, ETV2, ERF, ELF2, ELK3, ETV3, ELF1, SPDEF, ELK1, ETS1, EHF, ELF5, ETV6, SPIB, FLI1, GABPA, ERG, ETS2, ELK4, ELF3, FEV, SPIC, ETV4, ETV5, FOXN3, FOXC1, FOXP2, FOXF1, FOXN1, FOXM1, FOXP1, FOXO3, FOXA2, FOXP2, FOXP1, FOXP4, FOXP2, FOXN4, FOXK2, FOXO1, FOXH1, FOXQ1, FOXK1, FOXI1, FOXD4, FOXA3, FOXN2, FOXB1, FOXG1, FOXR1, FOXL1, FOXC2, FOXE1, FOXS1, FOXL2, FOXO4, FOXD4L1, FOXD4L4, FOXD2, FOXI2, FOXE3, FOXD3, FOXD4L3, FOXR2, FOXJ3, FOXO6, FOXB2, FOXD4L5, FOXD4L6, FOXD4L2, KIAA0415, FOXA1, FOXP3, GCM2, GCM1, NR3C1, GTF2IRD1, GTF2I, GTF2IRD2B, GTF2IRD2, SOX8, SOX30, PMS1, CIC, TCF7, TOX4, SOX10, HMGXB4, HBP1, TFAM, UBTf, WHSC1, SOX6, HMGXB3, BBX, TOX2, SOX4, SOX21, SOX9, SOX15, SOX5, SOX3, LEF1, HMG20A, SOX13, TCF7L2, SSRP1, TCF7L1, SOX17, SOX14, PINX1, SOX7, SOX11, SOX12, SOX2, SOX1, SRY, SOX18, UBTFL1, UBTFL2, TOX, HMGB1, HMGB2, PBRM1, TOX3, SMARCE1, HMGB20B, HMGB3, HMGA2, HMGA1, ARX, HOXA11, MEOX1, DLX6, ISL1, HOXC8, BARX2, ALX4, GSC2, DLX3, PITX1, HOXA9, HOXA10, LHX5, LASS4, ZFHx4, SIX4, VSX1, ADNP, RHOXF1, MEIS3, PBX4, DLX5, HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA6, HOXA13, EVX1, NOBOX, MEOX2, LHX2, LHX6, LHX3, TLX1, PITX3, HOXB6, HNF1B, DLX4, SEBOX, VTN, PHOX2B, NKX3-2, DBX1, NANOG, IRX4, CDX1, TLX2, DLX2, VAX2, PRRX1, TGIF2, VSX2, NKX2-3, HOXB8, HOXB5, HOXB7, HOXB3, HOXB1, MSX2, LHX4, HOXA7, HOXC13, HOXC11, HOXC12, ESX1, BARHL1, NKX2-4, NKX2-2, SIX1, HOXD1, HOXD3, HOXD9, HOXD10, HOXD11, HOXD13, MNX1, CDX4, BARX1, RHOXF2, LHX1, GSC, MEIS2, RAX, EMX1, NKX2-8, NKX2-1, HLX, LMX1B, SIX3, LBX1, PDX1, LASS5, ZFHx3, BARHL2, LHX9, LASS2, MEIS1, DLX1, HMBOX1, ZEB1, VAX1, NKX6-2, VENTX, HHEX, TGIF2LX, LASS3, ALX3, HOXB13, IRX6, ISL2, PKNOX1, LHX8, LMX1A, EN1, MSX1, NKX6-1, HESX1, PITX2, TLX3, EN2, UNCX, GBX1, NKX6-3, ZHX1, HDX, PHOX2A, PKNOX2, CDX2, DRGX, NKX3-1, PBX3, PRRX2, GBX2, SHOX2, GSX1, HOXD4, HOXD12, EMX2, IRX1, IRX2, SIX2, HOXB9, HOPX, OTP, LASS6, HOXC5, HOXB2, RAX2, EVX2, ZHX3, PROP1, ISX, HOXD8, TGIF2LY, IRX5, SIX5, TGIF1, IRX3, ZHX2, LBX2, NKX2-6, ALX1, GSX2, HOXC9, HOXC10, HOXB4, NKX2-5, SIX6, MIXL1, DBX2, PBX1, SHOX, ARGFX, HMX3, HMX2, BSX, HOXA4, DMBX1, HOXC6, HOXC4, RHOXF2B, PBX2, DUXA, DPRX, LEUTX, NOTO, HOMEZ, HMX1, DUX4L5, DUX4L2, DUX4L3, DUX4L6, NKX1-1, HNF1A, HSF4, HSFY2, HSFY1, HSFY2, HSFY1, HSF1, LCOLL, LCOLL, IRF6, IRF1, IRF3, IRF5, IRF4, IRF8, IRF2, IRF7, IRF9, MBD3, BAZ2B, MBD4, SETDB2, MBD1, MECPP2, SETDB1, MBD2, BAZ2A, SMAD7, SMAD5, SMAD9, SMAD6, SMAD4, SMAD3, SMAD1, SMAD2, ZZZ3, RCOR1, CDC5L, MYBL2, DNAJC2, TADA2A, RCOR3, MYB, TERF2, DMTF1, DNAJC1, NCOR1, TERF1, MIER3, MYSM1, SNAPC4, RCOR2, TADA2B, MYBL1,

TERFIP2, NCOR2, CCDC79, SMARCC1, SMARCC2, TTF1, C11orf9, NFYA, NFYC, NFBYB, NRF1, NR4A3, NR4A1, NR4A2, ESR1, NR0B2, NR0B1, PREB, EAF2, SPZ1, TP63, TP73, TP53, PAX6, PAX7, PAX2, PAX4, PAX8, PAX1, PAX3, PAX5, PAX9, SUB1, POU2F2, POU1F1, POU4F3, POU6F2, POU2F3, POU2F1, POU4F2, POU4F1, POU6F1, POU3F2, POU3F1, POU3F4, POU3F3, POU5F1, POU5F1B, PPAR, PARG, PPARA, PGR, PROX1, PROX2, NR2E1, NR5A2, NR2C1, NR5A1, NR6A1, ESRR, NR2C2, RFX3, RFX2, RFX4, RFX1, RFX5, RFX7, RFX6, RFX8, NFATC3, NFKB2, NFATC4, NFATC2, NFAT5, RELB, NFKB1, NFATC1, REL, RELA, RORA, RORC, NR1D2, RORB, RUNX3, RUNX1, SPI10, SPI40, GMEB2, SPI10, AIRE, GMEB1, DEAF1, SPI40L, LOC729991-MEF2B, MEF2A, SRF, MEF2D, MEF2B, STAT1, STAT5A, STAT4, STAT6, STAT3, STAT2, STAT5B, TBX21, TBX5, TBX15, TBX18, TBX2, TBX4, TBX22, TBX3, TBR1, TBX19, TBX6, EOMES, T, TBX20, TBX10, MGA, TBX1, TEAD3, TEAD2, TEAD1, TEAD4, CREBL2, NFE2L3, CREB3L3, FOSL2, NFE2L1, CREM, DBP, CREB3, HLF, BACH2, ATF2, NFE2L2, ATF6, CREB1, ATF1, NFE2, FOSB, ATF4, NRL, JUND, JDP2, CREB3L4, BATF, BACH1, CREB3L1, NFIL3, TEF, BATF2, ATF5, FOS, JUNB, DDIT3, FOSL1, JUN, MAF, CREB3L2, MAFA, MAFF, MAFG, MAFK, MAFB, ATF6B, CRX, OTX1, OTX2, THAP3, THAP10, THAP1, PRKRIR, THAP8, THAP9, THAP11, THAP2, THAP6, THAP4, THAP5, THAP7, NR1H4, NR2E3, RARB, HNF4A, VDR, ESRRB, THRA, NR1D1, RARA, ESR2, NR1I3, NR1I2, THRB, NR3C2, HNF4G, RARG, RXRA, ESRRG, RXRB, TSC22D1, TSC22D3, TSC22D4, TSC22D2, TULP3, TULP2, TULP1, TULP4, TUB, ZBTB33, ZBTB32, ZBTB11, MYNN, ZBTB25, PATZ1, ZBTB16, ZBTB24, BCL6, ZBTB47, ZBTB17, ZBTB45, GZF1, ZBTB1, ZBTB46, ZBTB8A, ZBTB7B, BCL6B, ZBTB49, ZBTB43, HIC2, ZBTB26, ZNF131, ZNF295, ZBTB4, ZBTB34, ZBTB38, HIC1, ZBTB41, ZBTB7A, ZNF238, ZBTB42, ZBTB2, ZBTB20, ZBTB40, ZBTB7C, ZBTB37, ZBTB3, ZBTB6, ZBTB44, ZFP161, ZBTB12, ZBTB48, ZBTB10, ZBED4, ZBED3, ZBED2, C11orf95, ZBED1, IKZF5, ZNF821, ZNF451, ZNF195, ZFX, ZNF263, ZNF200, HIVEP2, WIZ, ZNF582, SNAI2, ZFP64, IKZF2, ZIC2, ZNF800, PRDM1, PRDM6, ZFP112, ZNF275, ZNF76, ZFAT, KLF6, ZFY, ZXDC, GLI2, ZNF532, ZNF37A, ZNF510, ZNF506, ZNF324, ZNF671, ZNF416, ZNF586, ZNF446, ZNF8, ZNF264, REST, MECOM, ZNF213, ZNF343, ZNF302, ZNF268, ZNF10, HIVEP1, ZNF184, MZF1, SALL4, ZNF516, KLF8, KLF5, ZNF629, ZNF423, CTCF, ZNF500, ZNF174, SALL1, MAZ, ZNF419, OVOL3, ZNF175, ZNF14, ZNF574, ZNF85, SP4, ZKSCAN1, GLI3, GLIS3, KLF3, PRDM4, GLI1, PRDM13, ZNF142, PRDM2, ZNF684, ZNF541, KLF7, PLAGL1, ZNF430, KLF12, KLF9, ZNF410, BCL11A, EGR1, ZFP30, TSHZ3, ZNF549, ZSCAN18, ZNF211, ZNF639, ZSCAN20, GTF3A, ZNF205, ZNF644, EGR2, IKZF4, CTCFL, ZNF831, SNAI1, ZNF576, ZNF45, TRERF1, ZNF391, RREB1, ZNF133, OVOL2, ZNF436, PLAGL2, GLIS2, ZNF384, ZNF484, HIVEP3, BCL11B, KLF2, ZNF780B, FEZF1, KLF16, ZSCAN10, ZNF557, ZNF337, PRDM12, ZNF317, ZNF426, ZNF331, ZNF236, ZNF341, ZNF227, ZNF141, ZNF304, ZSCAN5A, ZNF132, ZNF20, EGR4, ZNF670, VEZF1, KLF4, ZFP37, ZNF189, ZNF193, ZNF280D, PRDM5, ZNF740, ZIC5, ZSCAN29, ZNF710, ZNF434, ZNF287, ZIM3, PRDM15, ZFP14, ZNF787, ZNF473, ZNF614, PRDM16, ZNF697, ZNF687, OSR1, ZNF514, ZNF660, ZNF300, RBAK, ZNF92, ZNF157,

ZNF182, ZNF41, ZNF711, PRDM14, ZNF7, ZNF214, ZNF215, SALL3, ZNF827, ZNF547, ZNF773, ZNF776, ZNF256, ZSCAN1, ZNF837, PRDM8, ZNF117, ZIC1, FEZF2, ZNF599, ZNF18, KLF10, ZKSCAN2, ZNF689, ZIC3, ZNF19, ZSCAN12, ZNF276, ZNF283, ZNF221, ZNF225, ZNF230, ZNF222, ZNF234, ZNF233, ZNF235, ZNF362, ZNF208, ZNF714, ZNF394, ZNF333, ZNF382, IKZF3, ZNF577, ZNF653, ZNF75A, GF11, ZNF281, ZNF496, ZNF2, ZNF513, ZNF148, KLF15, ZNF691, ZNF589, PRDM9, ZNF12, SP8, OSR2, ZNF367, ZNF22, GF11B, ZNF219, SALL2, ZNF319, ZNF202, ZNF143, ZNF3, ZSCAN21, ZNF606, SP2, ZNF91, ZNF23, ZNF226, ZNF229, ZNF180, ZNF668, ZNF646, ZNF641, ZNF610, ZNF528, ZNF701, ZNF526, ZNF146, ZNF444, ZNF83, ZNF558, ZNF232, E4F1, ZNF597, INSM2, ZNF30, ZNF507, ZNF354A, ZEB2, ZNF32, KLF13, ZFPM2, ZNF764, ZNF768, ZNF35, ZNF778, ZNF212, ZNF282, PRDM10, SP7, SCRT1, ZNF16, ZNF296, ZNF160, ZNF415, ZNF672, ZNF692, ZNF439, ZNF440, ZNF581, ZNF524, ZNF562, ZNF561, ZNF584, ZNF274, ZIK1, ZNF540, ZNF570, KLF17, ZNF217, ZNF57, ZNF556, ZNF554, KLF11, HINFP, ZNF24, ZNF596, OVOL1, SP3, ZNF621, ZNF680, BNC2, ZNF483, ZNF449, INSM1, ZNF417, ZNF791, ZNF80, GLIS1, ZNF497, KLF14, ZNF266, ZIC4, ZNF408, ZNF519, ZNF25, ZNF77, ZNF169, ZNF613, ZNF683, ZNF135, ZSCAN2, ZNF575, ZNF491, ZNF620, ZNF619, ZNF354C, ZNF114, ZNF366, ZNF454, ZNF543, ZNF354B, ZNF223, ZNF713, ZNF852, ZNF552, ZFP42, ZNF664, EGR3, ZFPM1, ZNF784, ZNF648, FIZ1, ZNF771, TSHZ1, ZNF48, ZNF816, ZNF571, ZSCAN4, ZNF594, ZFP3, ZNF443, ZNF792, ZNF572, ZNF707, ZNF746, ZNF322A, ZNF467, ZNF678, ZFP41, HKR1, PLAG1, ZNF329, ZNF101, ZNF716, ZNF708, ZSCAN22, ZNF662, ZNF320, ZNF623, ZNF530, ZNF285, ZFP1, WT1, ZFP90, ZNF479, ZNF445, ZNF74, SP1, SNAI3, ZNF696, IKZF1, ZNF267, ZNF566, ZNF224, ZNF529, ZNF284, ZNF749, ZNF17, ZNF555, ZNF75D, ZNF501, ZNF197, ZNF396, ZFP91, ZNF732, ZNF397, ZSCAN30, ZNF546, ZNF286A, ZKSCAN4, ZNF70, ZNF643, ZNF642, ZSCAN23, ZNF490, ZNF626, ZNF793, ZNF383, ZNF669, ZNF559, ZNF177, ZNF548, MTF1, ZNF322B, ZNF563, ZNF292, ZNF567, SP6, ZNF573, ZNF527, ZNF33A, ZNF600, ZKSCAN3, ZNF676, ZNF699, ZNF250, ZNF79, ZNF681, ZNF766, ZNF107, ZNF471, ZNF836, ZNF493, ZNF167, ZNF565, ZNF34, ZNF781, ZNF140, ZNF774, ZNF658, ZNF765, ZNF124, ZNF569, ZNF777, ZNF775, ZNF799, ZNF782, ZNF846, ZNF136, ZKSCAN5, ZNF502, ZFP62, ZNF33B, ZNF512B, ZNF431, ZNF418, ZNF700, ZNF239, ZSCAN16, ZFP28, ZNF705A, ZNF585A, ZNF138, ZNF429, ZNF470, ZNF100, ZNF398, ZNF498, ZNF441, ZNF420, ZNF763, ZNF679, ZNF682, ZNF772, ZNF257, ZNF785, ZSCAN5B, ZNF165, ZNF655, ZNF98, ZNF786, ZNF517, ZNF675, ZNF860, ZNF628, ZNF665, ZNF624, ZNF841, ZNF615, ZNF350, ZNF432, ZNF433, ZNF460, ZNF81, ZNF780A, ZNF461, ZNF181, LOC100287841, ZNF44, ZNF790, ZNF677, ZNF823, ZNF311, ZNF347, ZNF71, ZNF121, ZNF335, ZNF560, ZNF273, ZNF84, ZNF667, ZNF649, ZNF248, ZNF544, ZNF770, ZNF737, ZNF251, ZNF607, ZNF334, ZXDA, ZNF485, ZIM2, PEG3, ZNF192, ZNF442, ZNF813, ZNF26, ZNF69, ZNF583, ZNF568, ZXDB, ZNF480, ZNF587, ZNF808, ZNF43, ZNF28, ZNF627, ZNF789, ZNF536, ZNF534, ZNF652, ZNF521, ZNF358, ZFP2, SP5, ZNF814, ZNF551, ZNF805, ZSCAN5C, ZNF468, ZNF616, ZFP57, ZNF155, ZNF783, ZNF425, ZNF580, ZNF611, ZNF254, ZNF625, ZNF134, ZNF845, ZNF99, ZNF253, ZNF90, ZNF93, ZNF486, REPIN1, LOC100131539, ZNF705D, LOC100132396, ZNF705G, SCRT2, ZNF407, SP9, ZNF579, ZNF880, ZNF630, ZNF844, ZNF469, ZNF717, ZNF865, ZNF492, ZNF688, YY2, ZNF878, ZNF879, ZNF736, ZNF323, ZNF709, ZNF512, ZNF585B, ZNF154, ZNF324B, ZNF564, ZFP82, GLI4, ZNF674, ZNF345, ZNF550, KLF1, YY1, MYST2, ST18, L3MBTL4, MYT1L, MYT1, L3MBTL1, MTA3, GATA1, TRPS1, GATA3, GATA5, GATA4, GATA6, GATAD2B, GATAD1, GATA2, MTA1, ZGLP1, MTA2, RERE, C16orf5, LITAF, PIAS1, PIAS2, PIAS4, ZMIZ1, ZMIZ2, PIAS3, RNF138, NFX1, NFXL1

или любые их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки обрабатывают (например, преобразуют или дифференцируют) для перехода клеток из одного типа клеток в другой. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки поджелудочной железы обрабатывают и переводят в бета-островковые клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения фибробласты обрабатывают и переводят в iPS-клетки. В некоторых вариантах осуществления преадипоциты обрабатывают и переводят в коричневые жировые клетки. Другие иллюстративные клетки включают, например, мышечные клетки, нервные клетки, лейкоциты и лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой патологическую или мутантную клетку. Такими клетками можно манипулировать путем их обработки для лечения заболевания, например, для исправления мутации или для изменения фенотипа клетки, например, для ингибирования роста раковой клетки. Например, клетка может быть ассоциирована с одним или несколькими заболеваниями или состояниями, описанными здесь.

В некоторых вариантах осуществления изобретения обрабатываемая клетка представляет собой нормальную клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения обрабатываемая клетка представляет собой стволовые клетки или клетки-предшественники (например, iPS, эмбриональные, гемопоэтические, адипозные, зародышевые, легочные или нейронные стволовые клетки или клетки-предшественники). В некоторых вариантах осуществления обрабатываемая клетка может представлять собой клетку любого из трех зародышевых слоев (т.е. мезодермальных, эндодермальных или эктодермальных). В некоторых вариантах обрабатываемая клетка может происходить из экстраэмбриональной ткани, например из плаценты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения обрабатываемую клетку выбирают из фибробластов, моноцитарных предшественников, в-клеток, экзокринных клеток, клеток-предшественников кле-

ток поджелудочной железы, эндокринных клеток-предшественников, гепатобластов, миобластов или преадипоцитов. В некоторых вариантах осуществления клетки обрабатывают (например, преобразуют или дифференцируют) для перехода клеток в мышечные клетки, эритроидные-мегакариоцитарные клетки, эозинофилы, iPS-клетки, макрофаги, Т-клетки, островковые бета-клетки, нейроны, кардиомиоциты, клетки крови, эндокринные клетки-предшественники, экзокринные клетки-предшественники, дуктальные клетки, ацинозные клетки, альфа-клетки, бета-клетки, дельта-клетки, PP-клетки, гепатоциты, холангиоциты, ангиобласты, мезоангиобласты или в коричневые адипоциты.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клеткой является мышечная клетка, эритроид-мегакариоцитарная клетка, эозинофил, iPS-клетка, макрофаг, Т-клетка, островковая бета-клетка, нейрон, кардиомиоцит, клетка крови, эндокринная клетка-предшественник, экзокринная клетка-предшественник, дуктальная клетка, ацинозная клетка, альфа-клетка, бета-клетка, дельта-клетка, PP-клетка, гепатоцит, холангиоцит или белый или коричневый адипоцит.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку-предшественник, плюрипотентную клетку, тотипотентную клетку, зрелую стволовую клетку, клетку внутренней клеточной массы, эмбриональную стволовую клетку или iPS-клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения обрабатываемая клетка представляет собой раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения раковая клетка может представлять собой клетку рака легкого, клетку рака молочной железы, клетку рака кожи, клетку рака головного мозга, клетку рака поджелудочной железы, гемопоэтическую злокачественную клетку, клетку рака печени, клетку рака почки, клетку рака яичника, клетку рака предстательной железы, клетку рака кожи. В некоторых вариантах осуществления изобретения клеткой является мышечная клетка, эритроид-мегакариоцитарная клетка, эозинофил, iPS-клетка, макрофаг, Т-клетка, островковая бета-клетка, нейрон, кардиомиоцит, клетка крови, эндокринная клетка-предшественница, экзокринная клетка-предшественница, прототарная клетка, ацинозная клетка, альфа-клетка, бета-клетка, дельта-клетка, PP-клетка, гепатоцит, холангиоциты или белый или коричневый адипоцит.

Введение ингибиторов ДНК-РК и системы редактирования генов в клетку (клетки).

Введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК может быть осуществлено любым способом, известным в данной области техники. Введение может быть выполнено в условиях *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Введение в клетку (клетки) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-РК может происходить одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК и компоненты системы редактирования генома входят в клеточную мембрану. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК и компоненты системы редактирования генома входят в ядро клетки. В некоторых вариантах осуществления введение включает инкубацию клетки в присутствии ингибитора ДНК-РК и системы редактирования генома.

Система редактирования гена может быть введена в клетку (клетки) любым способом, известным в данной области техники. Например, могут быть использованы любые способы доставки нуклеиновых кислот или белков, известные в данной области. Систему редактирования генов вводят (например, доставляется) в клетку посредством нуклеиновой кислоты, кодирующей компоненты системы редактирования генов. Система редактирования гена может быть введена в клетку вирусным или невирусным вектором. В некоторых вариантах осуществления используют вирусные векторы. Вирусные векторы могут представлять собой ретровирусные векторы (например, вирус мышинного лейкоза, ВИЧ или лентивирус) или ДНК-вирусы (например, аденовирус, вирус простого герпеса и аденоассоциированный вирус). В некоторых вариантах для введения системы редактирования генома в клетку используют способы трансфекции (например, способы невирусной доставки). Способы трансфекции включают контактирование клетки с DEAE-декстраном, фосфатом кальция, липосомами, или электропорацию плазмиды в клетку. Дополнительные способы невирусной доставки включают использование электропорации, липофекции, микроинъекции, биолистики, виросом, липосом, иммунолипосом, поликатионов или конъюгатов липид: нуклеиновая кислота, голый ДНК, голый РНК, искусственных вирионов и усиленное агентом поглощение ДНК. Для доставки нуклеиновых кислот можно также использовать сонопорацию с применением, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar). В некоторых вариантах осуществления изобретения доставляют одну или несколько нуклеиновых кислот в виде мРНК. В некоторых вариантах осуществления для повышения эффективности трансляции и/или стабильности мРНК используют блокированные мРНК. В некоторых вариантах используют эпированные ARCA (аналог кэп-структуры с правильной ориентацией) или их варианты (см. патенты США US 7074596 и US 8153773).

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) и gРНК (направляющая РНК) транскрибируют из ДНК.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазу (например, Cas, Cpf1 и т.п.) транскрибируют из ДНК, и gРНК представляет собой РНК.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) и gРНК представлены в виде РНК.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) представлена в виде белка, а gРНК представлена в виде ДНК.

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) представлена в виде белка, а gРНК представлена в виде РНК.

Дополнительные системы доставки нуклеиновой кислоты включают системы, поставляемые Amaha Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte Inc. (Rockville, Maryland), BTK Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) и Copernicus Therapeutics Inc. (см., например, US 6008336). Липофекция описана, например, в патентах США №№ 54946787 и 4897355), и реагенты для липофекции коммерчески доступны (например, Transfectam™, Lipofectin™ и Lipofectamine™ RNAiMAX). Катионные и нейтральные липиды, которые пригодны для эффективной липофекции полинуклеотидов методом с распознаванием рецептора включают липиды, предложенные Фейгнером, липиды, описанные в WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (введение *ex vivo*) или в ткани-мишени (введение *in vivo*).

Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно специалистам в данной области (см., например, Crystal, Science 270: 404-410 (1995); Blaese et al. Cancer Gene Ther. 2: 291-297 (1995); Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995).

Дополнительные способы доставки включают применение носителей для доставки EnGeneIC (EDV), в которые упаковывают нуклеиновые кислоты. Эти EDV специфически нуклеиновые кислоты доставляют в ткани-мишени за счет использования биспецифических антител, где одно плечо антитела обладает специфичностью к целевой ткани-мишени, а другое плечо специфично к EDV. Антитело переносит EDV к поверхности целевых клеток-мишеней, а затем EDV проникает в клетку посредством эндоцитоза. После проникновения EDV в клетку ее содержимое высвобождается (см. Macdiarm Et al. (2009) Nature Biotechnology 27 (7): 643) Ahmad Et al. Cancer Res 52: 4817-4820 (1992); патенты США №№ 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 4946787).

В некоторых вариантах осуществления изобретения трансфекция может быть транзистентной, в которой трансфицирующая система редактирования генома, содержащая плазмиду, входит в ядро, но не включается в геном клетки во время репликации. Трансфекция может быть стабильной, при которой трансфицирующая плазида интегрируется в геномную область клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых используется транзистентная экспрессия, можно использовать системы на основе аденовирусов. Векторы на основе аденовирусов способны обеспечивать очень высокую эффективность трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С такими векторами были получены высокие титры и высокие уровни экспрессии. Такой вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Векторы, ассоциированные с аденоассоциированным вирусом ("AAV"), также используют для трансдукции клеток с помощью нуклеиновых кислот-мишеней, например, в производстве *in vitro* нуклеиновых кислот и пептидов, а также для способов геновой терапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West et al., Virology 160:38-47 (1987); патент США № 4797368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J., Clin. Invest. 94: 1351 (1994)). Конструирование рекомбинантных AAV-векторов описано в ряде публикаций, включая патент США № 5173414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); и Samulski et al., J. Virol 63:03822-3828 (1989).

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение в клетку (клетки) ингибитора ДНК-РК осуществляют культивированием выделенной клетки (клеток) в присутствии ингибитора ДНК-РК и любой подходящей среды, которая позволяет ингибитору ДНК-РК проникать в клеточную мембрану и/или ядро клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибиторы ДНК-РК вводят в клетку (клетки) в условиях *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-РК приводят в контакт с клеткой (клетками) в течение приблизительно 5 ч, 10 ч, 15 ч, 20 ч, 21 ч, 22 ч, 23 ч, 24 ч, 25 ч, 30 ч, 35 ч, 40 ч, 45 ч, 50 ч, 55 ч, 60 ч, 65 ч, 70 ч, 85 ч, 90 ч, 100 ч, 125 ч, 150 ч, 200 ч, или в течение любого промежутка времени между указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК приводят в контакт с клеткой (клетками) в течение приблизительно 1,5 недель, 2,0 недель, 2,5 недель, 3,0 недель, 3,5 недель, 4 недель или в течение любого промежутка времени между указанными значениями. Ингибитор ДНК-РК можно повторно вводить при замене среды для культивирования клеток. Ингибитор ДНК-РК можно вводить в контакт с клеткой до, во время или после введения компонентов системы редактирования генома.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК вводят в клетку (клетки) в концентрации приблизительно 0,1 мкМ, 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 0,75 мкМ, 1,0 мкМ, 1,25 мкМ, 1,50 мкМ, 1,75 мкМ, 2,0 мкМ, 2,5 мкМ, 3,0 мкМ, 3,5 мкМ, 4,0 мкМ, 4,5 мкМ, 5,0 мкМ, 5,5 мкМ, 6,0 мкМ, 6,5 мкМ, 7,0 мкМ, 7,5 мкМ, 8,0 мкМ, 8,5 мкМ, 9,0 мкМ, 9,5 мкМ, 10 мкМ, 10,5 мкМ, 11,0 мкМ, 11,5 мкМ, 12 мкМ или в любой концентрации между указанными значениями. Концентрация ингибитора ДНК-РК может быть изменена в процессе введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения компоненты для редактирования генов доставляются в клетку (клетки) одним или несколькими векторами, или в форме РНК, мРНК, или, в случае эн-

донуклеазного компонента, в виде очищенного белка или мРНК (например, белка Cas9). Один или несколько векторов могут включать вирусные векторы, плазмиды или оцДНК. Вирусные векторы могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, аденоассоциированные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления компоненты, редактирующие ген, доставляются через РНК или синтетическую РНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку вместе с системой редактирования гена к увеличению количества результатов редактирования генов гомологичной направленной репарации по сравнению с исходным состоянием, при котором в клетку не вводят ингибитор ДНК-РК. В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к подавлению вставок/инсерций (от NHEJ) либо на мишени, либо вне мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к повышенной или пониженной экспрессии представляющего интерес гена. Введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена может привести к экспрессии гена, не эндогенного в клетке. В некоторых вариантах изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификации гена из клетки (клеток).

В некоторых вариантах изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификации интрона и/или экзона в клетке (клетках). В некоторых вариантах изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к полному или частичному удалению или модификацию некодирующей области в клетке (клетках). В некоторых вариантах изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку вместе с системой редактирования гена приводит к одновременному или последовательному, полному или частичному удалению или модификации кодирующей и/или некодирующей генетической области в клетке (клетках). В некоторых вариантах изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку (клетки) вместе с системой редактирования гена приводит к одновременному или последовательному, полному или частичному удалению или модификации кодирующей и/или некодирующей генетической области в клетке (клетках), включая внехромосомную ДНК или РНК. Внехромосомная ДНК может представлять собой митохондриальную ДНК, хлоропластную ДНК, внехромосомную кольцевую ДНК или вирусную внехромосомную ДНК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку вместе с системой редактирования генома приводит к повышенной экспрессии или пониженной экспрессии представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения увеличение или уменьшение экспрессии представляющего интерес гена может составлять приблизительно 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, включая промежуточные значения, по сравнению с исходным состоянием, когда в клетку не вводили ингибитор ДНК-РК. В некоторых вариантах изобретения увеличение или уменьшение представляющего интерес гена может быть приблизительно 0,5-кратным, 1,0-кратным, 1,5-кратным, 2,0-кратным, 2,5-кратным, 3,0-кратным, 3,5-кратным, 4-кратным, 4,5-кратным, 5-кратным или 10-кратным, включая промежуточные значения, по сравнению с исходным уровнем экспрессии, когда в клетку вводили ингибитор ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение ингибиторов ДНК-РК в клетку вместе с системой редактирования генома приводит к увеличению эффекта редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления увеличение эффекта редактирования генома может составлять приблизительно 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, включая промежуточные значения, по сравнению с исходным уровнем, когда в клетку не вводили ингибитор ДНК-РК. В некоторых вариантах увеличение эффекта редактирования генома может быть приблизительно 0,5-кратным, 1,0-кратным, 1,5-кратным, 2,0-кратным, 2,5-кратным, 3,0-кратным, 3,5-кратным, 4-кратным, 4,5-кратным, 5-кратным или 10-кратным, включая промежуточные значения, по сравнению с исходным уровнем, когда в клетку вводили ингибитор ДНК-РК.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение ингибитора ДНК-РК и системы редактирования генов в клеточную популяцию приводит к большему выживанию клеток по сравнению с исходным состоянием, когда в клеточную популяцию вводили только систему редактирования генов, и не вводили ингибитор ДНК-РК. В некоторых вариантах изобретения ингибитор ДНК-РК, который приводит к большему выживанию клеток, представляет собой соединение структурной формулы I, структурной формулы II или структурной формулы II".

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка синхронизируется в фазе клеточного цикла S или G2 до, после или во время введения ингибитора ДНК-РК. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка синхронизируется в фазе клеточного цикла S или G2 до, после или во время введения компонентов редактирования гена. Синхронизация клетки в фазе клеточного цикла S или G2 может быть достигнута любым способом, известным в данной области. В качестве неограничивающего примера агенты, которые могут быть использованы для синхронизации клетки в фазе клеточного цикла S или G2, включают афидолин, диросимочевину, ловастатин, мимеотозин, носодазол, тимидин или любые

их комбинации (см. Lin et al. *Elife*. 2014 Dec 15; 32014). В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты для синхронизации клеток можно вводить в любое время во время процесса редактирования гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК и/или система редактирования генома могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями для использования. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК и/или система редактирования генома, включенная в контейнер, пакет или дозатор, вместе с инструкциями для применения, представляет собой набор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибиторы ДНК-РК и/или система редактирования генома включены в набор с инструкциями для применения. Набор может содержать любую систему редактирования генома и/или ингибитор ДНК-РК и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК представляет собой любое из соединений, представленных структурными формулами I, II, II', II'', II''', III, III', или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома представляет собой систему, выбранную из системы на основе мегануклеазы, системы на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), системы на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo. Система редактирования генома может быть представлена в наборе в любой форме, например, в виде плазмиды, вектора, ДНК или РНК-конструкта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК и/или систему редактирования генома вводят *in vivo*. Ингибиторы ДНК-РК и системы для редактирования гена готовят в виде препаратов таким образом, чтобы они были совместимы с предполагаемым способом введения. Примеры способов введения включают парентеральное, например внутривенное, интрадермальное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (то есть местное), чресслизистое и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутривенного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетатный буфер, цитратный буфер или фосфатный буфер, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множества доз, изготовленные из стекла или пластмассы.

Подходящие носители для инъекционного применения включают стерильные водные растворы (когда компоненты являются водорастворимыми) или дисперсии, и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Для внутривенного (IV) введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Для таких инъекционных форм и форм для внутривенного введения композиция является стерильной и текучей в той степени, что их можно легко вводить с использованием шприца. Они стабильны в условиях производства и хранения и защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и подходящие смеси. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, с использованием покрытия частиц, такого как лецитин, для поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвратить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В некоторых вариантах изобретения в композицию включены изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, такого как моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем введения активного агента в требуемом количестве в подходящий растворитель с использованием одного или комбинации ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем введения активного агента в стерильный носитель, который включает основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерилизованного фильтрованием.

Пероральные композиции обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Их

можно заключать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для перорального терапевтического введения активное соединение может быть включено в эксципиенты и изготовлено в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также могут быть приготовлены с использованием жидкого носителя для использования в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяется перорально и смывается, отхаркивается или проглатывается. В качестве части композиции могут быть включены фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или вспомогательные вещества. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений подобной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирант, такой как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; лубрикант, такой как стеарат магния или Sterotes; глидант, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

При введении путем ингаляции агенты доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, содержащего подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или из распылителя.

Системное введение также может осуществляться через слизистые оболочки или через кожу. Для трансмукозального или чрескожного введения в композиции используются пенетранты, соответствующие барьеру, через который происходит проникновение. Такие пенетранты хорошо известны в данной области и включают, например, средства для введения через слизистые оболочки, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмукзальное введение может осуществляться с помощью назальных спреев или суппозиториев. Для трансдермального введения активные соединения включают в состав мазей, масел, гелей или кремов, как известно в данной области.

Агенты также могут быть приготовлены в форме суппозиториев (например, с обычными основами для суппозиториев, такими как масло какао и другие глицериды) или удерживаемых клизм для ректального введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты готовят вместе с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такие как лекарственная форма с замедленным/контролируемым высвобождением, включая импланты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций известны специалистам в данной области.

Например, активные агенты могут быть включены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или посредством межфазной полимеризации, например, в капсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина, и, соответственно, в микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), включены в коллоидные системы доставки лекарств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии.

Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих агент, где эти матрицы находятся в форме формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (см. патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LU-PRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, дают возможность высвобождения молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения препарат/композиция может также содержать более чем одно активное соединение, которое необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, например, соединения с дополнительными активностями, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Альтернативно или дополнительно композиция может включать агент, усиливающий ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор ДНК-РК и/или систему редактирования генома вводят в рамках комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами, например терапевтическими агентами, которые полезны для лечения патологических состояний или нарушений, таких как различные формы рака и воспалительные заболевания. Термин "в сочетании" или "в комбинации" в этом контексте означает, что агенты вводят по существу одновременно, либо одновременно, либо последовательно. При последовательном введении на момент введения второго соединения первое из

двух соединений предпочтительно все еще обнаруживается в эффективных концентрациях в месте/области лечения.

Способы скрининга при редактировании генома.

Любой способ, известный в данной области, может быть использован для скрининга клеток в отношении эффективности редактирования генома, включая эффективность NHEJ и/или HDR. Например, способы скрининга могут включать ПЦР-амплификацию целевых областей с последующим секвенированием или глубоким секвенированием амплифицированных областей, чтобы подтвердить редактирование генома. Генотипирование ПЦР позволяет количественно оценить и ранжировать соединения при стимулировании HDR. Другие способы скрининга могут включать секвенирование следующего поколения (см., например, Bell et al., "A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing", BMC Genomics, 15:1002 (2014)).

Праймеры для ПЦР могут быть сконструированы для селективного амплифицирования как немодифицированных, так и модифицированных генетических областей, что приводит к ампликонам различной длины в зависимости от статуса генетической модификации. Затем ампликоны можно разделить на геле, и эффективность HDR оценить с помощью денситометрии с использованием прибора Bio-Imager. В качестве альтернативы можно использовать новую технологию ПЦР, быструю цифровую капельную ПЦР (DDPCR) для одновременного измерения результатов HDR и NHEJ в образцах с отредактированными геномом (см., например, Miyaoka et al., "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing", Scientific Reports, 6, 2016). Другие методы, которые можно использовать для скрининга клеток на предмет модификаций генома, включают секвенирование по Сэнгеру, глубокое секвенирование и ОТ-ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления для скрининга клеток используют конструкцию светового репортера (TLR). Скрининг с TLR включает репортерную клетку, которая сконструирована так, чтобы экспрессировать флуоресцентный маркер при целевом редактировании генома. После соответствующего нацеливания флуоресцентный маркер экспрессируется клеткой. Количественное определение клеток-мишеней может быть выполнено любым методом, известным в данной области, например, методом проточной цитометрии (см., например, Certo et al. 2011, "Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints", Nature Methods, 8, p. 671-676 (2011)).

Релевантные части всех публикаций и патентных документов, цитируемых здесь, включены сюда посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были специально и индивидуально указаны как включенные в настоящее описание посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не претендует на признание того, что они являются каким-либо уровнем техники, и также не означает какого-либо признания их содержания или даты этого документа. Настоящее изобретение раскрыто и проиллюстрировано с помощью письменного описания, и специалистам в данной области техники понятно, что на практике может быть выполнено множество вариантов осуществления, и что приведенное выше описание и примеры, приведенные ниже, предназначены только для целей иллюстрации, а не ограничения приведенной ниже формулы изобретения.

Применение ингибиторов ДНК-РК при лечении/предупреждении состояний.

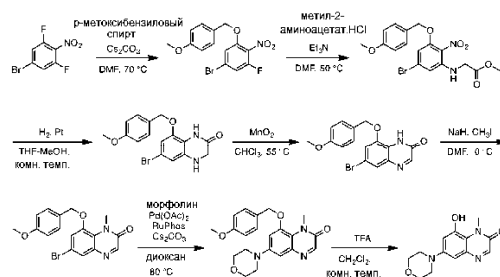
В другом варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение любой из формул, описанных здесь, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В дополнительном варианте изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение из табл. 2. В дополнительном варианте изобретения композиции дополнительно содержат дополнительный терапевтический агент.

В соответствии с другим вариантом настоящее изобретение относится к композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемое производное и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество (адъювант) или наполнитель. В одном варианте количество соединения в композиции по изобретению является таким, которое эффективно для заметного ингибирования ДНК-РК в биологическом образце или у пациента. В другом варианте количество соединения в композиции по изобретению является таким, которое эффективно для заметного ингибирования ДНК-РК. В одном варианте осуществления композицию по изобретению готовят в форме для введения пациенту, нуждающемуся во введении такой композиции. В дополнительном варианте осуществления композицию по настоящему изобретению готовят в форме для перорального введения пациенту.

Получение соединений по изобретению

Раздел I. Подучение промежуточных соединений гидросихиноксалинона.

В разделе I описаны способы синтеза для получения функционализированных промежуточных соединений 8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2(1H)-она. Эти промежуточные продукты используются вместе с соответствующим выбором промежуточного мезилата, описанного в разделе II, для получения соединений, указанных в табл. А.



Синтез 8-гидрокси-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-она.

Стадия 1. 5-Бром-1-фтор-3-((4-метоксибензил)окси)-2-нитробензол.

5-Бром-1,3-дифтор-2-нитробензол (300 г, 1,261 моль) и п-метоксибензиловый спирт (190 г, 1,375 моль) растворяли в N,N-диметилформамиде (1,8 л). К полученному раствору добавляли карбонат цезия (611 г, 1,875 моль), смесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 16 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в холодную воду (2 л), получая осадок твердого вещества желтого цвета. Осадок собирали на воронке Бюхнера и промывали водой (2×500 мл). Осадок растворяли в дихлорметане (5 л), промывали водой (2×1 л), насыщенным раствором соли (1 л), сушили (Na₂SO₄) и фильтровали через силикагелевую пробку (500 г). Слой силикагеля промывали дихлорметаном (500 мл) и объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с гептаном (2 л) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 14 ч с получением 5-бром-1-фтор-3-((4-метоксибензил)окси)-2-нитробензола (350 г, 72% выход) в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,35-7,27 (м, 2H), 7,08-6,99 (м, 2H), 6,97-6,87 (м, 2H), 5,11(с, 2H), 3,82(с, 3H), 19F ЯМР (282 МГц, CDCl₃) δ -120,36.

Стадия 2. Метил-(5-бром-3-((4-метоксибензил)окси)-2-нитрофенил)глицинат.

К смеси 5-бром-1-фтор-3-[(4-метоксифенил)метокси]-2-нитробензола (350 г, 0,914 моль) и метил-2-аминоацетата (гидрохлоридная соль, 173 г, 1,364 моль) в N,N-диметилформамиде (2 л) добавляли триэтиламин (350 мл, 2,511 моль). Полученную реакцию смесь нагревали до 50°C и перемешивали при этой же температуре в течение 54 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и выливали в холодную воду (3 л), получая при этом светло-коричневый пастообразный материал. Воду декантировали и светло-коричневую массу растворяли в дихлорметане (5 л), промывали водой (1 л), насыщенным раствором соли (1 л) и сушили (Na₂SO₄). Раствор фильтровали через слой силикагеля и слой промывали дихлорметаном (2×500 мл). Объединенный фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с метил-трет-бутиловым эфиром (2 л) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 12 ч с получением метил-(5-бром-3-((4-метоксибензил)окси)-2-нитрофенил)глицината (252 г, 62%) в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,40-7,30 (м, 2H), 6,96-6,86 (м, 2H), 6,63 (т, J=4,9 Гц, 1H), 6,58 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,40 (д, J=1,8 Гц, 1H), 5,07 (с, 2H), 3,96 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,82 (с, 6H).

Стадия 3. 6-Бром-8-((4-метоксибензил)окси)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1H)-он.

К раствору метил-(5-бром-3-((4-метоксибензил)окси)-2-нитрофенил)глицината (52 г, 112,5 ммоль) в тетрагидрофуране (700 мл) и метаноле (400 мл) добавляли платину [7 г 3% мае./мае. на активированном древесном угле, восстановленном, 70% влажной пасты (ESCAT 2931), 1,076 ммоль]. Реакционную смесь вакуумировали в течение 5 мин, затем помещали в атмосферу водорода (подача из баллона) на 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит и слой промывали метанолом (2×200 мл). Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали азеотропной перегонке с дихлорметаном (400 мл) и растирали с метил-трет-бутиловым эфиром с получением 6-бром-8-((4-метоксибензил)окси)-3,4-дигидрохиноксалин-2(1H)-она (39 г, 93%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 9,42 (с, 1H), 7,56-7,29 (м, 2H), 7,02-6,81 (м, 2H), 6,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,49 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,19 (с, 1H), 5,05 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,70 (с, 2H).

Стадия 4. 6-Бром-8-((4-метоксибензил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

6-Бром-8-[(4-метоксифенил)метокси]-3,4-дигидро-1H-хиноксалин-2-он (178 г, 0,485 ммоль) растворяли в хлороформе (6,0 л). К полученному раствору добавляли диоксид марганца(IV) (400 г, 4,601 моль). Полученную реакцию смесь концентрировали в вакууме, нагревали до 55°C и перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и фильтровали через слой силикагеля. Слой промывали 40% этилацетатом в дихлорметане (4×500 мл). Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток растирали с этилацетатом/метил-трет-бутиловым эфиром (1:2, 3 л) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 14 ч с получением 6-бром-8-((4-метоксибензил)окси)хиноксалин-2(1H)-она (125 г, 71%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 12,06 (с, 1H), 8,19 (с, 1H), 7,67-7,33 (м, 4H), 7,03-6,85 (м, 2H), 5,26 (с, 2H), 3,75 (с, 3H).

Стадия 5. 6-Бром-8-((4-метоксибензил)окси)-1-метилхиноксалин-2(1H)-он.

К раствору 6-бром-8-((4-метоксибензил)окси)хиноксалин-2(1H)-она (125 г, 0,343 ммоль) в N,N-диметилФормамиде (4,0 л) добавляли метилиодид (110 мл, 1,767 моль). Полученную смесь охлаждали до 0°C на ледяной бане и в течение 20 мин добавляли порциями гидрид натрия (35 г, 60% мас./мас. 0,875 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при температуре $\leq 3^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, при этом анализ ВЭЖХ показал, что соотношение N-метилирования и O-метилирования в продукте составляет приблизительно 85:15. Реакционную смесь выливали в холодную воду (4,0 л), получая желтый осадок. Твердое вещество собирали на воронке Бюхнера, промывали водой (2×1,0 л) и сушили в конвекционной печи при 50°C в течение 4 ч. Осадок (соотношение 85:15) суспендировали в 20% этилацетате в метил-трет-бутиловом эфире (3,0 л), кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч и охлаждали до температуры окружающей среды. Смесь фильтровали через фриттовую воронку со средней пористостью и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 5 ч, получая N-метилированный продукт (120 г) с чистотой 96%. Продукт повторно суспендировали в 20% этилацетате в метил-трет-бутиловом эфире (3,0 л), кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч, фильтровали и сушили в вакууме, как описано выше, получая 6-бром-8-((4-метоксибензил)окси)-1-метилхиноксалин-2(1H)-он (90 г) с чистотой 99% в виде желтого твердого вещества. Фильтрат дополнительно концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали хроматографией на силикагеле (330 г колонка Isco gold, линейный градиент: 0% - 60% этилацетат/дихлорметан) с получением дополнительной порции целевого продукта 3 (13 г, 99% чистоты).

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,26 (с, 1H), 7,63 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 7,40-7,29 (м, 2H), 7,26 (с, 1H), 7,05-6,83 (м, 2H), 5,05 (с, 2H), 3,84 (д, $J=1,7$ Гц, 6H).

ESI-MS m/z вычислено 374,03, найдено 375,05 (M+1).

Стадия 6. 8-((4-Метоксибензил)окси)-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-он.

Смесь 6-бром-8-[(4-метоксифенил)метокси]-1-метилхиноксалин-2-она (103 г, 270,9 ммоль) и морфолина (36 мл, 412,8 ммоль) в диоксане (2,0 л) дезоксигенировали путем барботирования потока газообразного азота через раствор в течение 10 мин. Последовательно добавляли ацетат палладия (II) (1,3 г, 5,790 ммоль), RuPhos (5,5 г, 11,79 ммоль) и карбонат цезия (200 г, 613,8 ммоль). Реакционную смесь дезоксигенировали потоком азота в течение дополнительных 10 мин. Полученную реакционную смесь нагревали до 80°C и перемешивали в течение 14 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали при пониженном давлении для удаления диоксана. Добавляли холодную воду (2,5 л) и образовывался желтый осадок. Осадок собирали на воронке Бюхнера, промывали водой (500 мл) и сушили в конвекционной печи. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (колонка 4×330 г, линейный градиент, 0% - 10% метанол/дихлорметан) с получением 8-((4-метоксибензил)окси)-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-она (68 г, 66%) в виде желтого твердого вещества.

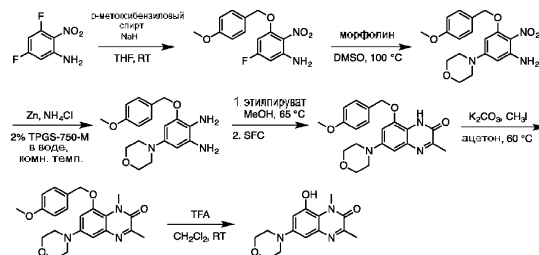
^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,25 (с, 1H), 7,41-7,28 (м, 2H), 7,03-6,89 (м, 3H), 6,82 (д, $J=2,7$ Гц, 1H), 5,05 (с, 2H), 3,93-3,87 (м, 4H), 3,86 (с, 3H), 3,84 (с, 3H), 3,46-2,82 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 381,17, найдено 382,21 (M+1).

Стадия 7. 8-Гидрокси-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-он.

8-((4-Метоксибензил)окси)-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-он (13,90 г, 36,44 ммоль) растворяли в дихлорметане (250 мл). Добавляли трифторуксусную кислоту (31,0 мл, 402 ммоль) и полученный темно-коричневый раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Растворитель выпаривали в вакууме, остаток растворяли в дихлорметане и фильтровали через слой силикагеля. Для элюирования примесей с высоким R_f слой силикагеля элюировали сначала дихлорметаном, и элюат с примесями удаляли. Элюент заменяли на ацетон, что приводило к элюированию желто-оранжевой полосы. Эту полосу собирали и концентрировали досуха с получением 8-гидрокси-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-она (8,89 г, выход 50%).

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 10,23 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 6,77 (д, $J=3,1$ Гц, 2H), 3,84 (с, 3H), 3,81-3,70 (м, 4H), 3,19-2,99 (м, 4H).



Синтез 8-гидрокси-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-она.

Стадия 1. 5-фтор-3-[(4-метоксифенил)метокси]-2-нитроанилин.

К раствору (4-метоксифенил)метанола (4,17 г, 30,18 ммоль) в тетрагидрофуране (52,4 мл) добавляли

гидрид натрия (60% дисперсия в минеральном масле; 1,28 г, 32,00 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин, обрабатывали 3,5-дифтор-2-нитроанилином (5 г, 28,72 ммоль) и перемешивали в течение еще 1 ч. Смесь осторожно распределяли между этилацетатом и водой, и добавляли по каплям 1 н. соляную кислоту до тех пор, пока красный цвет не изменялся до желто-оранжевого. Органические слои собирали, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (330 г колонка ISCO, линейный градиент 0-25% этилацетат/гептан), получая 5-фтор-3-[(4-метоксифенил)метокси]-2-нитроанилин в виде желто-оранжевого твердого вещества.

Стадия 2. 3-[(4-Метоксифенил)метокси]-5-морфолино-2-нитроанилин.

Раствор 5-фтор-3-[(4-метоксифенил)метокси]-2-нитроанилина (4,64 г, 15,88 ммоль) и морфолина (7,0 мл, 80,27 ммоль) в диметилсульфоксиде (13,6 мл) нагревали до 100°C в течение 2,5 ч. Смесь распределяли между этилацетатом и водой. Фазы разделяли и водную фазу экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали с получением 3-[(4-метоксифенил)метокси]-5-морфолино-2-нитроанилина (5,70 г, 100%) выход) в виде оранжевого твердого вещества, которое использовали без дальнейшей обработки.

ESI-MS m/z вычислено 359,15, найдено 360,17 (M+1).

Стадия 3. 3-[(4-Метоксифенил)метокси]-5-морфолино-бензол-1,2-диамин.

Смесь 3-[(4-метоксифенил)метокси]-5-морфолино-2-нитроанилина (5,66 г, 15,75 ммоль), хлорида аммония (1,53 г, 28,60 ммоль), цинка (5,59 г, 85,46 ммоль) и 2% TPGS-750-M в воде (31 мл) перемешивали в течение ночи. Добавляли целит для поглощения воды, а затем этилацетат. Смесь фильтровали, и слой целита дополнительно промывали этилацетатом. Объединенный фильтрат концентрировали и неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (330 г, картридж с силикагелем; линейный градиент 0-5% метанол/дихлорметан) с получением 3-[(4-метоксифенил)метокси]-5-морфолино-бензол-1,2-диамина (3,41 г, выход 66%) в виде красного твердого вещества.

ESI-MS m/z вычислено 329,17, найдено 330,19 (M+1).

Стадия 4. 8-[(4-Метоксифенил)метокси]-3-метил-6-морфолино-1Н-хиноксалин-2-он.

Смесь 3-[(4-метоксифенил)метокси]-5-морфолино-бензол-1,2-диамина (315 мг, 0,956 ммоль), этилпирувата (212 мкл, 1,908 ммоль) и метанола (3,0 мл) нагревали в герметично закрытом сосуде при 65°C в течение 2 ч. Твердое вещество выпадало в осадок из реакционной смеси. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли воду и смесь перемешивали в течение 30 мин. Твердое вещество собирали фильтрацией, промывали водой и сушили в вакууме в течение ночи с получением региоизомерной смеси продуктов (365 мг, отношение 1,7:1, с преобладанием целевого соединения, показанного на схеме). Полученную смесь очищали с помощью SFC с получением требуемого изомера 8-((4-метоксифенил)метокси)-3-метил-6-морфолино-1Н-хиноксалин-2-она (110 мг) и нежелательного изомера 5-((4-метоксибензил)окси)-3-метил-7-морфолинохиноксалин-2(1Н)-она (64 мг).

Данные для 8-((4-метоксибензил)окси)-3-метил-6-морфолинохиноксалин-2(1Н)-она:

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,56 (с, 1H), 7,55-7,46 (м, 2H), 6,98 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,95-6,89 (м, 2H), 6,72 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,21 (с, 2H), 3,74 (м, 7H), 3,10 (м, 4H), 2,78 (кв, J=7,4 Гц, 2H), 1,23-1,14 (т, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 381,17, найдено 382,17 (M+1).

Данные для 5-((4-метоксибензил)окси)-3-метил-7-морфолинохиноксалин-2(1Н)-она:

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,96 (с, 1H), 7,49-7,38 (м, 2H), 7,00-6,90 (м, 2H), 6,60 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,21 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,17 (с, 2H), 3,75 (м, 7H), 3,18 (м, 4H), 2,69 (кв, J=7,4 Гц, 2H), 1,17 (т, J=7,4 Гц, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 381,17, найдено 382,17 (M+1).

Стадия 5. 8-((4-Метоксибензил)окси)-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2(1Н)-он.

Смесь 8-[(4-метоксифенил)метокси]-3-метил-6-морфолино-1Н-хиноксалин-2-она (110 мг, 0,274 ммоль), карбоната калия (183 мг, 1,324 ммоль) и ацетона (3,0 мл) обрабатывали метилиодидом (21 мкл, 0,337 ммоль). Полученную реакционную смесь герметично закрывали и перемешивали при 60°C в течение ночи. Смесь распределяли между этилацетатом и водой. Фазы разделяли и водную фазу экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (4 г силикагеля; линейный градиент 0-10% метанол/дихлорметан) с получением 8-((4-метоксибензил)окси)-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2(1Н)-она (94 мг, 82%).

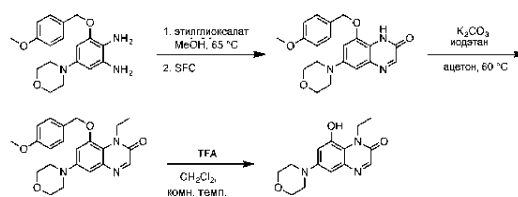
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,48-7,41 (м, 2H), 7,04 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,99-6,94 (м, 2H), 6,79 (д, J=2,6 Гц, 1H), 5,15 (с, 2H), 3,76 (м, 10H), 3,16 (м, 4H), 2,38 (с, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 395,18, найдено 396,26 (M+1).

Стадия 6. 8-Гидрокси-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2(1Н)-он.

Раствор 8-[(4-метоксифенил)метокси]-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2-она (88 мг, 0,177 ммоль) размешанного в дихлорметане (5,0 мл) обрабатывали трифторуксусной кислотой. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали, и сырой остаток использовали без дополнительной очистки.

ESI-MS m/z вычислено 275,13, найдено 276,14 (M+1).



Синтез 1-этил-8-гидрокси-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-она.

Стадия 1. 8-((4-Метоксибензил)окси)-6-морфолинохиноксалин-2(1H)-он.

К раствору 3-[(4-метоксифенил)метокси]-5-морфолино-бензол-1,2-диамина (7,51 г, 22,80 ммоль) в метаноле (877 мл) добавляли этилглиоксальат (9,3 мл 50% мас./об. в толуоле, 45,55 ммоль). Полученный раствор герметизировали в колбе и нагревали при 65°C в течение 2 ч. Твердое вещество выпадало в осадок из реакционной смеси. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли воду. Твердое вещество собирали фильтрацией, промывали водой, растирали с изопропанолом и сушили в вакууме, получая региоизомерную смесь продуктов (6,34 г). Полученную смесь очищали с помощью SFC [препаративная колонка IV, с использованием 40% этанола (5 мМ аммиака)] с получением целевого региоизомера, 8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолино-1H-хиноксалин-2-она (3,48 г), а также нежелательного региоизомера -5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-1H-хиноксалин-2-она (2,35 г).

Данные для 8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолино-1H-хиноксалин-2-она:

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,80 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 7,55-7,47 (м, 2H), 7,06 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,96-6,89 (м, 2H), 6,76 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,23 (с, 2H), 3,76 (м, 7H), 3,12 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 367,15, найдено 368,09 (M+1).

Данные для 5-[(4-метоксифенил)метокси]-7-морфолино-1H-хиноксалин-2-она:

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 12,08 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 7,46-7,37 (м, 2H), 7,02-6,92 (м, 2H), 6,63 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,19 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,14 (с, 2H), 3,77 (м, 7H), 3,24 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 367,15, найдено 368,09 (M+1).

Стадия 2. 1-Этил-8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолинохиноксалин-2-он.

К раствору 8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолино-1H-хиноксалин-2-она (150 мг, 0,408 ммоль) в ацетоне (4,3 мл) добавляли карбонат калия (273 мг, 1,975 ммоль) и йодэтан (40 мкл, 0,500 ммоль). Полученную реакционную смесь герметизировали в колбе и перемешивали при 60°C в течение ночи. Смесь распределяли между этилацетатом и водой. Фазы разделяли и водную фазу экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (4 г силикагеля; линейный градиент 0-10% метанол/дихлорметан) с получением 1-этил-8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолинохиноксалин-2-она (55 мг, выход 32%).

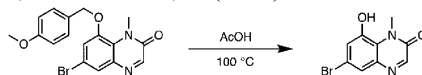
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,46 (д, J=8,7 Гц, 2H), 7,16 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,99-6,93 (м, 2H), 6,86 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,26 (с, 2H), 4,43 (кв, J=7,0 Гц, 2H), 3,78 (м, 4H), 3,76 (с, 3H), 3,23 (м, 4H), 1,40 (т, J=7,1 Гц, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 395,18, найдено 396,23 (M+1).

Стадия 3. 1-Этил-8-гидрокси-6-морфолинохиноксалин-2-он.

К раствору 1-этил-8-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолинохиноксалин-2-она (50 мг, 0,1264 ммоль) в дихлорметане (приблизительно 1,0 мл) добавляли трифторуксусную кислоту. Полученный красный реакционный раствор концентрировали и использовали без дальнейшей обработки.

ESI-MS m/z вычислено 275,13, найдено 276,14 (M+1).

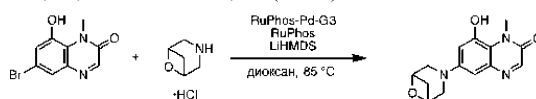


6-Бром-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2(1H)-он.

Раствор 6-бром-8-[(4-метоксифенил)метокси]-1-метилхиноксалин-2-она (4 г, 10,66 ммоль) в уксусной кислоте (56 мл) нагревали до 100°C в течение 5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и оставляют стоять в течение ночи, получая желтый осадок. Твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией, промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме, получая 6-бром-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-он (1,92 г, выход 69%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,21 (с, 1H), 7,44 (д, J=2,3 Гц, 1H), 7,19 (д, J=2,3 Гц, 1H), 3,86 (с, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 253,97, найдено 254,97 (M+1).

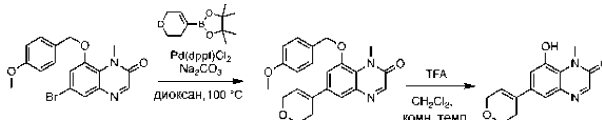


8-Гидрокси-1-метил-6-(6-окса-3-азабцикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-2-он.

6-бром-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-он (312 мг, 1,223 ммоль), 6-окса-3-азабцикло[3.1.1]гептан (гидрохлорид; 201 мг, 1,482 ммоль), RuPhos-G3-палладацикл (52 мг, 0,062 ммоль) и RuPhos (29 мг, 0,062 ммоль) объединяли в герметично закрытом сосуде в атмосфере азота. Добавляли

бис-(триметилсилил)амид лития (3 мл 1,0 М раствор в тетрагидрофуране, 3,000 ммоль) и сосуд нагревали до 65°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом и фильтровали. Фильтрат концентрировали и сырой остаток очищали хроматографией на аминофункционализованном силикагеле (картридж 12 г, линейный градиент 0-10% метанол/дихлорметан), с получением 8-гидрокси-1-метил-6-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-2-она (214 мг, выход 64%).

ESI-MS m/z вычислено 273,11, найдено 274,24 (M+1).



Синтез 6-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-она.

Стадия 1. 6-(3,6-Дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-[(4-метоксибензил)окси]-1-метилхиноксалин-2(1Н)-он.

Смесь 6-бром-8-[(4-метоксифенил)метокси]-1-метилхиноксалин-2-она (4,0 г, 10,66 ммоль), 2-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (2,72 г, 12,95 ммоль), карбоната натрия (8 мл 2,0 М водный раствор, 16,00 ммоль) и диоксана (40 мл) дегазировали барботированием газообразного азота через смесь в течение 10 мин. Добавляли [1,1'-бис-(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (комплекс с дихлорметаном; 881 мг, 1,079 ммоль). Полученную реакционную смесь дегазировали в течение дополнительных 5 мин, затем нагревали до 85°C в течение 4 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между водой и этилацетатом. Слои разделяли, и водный слой дополнительно экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (30 г силикагеля, линейный градиент 0-50% этилацетат/гептан), получая 6-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-[(4-метоксифенил)метокси]-1-метилхиноксалин-2-он (2,81 г, выход 69%) в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,21 (с, 1H), 7,52-7,42 (м, 4H), 7,02-6,94 (м, 2H), 6,48-6,42 (м, 1H), 5,22 (с, 2H), 4,27 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 3,85 (т, J=5,5 Гц, 2H), 3,78 (с, 3H), 3,77 (с, 3H).

ESI-MS m/z вычислено 378,16, найдено 379,17 (M+1).

Стадия 2. 6-(3,6-Дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-он.

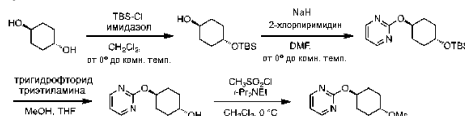
К раствору 6-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-[(4-метоксифенил)метокси]-1-метилхиноксалин-2-она (1,81 г, 4,783 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (5,0 мл, 64,90 ммоль). Полученный реакционный раствор перемешивали в течение 2 ч и концентрировали. Сырой остаток распределяли между этилацетатом и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические экстракты промывали соевым раствором, сушили (MgSO₄), фильтровали и концентрировали. Добавляли дихлорметан, получая коричневый осадок, который собирали вакуумной фильтрацией, с получением 6-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-она (1,10 г, выход 82%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10,40 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,32 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,20 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,26 (дф, J=3,1, 1,5 Гц, 1H), 5,76 (с, 1H), 4,24 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,83 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,48-2,40 (м, 2H).

ESI-MS m/z вычислено 258,10, найдено 259,16 (M+1).

Раздел II. Получение промежуточных мезилатных соединений.

В разделе II описаны способы синтеза для получения промежуточных мезилатных соединений. Эти промежуточные соединения вместе с соответствующим выбором 8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2(1Н)-она (описан в разделе I) приводят к получению соединений, представленных в табл. А с использованием методов, описанных в разделе III.



(1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-илокси)циклогексилметансульфонат.

Стадия 1. (1,4-транс)-4-((трет-Бутилдиметилсилил)окси)циклогексан-1-ол.

К раствору (1,4-транс)циклогексан-1,4-диола (70 г, 602,6 ммоль) и имидазола (130 г, 1,910 ммоль) в дихлорметане (1,5 л) добавляли трет-бутилхлордиметилсилан (100 г, 663,5 ммоль) одной порцией. Полученную реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 24 ч, при этом ТСХ-анализ выявил смесь исходного материала, целевого продукта и продукта бисприсоединения. Реакционную смесь выливали в воду (300 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (100 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой (100 мл) и насыщенным раствором соли (100 мл), сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (800 г, колонка с силикагелем, линейный градиент 0-50% этилацетат в гептане) с получением (1,4-транс)-4-[(трет-

бутил(диметил)силил]оксоциклогексанола (58 г, 41%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 4,44 (д, $J=4,1$ Гц, 1H), 3,69-3,50 (м, 1H), 3,48-3,35 (м, 1H), 1,84-1,60 (м, 4H), 1,37-1,09 (м, 4H), 0,84 (с, 9H), 0,02 (с, 6H).

Стадия 2. 2-((1,4-транс)-4-((трет-Бутилдиметилсилил)окси)циклогексил)окси)пиримидин.

К раствору (1,4-транс)-4-[трет-бутил(диметил)силил]оксоциклогексанола (13,7 г, 58,86 ммоль) и 2-хлорпиримидина (9 г, 74,65 ммоль) в N,N -диметилформамиде (100 мл) добавляли гидрид натрия (5 г 60% мас./мас, суспензия в минеральном масле, 125,0 ммоль) одной порцией. Полученную реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение 30 мин и продолжали перемешивание еще в течение 10 ч. Реакционную смесь выливали в ледяную воду (400 мл), получая в результате осадок рыже-вато-коричневого твердого вещества. Твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией, промывали водой (3 \times 100 мл) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 16 ч с получением (1,4-транс)-трет-бутилдиметил-(4-пиримидин-2-илоксициклогексокси)силана (18,8 г, чистота 95%, выход 98%), который использовали далее без дополнительной очистки.

^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 8,57 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 7,08 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,04-4,80 (м, 1H), 3,90-3,68 (м, 1H), 2,11-1,95 (м, 2H), 1,93-1,76 (м, 2H), 1,64-1,47 (м, 2H), 1,46-1,30 (м, 2H), 0,87 (с, 9H), 0,05 (с, 6H).

Стадия 3. (1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-илокси)циклогексан-1-ол.

К раствору (1,4-транс)-трет-бутилдиметил-(4-пиримидин-2-илокси)силана (26 г, 83,44 ммоль) в смеси тетрагидрофурана (150 мл) и метанола (6 мл) добавляли тригидрофторид триэтиламина (40 г, 248,1 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до 0°C на ледяной бане и добавляли водный гидроксид аммония (30 г, 30% мас./мас, 256,8 ммоль), затем воду (100 мл) и этилацетат (200 мл). Органический слой отделяли и водный слой дополнительно экстрагировали этилацетатом (100 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой (100 мл) и насыщенным раствором соли (100 мл), сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением (1,4-транс)-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола (16,2 г, 99%) в виде бледно-желтого вязкого масла.

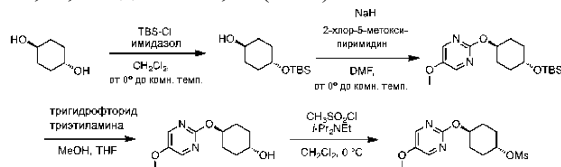
^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,48 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 6,89 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,09-4,87 (м, 1H), 3,91-3,62 (м, 1H), 2,29-2,10 (м, 2H), 2,10-1,95 (м, 2H), 1,68-1,36 (м, 4H).

Стадия 4. (1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-илокси)циклогексилметансульфонат.

К раствору (1,4-транс)-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола (16,2 г, 82,6 ммоль) и диизопропилэтиламина (40 мл, 229,6 ммоль) в дихлорметане добавляли по каплям в течение 25 мин раствор метансульфонилхлорида (8 мл, 103,4 ммоль) в дихлорметане (50 мл). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. Реакционную смесь гасили добавлением насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (100 мл). Органический слой отделяли и водный слой дополнительно экстрагировали дихлорметаном (100 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом натрия, промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (330 г, Isco gold колонка, линейный градиент 0-50% этилацетат/дихлорметан) с получением (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексилметансульфоната (19,4 г, выход 85%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,49 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 6,91 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,25-5,02 (м, 1H), 4,98-4,77 (м, 1H), 3,03 (с, 3H), 2,33-2,04 (м, 4H), 1,95-1,72 (м, 4H).

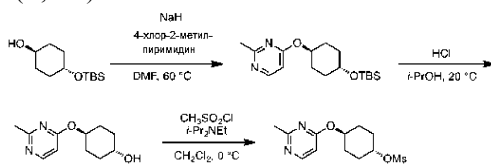
SI-MS m/z вычислено 272,32, найдено 273,07 ($M+1$).



(1,4-транс)-4-((5-Метоксипиримидин-2-ил)окси)циклогексилметансульфонат.

Получен по указанной выше 4-стадийной схеме синтеза для (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексилметансульфоната.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,17 (с, 2H), 5,13-4,95 (м, 1H), 4,94-4,73 (м, 1H), 3,85 (с, 3H), 3,02 (с, 3H), 2,37-1,99 (м, 4H), 1,94-1,68 (м, 4H).



(1,4-транс)-4-((2-Метилпиримидин-4-ил)окси)циклогексилметансульфонат.

Стадия 1. 4-((1,4-транс)-4-((трет-Бутилдиметилсилил)окси)циклогексил)окси)-2-метилпиримидин.

К раствору (1,4-транс)циклогексан-1,4-диола (2 г, 17,05 ммоль) и 4-хлор-2-метилпиримидина (1,5 г, 11,67 ммоль) в N,N-диметилформамиде (10 мл) добавляли гидрид натрия (950 мг, 60% мас./мас., суспензия в минеральном масле, 23,75 ммоль) одной порцией. Охлаждающую баню удаляли и реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в ледяную воду (60 мл), получая рыжевато-коричневый осадок. Твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией, промывали водой (2×10 мл) и сушили в вакуумной печи при 60°C в течение 14 ч с получением нежелательного бис-аддукта, 2-метил-4-[4-(2-метилпиримидин-4-ил)оксоциклогексокси]пиримидина (1,1 г, 31%). Фильтрат из вакуумной фильтрации экстрагировали 2-метилтетрагидрофураном (4×60 мл), объединенные фильтраты сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением желтого масла, которое очищали хроматографией на силикагеле (линейный градиент 0-100% этилацетат/гептан), получая целевой продукт, (1,4-транс)-4-(2-метилпиримидин-4-ил)оксогексанол (1,23 г, чистота 95%, выход 48%) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD) δ 8,39-8,18 (м, 1H), 6,76-6,38 (м, 1H), 5,24-5,02 (м, 1H), 3,81-3,62 (м, 1H), 3,54 (с, 1H), 2,66-2,39 (м, 3H), 2,26-1,80 (м, 4H), 1,69-1,15 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 208,26, найдено 209,13 (M+1).

Стадия 2.

Раствор трет-бутилдиметил-[4-(2-метилпиримидин-4-ил)оксициклогексокси]силана (17,82 г, 54,70 ммоль) в изопропиловом спирте (225 мл) обрабатывали концентрированной соляной кислотой (16 мл 12 м раствора, 192,0 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток подвергали азеотропной перегонке с этилацетатом (2×200 мл) с получением рыжевато-коричневого твердого вещества. Неочищенный остаток далее очищали растиранием с метил-трет-бутиловым эфиром (100 мл) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 14 ч с получением (1,4-транс)-4-(2-метилпиримидин-4-ил)оксоциклогексанола (11,57 г, 98%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества, которое использовали далее без дополнительной очистки.

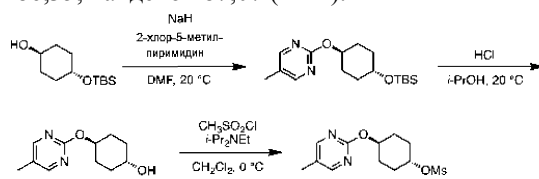
¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 8,62 (д, J=6,6 Гц, 1H), 7,07 (д, J=6,6 Гц, 1H), 5,30-4,95 (м, 1H), 3,64-3,42 (м, 1H), 2,66 (с, 3H), 2,17-1,95 (м, 2H), 1,95-1,75 (м, 2H), 1,65-1,43 (м, 2H), 1,43-1,22 (м, 2H).

Стадия 3. (1,4-транс)-4-((2-Метилпиримидин-4-ил)окси)циклогексилметансульфонат.

Получение мезилата осуществляли в соответствии с методикой, описанной выше для получения (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексилметансульфоната. Использовали (1,4-транс)-4-(2-метилпиримидин-4-ил)оксоциклогексанол в качестве исходного вещества для получения (1,4-транс)-4-((2-метилпиримидин-4-ил)окси)циклогексилметансульфоната (выход 85%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,31 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,47 (д, J=5,8 Гц, 1H), 5,35-5,13 (м, 1H), 5,00-4,75 (м, 1H), 3,04 (с, 3H), 2,59 (с, 3H), 2,28-2,03 (м, 4H), 1,96-1,64 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 286,35, найдено 287,07 (M+1).

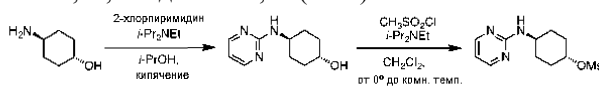


(1,4-транс)-4-((5-Метилпиримидин-2-ил)окси)циклогексилметансульфонат.

Получение осуществляли по схеме синтеза, описанной выше, с использованием условий реакции, описанных ранее в этом разделе.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 8,31 (с, 2H), 5,17-4,99 (м, 1H), 4,97-4,74 (м, 1H), 3,02 (с, 3H), 2,22 (с, 3H), 2,20-2,01 (м, 4H), 1,94-1,71 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 286,35, найдено 287,16 (M+1).



(1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-иламино)циклогексилметансульфонат.

Стадия 1. (1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-иламино)циклогексан-1-ол.

2-хлорпиримидин (70,30 г, 613,8 ммоль) и транс-1,4-аминоциклогексанол (71,77 г, 604,5 ммоль) растворяли в изопропанол (400 мл). Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (120 мл, 689 ммоль) и полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение ночи. Растворитель выпаривали при пониженном давлении, оставшееся твердое вещество суспендировали в дихлорметане и фильтровали через слой силикагеля. Колонку с диоксидом кремния элюировали сначала дихлорметаном, чтобы элюировать остаточный исходный продукт, затем использовали этилацетат, чтобы элюировать целевой продукт.

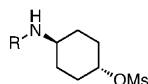
Фильтрат из элюата этилацетата выпаривали при пониженном давлении, получая (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексан-1-ол в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,25 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 6,50 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,16 (д, $J=7,4$ Гц, 1H), 3,95-3,54 (м, 2H), 2,25-1,91 (м, 5H), 1,60-1,13 (м, 4H).

Стадия 2. (1,4-транс)-4-(Пиримидин-2-иламино)циклогексилметансульфонат.

К суспензии (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексан-1-ола (52 г, 55,53 ммоль) в дихлорметане (727 мл) при 0°C добавляли диизопропилэтиламин (90 мл, 516,7 ммоль). Добавляли метансульфонилхлорид (35 мл, 452,2 ммоль) с помощью шприца со скоростью, которая позволяла внутренней температуре оставаться равной 20°C или ниже 20°C . Реакционную смесь перемешивали в течение еще 1 ч, разбавляли дихлорметаном и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой сушили (MgSO_4) и фильтровали через тонкий слой силикагеля. Слой силикагеля элюировали 20% этилацетатом/дихлорметаном и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением рыжевато-коричневого твердого вещества. Твердое вещество растворяли в минимальном количестве дихлорметана. Добавляли пентан до тех пор, пока продукт не начинал кристаллизоваться. Смесь охлаждали в бане с сухим льдом и ацетоном, твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией, промывали пентаном и сушили в вакууме с получением (1,4-транс)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексилметансульфоната (59,72 г, выход 82%) в виде светло-коричневого твердого вещества.

^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,27 (д, $J=2\text{H}$), 6,54 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,13 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 4,69 (тт, $J=10,5, 4,0$ Гц, 1H), 3,98-3,73 (м, 1H), 3,03 (с, 3H), 2,21 (дд, $J=9,3, 4,2$ Гц, 4H), 1,91-1,67 (м, 2H), 1,51-1,25 (м, 2H).

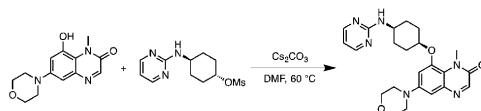


Пути синтеза для получения дополнительных мезилатов указанного выше типа, где R представляет собой замещенное или незамещенное ароматическое кольцо, замещенное или незамещенное гетероароматическое кольцо или карбамат, описаны ранее (см. патент США US 20140275059 A1), и поэтому они здесь не описываются.

Раздел III. Соединения, полученные с использованием замещения мезилата на конечной стадии.

Соединения, описанные в разделе III, получали соответствующим выбором 8-гидроксихиноксалинона (описанного в разделе I) и промежуточного мезилата (описанного в разделе II) с использованием способов, показанных ниже. Аналитические данные для соединений, полученных способами, описанными в секции III, представлены в табл. A.

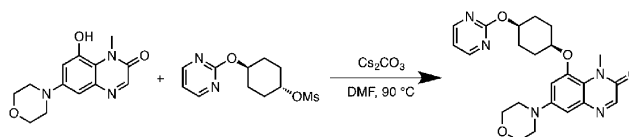
Способ А-А.



1-Метил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

К раствору 8-гидрокси-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2-она (7,65 г, 15,63 ммоль) в N,N -диметилформамиде (100 мл) добавляли транс-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексилметансульфонат (30,34 г, 111,8 ммоль) и карбонат цезия (35,64 г, 109,4 ммоль). Смесь нагревали при 60°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит. Слой целита промывали N,N -диметилформамидом и фильтрат упаривали в вакууме с получением темно-окрашенного масла, которое отверждали под высоким вакуумом. Твердое вещество растворяли в дихлорметане, фильтровали через слой силикагеля и элюировали смесью 5% метанола и этилацетата. Фильтрат выпаривали с получением коричневатого-желтого твердого вещества. Твердое вещество растворяли в дихлорметане и очищали хроматографией на силикагеле (330 г, картридж с силикагелем; изократический раствор 3% метанол/этилацетат) с получением ярко-желтого твердого вещества. Твердое вещество промывали небольшим количеством этилацетата, который предварительно охлаждали на бане с сухим льдом и ацетоном, с последующим добавлением гептана. Наконец, материал сушили в высоком вакууме при 60°C с получением 1-метил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-она.

Способ А-В.



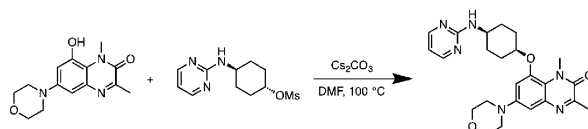
1-Метил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

К раствору 8-гидрокси-1-метил-6-морфолинохиноксалин-2-она (34,5 мг, 0,132 ммоль) в N,N -

диметилформамиде (690 мкл) добавляли транс-(4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфонат (68,0 мг, 0,247 ммоль) и карбонат цезия (215 мг, 0,660 ммоль). Смесь нагревали при 90°C в течение 5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между дихлорметаном и водой. Органическую фазу собирали и выпаривали. Неочищенный остаток растворяли в минимальном количестве DMSO и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке С 18 (ацетонитрил/вода с трифторуксусным модификатором). Соответствующие фракции объединяли и концентрировали досуха. Полученный таким образом материал растворяли в дихлорметане и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органическую фазу собирали, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали с получением 1-метил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-она (16,1 мг, выход 25%).

Примечание: вещества, полученные данным способом, также очищали хроматографией на силикагеле (метанол/дихлорметан).

Способ А-С.

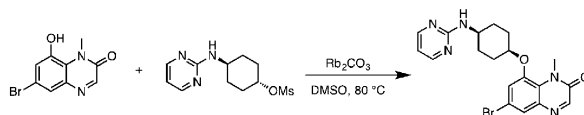


1,3-Диметил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиназолин-2(1H)-он.

К смеси 8-гидрокси-1,3-диметил-6-морфолинохиноксалин-2-она (48,7 мг, 0,177 ммоль) и карбоната цезия (572 мг, 1,756 ммоль) в N,N-диметилформамиде (1,1 мл) добавляли (транс)-[4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил]метансульфонат (147 мг, 0,542 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 100°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между метил-трет-бутиловым эфиром и водой. Фазы разделяли, и водную фазу дополнительно экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром. Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (4 г силикагеля, с использованием линейного градиента 0-10% метанол/дихлорметан; затем осуществляли вторую очистку на силикагеле с использованием линейного градиента 0-100% этилацетат/гептан) с получением 1,3-диметил-6-морфолино-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он (17,3 мг, выход 21%).

Примечание: вещества, полученные данным способом, также очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой (ацетонитрил/вода, с использованием либо трифторуксусной кислоты, либо гидроксиамина в качестве модификатора) или с помощью обращенно-фазовой С18-дериватизованной хроматографией на силикагеле (ацетонитрил/вода с использованием трифторуксусной кислоты в качестве модификатора).

Способ А-D.



6-Бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)-циклогексанокси)хиноксалин-2-он.

К раствору 6-бром-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-она (954 мг, 3,740 ммоль) и [4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил]метансульфоната (3,1 г, 11,42 ммоль) в диметилсульфоксиде (7,0 мл) добавляли карбонат рубидия (2,49 г, 10,78 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между дихлорметаном и водой. Фазы разделяли, и водную фазу экстрагировали дихлорметаном. Органические слои концентрировали и сушили в течение ночи под вакуумом. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (80 г силикагеля, линейный градиент 0-5% метанол/дихлорметан) с получением 6-бром-1-метил-8-[[4-(пиримидин-2-иламино)циклогексанокси]хиноксалин-2-она (700 мг, выход 42%).

Таблица А

Соединения, полученные с использованием замещения мезилата на конечной стадии

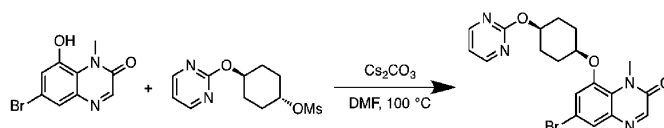
Соед. №	Структура соединения	Способ	DNA-PK Кт	рДНК-PK IC ₅₀ (A459)	ES-MS (M+H)	¹ H ЯМР
1		A-A	0,003	0,055	437,39	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,25 (д, J=4,7 Гц, 2H), 8,17 (с, 1H), 7,26 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,53 (т, J=4,7 Гц, 1H), 5,77 (с, 1H), 4,83 (с, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,89 (с, 1H), 3,80-3,70 (м, 4H), 3,19-3,10 (м, 4H), 2,03 (дд, J=12,2, 6,3 Гц, 2H), 1,81-1,55 (м, 6H), 1,18 (т, J=7,1 Гц, 1H)
2		A-B	0,002	0,075	438,29	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,60 (д, J=4,8 Гц, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,11 (т, J=4,8 Гц, 1H), 7,02 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,84 (д, J=2,6 Гц, 1H), 5,15 (м, 1H), 4,76 (м, 1H), 3,88 (с, 3H), 3,80-3,72 (м, 4H), 3,20-3,12 (м, 4H), 1,98-1,83 (м, 8H)
3		A-B	0,005	0,074	452,35	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,37 (д, J=5,8 Гц, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,01 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,84 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,74 (дд, J=5,9, 0,7 Гц, 1H), 5,26 (м, 1H), 4,74 (м, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,76 (м, 4H), 3,20-3,11 (м, 4H), 2,50 (с, 3H), 1,89 (м, 8H)
4		A-B	0,003	0,068	468,22	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,36 (с, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,01 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,04 (м, 1H), 4,75 (м, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 3,77 (м, 4H), 3,16 (м, 4H), 1,91 (м, 8H)
5		A-B	<0,001	0,028	467,28	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,16 (с, 1H), 8,10 (с, 2H), 6,96 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,87 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,82 (м, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,76 (м, 4H), 3,73 (с, 3H), 3,17-3,11 (м, 4H), 2,02 (м, 2H), 1,68 (м, 6H)
6		A-B	0,003	0,075	452,28	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,43 (д, J=0,5 Гц, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,01 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,10 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,03 (дд, J=14,2, 7,1 Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,83-3,68 (м, 4H), 3,25-3,08 (м, 4H), 1,18 (с, 1H)
7		A-C	0,008	0,330	451,3	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,25 (д, J=4,7 Гц, 2H), 7,26 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,76 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,52 (т, J=4,7 Гц, 1H), 4,81 (м, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,87 (м, 1H), 3,76 (м, 4H), 3,14 (м, 4H), 2,40 (с, 3H), 2,01 (м, 2H), 1,68 (м, 6H)
8		A-C	0,015	>1	451,29	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,26 (д, J=4,8 Гц, 2H), 7,17-7,10 (м, 2H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,54 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,87 (м, 1H), 4,48 (кв, J=7,0 Гц, 2H), 3,79 (м, 5H), 3,23 (м, 4H), 2,03 (м, 2H), 1,73 (м, 6H), 1,41 (т, J=7,0 Гц, 3H)
9		A-D	>4	>1	430,19	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,29-8,22 (м, 3H), 7,56 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,44 (д, J=2,2 Гц, 1H), 7,21 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,52 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,83 (м, 1H), 3,94 (с, 3H), 3,89 (м, 1H), 2,02 (м, 2H), 1,81-1,55 (м, 6H)

13		A-C	0,015	0,550	459,27	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,16 (с, 1H), 6,95 (m 2H), 6,81 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,40 (m, 1H), 3,14 (m, 4H), 1,95 (m, 2H), 1,72-1,47 (m, 6H), 1,38 (с, 9H)
14		A-A	<0,001	0,097	450,29	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,13 (д, J=14,1 Гц, 2H), 8,11 (с, 1H), 6,96 (д, J=7,0 Гц, 2H), 6,81 (д, J=2,2 Гц, 1H), 4,81 (br s, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,85 (br s, 1H), 3,80-3,68 (m, 4H), 3,23-3,06 (m, 4H), 1,69 (d, J=20,2, 10,1 Гц, 6H)
15		A-B	<0,001	0,061	451,39	¹ H ЯМР (300 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,17 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 7,27 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,98 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,28 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,16 (m, 4H), 2,31 (с, 3H), 1,99 (m, 2H), 1,66 (m, 6H)
16		A-B	<0,001	0,036	483,46	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,18 (с, 1H), 8,17 (д, J=2,3 Гц, 1H), 7,49 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,88 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,96 (с, 3H), 3,80-3,72 (m, 4H), 3,16 (m, 4H), 2,60 (кв, д, J=7,5, 2,3 Гц, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,71 (m, 6H), 1,16 (т, J=7,6 Гц, 3H)
19		A-B	0,004	0,175	493,41	
20		A-B	0,003		494,40	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,84 (д, J=5,3 Гц, 1H), 8,81 (д, J=4,9 Гц, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,58 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,02 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,6 Гц, 1H), 5,33 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,88 (с, 3H), 3,81-3,72 (m, 4H), 3,21-3,12 (m, 4H), 2,82 (д, J=4,8 Гц, 3H), 2,02-1,84 (m, 8H)
21		A-B	0,006	0,760	417,33	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,16 (с, 1H), 7,24 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,77 (m, 1H), 3,89 (с, 3H), 3,79-3,72 (m, 4H), 3,52 (с, 3H), 3,47 (m, 1H), 3,18-3,11 (m, 4H), 2,02-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 6H)
22		A-B	0,008	0,160	431,33	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,16 (с, 1H), 7,20 (д, J=7,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,77 (m, 1H), 3,97 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,75 (m, 4H), 3,46 (m, 1H), 3,18-3,11 (m, 4H), 1,97 (m, 2H), 1,74-1,44 (m, 6H), 1,16 (т, J=7,1 Гц, 3H)
23		A-C	0,003	0,097	480,31	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8,35 (с, 2H), 8,15 (с, 1H), 6,76 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,69 (д, J=2,7 Гц, 1H), 5,10-4,99 (m, 1H), 4,87-4,67 (m, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,84 (с, 3H), 3,63 (д, J=11,4 Гц, 2H), 3,45 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,30 (с, 20H), 2,11-1,82 (m, 8H)

24		A-C	0,003	0,074	464,33	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,43 (д, J=0,9 Гц, 2H), 8,15 (с, 1H), 6,76 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,68 (д, J=2,7 Гц, 1H), 5,17-5,04 (м, 1H), 4,84-4,68 (м, 3H), 3,63 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,45 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,23-3,09 (м, 1H), 2,18 (с, 3H), 2,08-1,82 (м, 8H)
25		A-C	0,005	0,160	464,37	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,38 (д, J=5,8 Гц, 1H), 8,15 (с, 1H), 6,80-6,73 (м, 2H), 6,69 (д, J=2,6 Гц, 1H), 5,33-5,18 (м, 1H), 4,81-4,68 (м, 3H), 3,87 (с, 3H), 3,63 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,45 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,19-3,07 (м, 1H), 2,01-1,85 (м, 8H)
28		A-B	0,002	0,028	493,32	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,17 (с, 1H), 6,94 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,85-6,78 (м, 2H), 4,84 (м, 1H), 4,52 (т, J=9,1 Гц, 2H), 4,10-4,01 (м, 1H), 3,95 (с, 3H), 3,81-3,71 (м, 4H), 3,15 (м, 4H), 3,06 (т, J=9,0 Гц, 2H), 2,30 (с, 3H), 2,05 (м, 2H), 1,71 (м, 6H)
30		A-C	0,004	0,187	449,34	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,33 (д, J=5,8 Гц, 1H), 8,29 (с, 1H), 7,47 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,17 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,54 (д, J=5,9, 0,6 Гц, 1H), 6,22-6,17 (м, 1H), 5,39-5,32 (м, 1H), 4,61-4,50 (м, 1H), 4,36 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,04 (с, 3H), 3,97 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,62-2,52 (м, 4H), 2,18-1,82 (м, 4H)
31		A-C	0,005	0,114	449,33	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,36 (с, 2H), 8,30 (с, 1H), 7,48 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,18 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,26-6,16 (м, 1H), 5,28-5,12 (м, 1H), 4,63-4,49 (м, 1H), 4,39 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,04 (с, 3H), 3,99 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,64-2,54 (м, 1H), 2,26 (с, 3H), 2,25-2,08 (м, 3H), 2,08-1,85 (м, 3H)
32		A-C	0,005	0,52	465,36	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,30 (с, 1H), 8,23 (с, 2H), 7,48 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,18 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,24-6,17 (м, 1H), 5,18-5,10 (м, 1H), 4,60-4,51 (м, 1H), 4,38 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,04 (с, 3H), 3,99 (т, J=5,5 Гц, 2H), 3,89 (с, 3H), 2,63-2,55 (м, 1H), 2,25-2,09 (м, 3H), 2,06-1,85 (м, 2H)
33		A-C	<0,001	0,054	448,39	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,31 (с, 1H), 8,14 (д, J=5,9 Гц, 1H), 7,49 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,16 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,24-6,17 (м, 2H), 5,01-4,83 (м, 1H), 4,73-4,64 (м, 1H), 4,38 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,05 (с, 3H), 3,99 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,63-2,55 (м, 1H), 2,52 (с, 3H), 2,22-2,09 (м, 1H), 2,07-1,87 (м, 3H), 1,84-1,67 (м, 1H)
34		A-C	<0,001	0,028	448,39	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,31 (с, 1H), 8,16 (д, J=0,8 Гц, 2H), 7,47 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,16 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,25-6,18 (м, 1H), 5,01 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,71-4,61 (м, 1H), 4,38 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 3,99 (т, J=5,4 Гц, 3H), 2,63-2,54 (м, 2H), 2,20-2,07 (м, 4H), 2,07-1,87 (м, 3H), 1,84-1,66 (м, 2H)
35		A-C	<0,001	0,031	464,29	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,31 (с, 1H), 8,09 (с, 2H), 7,47 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,16 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,25-6,17 (м, 1H), 4,94 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,38 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,06 (с, 3H), 4,03-3,89 (м, 3H), 3,83 (с, 3H), 2,63-2,54 (м, 1H), 2,20-2,07 (м, 1H), 2,07-1,83 (м, 3H), 1,81-1,69 (м, 1H)
36		A-C	<0,001	0,073	480,31	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,34 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,49 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,17 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,26-6,18 (м, 1H), 5,00-4,87 (м, 1H), 4,38 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 3,99 (т, J=5,4 Гц, 2H), 2,74 (кв, д, J=7,6, 2,3 Гц, 2H), 2,65-2,54 (м, 2H), 2,27-2,15 (м, 2H), 2,13-2,01 (м, 2H), 2,01-1,87 (м, 2H), 1,81-1,65 (м, 2H), 1,29 (т, J=7,6 Гц, 3H)

Раздел IV. Получение промежуточных бромхиноксалиновых промежуточных соединений.

Раздел IV описывает способы синтеза для получения функционализированных промежуточных соединений 6-бром-1-метилхиноксалин-2(1H)-она, которые не описаны в другом месте этого документа. Эти промежуточные продукты используют вместе с соответствующим выбором соединения амина или сложного эфира бороновой кислоты для получения соединений, представленных в табл. В.

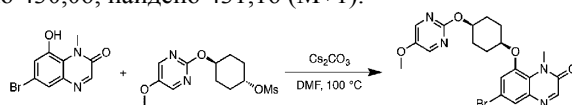


6-Бром-1-метил-8-(4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-он.

Смесь 6-бром-8-гидрокси-1-метилхиноксалин-2-она (299 мг, 1,172 ммоль), метансульфоната (4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (517 мг, 1,899 ммоль), карбоната цезия (501 мг, 1,538 ммоль) и *N,N*-диметилформамида (6,0 мл) нагревали при 100 °С в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии (100 г, C18-дериватизированного картридж Isco RediSep Rf с силикагелем; линейный градиент 25-60% ацетонитрил/вода с использованием трифторуксусной кислоты в качестве модификатора). Фракции, содержащие продукт, разделяли между этилацетатом и насыщенным раствором бикарбоната натрия. Фазы разделяли, и водную фазу экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором, сушили ($MgSO_4$), фильтровали и концентрировали, получая 6-бром-1-метил-8-(4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-он (320,6 мг, выход 63%).

1H ЯМР (300 МГц, $DMSO-d_6$) δ 8,60 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 8,25 (с, 1H), 7,58 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 7,51 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 7,12 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,22-5,09 (м, 2H), 4,85-4,72 (м, 2H), 3,88 (с, 3H), 2,03-1,85 (м, 8H).

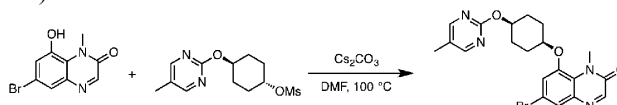
ESI-MS m/z вычислено 430,06, найдено 431,16 ($M+1$).



6-Бром-8-((1,4-цис)-4-((5-метоксипиримидин-2-ил)окси)циклогексил)окси)-1-метилхиноксалин-2(1H)-он.

Это соединение получали по методикам, аналогичным описанном выше для 6-бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-она.

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,30 (с, 1H), 8,22 (с, 2H), 7,63 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 7,19 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 5,20-5,10 (м, 1H), 4,58-4,47 (м, 1H), 4,01 (с, 3H), 3,89 (с, 3H), 2,26-1,85 (м, 8H). ESI-MS m/z вычислено 460,07, найдено 461,13 ($M+1$).

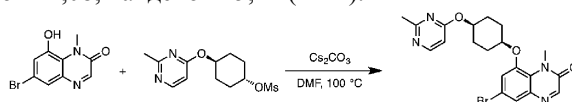


6-Бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-((5-метилпиримидин-2-ил)окси)циклогексил)окси хиноксалин-2(1H)-он.

Это соединение получали по методике, аналогичной описанной выше для 6-бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-она.

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,21 (д, $J=0,9$ Гц, 2H), 8,14 (с, 1H), 7,48 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 7,04 (д, $J=2,2$ Гц, 1H), 5,13-4,99 (м, 1H), 4,43-4,30 (м, 1H), 3,86 (с, 3H), 2,11 (с, 3H), 2,09-1,93 (м, 4H), 1,93-1,71 (м, 4H).

ESI-MS m/z вычислено 444,08, найдено 445,11 ($M+1$).



6-Бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-((2-метилпиримидин-4-ил)окси)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

Это соединение получали по методике, аналогичной описанной выше для 6-бром-1-метил-8-((1,4-цис)-4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-она.

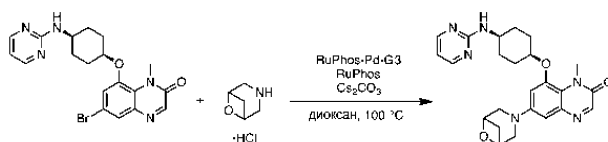
1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,36 (д, $J=5,8$ Гц, 1H), 8,31 (с, 1H), 7,65 (д, $J=2,1$ Гц, 1H), 7,29 (с, 8H), 6,57 (д, $J=5,8$ Гц, 1H), 5,43-5,35 (м, 1H), 4,61-4,51 (м, 1H), 4,03 (с, 3H), 2,62 (с, 3H), 2,18-1,86 (м, 8H).

ESI-MS m/z вычислено 444,08, найдено 445,11 ($M+1$).

Раздел V. Соединения, полученные с использованием реакции сочетания Бухвальда или реакции сочетания Сузуки на конечной стадии.

Соединения, описанные в этом разделе, получали путем соответствующего выбора функционализированного 6-бром-1-метилхиноксалин-2(1H)-она (описанного в разделе IV) и амина (в случае реакции сочетания Бухвальда) или сложного эфира бороновой кислоты (в случае реакции сочетания Сузуки), с использованием способов, описанных ниже. Аналитические данные для соединений, полученных способами, описанными в этом разделе, представлены в табл. В.

Способ В-А.

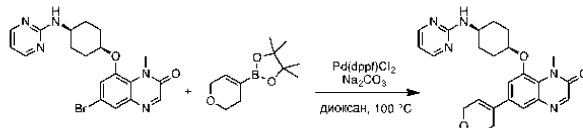


6-(6-Окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)-1-метил-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

Смесь 6-бром-1-метил-8-[4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил]окси)хиноксалин-2-она (74 мг, 0,167 ммоль), 6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептана (гидрохлорид; 61 мг, 0,450 ммоль), карбоната цезия (263 мг, 0,807 ммоль), RuPhos-G3-палладацикл (30 мг, 0,036 ммоль), RuPhos (17 мг, 0,036 ммоль) и диоксана (700 мкл) перемешивали при 100°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между этилацетатом и водой. Фазы разделяли, и водный слой дополнительно экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (12 г силикагеля, линейный градиент 0-5% метанол/дихлорметан) с получением 6-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)-1-метил-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-она (17,0 мг, выход 22%).

Примечание: соединения, полученные данным способом, также очищали с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке C18 (ацетонитрил/вода с использованием либо трифторуксусной кислоты, либо гидроксида аммония в качестве модификатора).

Способ В-В.

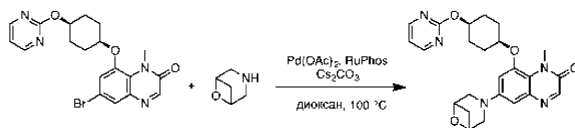


6-(3,6-Дигидро-2H-пиран-4-ил)-1-метил-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он.

К смеси 6-бром-1-метил-8-[4-(пиримидин-2-иламино)циклогексанокси]хиноксалин-2-она (62 мг, 0,140 ммоль), 2-(3,6-дигидро-2H-пиран-4-ил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (44 мг, 0,209 ммоль), карбоната натрия (207 мкл 2 М водного раствора, 0,414 ммоль) и диоксана (1,1 мл) добавляли [1,1'-бис-(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) (комплекс с дихлорметаном; 10 мг, 0,014 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ C-18 (ацетонитрил/вода с трифторуксусной кислотой в качестве модификатора), и соответствующие фракции объединяли и концентрировали досуха. Полученный таким образом материал растворяли в дихлорметане и промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органическую фазу собирали, сушили (Na₂SO₄), фильтровали, концентрировали и выпаривали, получая 6-(3,6-дигидро-2H-пиран-4-ил)-1-метил-8-((1,4-цис)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексил)окси)хиноксалин-2(1H)-он (30 мг, выход 47%).

Примечание: соединения, полученные данным способом, также очищали хроматографией на силикагеле (этилацетат/дихлорметан).

Способ В-С.



1-Метил-6-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)-8-((1,4-цис)-4-пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-2-он.

Суспензию 6-бром-1-метил-8-(4-пиримидин-2-илокси)хиноксалин-2-она (80 мг, 0,186 ммоль) и карбоната цезия (195 мг, 0,599 ммоль) в диоксане (1,0 мл) дегазировали барботированием газообразного азота через смесь в течение 5 мин. Добавляли RuPhos (9 мг, 0,019 ммоль) и ацетат палладия (II) (2 мг, 0,009 ммоль), а затем реакционную смесь дегазировали в течение еще 5 мин. Наконец, добавляли 6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан (31 мг, 0,313 ммоль), сосуд закрывали и нагревали при 100°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали и концентрировали. Сырой остаток очищали хроматографией на силикагеле (12 г силикагеля с использованием изократического этилацетата) с получением 1-метил-6-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)-8-((1,4-цис)-4-пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-2-она (36,5 мг, выход 43%).

Таблица В

Соединения, полученные с использованием реакции сочетания Бухвальда на конечной стадии

Соед. №	Структура соединения	Способ	DNA-PK К1	рДНК-PK IC ₅₀ (A459)	ES-MS (M-H)	1H ЯМР
10		B-A	<0,001	0,510	449,39	1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,25 (д, J=4,7 Гц, 2H), 8,16 (с, 1H), 7,22 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,72 (м, 1H), 6,66 (м, 1H), 6,52 (т, J=4,7 Гц, 1H), 4,83 (м, 1H), 4,73 (д, J=6,3 Гц, 2H), 3,94 (с, 3H), 3,88 (м, 1H), 3,62 (м, 2H), 3,45 (м, 2H), 3,13 (м, 1H), 2,08 (м, 2H), 1,94 (м, 1H), 1,69 (м, 6H)
11		B-B	<0,001		434,29	1H ЯМР (300 МГц, CDCl ₃) δ 8,31-8,27 (м, 3H), 7,45 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,14 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,55 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,20 (м, 1H), 5,19 (м, 1H), 4,65 (м, 1H), 4,36 (м, 2H), 4,04 (с, 3H), 3,97 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,18-2,05 (м, 2H), 2,05-1,86 (м, 4H), 1,77 (м, 2H)
12		B-A	<0,001	0,250	463,37	1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,25 (д, J=4,7 Гц, 2H), 8,15 (с, 1H), 7,25 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,71 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,53 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,82 (м, 1H), 4,44 (м, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,88 (м, 1H), 3,47 (м, 2H), 2,82 (м, 2H), 2,08-2,00 (м, 2H), 1,85 (м, 4H), 1,78-1,60 (м, 6H)
26		B-C	0,002	0,120	450,37	1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,60 (д, J=4,8 Гц, 2H), 8,15 (с, 1H), 7,11 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,77 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,69 (д, J=2,7 Гц, 1H), 5,20-5,11 (м, 1H), 4,84-4,70 (м, 2H), 3,88 (с, 3H), 3,65 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,46 (д, J=11,3 Гц, 2H), 3,21-3,07 (м, 1H), 2,23-1,67 (м, 8H)
27		B-B	<0,001	0,085	435,38	1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,60 (д, J=4,8 Гц, 2H), 8,21 (с, 1H), 7,44-7,37 (м, 2H), 7,11 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,47-6,40 (м, 1H), 5,20-5,10 (м, 1H), 4,86-4,76 (м, 1H), 4,26 (кв, J=2,8 Гц, 2H), 3,85 (т, J=5,5 Гц, 2H), 2,08-1,82 (м, 9H)
29		B-C	0,002	0,056	464,29	1H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,54 (д, J=4,8 Гц, 2H), 8,26 (с, 1H), 6,96 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,68 (д, J=2,8 Гц, 1H), 5,31-5,20 (м, 1H), 4,61-4,52 (м, 2H), 4,52-4,40 (м, 1H), 4,00 (с, 3H), 3,34 (д, J=11,4 Гц, 1H), 3,08 (д, J=11,3, 2,6 Гц, 2H), 2,27-2,11 (м, 4H), 2,11-1,85 (м, 6H)
40		B-C	0,004	0,050	494,31	1H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,26 (с, 1H), 8,22 (с, 2H), 6,85 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,67 (д, J=2,7 Гц, 1H), 5,14-5,07 (м, 1H), 4,60-4,52 (м, 2H), 4,51-4,53 (м, 1H), 4,00 (с, 3H), 3,89 (с, 3H), 3,38-3,30 (м, 2H), 3,08 (д, J=11,3, 2,6 Гц, 2H), 2,25-1,82 (м, 8H)
38		B-C	0,002	0,065	478,24	1H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 8,36 (д, J=0,8 Гц, 2H), 8,26 (с, 1H), 6,87 (д, J=2,7 Гц, 1H), 6,74 (д, J=2,7 Гц, 1H), 5,25-5,12 (м, 1H), 4,62-4,52 (м, 2H), 4,52-4,41 (м, 1H), 4,00 (с, 3H), 3,35 (д, J=11,1 Гц, 2H), 3,10 (д, J=11,3, 2,6 Гц, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,24-1,85 (м, 8H)
39		B-C	0,003	0,058	478,24	1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) δ 8,38 (д, J=5,8 Гц, 1H), 8,15 (с, 1H), 6,89 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,79-6,71 (м, 2H), 5,31-5,22 (м, 1H), 4,80-4,68 (м, 1H), 4,51-4,40 (м, 2H), 3,85 (с, 3H), 3,49 (д, J=11,4 Гц, 2H), 3,31 (с, 3H), 2,50 (с, 127H), 1,96-1,78 (м, 12H)

Примеры редактирования генов

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и результаты, приведены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1. Материалы и методы.

Методы.

Клетки и культура.

Бронхиальные эпителиальные клетки (BEC) были получены от доноров-людей, у которых диагностирован муковисцидоз с генотипом CFTR dF508/dF508.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) были получены из дермальных фиб-

робластов человека после вирусной трансдукции, выполненной с помощью факторов перепрограммирования Yamanaka's, Oct4, Sox2, KLF4 и c-Мус. Полученные iPSC были способны дифференцироваться в 3 зародышевых слоя и содержали нормальный кариотип с 23 парами хромосом.

Первичные гемопоэтические стволовые клетки периферической крови человека (mPB) CD34⁺, гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPC) были приобретены у Nemasage или у AllCells. Клетки оттаивали, промывали и ресуспендировали в полной среде, содержащей бессывороточную среду CellGro SCGM (CellGenix) и дополненную смесью цитокинов (300 нг/мл SCF, 300 нг/мл Flt3L, 100 нг/мл TPO, 60 нг/мл IL-3) при плотности $1-3 \times 10^5$ клеток на мл и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 48 ч перед электропорацией.

Ингибиторы ДНК-РК.

В примерах редактирования генов в качестве ингибитора ДНК-РК использовали соединение 1. 10-мМ исходные растворы получали с использованием безводного DMSO и хранили при -80°C.

Электропорация.

Используемые очищенные с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) синтетические sgРНК приобретали у Synthego, и они содержали химически модифицированные нуклеотиды (2'-О-метил-3'-фосфоротиоат) в трех концевых положениях на обоих 5'- и 3'-концах. Последовательности sgРНК с подчеркнутыми модифицированными нуклеотидами показаны ниже

sgРНК AAVS1:

5'ACCCACAGUGGGGCCACUAGUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUUA
AAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG
CUUUU 3' (SEQ ID NO: 3).

sgРНК NAV1.7:

5'GGCUGAGCGUCCAUCAACCAGUUUAGAGCUAGAAAAG
CAAGUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCUUUU 3' (SEQ ID NO: 4)

Cas9-МРНК приобретали у TriLink Biotechnologies (L-7206). Эти Cas9-МРНК экспрессируют вариант белка Cas9 Streptococcus pyogenes SF370 (связанный с белком 9 CRISPR) с сигналами ядерной локализации. SpCas9-МРНК также содержит структуру CAP1, сигнал полиаденилирования и модифицированные уридины для оптимальных уровней экспрессии в клетках млекопитающих.

Донорские оцОДН приобретали у IDT. Эти оцОДН содержат 10-нуклеотидную инсерционную последовательность для измерения HDR-результатов в TIDE-анализе, фланкированную 40 нуклеотидами гомологичных плеч. Эти оцОДН содержат всего 90 нуклеотидов и фосфоротиоатные модифицированные нуклеотиды в трех терминальных положениях на обоих 5'- и 3'-концах. Последовательности донорских оцОДН с подчеркнутыми фосфоротиоатными модифицированными нуклеотидами показаны ниже

PAM AAVS1:

5'GGGTACTTTTATCTGTCCCTCCACCCACAGTGGGGCCAG
AATTCTCAGTAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCATCTTAGG3'
(SEQ ID NO: 5)

He-PAM AAVS1:

5'CCTAAGGATGGGGCTTTTCTGTCCACCAATCCTGTCCCTAGC
TGAGAATTCTGGCCCACTGTGGGGTGGAGGGGACAGATAAAAGTACCC3'
(SEQ ID NO: 6)

PAM NAV1.7:

5'AGCTGTCCATTGGGGAGCATGAGGGCTGAGCGTCCATCAA
CTGAGAAATCCAGGGAGACCACCCGTTGCAGTCCACAGCACTGTGCAT3'
(SEQ ID NO: 7)

He-PAM NAV1.7

5'ATGCACAGTGTGGACTGCAACGGTGTGGTCTCCCTGG
GAATTCTCAGTTGATGGAGCTCAGCCCTCATGCTCCCAATGGACAGCT3'
(SEQ ID NO: 8)

Все операции электропорирования проводили с использованием системы Lonza 4D-Nucleofector™.

В случае ВЕС использовали следующие условия электропорации: $1,8 \times E5$ клеток, 250 нг CAS9-МРНК, 500 нг sgРНК и 0,66 мкМ оцОДН в 20 мкл буфера для электропорации P4, при использовании программы CM-138. Клетки после электропорации переносили в 96-луночный планшет, содержащий 100 мкл среды для культивирования ВЕС, дополненной ингибиторами ДНК-РК, или оставляли необработанными. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

В случае iPSC использовали следующие условия электропорации: $2,5 \times E5$ клеток, 250 нг CAS9-МРНК, 500 нг sgРНК и 0,66 мкМ оцОДН в 20 мкл буфера для электропорации P3, при использовании программы CA-137. Клетки после электропорации переносили в 96-луночный планшет, содержащий 100 мкл среды mTEsR1 (Stem Cell Technologies), дополненной 10 мкМ ингибитором ROCK Y-27632 (Stem Cell Technologies) с или без ингибиторов ДНК-РК, и затем инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

Клетки CD34⁺ подвергали электропорации через два дня после оттаивания. Для электропорации использовали следующие условия: $2,0 \times E6$ клеток, 15 мкг белка Cas9 (Feldan), 15 мкг sgРНК, 1 мкМ оцОДН в 100 мкл буфера для электропорации P3, при использовании программы CA-137. Клетки после электро-

порации переносили путем равномерного деления их на восемь лунок 24-луночного планшета, где каждая лунка содержала различные концентрации ингибиторов ДНК-РК. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение двух дней, а затем оценивали жизнеспособность клеток и редактирование генов.

Опосредованная липидами трансфекция клеток.

За один день до трансфекции клетки высевали в 96-луночный планшет при плотности клеток 1×E4 клеток на лунку в культуральной среде для ВЕС. Сначала 0,15 мкл MessengerMax (ThermoFisher, LMR-NA 003) разбавляли в 5 мкл Opti-MEM и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. 80 нг Cas9-МРНК (Trink, L-7206), 20 нг sgРНК (Synthego) и 1 пикомоль оцОДН добавляли к 5 мкл Opti-MEM, а затем смешивали с раствором MessengerMax. Смесь инкубировали в течение 5 мин перед добавлением к клеткам. Весь раствор добавляли к клеткам в лунке 96-луночного планшета с 100 мкл культуральной среды с или без ингибиторов ДНК-РК. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

Измерение показателей выживания клеток.

Клетки инкубировали с 5 мкг/мл Hoechst 33342 (Life technologies: H3570) и 0,5 мкг/мл йодида пропидия (PI; Life Technologies: P3566) в культуральной среде в течение 1 ч при 37°C. Клетки визуализировали для измерения положительных результатов в отношении Hoechst (живые и погибшие клетки) и положительных результатов в отношении PI (погибшие клетки) с использованием системы визуализации High-Content Imaging System (Molecular devices). Относительный уровень выживания клеток оценивали по уравнению

$$\frac{[(\text{Hoescht}^+ \text{ результаты} - \text{PI}^+ \text{ результаты}) \text{ в образце}]/[(\text{Hoescht}^+ \text{ результаты} - \text{PI}^+ \text{ результаты}) \text{ в контроле}]}{\times 100}.$$

Контроль представлял собой ложно-трансфицированные клетки, и выживаемость этих клеток была произвольно установлена как 100%.

Выживание клеток CD34⁺ HSPC измеряли с использованием реагента Cell Titer Glo (CTG) (Promega). 100 мкл клеточной суспензии смешивали с 100 мкл полного реагента CTG. Хемилюминесцентный сигнал измеряли с использованием люминометра, и вычисляли % жизнеспособных клеток по сравнению с клетками контроля (клетки, не обработанные ингибиторами ДНК-РК).

Измерение уровней редактирования генов.

Геномную ДНК выделяли путем инкубирования клеток с раствором DNA Quickextract solution (Epicentre) (50 мкл на лунку) в 96-луночном планшете в течение 30 мин при 37°C. Клеточный экстракт смешивали, переносили в планшет для ПНР и затем инкубировали в течение 6 мин при 65°C и 2 мин при 98°C. Реакции ПЦР проводили с 1 мкл раствора, содержащего Genomic DNA, с использованием ДНК-полимеразы AccuPrime™ Pfx (ThermoFisher, 12344024). Условия ПЦР: 4 мин при 94°C (1×), затем 15 секунд при 94°C, 15 секунд при 60°C и 1 мин при 60°C (40×). Продукты ПЦР очищали, а затем секвенировали по Сангеру с помощью GENEWIZ. Для ПЦР использовали следующие пары праймеров, перекрывающие целевой сайт, (FW - прямой; RV - обратный). Праймеры, используемые для секвенирования по Сангеру, отмечены звездочкой (*)

AAVS1_FW: 5' GGACAACCCCAAAGTACCCC 3' (SEQ ID NO: 9)

AAVS1_RV*: 5' aggatcagtgaacgcacca 3' (SEQ ID NO: 10).

NAV1.7_FW*: 5' gccagtggttcagtggtat 3' (SEQ ID NO: 11).

NAV1.7_RV: 5' tcagcattatccttcattttctgt 3' (SEQ ID NO: 12).

Каждую хроматограмму последовательности анализировали с использованием программного обеспечения TIDE (отслеживание инделов с помощью разложения) (<http://tide.nki.nl>) (см. также Brinkman et al., Nucleic Acids Research, Volume 42, Issue 22, 16 December 2014, p. e168). В качестве контрольной последовательности использовали образцы с ложным электропорированием, и параметры были установлены на размер инсерции/делеции в 30 нуклеотидов, окно разложения было установлено так, чтобы покрыть самое большее возможное окно с высоким уровнем отслеживания. Общие уровни инсерций и делеций были получены непосредственно из TIDE-графиков. Уровни HDR представляют собой процент случаев с инсерцией в 10 нуклеотидов. Уровни NHEJ рассчитывались как общее количество случаев инсерций/делеций минус уровень HDR. Для получения графиков и для вычисления всех статистических показателей использовали программное обеспечение GraphPad Prism 7.

Пример 2. Ингибиторы ДНК-РК улучшают уровни редактирования гена HDR в ВЕС.

На фиг. 1 показана схема анализов редактирования генов, используемых в примерах, приведенных ниже. Для исследования влияния ингибиторов ДНК-РК на уровни редактирования гена HDR, ВЕС подвергали электропорации с spCAS9-МРНК, NAV1.7 sgРНК и NAV1.7 не-РАМ оцОДН, а затем инкубировали с различными концентрациями соединения 1 или оставляли без обработки (контроль). Уровни редактирования генов определяли, используя TIDE-анализ через 72 ч после электропорации. Уровни редактирования генов выражали в процентах и классифицировали как HDR и NHEJ. Выживаемость клеток показана в процентах, при этом выживаемость контрольных клеток была принята за 100%.

Как показано на фиг. 2, ингибитор ДНК-РК, такой как соединение 1, улучшает уровни редактирования генов в ВЕС. Для соединения 1 значение IC50 NHEJ составило 0,4450 мкМ, значение EC50 HDR составило 0,4448 мкМ, и TOP HDR (%) составило 69,37.

Пример 3. Ингибиторы ДНК-ПК улучшают уровни редактирования гена по пути HDR в CD34⁺ клетках.

Для исследования влияние ингибиторов ДНК-ПК на уровни редактирования гена по пути HDR, клетки CD34⁺ mPB подвергали электропорации с RNP (белок spCAS9+sgPHK NAV1.7) и оцОДН не-PAM NAV1.7. Затем клетки инкубировали с различными концентрациями соединения 1. Уровни редактирования гена определяли, используя TIDE-анализ через 48 ч после электропорации. Уровни редактирования генов выражали в процентах и классифицировали как HDR и NHEJ, как показано на фиг. 3А (донор В) и на фиг. 3В (донор С). Выживаемость клеток показана в процентах, при этом выживаемость контрольных клеток была принята за 100%.

Как показано на фиг. 3А и 3В ингибитор ДНК-ПК, такой как соединение 1, улучшает уровни редактирования генов в CD34⁺ клетках. Значения EC50 для HDR и инсерций/делений для донора В составляли соответственно 0,29 и 0,35 мкМ.

Пример 4. Ингибиторы ДНК-ПК улучшают уровни редактирования гена по пути HDR в iPSC.

Для исследования влияния ингибиторов ДНК-ПК на уровни редактирования гена по пути HDR, iPSC подвергали электропорации с мPHK spCAS9, sgPHK aaVs1 и оцОДН PAM AaVs1, и затем их инкубировали с различными концентрациями соединения 1 или оставляли необработанным (контроль). Уровни редактирования генов определяли, используя TIDE-анализ через 72 ч после электропорации. Уровни редактирования генов выражали в процентах и классифицировали как HDR и NHEJ. Выживаемость клеток показана в процентах, при этом выживаемость контрольных клеток была принята за 100%.

Как показано на фиг. 4, ингибитор ДНК-ПК, такой как соединение 1, улучшает уровни редактирования генов в iPSC. Для соединения 1 значение IC50 для NHEJ составило 0,474 мкМ, значение EC50 для HDR равно 0,3253 мкМ, и TOP HDR (%) составило 24,41.

Пример 5. Определение кинетики редактирования гена при Ectax.

Для исследования кинетики редактирования гена при Ectax, ВЕС подвергали электропорации с мPHK spCAS9, sgPHK AAVS1 и оцОДН PAM AAVS1, а затем инкубировали в течение различных периодов времени с 10 мкМ соединения 1 или оставляли необработанными (контроль). Уровни редактирования генов определяли с помощью TIDE-анализа и выражали в процентах для HDR и NHEJ. 10 мкМ является максимальной действующей концентрацией (Ectax) для соединения 1.

На фиг. 5 показано, что существует тесная обратная корреляция между событиями HDR и NHEJ.

Пример 6. Определение кинетики редактирования гена при EC50.

ВЕС электропорировали с мPHK spCAS9, sgPHK AAVS1 и оцОДН PAM AAVS1, а затем инкубировали в течение различных периодов времени с 0,7 мкМ соединения 1 или оставляли необработанным (контроль). Уровни редактирования генов определяли с помощью TIDE-анализа и выражали в процентах от HDR и NHEJ. Концентрация 0,7 мкМ представляет собой полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) для соединения 1. На фиг. 6 показана динамика ингибирования ДНК-ПК в отношении HDR и NHEJ в ВЕС.

Пример 7. Ингибитор ДНК-ПК улучшают уровни HDR, когда компоненты для редактирования генов доставляют в ВЕС с помощью опосредованной липидами трансфекции.

Для исследования эффектов опосредованной липидами трансфекции ВЕС трансфицировали мPHK spCAS9, sgPHK AAVS1 и оцОДН PAM AAVS1, а затем инкубировали с различными концентрациями соединения 1 или оставляли необработанными (контроль). Уровни редактирования генов определяли используя TIDE-анализ через 72 ч после трансфекции.

На фиг. 7 показано повышение эффективности HDR при возрастающих концентрациях соединения 1, доставляемого с помощью опосредованной липидами трансфекции.

Краткое изложение сущности изобретения

Результаты добавления ингибиторов ДНК-ПК к различным типам клеток и в различные локусы показали значительное увеличение эффективности пути HDR. Увеличение уровней редактирования гена по пути HDR показано на различных типах клеток, включая ВЕС, iPSC, CD34⁺ HPSC (от 3-х доноров). Увеличение уровней редактирования гена по пути HDR показано для многих локусов, включая AAVS1.1 и NaV1.7. Экспериментальные результаты также подтвердили, что доставка с использованием липидов и доставка электропорацией являются эффективными способами. Примеры с использованием электропорации включают ВЕС, iPSC, CD34⁺ HPSC, а эффективность доставки системой с использованием липидов показана на ВЕС. В отношении различных локусов, экспериментальных условий и типов клеток наблюдали тесную обратную корреляцию между событиями HDR и NHEJ.

Сводная таблица.

Ингибиторы ДНК-ПК улучшают редактирование гена, опосредованное через путь HDR

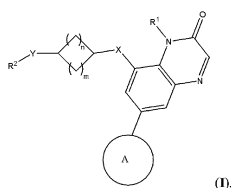
	Соединение 1	
	AAVS1	NaV1.7
Клетки	HDR EC50 (мкМ) и Max %	
ВЕС	0,72 мкМ	0,72 мкМ
	66%	69%
iPSC*	0,33 мкМ	Не определяли
	24%	Не определяли
CD34 ⁺		
Донор А	0,12 мкМ	0,39 мкМ
	76%	82%
Донор В	Не определяли	0,29 мкМ
	Не определяли	86%
Донор С	0,18 мкМ	0,11 мкМ
	88%	67%

Эквиваленты.

Хотя в данном описании изобретение было конкретно описано и раскрыто со ссылками на предпочтительные варианты его осуществления, специалистам в данной области техники понятно, что могут быть сделаны различные изменения в форме и деталях без отклонения от сущности изобретения и объема его раскрытия, определенного в прилагаемой формуле изобретения. Специалистам в данной области техники понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного здесь, или они могут их установить, используя не более чем рутинное экспериментирование. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



где m и n независимо равны 1 или 2;

X представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C₁-C₄-алкил;Y представляет собой связь, O или NR; где R представляет собой H или C₁-C₄-алкил;R¹ представляет собой C₁-C₄-алкил;R² представляет собой:

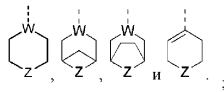
а) 5- или 6-членное арильное или гетероарильное кольцо, содержащее один или два гетероатома, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где арильное и гетероарильное кольцо могут быть замещены 0, 1, 2 или 3 заместителями R³, независимо выбранными из группы, включающей CN, галоген, C₁-C₄-алкил, C₃-C₆-циклоалкил, C₁-C₄-галогеналкил, C₁-C₄-алкокси, C₁-C₄-галогеналкокси, C(=O)NHR¹ и 5- или 6-членное гетероциклоалкильное или гетероарильное кольцо, где каждое кольцо содержит 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из N, O и S; где R¹ представляет C₁-C₄-алкил; или где две группы R³, соединенные с соседними атомами углерода арильного или гетероарильного кольца, могут образовывать конденсированное 5- или 6-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S; или

б) COOR⁴, где R⁴ представляет собой C₁-C₄-алкил или бензил;

где каждый из C₁-C₄-алкила, C₁-C₄-галогеналкила, C₁-C₄-алкокси и C₁-C₄-галогеналкокси может быть дополнительно замещен OR⁵ или NR⁶R⁷, где каждый из R⁵, R⁶ и R⁷ независимо представляет собой

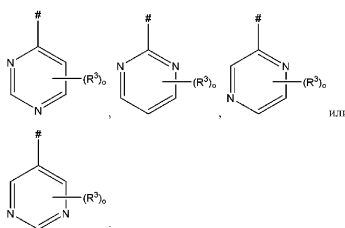
H, C₁-C₄-алкил или C₃-C₆-циклоалкил; или где R⁶ и R⁷ и атом азота, к которому они присоединены, образуют насыщенное 5- или 6-членное кольцо, которое может содержать 0 или 1 дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S, и где кольцо может быть дополнительно замещено C₁-C₄-алкилом;

кольцо A выбирают из группы, состоящей из



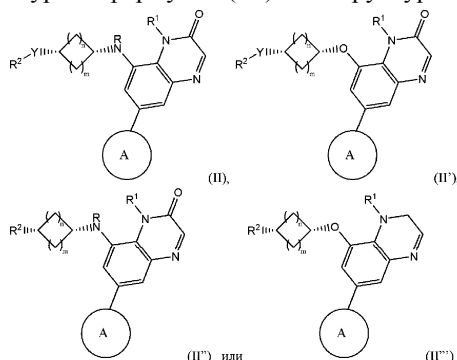
где W представляет собой N или CR³ и Z представляет собой O или S; где R³ представляет собой H или C₁-C₄-алкил.

2. Соединение по п.1, где R² представляет 5- или 6-членное арильное или гетероарильное кольцо, содержащее один или два гетероатома, выбранных из N, O и S, где арильное и гетероарильное кольцо могут быть замещены 0, 1 или 2 заместителями R³, независимо выбранными из группы, состоящей из CN, галогена, C₁-C₄-алкила или C₃-C₆-циклоалкила, C₁-C₄-галогеналкила, C₁-C₄-алкокси, C₁-C₄-галогеналкокси и C(=O)NHR¹, где R¹ представляет собой C₁-C₄-алкил; или где две группы R³, соединенные с соседними атомами углерода ароматического или гетероароматического кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S; и/или



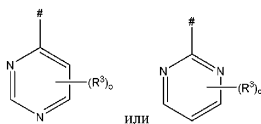
где # означает положение, где R² присоединен к остальной части соединения формулы (I); и o равно 0, 1 или 2.

3. Соединение по п.1 или 2, где соединение формулы (I) представлено структурной формулой (II), структурной формулой (II'), структурной формулой (II'') или структурной формулой (II''')



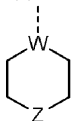
4. Соединение по любому из пп.1-3, где:

- (i) каждый из m и n равен 2; и/или
- (ii) R¹ представляет собой метил; и/или
- (iii) R² представляет собой

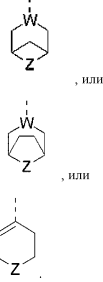


5. Соединение по п.1 или 2, где каждый из m и n равен 2, Y является связью, R¹ представляет собой метил, R² представляет собой COOR⁴ и R⁴ представляет собой C₁-C₄-алкил или бензил.

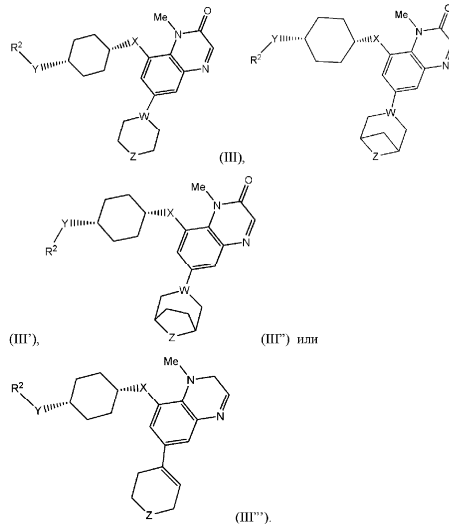
6. Соединение по любому из пп.1-5, где A представляет собой



7. Соединение по любому из пп.1-5, где А представляет собой



8. Соединение по любому из пп.1-5, где соединение формулы (I) представлено структурной формулой (II), структурной формулой (II'), структурной формулой (II'') или структурной формулой (II''')

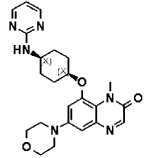
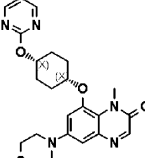
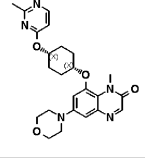
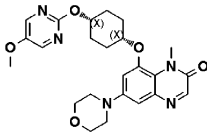
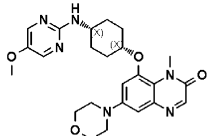


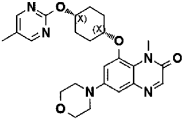
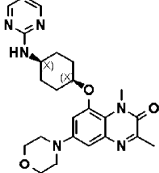
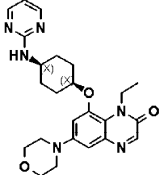
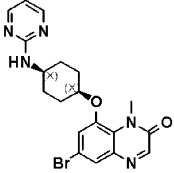
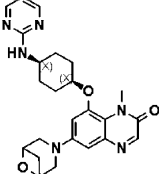
9. Соединение по любому из пп.1-6, где α равно 0, 1 или 2, и каждый R^3 независимо выбран из группы, состоящей из CN, галогена, NO_2 , C_1 - C_2 -алкила, C_1 - C_4 -галогеналкила, C_1 - C_2 -алкокси, C_1 - C_2 -галогеналкокси и $C(=O)NHR^{1'}$, где $R^{1'}$ представляет собой C_1 - C_2 -алкил.

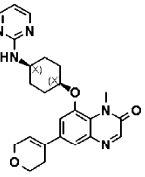
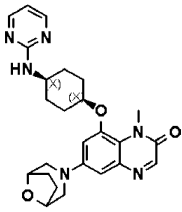
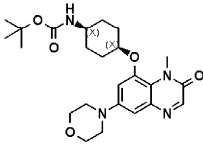
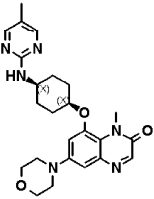
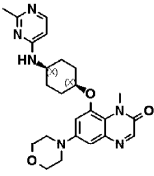
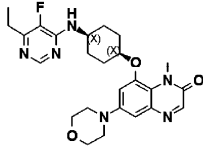
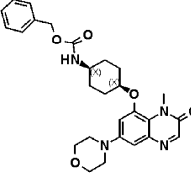
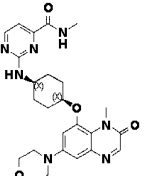
10. Соединение по любому из пп.1-9, где:

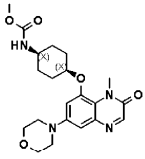
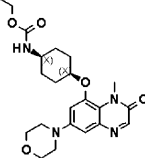
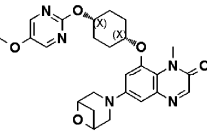
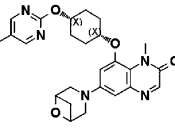
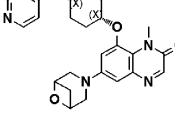
(i) две группы R^3 , соединенные с соседними атомами углерода арильного или гетероарильного кольца, могут образовывать конденсированное 5-членное кольцо, которое может содержать гетероатом, выбранный из O, N и S; и/или

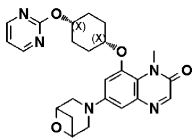
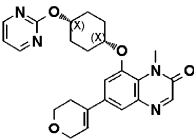
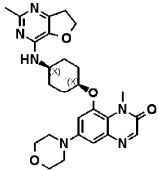
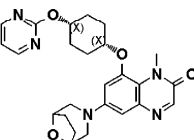
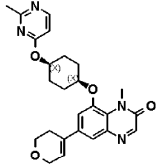
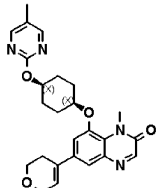
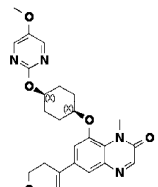
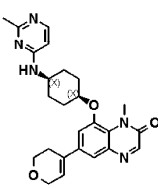
соединение выбрано из следующих соединений:

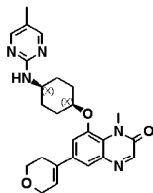
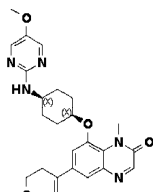
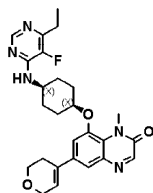
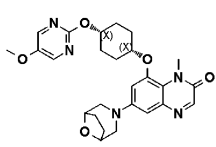
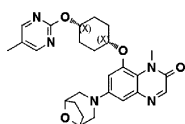
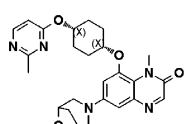
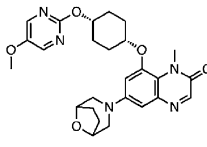
Соединение №	Структура
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	

11	
12	
13	
14	
15	
16	
19	
20	

21	
22	
23	
24	
25	

26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	

34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

11. Способ редактирования одной или нескольких целевых геномных областей, включающий введение в одну или несколько клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-10, или его фармацевтически приемлемой соли или его сокристалла,

где одна или несколько целевых геномных областей редактируются.

12. Способ по п.11, где эффективность редактирования целевых геномных областей в одной или нескольких клетках увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, когда редактирование выполняется без использования указанного соединения.

13. Способ репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях с помощью пути гомологичной направленной репарации (HDR), включающий введение в одну или несколько клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемую соль или его сокристалл,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) целевых геномных областей, что приводит к разрыву ДНК, и где разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, через путь HDR.

14. Способ по п.13, где:

(a) эффективность репарации разрыва ДНК в целевых геномных областях в одной или нескольких клетках через путь HDR увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, когда редактирование выполняют без использования указанного соединения; или

(b) разрыв ДНК включает разрыв двойной цепи ДНК (DSB).

15. Способ ингибирования репарации разрыва ДНК в одной или нескольких целевых геномных областях через путь негомологичного концевое соединения (NHEJ), включающий

введение в одну или несколько клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-10 или его фармацевтически приемлемую соль или его сокристалл,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) одной или нескольких целевых геномных областей, что приводит к разрыву ДНК, и где репарация разрыва ДНК через путь NHEJ ингибируется или подавляется.

16. Способ по п.15, где:

(a) эффективность ингибирования репарации разрыва ДНК в целевых геномных областях в одной или нескольких клетках через путь NHEJ увеличена по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, когда редактирование выполняют без использования указанного соединения;

(b) разрыв ДНК включает разрыв двойной цепи ДНК (DSB).

17. Способ модификации экспрессии одного или более генов или белков, включающий

введение в одну или несколько клеток, которые содержат одну или несколько целевых геномных областей, системы редактирования генома и соединения по любому из пп.1-10, или его фармацевтически приемлемую соль или его сокристалл,

где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой (кислотами) одной или нескольких целевых геномных областей гена-мишени (генов-мишеней), приводя к редактированию одной или нескольких целевых геномных областей, и где редактирование модифицирует экспрессию нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с целевым геном (генами).

18. Способ по п.17, где:

(a) где экспрессия нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с геном-мишенью (генами-мишенями), увеличена по сравнению с базовым уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением, дополнительно, необязательно, где указанная экспрессия увеличена по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, или экспрессия имеет 1-, 1,5-, 2-, 2,5-, 3-, 3,5-, 4-, 4,5-, 5- или 10-кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением; или

(b) экспрессия нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с геном-мишенью (генами-мишенями), уменьшена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением, необязательно, где экспрессия гена уменьшена по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или нескольких клетках перед введением; или

(c) экспрессия нижерасположенного гена (генов) и/или белка (белков), ассоциированного с геном-мишенью (генами-мишенями), в одной или нескольких клетках по существу отсутствует.

19. Способ по любому из пп.11-16, где:

(i) указанная эффективность увеличена по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или в 100 раз по сравнению с эффективностью в другой идентичной клетке или клетках, когда редактирование выполняют без использования указанного соединения; или

(ii) указанную эффективность измеряют по частоте целевой интеграции полинуклеотидов или частоте направленного мутагенеза, необязательно, где направленный мутагенез включает точечные мутации, делеции и/или инсерции.

20. Способ по любому из пп.11-16, где:

(i) клетка синхронизирована в фазе клеточного цикла S или G2; и/или

(ii) одна или несколько клеток, которым вводят или которые контактируют с указанным соединением, имеют повышенную выживаемость по сравнению с одной или несколькими клетками, которым не было введено или которые не были приведены в контакт с указанным соединением; и/или

(iii) систему редактирования генома и указанное соединение вводят в одну или несколько клеток одновременно; и/или

(iv) систему редактирования генома и указанное соединение вводят в одну или несколько клеток последовательно; необязательно, где:

(a) систему редактирования генома вводят в одну или несколько клеток перед введением указанного соединения; или

(b) соединение вводят в одну или более клеток перед введением системы редактирования генома; и/или

(v) одна или несколько клеток являются:

(a) культивируемыми клетками; или

(b) клетками *in vivo* в организме; или

(c) клетками *ex vivo* из организма;

необязательно, где организм представляет собой млекопитающее или человека; и/или

(vi) где систему редактирования генома и указанное соединение вводят:

(a) одним и тем же путем введения; или

(b) разными путями введения, необязательно, где систему редактирования генома вводят внутривенно, а указанное соединение вводят перорально; и/или

(vii) систему редактирования генома выбирают из системы на основе мегануклеазы, системы на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), системы на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo, необязательно, системы на основе CRISPR.

21. Способ по п.20, где система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas или систему CRISPR-Cpf, необязательно, где:

(i) система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas, и система CRISPR-Cas включает:

(a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент, который включает: (i) нацеливающую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую РНК; и (ii) активирующую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, способную к гибридизации с нацеливающей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую активирующую РНК; и

(b) элемент белка Cas, который включает белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок Cas, дополнительно, необязательно, где:

(a) указанная направляющая РНК и активирующая РНК слиты в одну молекулу; или

(b) белок Cas представляет собой белок Cas9 типа II, необязательно,

где белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никазу D10A, или любые их комбинации; или

(ii) система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf, и система CRISPR-Cpf включает:

(a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющий РНК-элемент, направляющую РНК, которая включает нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях; и

(b) элемент белка Cpf, который включает белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

22. Способ по любому из пп.15-21, где:

(i) систему редактирования генома доставляют одним или несколькими векторами, необязательно, где один или несколько векторов выбирают из вирусных векторов, плазмид или одноцепочечных ДНК (оцДНК), дополнительно, необязательно, где вирусные векторы выбирают из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных, аденоассоциированных векторов и векторов на основе вируса простого герпеса; и/или

(ii) систему редактирования генома доставляют с помощью:

(a) синтетической РНК или

(b) наноконструкции.

23. Набор для редактирования одной или нескольких целевых геномных областей, содержащий систему редактирования генома и соединение по любому из пп.1-10, или его фармацевтически приемлемая соль или его сокристалл.

24. Набор по п.23, где система редактирования генома представляет собой систему на основе мегануклеазы, систему на основе нуклеазы цинкового пальца (ZFN), систему на основе эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo, дополнительно, необязательно, где система редактирования генома представляет собой систему на основе CRISPR.

25. Набор по п.23 или 24, где система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas или систему CRISPR-Cpf, необязательно, где:

(i) система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cas, и система CRISPR-Cas включает: (a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент, который включает: (i) нацеливающую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую нацеливающую

РНК; и (ii) активирующую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, способную к гибридизации с нацеливающей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую активирующую РНК; и (b) элемент белка Cas, который включает белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую белок Cas, необязательно, где белок Cas представляет собой белок Casp9 типа, дополнительно, необязательно, где белок представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или никазу D10A, или любую их комбинацию; или

(ii) система на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf, и система CRISPR-Cpf включает: (a) по меньшей мере один направляющий РНК-элемент или нуклеиновую кислоту, которая включает нуклеотидную последовательность (последовательности), кодирующую направляющий РНК-элемент, направляющую РНК, которая включает нацеливающую РНК, которая включает нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или нескольких целевых геномных областях; и (b) элемент белка Cpf, который включает белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

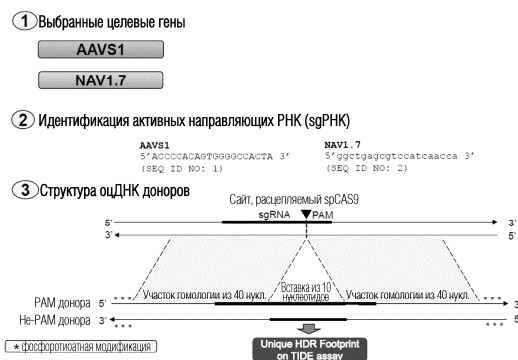
26. Набор по любому из пп.23-25, где система редактирования генома включена или упакована в один или несколько векторов, необязательно, где один или несколько векторов выбирают из вирусных векторов, плазмид или одноцепочечных ДНК (оцДНК), дополнительно, необязательно, где вирусные векторы выбирают из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных, аденоассоциированных векторов и векторов на основе вируса простого герпеса.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

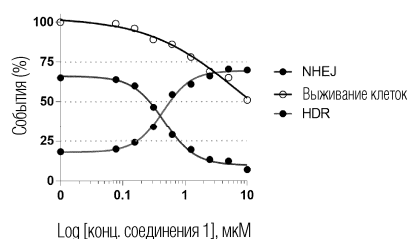
28. Способ сенсibilизации клетки к терапевтическому агенту или сенсibilизации болезненного состояния, которое индуцирует повреждение ДНК, включающее стадию контактирования клетки с соединением по любому из пп.1-10 или с фармацевтической композицией, содержащей указанное соединение.

29. Способ увеличения эффективности терапевтического режима лечения рака у пациента, включающий стадию введения указанному пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение.

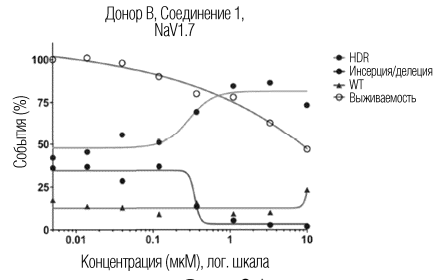
30. Способ лечения рака или ингибирования роста раковых клеток у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-10 или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.



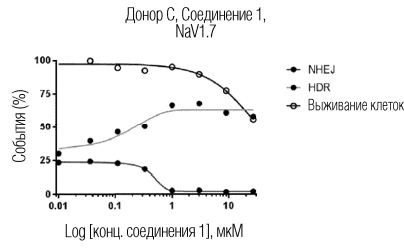
Фиг. 1



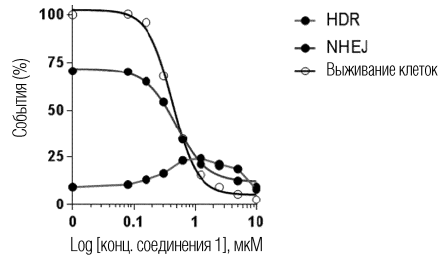
Фиг. 2



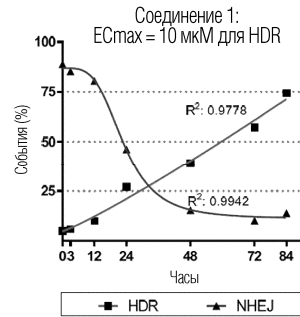
Фиг. 3А



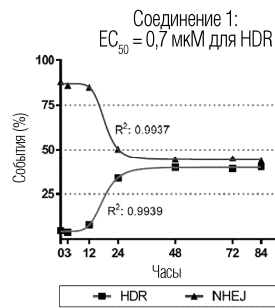
Фиг. 3В



Фиг. 4

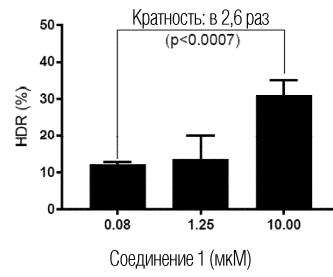


Фиг. 5



Фиг. 6

042641



Фиг. 7

