

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047271**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- |   |   |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента<br/><b>2024.06.26</b></p> <p>(21) Номер заявки<br/><b>202091709</b></p> <p>(22) Дата подачи заявки<br/><b>2019.01.16</b></p> | <p>(51) Int. Cl. <b>C07D 403/12</b> (2006.01)<br/><b>C07D 413/12</b> (2006.01)<br/><b>A61P 35/00</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/506</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/5377</b> (2006.01)<br/><b>A61K 31/5386</b> (2006.01)<br/><b>C12N 15/10</b> (2006.01)</p> |
|---|---|

**(54) ИНГИБИТОРЫ ДНК-ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ**

- |  |  |
|--|--|
| <p>(31) <b>62/618,598</b></p> <p>(32) <b>2018.01.17</b></p> <p>(33) <b>US</b></p> <p>(43) <b>2020.11.10</b></p> <p>(86) <b>PCT/US2019/013783</b></p> <p>(87) <b>WO 2019/143675 2019.07.25</b></p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:<br/><b>ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ<br/>ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)</b></p> <p>(72) Изобретатель:<br/><b>Вайнберг Марк Сол, Д'Астольфо<br/>Диего Себастьян, Махаджан Судипта<br/>(US)</b></p> <p>(74) Представитель:<br/><b>Медведев В.Н. (RU)</b></p> | <p>(56) <b>WO-A1-2014159690</b><br/>ROBERT F. ET AL.: "Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing", GENOME MEDICINE, vol. 7, no. 1, 27 August 2015 (2015-08-27), pages 1-11, XP002769169, ISSN: 1756-994X, DOI:10.1186/S13073-015-0215-6, page 1, page 2<br/>RONGXUE PENG ET AL.: "Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing", FEBS JOURNAL, vol. 283, no. 7, 27 November 2015 (2015-11-27), pages 1218-1231, XP055377561, GB ISSN: 1742-464X, DOI: 10.1111/febs.13586, right hand column; page 1227<br/><b>WO-A1-2018013840</b></p> |
|--|--|

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

**B1**

**047271**

**047271  
B1**

### Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США 62/618,598, поданной 17 января 2018 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Список последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Копия ASCII, созданная 15 января 2019 г., называется 14390-686 Sequence listing\_ST25.txt и имеет размер 8 КБ.

### Область техники, к которой относится изобретение

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

### Уровень техники

Ионизирующее излучение (ИИ) вызывает различные повреждения ДНК, из которых самыми цитотоксическими являются двухцепочечные разрывы (ДЦР). Такие ДЦР могут привести к гибели клеток путем апоптоза и/или митотической катастрофы, если не будут быстро и полностью устранены. В дополнение к ИИ, некоторые химиотерапевтические средства, включая ингибиторы топоизомеразы II, блеомицин и доксорубин, также вызывают ДЦР. Эти поражения ДНК индуцируют сложный набор сигналов через сеть ответа на повреждение ДНК, функция которой заключается в репарации поврежденной ДНК и поддержании жизнеспособности и геномную стабильности клетки. В клетках млекопитающих преобладающим путем репарации ДЦР является Негомологичное соединение концов (NHEJ). Этот путь функционирует независимо от фазы клеточного цикла и не требует матрицы для повторного лигирования концов разрушенной ДНК. NHEJ требует координации многих белков и сигнальных путей. Основным аппаратом NHEJ состоит из гетеродимера Ku70/80 и каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК<sub>к</sub> или ДНК-ПК), которые вместе составляют активный комплекс фермента ДНК-ПК. ДНК-ПК<sub>к</sub> является членом семейства фосфатидилинозитол-3-киназа-родственных киназ (PIKK), в которое входят серин/треониновые протеинкиназы, также включающего мутантный при атаксии-телангиэктазии белок (ATM), атаксия-телангиэктазия и Rad3-родственный белок (ATR), mTOR, а также четыре изоформы PI3K. Впрочем, тогда как ДНК-ПК<sub>к</sub> входит в то же семейство протеинкиназ, что и ATM и ATR, функция этих последних киназ заключается в репарации повреждения ДНК по пути Гомологичной рекомбинации (HR) и ограничивается S и G<sub>2</sub> фазами клеточного цикла. Хотя ATM также мобилизуется к участкам ДЦР, ATR мобилизуется к участкам одноцепочечных разрывов ДНК.

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

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

Ингибирование активности ДНК-ПК вызывает эффекты как в делящихся, так и в неделящихся клетках. Это очень важно, так как большинство клеток в солидной опухоли не реплицируются активно в любой момент, что ограничивает эффективность многих средств, воздействующих на клеточный цикл. В равной степени интересны недавние сообщения, которые указывают на непосредственную взаимосвязь между ингибированием пути NHEJ и способностью убивать традиционно радиорезистентные раковые стволовые клетки (РСК). Было показано, что в некоторых опухолевых клетках ДЦР в неактивных РСК

преимущественно активируют репарацию ДНК по пути NHEJ; считается, что РСК обычно находятся в неактивной фазе клеточного цикла. Это может объяснять, почему половина онкобольных может испытывать локальный или удаленный рецидив опухоли, несмотря на лечение, поскольку современные стратегии не способны эффективно воздействовать на РСК. Ингибитор ДНК-ПК может обеспечить сенсibilизацию таких потенциальных метастатических клеток-предшественников к воздействию ИИ и подбор вызывающих образование ДЦР химиотерапевтических средств.

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

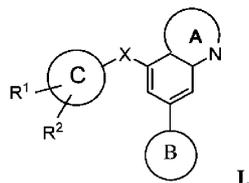
Кроме того, для обеспечения системной инженерии генетических вариаций требуются технологии точного воздействия на геном. Применение систем редактирования генома, в частности технологии редактирования генома на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных кластерами (CRISPR)-эндонуклеазы,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

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

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

### Сущность изобретения

Было обнаружено, что соединения настоящего изобретения и их фармацевтически приемлемые композиции эффективны в качестве ингибиторов ДНК-ПК. Таким образом, в изобретении представлены соединения, имеющие общую формулу



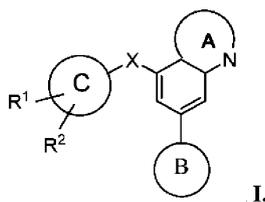
или их фармацевтически приемлемая соль, где каждый из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $X$  кольца А, кольца В и кольца С имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

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

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

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

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



или его фармацевтически приемлемых солей, где каждый из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $X$ , кольца А, кольца В и кольца С независимо имеет значение, определенное в другой части настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишеней по пути направленной гомологией репарации

(HDR), включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой I, или его фармацевтически приемлемых солей.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областей-мишеней по пути NHEJ, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой I, или его фармацевтически приемлемых солей.

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

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

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

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

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

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показана схема анализов редактирования генов.

Фиг. 2 является графиком, на котором показан процент редактирования генов в клетках ВЕС, обработанных ингибитором ДНК-ПК.

Фиг. 3А и 3В являются графиками, на которых показан процент редактирования генов после обработки ингибитором ДНК-ПК в CD34<sup>+</sup> клетках двух разных доноров.

Фиг. 4 является графиком, на котором показан процент редактирования генов в иПСК, обработанных ингибитором ДНК-ПК.

Фиг. 5 является графиком, на котором показана кинетика редактирования генов в ВЕС в присутствии EC<sub>max</sub> ингибитора ДНК-ПК.

Фиг. 6 является графиком, на котором показана кинетика редактирования генов в ВЕС в присутствии EC<sub>50</sub> ингибитора ДНК-ПК.

Фиг. 7 является гистограммой, на которой показан процент HDR для компонентов редактирования генов, доставленных путем липид-опосредованной трансфекции, в клетки ВЕС.

Фиг. 8 является графиком, на котором показан процент редактирования генов в CD34<sup>+</sup>, обработанных ингибитором ДНК-ПК.

Фиг. 9 является графиком, на котором показан процент редактирования генов в CD34<sup>+</sup>, обработанных ингибитором ДНК-ПК.

Фиг. 10 является графиком, на котором показан процент редактирования генов в CD34<sup>+</sup>, обработанных ингибитором ДНК-ПК.

На фиг. 11 показана схема стратегии редактирования генов для проведения направленной гомологией репарации (HDR) с применением CRISPR-Cas9 при использовании AAV доноров.

Фиг. 12 является графиком, на котором показано точное редактирование гена посредством HDR, опосредованного AAV донорами, CRISPR-Cas9 и селективным ингибитором ДНК-ПК.

#### **Подробное описание изобретения** **Определения и общая терминология**

При использовании в настоящем документе должны применяться следующие определения, если не указано иное. В рамках настоящего документа химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей химических элементов, версии CAS и Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed. 1994. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5<sup>th</sup> Ed., Smith,

M.B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Как правило, номенклатуры, используемые в отношении методов и технологий культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии и химии и гибридизации белков и олиго- или полинуклеотидов, описанные в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области. Стандартные методики используются для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментные реакции и методы очистки проводят в соответствии со спецификациями производителя, или как это обычно принято в данной области или как описано в настоящем документе. Вышеуказанные методы и процедуры обычно выполняют в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в уровне техники, и как описано в различных общих и более конкретных источниках, цитируемых и обсуждаемых в тексте настоящего описания. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

Как описано в настоящем документе, соединения согласно изобретению могут быть необязательно замещены одним или более заместителями, такими как проиллюстрированные в общем виде выше или представленные в качестве примеров конкретными классами, подклассами и соединениями изобретения. Следует понимать, что фраза "необязательно замещенный" используется попеременно с фразой "замещенный или незамещенный". Как правило, термин "замещенный", независимо от того, предшествует ли ему термин "необязательно", или нет, относится к замене одного или более радикалов водорода в данной структуре радикалом указанного заместителя. Если не указано иное, необязательно замещенная группа может содержать заместитель в каждом замещаемом положении группы. Если больше одного положения в данной структуре может быть замещено больше чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместители могут быть одинаковыми или разными в каждом положении.

Как описано в настоящем документе, если термин "необязательно замещенный" предшествует некоторому перечню, указанный термин относится ко всем последующим замещаемым группам в данном перечне. Например, если X является галогеном; необязательно замещенным C<sub>1-3</sub> алкилом или фенилом; X может быть необязательно замещенным алкилом или необязательно замещенным фенилом. Аналогичным образом, если термин "необязательно замещенный" следует после некоторого перечня, указанный термин также относится ко всем замещаемым группам в предыдущем перечне, если не указано иное. Например: если X представляет собой галоген, C<sub>1-3</sub> алкил или фенил, где X необязательно замещен J<sup>X</sup>, то C<sub>1-3</sub> алкил и фенил могут быть необязательно замещены J<sup>X</sup>. Как очевидно для специалиста в данной области, такие группы, как H, галоген, NO<sub>2</sub>, CN, NH<sub>2</sub>, OH или OCF<sub>3</sub>, не будут включены, поскольку они не являются замещаемыми группами. Как также очевидно специалисту в данной области, гетероарильное или гетероциклическое кольцо, содержащее NH-группу, может быть необязательно замещено путем замены атома водорода заместителем. Если радикал или структура заместителя не определены или определены как "необязательно замещенные", радикал или структура заместителя является незамещенным.

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

Термин "алкил" или "алкильная группа" при использовании в настоящем документе означает нормальную (т.е. неразветвленную) или разветвленную, замещенную или незамещенную углеводородную цепь, которая полностью насыщена. Если не определено иное, алкильные группы содержат 1-8 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления алкильные группы содержат 1-6 атомов углерода, и в других вариантах осуществления алкильные группы содержат 1-4 атома углерода (обозначены как "C<sub>1-4</sub> алкил"). В других вариантах осуществления алкильные группы характеризуют как "C<sub>0-4</sub> алкил", представляющий либо ковалентную связь, либо C<sub>1-4</sub> алкильную цепь. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, бутил, изопропил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил. Термин "алкилен" при использовании в настоящем документе означает насыщенную двухвалентную углеводородную группу с нормальной или разветвленной цепью, примеры которой представлены метиленом, этиленом, изопропиленом и т.п. Термин "алкилиден" при использовании в настоящем документе означает двухвалентную связывающую алкильную группу с неразветвленной цепью. Термин "алкенил" при использовании в настоящем документе означает моновалентную углеводородную группу с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащую одну или более углерод-углеродных двойных связей. Термин "алкинил" при использовании в настоящем документе означает моновалентную углеводородную группу с неразветвленной или разветвленной цепью, содержащую одну или более углерод-углеродных тройных связей.

Термин "циклоалкил" (или "карбоцикл") относится к моноциклическому C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> углеводороду или бициклическому C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> углеводороду, который является полностью насыщенным и имеет одну точку

присоединения к остальной части молекулы, и где любое отдельное кольцо в указанной бициклической кольцевой системе содержит 3-7 членов. Подходящие циклоалкильные группы включают, без ограничения перечисленным, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил.

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

Примеры гетероциклических колец включают, без ограничения перечисленными, следующие моноциклы: 2-тетрагидрофуранил, 3-тетрагидрофуранил, 2-тетрагидротииофенил, 3-тетрагидротииофенил, 2-морфолино, 3-морфолино, 4-морфолино, 2-тиоморфолино, 3-тиоморфолино, 4-тиоморфолино, 1-пирролидинил, 2-пирролидинил, 3-пирролидинил, 1-тетрагидропиперазинил, 2-тетрагидропиперазинил, 3-тетрагидропиперазинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 1-пиразолинил, 3-пиразолинил, 4-пиразолинил, 5-пиразолинил, 1-пиперидинил, 2-пиперидинил, 3-пиперидинил, 4-пиперидинил, 2-тиазолидинил, 3-тиазолидинил, 4-тиазолидинил, 1-имидазолидинил, 2-имидазолидинил, 4-имидазолидинил, 5-имидазолидинил; и следующие бициклы: 3-1H-бензимидазол-2-он, 3-(1-алкил)бензимидазол-2-он, индолинил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, бензотиолан, бензодитиан и 1,3-дигидроимидазол-2-он.

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

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

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

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

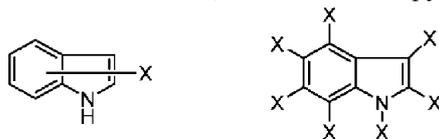
Термин "арил", используемый отдельно или как часть более крупной молекулы, как в "аралкиле", "аралкокси" или "арилоксиалкиле", относится к моноциклической, бициклической или трициклической карбоциклической кольцевой системе, содержащей в общей сложности от шести до четырнадцати членов в кольце, где указанная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

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

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).

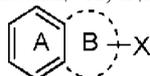
Как описано в настоящем документе, связь, отходящая от заместителя к центру одного кольца в полициклической системе (как показано ниже), представляет собой замещение заместителя в любом заме-

щаемом положении в любом из колец в полициклической системе. Например, структура а представляет собой возможное замещение в любом из положений, показанных в структуре b.



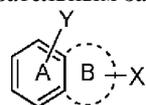
Структура а      Структура b

Это также относится к полициклическим системам, конденсированным с необязательными кольцевыми системами (которые могут быть представлены пунктирными линиями). Например, в структуре с, X является дополнительным заместителем и для кольца А, и для кольца В.



Структура с

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



Структура d

Термин "защитная группа" при использовании в настоящем документе означает такие группы, которые предназначены для защиты функциональной группы, такой как, например, спирт, амин, карбоксил, карбонил и т.д., от нежелательных реакций во время процедур синтеза. Обычно используемые защитные группы раскрыты в издании Greene and Wuts, *Protective Groups In Organic Synthesis*, 3<sup>rd</sup> Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999), которое включено в настоящий документ посредством ссылки. Примеры защитных групп азота включают ацильные, ароильные или карбамильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, т-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил,  $\alpha$ -хлорбутирил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, 4-нитробензоил и хиральные вспомогательные соединения, такие как защищенные или незащищенные D,L или D,L-аминокислоты, такие как аланин, лейцин, фенилаланин и т.п.; сульфонильные группы, такие как бензолсульфонил, п-толуолсульфонил и т.п.; карбаматные группы, такие как бензилоксикарбонил, п-хлорбензилоксикарбонил, п-метоксибензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2 нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(п-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил,  $\alpha,\alpha$ -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, т-бутилоксикарбонил, диизопропилметоксикарбонил, изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 2,2,2,-трихлорэтоксикарбонил, феноксикарбонил, 4-нитрофеноксикарбонил, флуоренил-9-метоксикарбонил, циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил, фенилтиокарбонил и т.п., арилалкильные группы, такие как бензил, трифенилметил, бензилоксиметил и т.п. и силильные группы, такие как триметилсилил и т.п. Предпочтительными N-защитными группами является формил, ацетил, бензоил, пивалоил, т-бутилацетил, аланил, фенилсульфонил, бензил, т-бутилоксикарбонил (Boc) и бензилоксикарбонил (Cbz). Примеры защитных групп гидроксила включают простые эфиры, такие как тетрагидропиранил, трет-бутил, бензил, аллил и т.п.; силиловые эфиры, такие как триметилсилил, триэтилсилил, триизопропилсилил, трет-бутилдифенилсилил и т.п.; сложные эфиры, такие как ацетил, трифторацетил и т.п.; и карбонаты. Защитные группы гидроксила также включают защитные группы, подходящие для защиты фенолов.

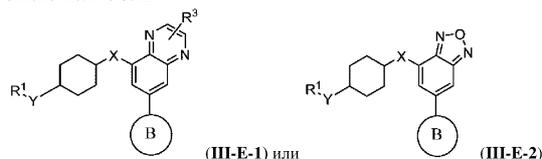
Если не показано или не указано иное, структуры, приведенные в настоящем документе, подразумевают включение всех изомерных (например, энантиомерных, диастереомерных и геометрических (или конформационных)) форм структуры; например, конфигураций R и S для каждого асимметричного центра, (Z) и (E) изомеров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

таких случаях, когда была определена абсолютная конфигурация, хиральный центр(ы) на фигуре обозначают (R) или (S).

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

### Описание соединений

В одном аспекте изобретения представлены соединения, имеющие формулу (III-E-1) или (III-E-2), или их фармацевтически приемлемая соль



X представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

Y представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

R<sup>3</sup> представляет собой водород, C<sub>1-4</sub>-алкил или ОС<sub>1-2</sub>-алкил.

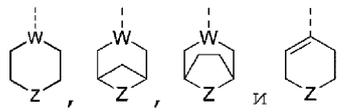
R<sup>1</sup> является 6-членным гетероароматическим кольцом, содержащим один или два атома азота, где гетероароматическое кольцо может быть замещено 0, 1, 2 или 3 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, CN, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-циклоалкила, OR<sup>6</sup>, C(=O)OR<sup>6</sup>, C(=O)NR<sup>7</sup>R<sup>6</sup>, и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>.

Каждый C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкил замещен 0, 1, или 2 группами OR<sup>6</sup>.

Каждый R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкил.

Каждый R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил или C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее 0 или 1 дополнительный атом O или N, где указанное гетероциклическое кольцо может быть замещено C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом или OR<sup>6</sup>.



Кольцо B выбрано из группы, состоящей из:

где W представляет собой N или CR<sup>7</sup> и

Z представляет собой O или S;

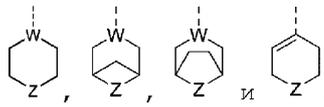
где R<sup>7</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

В другом аспекте R<sup>1</sup> является 6-членным гетероароматическим кольцом, содержащим один или два атома азота, где гетероароматическое кольцо может быть замещено 0, 1, или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>6</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>.

R<sup>6</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

каждый R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил или C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее 0 или 1 дополнительный атом N, где указанное гетероциклическое кольцо может быть замещено C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом.

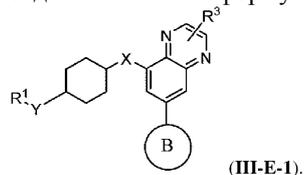


Кольцо B выбрано из группы, состоящей из:

W представляет собой N или CR<sup>7</sup> и

Z представляет собой O или S; где R<sup>7</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

В одном варианте осуществления соединения имеют формулу



В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В другом варианте осуществления X представляет собой NH.

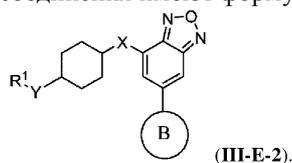
В одном варианте осуществления Y представляет собой O.



W представляет собой N и

Z представляет собой O или S.

В другом варианте осуществления соединения имеют формулу



В другом варианте осуществления X представляет собой NH.

В одном варианте осуществления Y представляет собой O.

В другом варианте осуществления Y представляет собой NH.

В дальнейшем варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH и R<sup>3</sup> является водородом.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>6</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>.

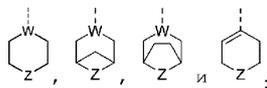
В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено заместителями R<sup>2</sup>, выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>6</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено одним заместителем R<sup>2</sup>, выбранным из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила и C(=O)NHR<sup>6</sup>.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом, и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено одним заместителем R<sup>2</sup>, выбранным из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила и C(=O)NHC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила.

В другом варианте осуществления X представляет собой O, Y представляет собой NH, R<sup>3</sup> является водородом, и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено одним заместителем R<sup>2</sup>, выбранным из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила и C(=O)NHC<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>2</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>;



Кольцо В выбрано из группы, состоящей из

W представляет собой N или CR<sup>3</sup> и

Z представляет собой O или S;

где R<sup>3</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>6</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>;



Кольцо В представляет собой

W представляет собой N или CR<sup>3</sup> и

Z представляет собой O или S;

где R<sup>3</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>2</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>;



Кольцо В представляет собой

W представляет собой N и

Z представляет собой O или S.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила и C(=O)NHR<sup>6</sup>;



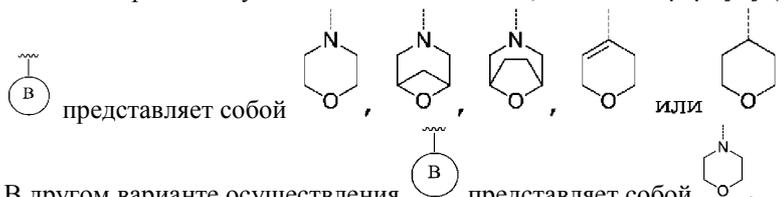
Кольцо В представляет собой  
W представляет собой N и  
Z представляет собой O или S.

В другом варианте осуществления X представляет собой O или NH, Y представляет собой O или NH, R<sup>3</sup> является водородом, и R<sup>1</sup> является пиримидиновым кольцом, которое замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила и C(=O)NH C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкила;



Кольцо В представляет собой  
W представляет собой N и  
Z представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления соединений, имеющих формулу (III-E-1) или (III-E-2),



В другом варианте осуществления представляет собой .

В другом варианте осуществления изобретения представлено соединение, выбранное из группы соединений, перечисленных в табл. 1.

В другом варианте осуществления изобретение представлено соединением, выбранное из группы соединений, перечисленных в табл. 2.

#### Композиции, составы и введение соединений

В еще одном варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение любой из формул, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В другом варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение из табл. 1. В другом варианте осуществления композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство.

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

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

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

При использовании в настоящем документе "лечение" или "лечение", или "облегчение" или "уменьшение тяжести" используются попеременно. Эти термины относятся к подходу для получения полезных или желаемых результатов, включающих, помимо прочего, терапевтический эффект и/или профилактический эффект. Под терапевтическим эффектом подразумевается любое терапевтически значимое улучшение или воздействие на одно или более заболеваний, состояний или симптомов, подвергаемых лечению. Для профилактического эффекта композиции могут вводить субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома или субъекту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже в том случае, если заболевание, состояние или симптом еще могли не проявиться. Такие термины также означают лечение заболевания у млекопитающего, например человека, включающее: (a) ингибирование заболевания, то есть остановку или предотвращение его развития; (b) облегчение заболевания, то есть регрессию патологического состояния; или (c) излечение заболевания.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству средства, которое является достаточным для достижения благоприятных или требуемых результатов. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от одного или бо-

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

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

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

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

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

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

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

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

Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в уровне техники. Например, фармацевтически приемлемые соли подробно описаны в публикации S. M. Berge et al., *J. Pharmaceutical Sciences*, 66:1-19, 1977, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений согласно изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых солей присоединения нетоксичных кислот являются соли аминогруппы, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других способов, применяемых в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, паноат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, суль-

фат, тартрат, роданид, *p*-толуолсульфонат, ундеcanoат, валерат и т.п. Соли, полученные из подходящих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и  $N^+(C_{1-4} \text{ алкил})_4$ . В настоящем изобретении также предусмотрена кватернизация любых содержащих основной азот групп соединений, раскрытых в настоящем документе. Растворимые или диспергируемые в воде или масле продукты могут быть получены путем такой кватернизации. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п. Другие фармацевтически приемлемые соли включают, в соответствующих случаях, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и аминов, образованные с такими противоионами, как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат,  $C_{1-8}$  сульфонат и арилсульфонат.

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

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

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

Для этой цели может использоваться любое нелетучее масло без вкуса и запаха, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, пригодны для изготовления препаратов для инъекций, как и природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в виде их полиоксиэтилиро-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

зиции для перорального введения также могут включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие вещества, подсластители, ароматизаторы и отдушки.

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

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

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

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

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

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

или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Действующие соединения также могут находиться в микрокапсулированной форме с одним или несколькими наполнителями, как указано выше. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пиллюль и гранул могут быть изготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия, покрытия, регулирующие высвобождение, и другими покрытиями, хорошо известными в области производства фармацевтических препаратов. В таких твердых лекарственных формах действующее соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы также могут содержать, что является обычной практикой, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, например смазывающие вещества для таблетирования и другие вспомогательные вещества для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пиллюль лекарственные формы также могут содержать буферные вещества. Они могут необязательно содержать вещества, придающие непрозрачность, а также могут иметь такой состав, что они высвобождают действующее вещество(а) только или предпочтительно в определенной части кишечного тракта, необязательно с задержкой. Примеры образующих матрицу композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

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

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

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

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

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

#### **Применения соединений и композиций**

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы сенсibilизации клетки по отношению к терапевтическому средству или патологическому состоянию, которое вызывает повреждение ДНК, включающие этап контакта клетки с одним или более ингибиторами ДНК-ПК,

раскрытыми в настоящем документе, такими как ингибиторы формулы (III-E-1) или (III-E-2) или их фармацевтически приемлемые соли.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы потенцирования терапевтической схемы лечения рака, включающие этап введения нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества ингибиторов ДНК-ПК, раскрытых в настоящем документе, таких как ингибиторы формулы (III-E-1) или (III-E-2) или их фармацевтически приемлемые соли. В одном аспекте терапевтическая схема лечения рака включает лучевую терапию.

Ингибиторы ДНК-ПК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться в случаях, когда лучевая терапия показана для, повышения терапевтической эффективности такого лечения. Кроме того, лучевая терапия часто показана в качестве вспомогательной процедуры с хирургией при лечении рака. Задача лучевой терапии в качестве вспомогательной процедуры состоит в снижении риска рецидива и улучшении выживаемости без рецидивов при контроле первичной опухоли. Вспомогательная лучевая терапия показана при нескольких заболеваниях, включающих рак толстой кишки, прямой кишки, легкого, гастроэзофагеального перехода и молочной железы, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления еще одно противоопухолевое химиотерапевтическое средство с ингибитором ДНК-ПК, раскрытым в настоящем документе, применяется в терапевтической схеме для лечения рака с или без лучевой терапии. Комбинация ингибитора ДНК-ПК, раскрытого в настоящем документе, с другими такими средствами может потенцировать химиотерапевтический протокол. Например, ингибитор ДНК-ПК, раскрытый в настоящем документе, могут вводить с эпозидом или блеомицином, средствами, которые, как известно, вызывают разрыв цепи ДНК.

В некоторых вариантах осуществления дополнительно раскрыты способы радиосенсибилизации опухолевых клеток с использованием соединения ингибитора ДНК-ПК, раскрытого в настоящем документе. Ингибитор ДНК-ПК, который может "радиосенсибилизировать" клетку, используемый в настоящем документе, определяют как молекулу, предпочтительно молекулу с низкой молекулярной массой, вводимую животным в терапевтически эффективном количестве для повышения чувствительности клеток к электромагнитному излучению и/или эффективности лечения заболеваний, которые поддаются лечению электромагнитным излучением (например, рентгеновским излучением). Заболевания, которые поддаются лечению электромагнитным излучением, включают неопластические заболевания, доброкачественные и злокачественные опухоли и раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе также предложены способы лечения рака у животного, которые включают введение животному эффективного количества ДНК-ПК, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе дополнительно предложены способы ингибирования роста раковых клеток, включающие процессы клеточной пролиферации, инвазивности и метастазирования в биологических системах. Такие способы включают применение ингибитора ДНК-ПК, раскрытого в настоящем документе, в качестве ингибитора роста раковых клеток. В некоторых конкретных вариантах осуществления способы применяются для ингибирования или уменьшения роста раковых клеток, инвазивности, метастазирования или возникновения опухоли у живых животных, таких как млекопитающие. Ингибиторы ДНК-ПК, раскрытые в настоящем документе, могут применяться отдельно или в комбинации с применением ИИ или одного или более химиотерапевтических средств для лечения рака или ингибирования роста раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления такие способы могут быть адаптированы для применения в аналитических системах, например, для анализа роста раковых клеток и их свойств, а также для идентификации соединений, которые влияют на рост раковых клеток.

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

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

пределены в сосудистой или лимфоретикулярной системах.

Активность ДНК-ПК может быть ассоциирована с различными формами рака, например онкологическими заболеваниями у взрослых и детей, ростом солидных опухолей/злокачественных новообразований, миксоидной и круглоклеточной карциномой, локально распространенными опухолями, метастатическим раком, саркомами мягких тканей человека, включая саркому Юинга, раковые метастазы, включая лимфатические метастазы, плоскоклеточную карциному, особенно головы и шеи, плоскоклеточную карциному пищевода, карциному полости рта, гемобластные новообразования, включая множественную миелому, лейкоз, в том числе острый лимфоцитарный лейкоз, острый нелимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз и волосатоклеточный лейкоз, эффузионные лимфомы (лимфомы, локализующиеся в полостях тела), лимфому тимуса, рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, кожную Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак коры надпочечников, АКТГ-продуцирующие опухоли, формы немелкоклеточного рака, рак молочной железы, включая мелкоклеточную карциному и протоковую карциному, формы рака желудочно-кишечного тракта, включая рак желудка, рак толстой кишки, рак прямой кишки, полипы, ассоциированные с колоректальной неоплазией, рак поджелудочной железы, рак печени, злокачественные опухоли мочеполовой системы, включая рак мочевого пузыря, в том числе первичные поверхностные опухоли мочевого пузыря, инвазивную переходно-клеточную карциному мочевого пузыря и мышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, злокачественные новообразования женских половых путей, включая рак яичника, первичные эпителиальные новообразования брюшины, карциному шейки матки, формы рака эндометрия матки, рак влагалища, рак вульвы, рак матки и солидные опухоли овариального фолликула, злокачественные новообразования мужских половых путей, включая рак яичка и рак полового члена, рак почки, включая почечно-клеточную карциному, рак головного мозга, в том числе внутренние опухоли головного мозга, нейробластома, астроцитарные опухоли головного мозга, глиомы, инвазию метастатических опухолевых клеток в центральную нервную систему, формы рака костей, включая остеомы и остеосаркомы, формы рака кожи, включая злокачественную меланому, прогрессирование опухоли из кератиноцитов кожи человека, плоскоклеточный рак, рак щитовидной железы, ретинобластома, нейробластома, выпот в брюшной полости, злокачественный плевральный выпот, мезотелиому, опухоли Вильмса, рак желчного пузыря, трофобластические новообразования, гемангиоперцитому и саркому Капоши. Способы потенцирования лечения этих и других форм рака также раскрыты в настоящем документе.

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

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

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

гена.

Из двух путей репарации ДНК, NHEJ присутствует с гораздо более высокой частотой, при этом имеются сообщения о более чем 70% эффективности, которая может быть достигнута даже в нейронах (Swiech et al., "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9", *Nat Biotechnol.* 2015 Jan; 33(1): 102-62014). С другой стороны, коррекция гена по пути HDR происходит с очень низкой частотой и во время S и G<sub>2</sub> фазы, когда репликация ДНК завершена, и сестринские хроматиды доступны для использования в качестве матриц репарации (Heyer et al., *Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annual Review of Genetics* 44:113-139, 2010). Поскольку NHEJ встречается в течение всего клеточного цикла, в конкуренции и предпочтительно в сравнении с HDR во время S и G<sub>2</sub> фазы, направленная вставка по пути HDR остается сложной задачей и направлением для дальнейших исследований.

ДНК-протеинкиназа (ДНК-ПК) играет роль в различных процессах репарации ДНК. ДНК-ПК участвует в репарации двухцепочечных разрывов ДНК посредством активации пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Считается, что NHEJ проходит в три этапа: распознавание ДЦР, процессинг ДНК с удалением нелигатируемых концов или других форм повреждения на концах и, наконец, лигирование концов ДНК. Распознавание ДЦР осуществляется при связывании Ku гетеродимера с разорванными концами ДНК с последующим рекрутингом двух молекул каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКкс) к обеим сторонам ДЦР; это служит для защиты разрушенных концов, пока не будут привлечены дополнительные процессирующие ферменты. Последние данные подтверждают предположение, что ДНК-ПКкс фосфорилирует процессирующий фермент Artemis, а также саму себя, чтобы подготовить концы ДНК к дополнительному процессингу. В некоторых случаях для синтеза новых концов перед этапом лигирования может требоваться ДНК-полимераза. Считается, что аутофосфорилирование ДНК-ПКкс вызывает конформационные изменения, которые раскрывают центральную ДНК-связывающую полость, высвобождают ДНК-ПКкс из ДНК и облегчают окончательное повторное лигирование концов ДНК.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления вставки, делеции или замены могут быть либо в кодирующей, либо в некодирующей геномной области, в интронных или экзонных областях, или их любых комбинациях, включая их перекрывающиеся или неперекрывающиеся сегменты. При использовании в настоящем документе "некодирующая область" относится к геномным областям, которые не кодируют аминокислотную последовательность. Например, некодирующие области включают интроны. Кодирующие области относятся к геномным областям, которые кодируют аминокислотную последовательность. Например, кодирующие области включают экзоны.

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

стке связывания фактора транскрипции или их любых комбинациях.

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

В некоторых вариантах осуществления способы редактирования одной или более геномных областей-мишеней в клетке(ах) включают введение в клетку(и) системы редактирования генома и ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления клетка(и) синхронизирована в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла. Синхронизация клетки (клеток) в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла может быть достигнута с помощью любого способа, известного в уровне техники. В качестве неограничивающего примера, средства, которые могут использоваться для синхронизации клетки (клеток) в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла, включают афидиколин, гидроксикарбамид, ловастатин, мимозин, нокодазол, тимидин или их любые комбинации (см., Lin et al., "Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery", *Elife*. 2014 Dec 15; 3). В некоторых вариантах осуществления средства для синхронизации клеток могут вводить в любое время в ходе процесса редактирования гена. В некоторых вариантах осуществления клетка(и) может быть синхронизирована в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла до, во время или после введения в клетку(и) системы редактирования генома и/или ингибитора ДНК-ПК.

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

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

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

Путь HDR может быть "каноническим" или "альтернативным". "HDR" (направленная гомологией репарация) относится к специализированной форме репарации ДНК, которая происходит, например, во время репарации двухцепочечных разрывов или ника ДНК в клетке(ах). HDR двухцепочечных разрывов обычно основана на гомологии нуклеотидных последовательностей и использует "донорную" молекулу для направленной матрицей репарации молекулы "мишени" (например, молекулы, в которой образовался двухцепочечный разрыв), и может привести к переносу генетической информации от донора к мишени. Канонический HDR двухцепочечных разрывов обычно основан на BRCA2 и RAD51 и, как правило, использует донорную молекулу дцДНК. Неканонический или "альтернативный" HDR представляет собой

механизм HDR, который подавляют BRCA2, RAD51 и/или функционально близкие гены. Альтернативный HDR может использовать оцДНК или содержащую ники донорную молекулу дцДНК. См., например, WO 2014172458.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Клетка может быть любым видом клетки на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть дифференцированной клеткой, тотипотентной стволовой клеткой, плюрипотентной стволовой клеткой, эмбриональной стволовой клеткой, эмбриональной зародышевой клеткой, взрослой стволовой клеткой, клеткой-предшественником, индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой или их любыми комбинациями. Дифференцированная клетка представляет собой специализированную клетку, которая выполняет определенную функцию в ткани. Тотипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку эмбриона, плода или зрелого организма, которая может делиться в течение длительных периодов времени и способна дифференцироваться в любой тип клеток любого из трех зародышевых слоев организма. Плюрипотентная стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку эмбриона, плода или зрелого организма, которая может делиться в течение длительных периодов времени и способна дифференцироваться в любой тип клеток организма, кроме внезародышевой ткани или плаценты. Эмбриональная стволовая клетка представляет собой недифференцированную стволовую клетку, которая находится во внутренней клеточной массе эмбриона и обладает способностью дифференцироваться в любой тип клеток любого из трех зародышевых слоев. Эмбриональная зародышевая клетка представляет собой эмбриональную клетку, из которой могут образовываться половые клетки, такие как сперматозоиды или яйцеклетки. Взрослая стволовая клетка представляет собой недифференцированную клетку, которая находится в дифференцированной ткани, способна к самообновлению и может дифференцироваться в любую из клеток ткани, в которой она находится. Клетка-предшественник или прогениторная клетка представляет собой частично дифференцированную клетку, которая обычно может дифференцироваться только в один тип клеток (например, унипотентную клетку). Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка представляет собой тип плюрипотентной стволовой клетки, которая образуется из взрослой дифференцированной или частично дифференцированной клетки. См., например, WO/2010/017562.

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

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

когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

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

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

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

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

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

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

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

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

пептидомиметики.

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

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к векторным системам, включающим один или более векторов, или векторам как таковым. Векторы могут быть разработаны для экспрессии CRISPR транскриптов (например, транскриптов нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Например, CRISPR транскрипты могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia coli*, клетки насекомых (с использованием бакуловирусных векторов экспрессии), дрожжевые клетки или клетки млекопитающих.

Клетки могут быть первичными клетками, индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (иПСК), эмбриональными стволовыми клетками (чЭСК), взрослыми стволовыми клетками, клетками-предшественниками или клеточными линиями. "Первичные клетки" представляют собой клетки, взятые непосредственно из живой ткани и помещенные в пробирку для роста. Первичные клетки имеют небольшой уровень удвоения популяции и имеют конечную продолжительность жизни в течение удвоенной популяции *in vitro*. "Стволовые клетки", "эмбриональные стволовые клетки" и "индуцированные плюрипотентные стволовые клетки" являются неспециализированными и недифференцированными клетками, способными к самообновлению и обладающими потенциалом к дифференцировке в клетки разных типов со специализированной функцией. "Клеточные линии" включают культуры клеток, полученные из клеток одного типа или набора клеток одного типа, которые могут размножаться неограниченное время.

Неограничивающие примеры линий клеток млекопитающих могут включать клетки CD34, клетки 293, клетки НЕК, клетки СНО, клетки ВНК, клетки CV-1, клетки Jurkat, клетки HeLa или их любые варианты.

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

При использовании в настоящем документе термины "метка" или "меченый" относятся к включению детектируемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, содержащего стрептавидин флуоресцентного маркера или ферментативной активности, которая может быть обнаружена с помощью оптических или калориметрических методов). В некоторых ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в уровне техники и могут использоваться. Примеры меток для полипептидов включают, без ограничения перечисленными, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментные метки (например, пероксидазу хрена,  $\beta$ -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные, биотинильные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, сайты связывания вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки прикрепляют к спейсерным группам различной длины для уменьшения потенциального стерического затруднения. Термин "фармацевтическое или лекарственное средство" при использовании в настоящем документе относится к химическому соединению или композиции, которые способны оказывать требуемое терапевтическое действие при надлежащем введении пациенту.

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

от всех присутствующих макромолекулярных соединений.

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

#### **Система редактирования генома**

Могут использоваться различные типы систем модификации генома. Термины "система редактирования генома", "система редактирования гена" и т.п. используется попеременно в настоящем документе и относятся к системе или технологии, которая позволяет редактировать ген-мишень или его функцию или экспрессию. Система редактирования генома включает: по меньшей мере один эндонуклеазный компонент, обеспечивающий возможность расщепления геномной области(ей)-мишени(ей) (или последовательности(ей)-мишени(ей)); и по меньшей мере один геном-направляющий элемент, который вводит или направляет эндонуклеазный компонент в геномную область(и)-мишень(и). Примеры геном-направляющего элемента включают ДНК-связывающий домен (например, цинк-пальцевый ДНК-связывающий белок или TALE ДНК-связывающий домен), элементы гидовой РНК (например, гидовую РНК CRISPR) и элементы гидовой ДНК (например, гидовую ДНК NgAgo). Программируемые геном-направляющие и эндонуклеазные элементы позволяют производить точное редактирование генома путем введения разрывов ДНК, таких как двухцепочечные разрывы (ДЦР), в определенные геномные локусы. Затем ДЦР привлекают эндогенный репарационный аппарат для негомологичного соединения концов (NHEJ) или направленной гомологией репарации (HDR) к участку ДЦР, опосредуя редактирование генома. "Эндонуклеазный компонент" включает эндонуклеазу или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую такую эндонуклеазу.

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

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

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

Расщепляющий полудомен может быть получен из любой нуклеазы или ее части, как указано выше, которая требует димеризации для расщепляющей активности. В некоторых вариантах осуществления для расщепления требуются два слитых белка, если слитые белки включают расщепляющие полудомены. В некоторых вариантах осуществления может использоваться один белок, включающий два расщепляющих полудомена. В некоторых вариантах осуществления два расщепляющих полудомена могут быть получены из одной и той же эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов). В некоторых вариантах осуществления расщепляющие полудомены могут быть получены из разных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, сайты-мишени для двух слитых белков предпочтительно расположены друг относительно друга так, что связывание двух слитых белков с их соответствующими сайтами-мишенями помещает расщепляющие полудомены в такой пространственной ориентации по от-

ношению друг к другу, которая позволяет расщепляющим полудоменам формировать функциональный расщепляющий домен, например, путем димеризации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления близкие края сайтов-мишеней разделены 5-50 нуклеотидами, 5-8 нуклеотидами или 15-18 нуклеотидами. Следует отметить, что между двумя сайтами-мишенями может быть расположено любое целое количество нуклеотидов или пар нуклеотидов (например, от 2 до 50 пар нуклеотидов или больше). В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления находится между сайтами-мишенями.

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

В некоторых вариантах осуществления эндонуклеазный компонент включает слитый белок(и), который включает расщепляющий домен (или расщепляющий полудомен) по меньшей мере из одной рестриктазы IIS и один или более связывающих цинк-пальцевых доменов, которые могут быть сконструированными или нет. Примером рестриктазы типа IIS, расщепляющий домен которой можно отделить от связывающего домена, является Fok I. Этот конкретный фермент активен в виде димера (Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575). Часть фермента Fok I, используемая в таких слитых белках, считается расщепляющим полудоменом. Таким образом, для направленного расщепления двойной цепи и/или направленной замены клеточных последовательностей с использованием слитых цинк-пальцевых или TALE-Fok I конструкций могут использоваться два слитых белка, каждый из которых содержит расщепляющий полудомен Fok I, с восстановлением каталитически активного расщепляющего домена. В альтернативе можно также использовать одну полипептидную молекулу, содержащую связывающий цинк-пальцевый домен и два расщепляющих полудомена Fok I.

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

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

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

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

Под "геномной областью-мишенью", "геном-мишенью", "ДНК-мишенью", "ДНК последовательностью-мишенью", "последовательностью-мишенью", "нуклеотидной последовательностью-мишенью", "сайтом-мишенью", "мишенью", "сайтом, представляющим интерес", "сайтом распознавания", "сайтом распознавания полинуклеотида", "последовательностью распознавания", "сайтом расщепления" подразумевается полинуклеотидная последовательность, которую распознает и расщепляет система редактирования генома. Эти термины относятся к определенному положению ДНК, предпочтительно геномному положению, в котором образование разрыва (расщепление) ДНК должно быть вызвано системой редактирования генома.

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

темой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo.

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

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

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-MfiI, PI-MgaI, PI-MgoI, PI-MinI, PI-MkaI, PI-MleI, PI-MmaI, PI-MshI, PI-MsmI, PI-MthI, PI-MtuI, PI-MxeI, PI-NpuI, PI-PfuI, PI-RmaI, PI-SpbI, PI-SspI, PI-FacI, PI-MjaI, PI-PhoI, PI-TagI, PI-ThyI, PI-TkoI, PI-TspI или I-MsoI;

или может быть их функциональный мутант или вариант, гомодимерный, гетеродимерный или мономерный. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG является производной I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG обладает по меньшей мере 80% подобием с природной LAGLIDADG мегануклеазой I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG обладает по меньшей мере 80% подобием с остатками 1-152 природной LAGLIDADG мегануклеазы I-CreI. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза LAGLIDADG может состоять из двух мономеров, обладающих по меньшей мере 80% подобием с остатками 1-152 природной LAGLIDADG мегануклеазы I-CreI, которые соединены с или без линкерного пептида.

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

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

Функции распознавания и расщепления ДНК у мегануклеаз, как правило, объединены в одном домене. В отличие от мегануклеаз, ДНК-связывающие домены систем на основе ZFN и TALEN отличаются от эндонуклеазы функцией расщепления. Система на основе ZFN включает: по меньшей мере один цинк-пальцевый белок или его вариант или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую цинк-пальцевый белок или его вариант в качестве его ДНК-связывающего домена; и эндонуклеазный элемент, такой как расщепляющий домен цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или FokI. Цинк-пальцевый белок (ZFP) не является природным, так как он предназначен для связывания с выбранным сайтом-мишенью. См., например, Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct Biol. 10:411-416; патенты США 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273 и патентные публикации США 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061.

Сконструированный цинк-пальцевый связывающий домен может обладать новой специфичностью связывания по сравнению с природным цинк-пальцевым белком. Методы инженерии включают, без ограничения перечисленными, рациональный дизайн и различные типы отбора. Рациональный дизайн включает, например, использование баз данных, содержащих триплетные (или квадруплетные) нуклеотидные последовательности и отдельные аминокислотные последовательности цинковых пальцев, в которых каждая триплетная или квадруплетная нуклеотидная последовательность связана с одной или более аминокислотными последовательностями цинковых пальцев, которые связывают конкретную триплетную или квадруплетную последовательность. См., например, патенты США 6453242 и 6534261, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки.

Различные типы способов отбора могут использоваться в сочетании со способами в настоящем документе. Примерные способы отбора, включая фаговый дисплей и двухгибридные системы, раскрыты в патентах США 5789538; 5925523; 6007988; 6013453; 6410248; 6140466; 6200759 и 6242568; а также в WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 и GB 2338237. Кроме того, улучшение специфичности связывания цинк-пальцевых связывающих доменов было описано, например, в WO 02/077227. Кроме того, как раскрыто в этих и других ссылках, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть соединены друг с другом при использовании любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или больше аминокислот. См., также, патенты США 6479626; 6903185 и 7153949 по поводу примерных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Белки, описанные в настоящем документе, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. Выбор сайтов-мишеней; ZFP и способов дизайна и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области и подробно описаны в патентах США 61400815; 789538; 6453242; 6534261; 5925523; 6007988; 6013453; 6200759; 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, цинк-пальцевые домены и/или мультипальцевые цинк-пальцевые белки могут быть соединены друг с другом при использовании любых подходящих линкерных последовательностей, включающих, например, линкеры длиной 5 или больше аминокислот. См., также патенты США 6479626; 6903185 и 7153949 по поводу примерных линкерных последовательностей длиной 6 или больше аминокислот. Белки, описанные в настоящем документе, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

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

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

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

которые гибридизуются в строгих условиях.

Элемент гидовой РНК может дополнительно включать активаторную РНК, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, включающую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК. Активаторная РНК и направляющая РНК могут быть разделены или слиты в одной нуклеиновой кислоте через последовательность линкерной петли с получением одной молекулы гРНК. Молекула гРНК может содержать некоторое количество доменов. Например, такая гРНК включает, например, от 5' к 3': направляющий домен (который комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени); первый комплементарный домен; соединительный домен; второй комплементарный домен (который комплементарен первому комплементарному домену); проксимальный домен; и, необязательно, хвостовой домен. См. WO 2015048557.

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

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

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

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

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

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

Способы конструирования молекул гРНК известны в уровне техники, включая способы отбора, конструирования и подтверждения домена-мишени. См., например, WO 2015048577, 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 Pub-Med PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014 BIOINFORMATICS Pub Med PMID: 24389662.

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

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

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

Белок Cas представляет собой CRISPR-ассоциированную (Cas) двухцепочечную нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR-Cas содержит белок Cas9. В некоторых вариантах осу-

ществления белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазу. Термин "белок Cas", такой как белок Cas9, включает белок Cas дикого типа или его функциональные производные (такие как усеченные версии или варианты белка Cas дикого типа с нуклеазной активностью).

В некоторых вариантах осуществления могут использоваться белки Cas9 из видов кроме *S. pyogenes* и *S. thermophiles*. Дополнительные виды белка Cas9, которые могут быть получены и могут использоваться в настоящем документе, включают

*Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *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*, *Gammaproteobacterium*, *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 *Verminephrobactereiseniae*.

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

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

Последовательность или матрица, которая может использоваться для рекомбинации в целевой локус, содержащий последовательности-мишени, называется "редактирующей матрицей" или "редактирующим полинуклеотидом", или "редактирующей последовательностью". Экзогенный матричный полинуклеотид может называться редактирующей матрицей или донорной матрицей. В некоторых вариантах осуществления может использоваться одноцепочечная ДНК и двухцепочечная ДНК синтетического или биологического происхождения. В качестве неограничивающего примера, подходящие редактирующие матрицы включают оцОДН, дцОДН, продукты ПЦР, плазмиды и вирусы, включая AAV, аденовирус, ретровирус, лентивирус и т.д. Также возможны дополнительные редактирующие матрицы. В некоторых вариантах осуществления рекомбинация является гомологичной рекомбинацией.

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

Общую информацию о системах CRISPR-Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, в том

числе способах, материалах, средствах доставки, векторах, частицах, AAV, а также их получении и применении, включая количества и составы, можно найти в: патентах США 8999641, 8993233, 8945839, 8932814, 8906616, 8895308, 8889418, 8889356, 8871445, 8865406, 8795965, 8771945 и 8697359; патентных публикациях США US 2014-0310830, US 2014-0287938 A1, US 2014-0273234 A1, US 2014-0273232 A1, US 2014-0273231, US 2014-0256046 A1, US 2014-0248702 A1, US 2014-0242700 A1, US 2014-0242699 A1, US 2014-0242664 A1, US 2014-0234972 A1, US 2014-0227787 A1, US 2014-0189896 A1, US 2014-0186958, US 2014-0186919 A1, US 2014-0186843 A1, US 2014-0179770 A1 и US 2014-0179006 A1, US 2014-0170753; европейских патентах EP 2784162 B1 и EP 2771468 B1; Европейских заявках на патент EP 277168 (EP13818570.7), EP 2764103 (EP 13824232.6) и EP 2784162 (EP 14170383.5); и патентных публикациях PCT WO 2014/093661, WO 2014/093694, WO 2014/093595, WO 2014/093718, WO 2014/093709, WO 2014/093622, WO 2014/093635, WO 2014/093655, WO 2014/093712, WO2014/093701, WO 2014/018423, 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 является системой CRISPR-Cpf. "Система CRISPR-Cpf" содержит: (a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент гидовой РНК, где гидовая РНК содержит направляющую РНК, имеющую нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности в локусе нуклеиновой кислоты-мишени; и (b) элемент белка Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую элемент белка Cpf.

Пример элемента белка Cpf включает нуклеазы Cpf1, такие как Cpf1 Francisella (FnCpf1) и их любые варианты. См., например, Zetsche et al., "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system", Cell, 163(3): pages 759-71; and Fonfara et al., "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", Nature 532 (7600): стр. 517-21. Предпочтительным PAM для Cpf1 является 5'-TTN, отличающийся от PAM Cas9 (3'-NGG) как геномным положением, так и GC-составом. В системе CRISPR-Cpf может не использоваться активаторная РНК (tracrRNA). Как Cpf1, так и его гидовые РНК обычно меньше, чем их аналоги SpCas9. Локус Cpf1 содержит смешанный альфа/бета домен, RuvC-I, после которого расположена спиральная область RuvC-II и домен, подобный цинковому пальцу. Белок Cpf1 имеет RuvC-подобный эндонуклеазный домен, который аналогичен домену RuvC Cas9. Кроме того, Cpf1 не имеет HNH эндонуклеазный домен, и N-концевой Cpf1 не имеет альфа-спирального распознающего сегмента Cas9. Локусы Cpf1 кодируют белки Cas1, Cas2 и Cas4, в большей степени подобные система I и III типа, чем II типа. Белки семейства Cpf1 могут быть обнаружены во многих видах бактерий.

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

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

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

#### **Ингибиторы ДНК-ПК для увеличения эффективности геномного редактирования**

Эффективность направленного редактирования генома может быть повышена путем введения в клетку(и) одного или более соединений (например, ингибиторов ДНК-ПК), описанных в настоящем документе, и системы редактирования генома. Системы редактирования генома, подходящие для применения, включают, например, систему на основе мегануклеазы, систему на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), систему на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), систему на основе CRISPR или систему на основе NgAgo. Способы, композиции и наборы согласно изобретению обеспечивают ингибиторы ДНК-ПК и/или систему редактирования генома для повышения эффективности редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления эффективность HDR редакти-

рования генома повышается после введения в клетку(и) ингибитора ДНК-ПК.

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

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

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR включает РНК, содержащую последовательность CRISPR (*cr*РНК), РНК, содержащую транскрибирующую *cr* (*tracr*) последовательность (*tracr*РНК), и эндонуклеазу Cas или их любые комбинации.

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

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома на основе CRISPR представляет собой систему CRISPR-Cpf. Нуклеаза Cpf является эндонуклеазой системы CRISPR-Cas 2 класса. Cpf представляет собой эндонуклеазу, направляемую одиночной РНК. Нуклеаза Cpf может быть дикого типа, сконструированной или мутантной нказой, или их любыми вариациями. См., например, Zetsche et al., "CPF1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", *Cell*, 163(3):759-71. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cpf представляет собой эндонуклеазу Cpf1.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы. В редактировании генома на основе мегануклеазы используются сиквенс-специфические эндонуклеазы, распознающие большие сайты-мишени ДНК (например, как правило, приблизительно >12 пн). См., например, U.S. 9,365,964. Мегануклеазы могут расщеплять уникальные хромосомные последовательности, не воздействуя на общую целостность генома. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза может быть хоуминг-эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления мегануклеаза может быть интрон-эндонуклеазой или интеин-эндонуклеазой. Хоуминг-эндонуклеазы могут принадлежать семейству LAGLIDADG. Мегануклеазы могут быть дикого типа, сконструированными или мутантными нказами.

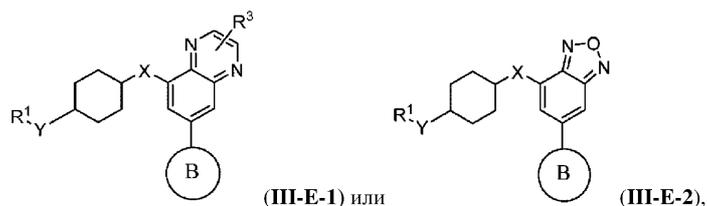
В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена является системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). ZFN представляет собой искусственную рестриктазу, сконструированную на основе слияния цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена и ДНК-расщепляющего домена. См., например, U.S. 9145565.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования гена представляет собой подобную активаторам транскрипции эффекторную нуклеазу (TALEN). Нуклеазы TALEN представляют собой сконструированные рестриктазы, полученные путем слияния TAL эффекторного ДНК-связывающего домена с ДНК-расщепляющим доменом. См., например, U.S. 9181535.

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

Ингибиторы ДНК-ПК могут быть любым ингибитором ДНК-ПК. Ингибитор ДНК-ПК может быть любым соединением или веществом, которое вызывает ингибирование ДНК-ПК. Ингибитор ДНК-ПК может быть соединением, малой молекулой, антителом или нуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК являются соединениями, представленными формулой (III-E-1) или (III-E-2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой (III-E-1) или (III-E-2):



где

X представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил;

Y представляет собой O или NR; где R представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил;

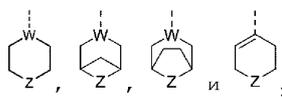
R<sup>3</sup> представляет собой водород, C<sub>1-4</sub>-алкил или ОС<sub>1-2</sub>-алкил;

R<sup>1</sup> является 6-членным гетероароматическим кольцом, содержащим один или два атома азота, где гетероароматическое кольцо может быть замещено 0, 1 или 2 заместителями R<sup>2</sup>, независимо выбранными из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-галогеналкила, C(=O)NHR<sup>2</sup> и NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>; где

R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-4</sub>-алкил,

каждый R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил или C(=O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил; или

R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее 0 или 1 дополнительный атом N, где указанное гетероциклическое кольцо может быть замещено C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом; и



Кольцо B выбрано из группы, состоящей из

где W представляет собой N или CR<sup>3</sup> и

Z представляет собой O или S;

где R<sup>3</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложен способ редактирования одной или более геномных областей-мишеней, включающий введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой (III-E-1) или (III-E-2), или его фармацевтически приемлемых солей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областей-мишеней по пути направленной гомологии репарации (HDR), где способ включает введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой (III-E-1) или (III-E-2)), или его фармацевтически приемлемых солей.

Система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) геномных областей-мишеней, что приводит к образованию разрыва ДНК, и где разрыв ДНК подвергается репарации, по меньшей мере частично, по пути HDR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областей-мишеней по пути NHEJ, где способ включает введение в одну или более клеток, которые содержат одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой (III-E-1) или (III-E-2)), или его фармацевтически приемлемых солей.

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

В некоторых вариантах осуществления изобретения также предложен способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий введение в одну или более клеток, включающих одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, представленного формулой (III-E-1) или (III-E-2), или его фармацевтически приемлемых солей.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления эффективность повышена по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз по сравнению с эффективно-

стью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления клетка синхронизирована в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла.

В некоторых вариантах осуществления одна или более клеток, которые подвергаются введению или контакту с указанным соединением, имеют повышенное выживание по сравнению с одной или более клетками, которые не подвергались введению или контакту с указанным соединением.

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

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

В некоторых вариантах осуществления организмом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления организмом является человек.

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

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

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

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

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

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

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

мишенях; и (b) элемент белка Crf, содержащий белок Crf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Crf.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляет синтетическая РНК.

В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генома доставляют наносоставом.

В некоторых вариантах осуществления предложен набор или композиция для редактирования одной или более геномных областей-мишеней. В некоторых вариантах осуществления набор или композиция содержит систему редактирования генома; и соединение, представленное формулой (III-E-1) или (III-E-2), или его фармацевтически приемлемые соли.

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

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

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

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

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

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

#### **Применение ингибиторов ДНК-ПК и систем редактирования генома, наборов и композиций**

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

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

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

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

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

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

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

Специалисту в данной области будет известно, что заболевания, приобретенные или наследственные, или полученные иным образом, включают нарушение регуляции гомеостатических механизмов, включая участие функции гена или белка. С этой целью специалист может применить способы, предложенные в настоящем документе, для модуляции, модификации, повышения, снижения или обеспечения иным образом функции гена у субъекта.

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

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

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

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

ластому, опухоль головного мозга, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга, глиому зрительного пути и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциномы, лимфому Беркитта, карциномидную опухоль у детей, карциномидную опухоль, желудочно-кишечного тракта, карциному без выявленного первичного очага, лимфому центральной нервной системы, первичную, астроцитому мозжечка у детей, астроцитому мозга/злокачественную глиому у детей, рак шейки матки, детский рак, хондросаркому, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелолипролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, эпителиоидную гемангиоэндотелиому (ЕНЕ), рак пищевода, саркому Юинга семейства опухолей Юинга, опухоль экстракраниальных половых клеток, опухоль экстрагонадных половых клеток, рак внепеченочных желчных протоков, рак глаза, внутриглазную меланому, рак глаза, ретинобластому, рак желчного пузыря, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), опухоль из зародышевых клеток: экстракраниальную, экстрагонадную или овариальную, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, астроцитому мозга у детей, глиому, зрительных путей и гипоталамуса у детей, карциномид желудка, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак (печени), лимфому Ходжкина, гипофарингеальный рак, глиому гипоталамуса и зрительного пути у детей, внутриглазную меланому, карциному из островковых клеток (эндокринной ткани поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (почечноклеточный рак), рак гортани, лейкозы, лейкоз, острый лимфобластный (также называемый острым лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, острый миелоидный (также называемый острым миелогенным лейкозом), лейкоз, хронический лимфоцитарный (также называемый хроническим лимфоцитарным лейкозом), лейкоз, хронический миелогенный (также называемый хроническим миелоидным лейкозом), лейкоз, волосатоклеточный, рак губы и полости рта, липосаркому, рак печени (первичный), рак легкого, немелкоклеточный, рак легкого, мелкоклеточный, лимфомы, СПИД-ассоциированную лимфому, лимфому Беркитта, Т-клеточную лимфому кожи, лимфомы Ходжкина, неходжкинскую (старая классификация всех лимфом кроме лимфомы Ходжкина) лимфому, первичную центральной нервной системы, макроглобулинемию, Вальденстрема, рак молочной железы у мужчин, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланому у детей, меланому, интраокулярную (глаза), рак из клеток Меркеля, мезотелиому, злокачественную мезотелиому взрослых, детский метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмноклеточную неоплазию, грибовидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолипролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз взрослых, детскую острую миелому, множественную (рак костного мозга), миелолипролиферативные нарушения, хроническую миксому, рак полости носа и околоносовых пазух, карциному носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легкого, олигодендроглиому, рак ротовой полости, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичника, эпителиальный рак яичника (поверхностную эпителиально-стромальную опухоль), опухоль яичника из зародышевых клеток, опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы из островковых клеток, рак околоносовых пазух и полости носа, рак парашитовидной железы, рак полового члена, фарингальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидной железы, герминому шишковидной железы, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточную неоплазию/множественную миелому, плевроролочную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному (рак почки), рак почечной лоханки и мочеточника, переходноклеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому, семейства опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (не меланому), рак кожи (меланому), карциному кожи, из клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному - рак кожи (не меланому), плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным очагом, метастатический, рак желудка, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, Т-клеточную лимфому, кожную (грибовидный микоз и синдром Сезари), рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, рак почечной лоханки и мочеточника, гестационную трофобластическую опухоль, карциному без выявленного первичного очага взрослых, рака без выявленного первичного очага, детский, мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточный рак, рак уретры, рак матки, рак эндометрия, саркому матки, рак влагалища, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема или опухоль Вильмса (рак почки).

В некоторых вариантах осуществления примеры генов-мишеней, ассоциированных с раком, включают

ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, AT1, AKT2, ALDH2, AL, AL017, APC, ARHGEF12, ARHN, ARID1A,

ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, AXIN1, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPRIA, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIPI, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, C2orf44, CAMTA1, CANT1, CARD11, CARS, CBFA2T1, CBFA2T3, C.BFB, CBL, CBLB, CBLC, CCDC6, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CD N2A, CD N2a(p14), CD N2C, CDX2, CEBPA, CEPI, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHN1, CIC, Cin A, CLTC, CLTCL1, CMKOR1, CNOT3, COL1A1, COPEB, COX6C, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC3, CTNNB1, CYLD, D10S170, DAXX, DDB2, DDIT3, DDX10, DDX5, DDX6, DEK, D1CER1, DNM2, DNMT3A, DUX4, EBF1, ECT2L, EGFR, E1F4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS 15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EVII, EWSR1, EXTI, 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, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, H3F3A, IICMOGT-1, IIEAB, HERPUD1, IIEY1, IIIPI, HIST1H3B, HIST1H4I, HLF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2BI, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, HRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH, IGK, IGL, IKZF1, IL2, TL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIF5B, KIT, KLF4, KLK2, KRAS, KTN1, LAF4, LASP1, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LMO2, LPP, LRIG3, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2KL, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLIII, MLL, MLL2, MLL3, MLLT1, MLLT10, MLLT2, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MLLT7, MN1, MPL, MSF, MSH2, MSH6, MSI2, MSN, MTCP1, MUC1, MUTYH, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYH11, MYH9, MYST4, NACA, NBS1, NCOA1, NCOA2, NCOA4, NDRG1, NF1, NF2, NFE2L2, NFIB, NFKB2, NIN, NKX2-1, NONO, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NR4A3, NRAS, NSD1, NT5C2, NTRK1, NTRK3, NUMA1, NUP214, NUP98, OLIG2, OMD, P2RY8, PAFAH1B2, PALB2, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBRM1, PBX1, PCM1, PCSK7, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PIIF6, PHOX2B, PICALM, PIK3CA, PIK3R1, PIM1, PLAG1, PML, PMS1, PMS2, PMX1, PNUTL1, POT1, POU2AF1, POU5F1, PPARG, PPP2R1A, PRCC, PRDM1, PRDM16, PRF1, 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, SSX1, SSX2, SSX4, STAT3, STK11, STL, SUFU, SIJZ12, SYK, TAF15, TALI, TAL2, TCEA1, TCF1, TCF12, TCF3, TCF7L2, TCL1A, TCL6, TERT, TET2, TFE3, TFEB, TFG, TFPT, TERC, THRAP3, TIF1, TLX1, TLX 3, TMPRSS2, TNFAIP3, TNFRSF14, TNFRSF17, TNFRSF6, TOPI, TP53, TPM3, TPM4, TPR, TRA, TRAF7, TRB, TRD, TRIM27, TRIM33, TRIP11, TSC1, TSC2, TSHR, TTL, U2AF1, USP6, VHL, VTUA, WAS, WHSC1, WHSC1L1, WIF1, WRN, WT1, WTX, WWTR1, XPA, XPC, XPO1, YWHAЕ, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2

или их любые комбинации.

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

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

рушением.

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

В некоторых вариантах осуществления наследственным нарушением является синдром делеций 1р36, синдром делеций 18р, дефицит 21-гидроксилазы, 47 XXX (синдром трисомии по X-хромосоме), 47 XXУ (синдром Клайнфельтера), 5-АЛК-дегидратаза-дефицитная порфирия, дефицит АЛК-дегидратазы, порфирия, вызванная дефицитом дегидратазы 5-аминолавулиновой кислоты, синдром делеций 5р, синдром кошачьего крика (или 5р-синдром), атаксия телеангиэктазия (или АТ), дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТ), ацерулоплазминемия, ахондрогенез II типа (АСG2), ахондроплазия (АСН), дефицит кислот бета-глюкозидазы, болезнь Гоше (любого типа, например, 1 типа, 2 типа, 3 типа), акроцефалосиндактилия (Апера), синдром Апера, акроцефалосиндактилия (любого типа, например, 1 типа, 2 типа, 3 типа, 5 типа), синдром Пфайффера, АКРОЦЕФАЛИЯ, острая церебральная болезнь Гоше, острая перемежающаяся порфирия, дефицит АСУ2 (АИР), болезнь Альцгеймера (БА), краниосиностоз типа Аделаида, синдром Мюнке, аденоматозный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, аденоматозный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз (САП), дефицит аденилосукцинатазы, нарушения надпочечников, адреногенитальный синдром, адренолейкодистрофия, синдром нечувствительности к андрогенам (СНА), алкаптонурия (АКУ), порфирия АЛК-дегидратазы, АЛК-D порфирия, дефицит АЛК-дегидратазы, синдром Алажиля, альбинизм, алкаптонурия, алкаптонурия, болезнь Александра, алкаптонурия, алкаптонурический охроноз, алкаптонурия, болезнь ингибитора альфа-1-протеиназы, альфа-1 связанная эмфизема, дефицит альфа-галактозидазы, болезнь Фабри, синдром Альстрема, болезнь Александра (ALX), несовершенный амелогенез, дефицит дегидратазы аминокислоты, дефицит аминокислоты 2, болезнь Канавана, болезнь Андерсона-Фабри, синдром нечувствительности к андрогенам, анемия, наследственная сидеробластная, X-сцепленная сидеробластная анемия селезеночная и/или семейная анемия, ангиокератома туловища диффузная, диффузная ангиокератома, ангиоматоз сетчатки, болезнь фон Гиппеля-Линдау, резистентность к АПС, Лейденского типа, тромбофилия при Лейденской мутации фактора V, синдром Апера, дефицит AR, синдром нечувствительности к андрогенам, болезнь Шарко-Мари-Тута (любого типа, например, СМТ1, СМТХ, СМТ2, СМТ4, тяжелая ШМТ с ранним началом), арахнодактилия, синдром Марфана, ARNSHL, внесиндромная глухота (аутосомно-рецессивная, аутосомно-доминантная, X-сцепленная или митохондриальная), артроофтальмопатия, наследственная прогрессирующая, синдром Стиклера (например, COL2A1, COL11A1, COL11A2, COL9A1), артрохалазия множественная врожденная, синдром Элерса-Данлоса (например, тип гиперподвижности, тип артрохалазии, классический тип, сосудистый тип, тип кифосколиоза, тип дерматоспараксиса) дефицит Asp, дефицит Aspa, дефицит аспартоацилазы, атаксия телеангиэктазия, синдром аутизма-деменции-атаксии-потери целевого использования рук, синдром Ретта, аутосомно-доминантный ювенильный АБС, аутосомно-доминантный синдром Опица G/BBB, аутосомно-рецессивная форма ювенильного АБС 3 типа, амиотрофический боковой склероз (любого типа; например, ALS1, ALS2, ALS3, ALS4, ALS5, ALS5, ALS6, ALS7, ALS8, ALS9, ALS10, ALS11, ALS12, ALS13, ALS14, ALS15, ALS16, ALS17, ALS18, ALS19, ALS20, ALS21, ALS22, FTDALS1, FTDALS2, FTDALS3, FTDALS4, FTDALS4, IBMPFD2), аутосомно-рецессивная внесиндромная потеря слуха, аутосомно-рецессивная сенсоневральная тугоухость и зоб, синдром Пендреда, болезнь Александра (AxD), синдром Айерсы, семейная легочная артериальная гипертензия, В вариант гексозаминидаза GM2 ганглиозидоза, болезнь Сандхоффа, BANF-связанное нарушение, нейрофиброматоз (любого типа, например, NF1, NF2, шванноматоз), синдром складчатой кожи Бира-Стивенсона, доброкачественный пароксизмальный перитонит, синдром Бенджамина, бета-талассемия, дефицит ВН4, дефицит тетрагидробиоптерина, двусторонний нейрофиброматоз слухового нерва, дефицит биотинидазы, рак мочевого пузыря, нарушения свертываемости крови, тромбофилия с Лейденской мутацией фактора V, синдром Блоха-Сульцбергера, недержание пигмента, синдром Блума, заболевания костей, болезнь Бурневилля, туберозный склероз, Болезни мозга, прионная болезнь, рак молочной железы, синдром Бирта-Хогга-Дюба, болезнь хрустального человека, несовершенный остеогенез, синдром широкого большого пальца кистей и стоп, синдром Рубинштейна-Тэйби, бронзовый диабет, гемохроматоз, пигментный цирроз, бульбоспинальная мышечная атрофия, X-сцепленная бульбоспинальная мышечная атрофия, синдром Бюргера-Грютца, липопротеиновый дефицит липазы, семейный CADASIL синдром, CGD хроническое гранулематозное нарушение, кампомелическая дисплазия, семейный синдром рака, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, дефицит карбоксилазы, множественный биотинидазный дефицит с поздним началом, синдром кошачьего крика, кардиофациальный синдром Caylog, тригексоидазцерамидная недостаточность, цереброретинальный ангиоматоз, семейная болезнь фон Гиппеля-Линдау, церебральная артериопатия, синдром CADASIL, церебральная аутосомно доминантная артериопатия, синдром CADASIL, церебротрофическая гиперамниемия, синдром Ретта, церебродизоз, болезнь

Шарко, синдром CHARGE, хондродистрофия, синдром хондродистрофии, хондродистрофия с нейросенсорной глухотой, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, недостаточность хондрогенеза, синдром гиперурикемии членовредительства хорееатетоза, синдром Леша-Нихена, классическая галактоземия, галактоземия, врожденная расщелина губы и неба, синдром Стиклера, Трилистниковидный череп с танатофорной карликовостью, танатофорной дисплазией (например, типа 1 или типа 2), синдром Коффина-Лоури (CLS), синдром Коккейна, синдром Коффина-Лоури, коллагенопатия типы II и XI, семейный неполипоз, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, семейный рак толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, рак толстой и прямой кишки, полная ГФРТ недостаточность, синдром Леша-Нихена, полная недостаточность гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы, компрессионная невропатия, наследственная невропатия со склонностью к параличам от сдавления, коллагеноз, кардиофациальный синдром, анемия Кули, бета-талассемия, болезнь накопления меди, болезнь Вильсона, болезнь транспорта меди, болезнь Менкеса, копропорфирия, наследственная копропорфирия, дефицит оксидазы копропорфириногена, синдром Каудена, дефицит СРХ, черепно-лицевой дизартроз, синдром Крузона, черепно-лицевой дизостоз, синдром Крузона, болезнь Крона, фиброstenоз, синдром Крузона, синдром Крузона с черным акантозом, синдром Крузона черепно-лицевой, синдром Коккейн (CS), синдром Каудена, синдром Куршманна-Баттена-Штейнерта, синдром пахидермии складчатой Бира-Стивенсона, Бира-Стивенсона пахидермии складчатой синдром, дефицит D-глицерат дегидрогеназы, первичная гипероксалурия, синдром пятнистых метафизов, спондилоэпиметафизарная дисплазия, тип Струдивика, деменция альцгеймеровского типа (DAT), генетическая гиперкальциурия, болезнь Дента, мышечная дистрофия (например, Дюшена и Беккера типа), тугоухость и зоб, синдромом Пендредда, синдром пигментного ретинита и глухоты, синдром Ушера, авитаминоз, фенилаланин-гидроксилаза, дегенеративные заболевания нервной системы, синдром де Груши 1, синдром де Груши, синдром Дежерина-Сотта, порфирия при дефиците дельта-аминолевулинат дегидратазы, деменция, синдром CADASIL, демиелигенная лейкодистрофия, болезнь Александра, дерматоспарактический тип синдрома Эйлерса-Данлоса, дерматоспараксис, наследственное нарушение развития, дистальная наследственная двигательная невропатия (dHMN), дистальная наследственная двигательная невропатия (например, DHMN-V), дефицит DHTR, синдром резистентности к андрогену, диффузный склероз глобоидного тела, болезнь Краббе, синдром Ди Джорджа, дефицит рецептора дигидротестерона, синдром нечувствительности к андрогена, дистальная наследственная моторная невропатия, Миотоническая дистрофия (тип 1 или тип 2), дистальная спинальная мышечная атрофия (любой тип, включая, например, тип 1, тип 2, тип 3, тип 4, тип 5, тип 6), мышечная дистрофия Дюшена и Беккера типа, карликовость (любой вид, например, ахондроплазийный, танатотропная дисплазия), синдром карликовости-атрофии сетчатки и тугоухости, синдром Коккейна, дисмиелиногенная лейкодистрофия, болезнь Александра, миотоническая дистрофия, пигментный ретинит и дизостозный дистрофийный синдром, синдром Ушера, семейная болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD), болезнь Альцгеймера (включая, например, тип 1, тип 2, тип 3 или тип 4), болезнь Экман-Лобштейна, незавершенный остеогенез, компрессионная невропатия, наследственная компрессионная невропатия, эритропоэтическая протопорфирия (EPP), эритробластическая анемия, бета-талассемия, эритрогепатитная протопорфирия, дефицит эритроид 5-аминолевулинат синтетазы, X-сцепленная сидеробластная анемия, рак глаза, ретинобластома, наследственная атаксия Фридрейха, FA, анемия Фанкони, лицевые повреждения и болезни, Лейденовская тромбофилия фактор V, FALS, амиотрофический боковой склероз, семейная нейрома слухового нерва, семейный аденоматозный полипоз, семейная болезнь Альцгеймера (FAD), семейный амиотрофический боковой склероз, амиотрофический боковой склероз, семейная вегетососудистая дистония, семейная вызванная жиром гипертриглицеридемия, липопротеин липазная недостаточность, семейный, семейный гемохроматоз, гемохроматоз, семейный дефицит LPL, липопротеиновый дефицит липазы, семейный, семейный неполипозный рак толстой кишки, наследственный неполипозный рак толстой и прямой кишки, семейный хронический полисерозит, семейный PCT, гемохроматоз, компрессионная невропатия, наследственная компрессионная невропатия, семейная первичная легочная гипертензия (FPPH), семейная сосудистая лейкоэнцефалопатия, синдром CADASIL, FAP, семейный аденоматозный полипоз, FD, семейная вегетососудистая дистония, дефицит феррохелатазы, ферропортиновая болезнь, гематохроматоз (любой тип, например, тип 1, тип 2A, тип 2B, тип 3, тип 4, неонатальный гематохроматоз, ацерулоплазминемиа, врожденная атрансферринемия, gracile синдром) синдром периодической лихорадки, семейная средиземноморская лихорадка (FMF), синдром FG, FGFR-связанный коронковый синостоз, фибриноидная дегенерация астроцитов, болезнь Александра, кистозно-фиброзного заболевание поджелудочной железы, болезнь Феллинга, fra (X) синдром, синдром ломкой X-хромосомы, несовершенный остеогенез, незавершенный остеогенез, синдром FRAXA, наследственная атаксия Фридрейха (FRDA), дефицит G6PD, заболевание, вызванное дефицитом галактокиназы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом галактозофосфатуридилтрансферазы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом галактозилцерамидазы, болезнь Краббе, галактозилцерамидный липидоз, болезнь Краббе, дефицит галактозилцереброзидазы, галактозилфингозиновый липидоз, дефицит GALC, дефицит GALT, галактоземия, гошеподобная болезнь, псевдобольшеу Гоше, дефицит GBA, генетические мозговые нарушения, генетическая эмфизема, генетический гемохроматоз, гемохроматоз, гигантоклеточный гепатит, новорожденный, новорожденный гемо-

хроматоз, дефицит GLA, глиобластома, ретинальная, ретинобластома, глиома, ретинальная, ретинобластома, глобоидная клетка лейкодистрофия (GCL, GLD), болезнь Краббе, глобоидноклеточная лейкоэнцефалопатия, дефицит глюкоцереброзидазы, глюкоцереброзидоз, глюкозилцереброзидный липидоз, дефицит глюкозилцерамидазы, дефицит бета-глюкозилцерамид глюкозидазы, глюкозилцерамидный липидоз, глицериновая ацидурия, гипероксалурия, первичная, глициновая энцефалопатия, некототическая гиперглицинемия, гликолевая ацидурия, гипероксалурия, основной, GM2 ганглиозидоз, болезнь Тея-Сакса, синдром зоба-тугоухости, синдром Пендредда, синдром Грефе-Ушера, синдром Ушера, синдром Гренблада-Страндберга, эластическая псевдоксантома, гемохроматоз, синдром Хальгрена, синдром Ушера, икhtiоз арлекина, болезнь Hb S, гипохондроплазия (HCH), наследственная копропорфирия (HCP), пороки развития головы и мозга, слуховые нарушения и тугоухость, нарушения слуха у детей, HEF2A, HEF2B, гематопорфирия, порфирия, дефицит гемсинтетазы, гемохроматоз, болезнь гемоглобина M, метгемоглобинемия бета-глобинового типа, болезнь гемоглобина S, гемофилия, гепатоэритропоэтическая порфирия (HEP), дефицит печеночной AGT, гипероксалурия, основной, синдром гепатолентикулярной дегенерации, болезнь Вилсона, наследственная артрофталмопатия, синдром Стиклера, наследственный дистопический липидоз, наследственный гемохроматоз (HHC), гемохроматоз, наследственная геморрагическая телеангиэктазия (HHT), наследственная миопатия с тельцами включения, регенерация скелетных мышц, наследственная железонасыщенная анемия, X-сцепленная сидеробластная анемия, наследственная моторная и сенсорная нейропатия, наследственная моторная нейропатия, тип V, дистальная наследственная моторная невропатия, наследственные множественные экзостозы, наследственный рак толстой и прямой кишки неполипозный, наследственный периодический синдром лихорадки, наследственный полипоз толстой кишки, семейный аденоматозный полипоз, наследственная легочная эмфизема, наследственная устойчивость к активированному протеину C, тромбофилия с Лейденской мутацией фактора V, наследственная сенсорная и автономная нейропатия III типа, семейная вегетососудистая дистония, наследственная спастическая параплегия, детский восходящий наследственный спастический паралич, наследственная спинальная атаксия, атаксия Фридрейха, наследственный спинальный склероз, атаксия Фридрейха, анемия Херрика, гетерозиготный OSMED, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, гетерозиготная отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, дефицит HexA, болезнь Тея-Сакса, дефицит гексозаминидазы, болезнь Тея-Сакса, дефицит альфа-субъединицы гексозаминидазы (любой вариант, например, вариант A, вариант B), болезнь Тея-Сакса, HFE-связанный гемохроматоз, гемохроматоз, HGPS, Прогерия, болезнь Гиппеля-Линдау, болезнь фон Гиппеля-Линдау, гемохроматоз (HLAH), дистальная наследственная моторная нейропатия (HMN V), наследственный рак толстой и прямой кишки неполипозный (HNPCC), наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления (HNCS), гомоцистинурия, дефицит оксидазы гомогентизиновой кислоты, алкаптонурия, гомогентизиновая ацидурия, алкаптонурия, гомозиготная поздняя кожная порфирия, гепатоэритропоэтическая порфирия, гипероксалурия, первичная (HP1), гипероксалурия (HP2), гиперфенилаланинемия (ГФА), ГФРТ - дефицит гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы, синдром Леша-Нихена, HSN III типа, семейная вегетососудистая дистония, семейная вегетососудистая дистония (HSAN3), наследственная сенсорная нейропатия (любого типа, например, HSN-I, HSN-II, HSN-III), семейная вегетососудистая дистония, дерматоспараксис, болезнь Хантингтона, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда, прогерия, гиперандрогенизм, неклассического типа вследствие дефицита 21-гидроксилазы, гиперхиломикронемия, семейный дефицит липопротеинлипазы, семейная, гиперглицинемия с кетоацидозом и лейкопенией, пропионовая ацидемия, гиперлиппротеинемия I типа, дефицит липопротеинлипазы, семейная гипероксалурия, первичная гиперфенилаланинемия, гиперфенилаланинемия, гиперфенил-аланинемия, гипохондродисплазия, гипохондроплазия, гипохондрогенез, гипохондроплазия, гипохромная анемия, X-сцепленная сидеробластная анемия, дефицит гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), синдром Леша-Нихена, детский восходящий наследственный спастический паралич (IAHSP), синдром ICF, синдром иммунодефицита, нестабильности центромер и лицевых аномалий, идиопатический гемохроматоз, гемохроматоз, 3 типа, идиопатический гемохроматоз новорожденных, гемохроматоз, новорожденных, идиопатическая легочная гипертензия, нарушения иммунной системы, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, недержание пигмента, детская мозговая болезнь Гоше, детская болезнь Гоше, детский восходящий наследственный спастический паралич, бесплодие, наследственная эмфизема, наследственная склонность к параличам от сдавления нерва, наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления, синдром Инсли-Астли, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром перемежающейся острой порфирии, острая перемежающаяся порфирия, синдром кишечного полипоза-пигментации кожи, синдром Пейтца-Егерса, недержание пигмента (IP), болезнь накопления железа, гемохроматоз, изодицентрический 15, изодицентрическая 15, изолированная тугоухость, внесиндромная глухота, синдром Джексона-Вайса, синдром Жубера, ювенильный первичный боковой склероз (JPLS), ювенильный амиотрофический боковой склероз, ювенильная подагра, хореоатетоз, синдром умственной отсталости, синдром Леша-Нихена, синдром ювенильной гиперурикемии, синдром Леша-Нихена, синдром Джексона-Вайса (JWS), спинальная и бульбарная мышечная атрофия, болезнь Кеннеди, спинально-бульбарная мышечная атрофия, спинальная и бульбарная мышечная атрофия Кеннеди, кератиновый гистиоцитоз, кератиновый липоидоз, кератиновый тезауризмоз, кетотическая глицинемия, пропионовая

ацидемия, кетотическая гиперглицинемия, пропионовая ацидемия, Болезни почек, гипероксалурия, первичная, дисплазия Книста, болезнь Краббе, болезнь Кугельберга-Веландера, спинальная мышечная артрофия, лакунарная деменция, синдром CADASIL, ахондрогенез Лангера-Салдино, дисплазия Лангера-Салдино, болезнь Альцгеймера с поздним началом, болезнь Краббе с поздним началом (LOKD), болезнь Краббе, нарушение способности к обучению, неспособность к обучению, лентигиноз, околоротовой, синдром Пейтца-Егерса, синдром Леша-Нихена, Лейкодистрофии, лейкодистрофия с волокнами Розенталя, болезнь Александера, лейкодистрофия, губковидная, синдром Ли-Фраумени (LFS), синдром Ли-Фраумени, дефицит липазы D, дефицит липопротеинлипазы, семейный дефицит LIPD, дефицит липопротеинлипазы, семейный липидоз, цереброзид, липидоз, ганглиозид, детский, болезнь Тей-Сакса, липоидный гистиоцитоз (керазинового типа), дефицит липопротеинлипазы, семейные заболевания печени, галактоземия, болезнь Лу Герига, синдром Луи-Бар, атаксия телеангиэктазия, синдром Линча, наследственный рак толстой и прямой кишки неполипоза, дефицит лизилгидроксилазы, болезнь Мачадо-Джозефа, спиноцеребеллярная атаксия (любого типа, например, SCA1, SCA2, SCA3, SCA 18, SCA20, SCA21, SCA23, SCA26, SCA28, SCA29), рак молочной железы у мужчин, рак молочной железы, мужские половые нарушения, злокачественная неоплазия молочной железы, рак молочной железы, злокачественная опухоль молочной железы, рак молочной железы, злокачественная опухоль мочевого пузыря, рак мочевого пузыря, рак груди, рак молочной железы, синдром Марфана, синдром маркера X, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Мартина-Белла, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Маккьюна-Олбрайта, синдром Маклеода, синдром MEDNIK, средиземноморская анемия, бета-талассемия, мегаэпифизарная карликовость, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, синдром Менкеса, болезнь Менкеса, умственная отсталость с костно-хрящевыми патологиями, синдром Коффина-Лоури, нарушения обмена веществ, метатропная карликовость, II типа, дисплазия Книста, метатропная дисплазия II типа, дисплазия Книста, метгемоглобинемия (любого типа, например, врожденная, бета-глобинового типа, врожденная метгемоглобинемия II типа), метилмалоновая ацидемия, синдром Марфана (MFS), МНАМ, синдром Каудена, Микро-синдром, микроцефалия, ММА, метилмалоновая ацидемия, болезнь Менкеса (также МК или MNK), синдром моносомии 1р36, болезнь двигательного нейрона, амиотрофический боковой склероз, амиотрофический боковой склероз, двигательные нарушения, синдром Моуэта-Уилсона, мукополисахаридоз (MPS I), муковисцидоз, мультиинфарктная деменция, синдром CADASIL, множественный дефицит карбоксилазы, с поздним началом, дефицит биотинидазы, синдром множественной гамартомы, синдром Каудена, множественный нейрофиброматоз, мышечная дистрофия (любого типа, включая, например, тип Дюшена и Беккера), атрофическая миотония, миотоническая дистрофия, дистрофическая миотония, синдром Нэнси-Инсли, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, хондродисплазия Нэнси-Суини, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, NBIA1, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, синдром Нилл-Дингуолл, синдром Коккейна, Нейробластома, ретиальная, ретинобластома, нейродегенерация с накоплением железа в головном мозге, I типа, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, неврологические болезни, нервно-мышечные нарушения, дистальная наследственная моторная нейронопатия, Ниманн-Пик, болезнь Ниманн-Пика, синдром Ноак, неклеточеская гиперглицинемия, глициновая энцефалопатия, ненейропатическая болезнь Гоше, нефенилкетонурическая гиперфенилаланинемия, дефицит тетрагидриобиптерина, внесиндромная глухота, синдром Нуан, болезнь Гоше норрботтенского типа, охроноз, алкаптонурия, охронотический артрит, алкаптонурия, Огденский синдром, несовершенный остеогенез (OI), болезнь Ослера-Вебера-Рандю, наследственная геморрагическая телеангиэктазия, OSMED, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, несовершенный остеогенез, остеопатироз, незавершенный остеогенез, врожденный остеосклероз, ото-спондило-мегаэпифизарная дисплазия, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, отоспондиломегаэпифизарная дисплазия, оксалоз, гипероксалурия, первичная, оксалурия, первичная, гипероксалурия, первичная, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, синдром Патау (трисомия 13), дефицит PBGD, острая перемежающаяся порфирия, дефицит PCC, пропионовая ацидемия, поздняя кожная порфирия (PCT), болезнь PDM, синдром Пендреда, Периодическая болезнь, Средиземноморская лихорадка, семейный периодический перитонит, синдром периорифициального лентигиноза, синдром Пейтца-Егерса, нарушения периферических нервов, семейная вегетососудистая дистония, периферический нейрофиброматоз, перонеальная мышечная атрофия, дефицит пероксисомальной аланин:глиоксилат аминотрансферазы, гипероксалурия, первичный синдром Пейтца-Егерса, заболевание, вызванное дефицитом фенилаланингидроксилазы, феохромоцитомы, болезнь фон Гиппеля-Линдау, синдром Пьера Робена с хондродисплазией плода, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, пигментный цирроз, гемохроматоз, синдром Пейтца-Егерса (PJS), пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация (PKAN), PKU, фенилкетонурия, пломбопорфирия, АЛК-дефицитная порфирия, PMA, поликистозная болезнь почек, полиоссальная фиброзная дисплазия, синдром Маккьюна-Олбрайта, семейный аденоматозный полипоз, гамартоматозный полипоз кишечника, синдром полипов и пятен, синдром Пейтца-Егерса, дефицит порфобилиногенсинтазы, АЛК-дефицитная порфирия, порфириновая болезнь, дефицит PPOX, смешанная порфирия, синдром Прадера-Лабхарта-Вилли, синдром Прадера-Вилли, прессенильная и сенильная деменция, первичная цилиарная дискинезия (PCD), первичный гемохроматоз, гемохроматоз, синдром первичной гиперурикемии, синдром Леша-Нихена, первичная сенильная дегенеративная деменция, EDS проколлагенового типа VII, мутантная,

прогерия, синдром прогерии Хатчинсона-Гилфорда, прогерия-подобный синдром, синдром Коккейна, прогероидный нанизм, синдром Коккейна, прогрессирующая хорей, хроническая наследственная (Хантингтона), болезнь Хантингтона, прогрессивно деформирующий несовершенный остеогенез с нормальными склерами, Несовершенный остеогенез (любого типа, например, I типа, II типа, III типа, IV типа, V типа, VI типа, VII типа, VIII типа), проксимальная миотоническая дистрофия (PROMM), пропионовая ацидемия, дефицит пропионил-КоА-карбоксилазы, дефицит протеина C, дефицит протеина S, протопорфирия, дефицит протопорфириногенаксидазы, смешанная порфирия, проксимальная миотоническая дистрофия, миотоническая дистрофия II типа, проксимальная миотоническая миопатия, псевдобольше Гоше, эластическая псевдоксантома, психозиновый липидоз, болезнь Краббе, легочная артериальная гипертензия, легочная гипертензия, псевдоксантома эластическая (PXE), псевдоксантома эластическая, ретинобластома (Rb), болезнь Реклингхаузена, рецидивирующий полисерозит, поражения сетчатки, синдром пигментного ретинита-глухоты, синдром Ушера, Ретинобластома, синдром Ретта, 3 типа RFALS, синдром Рикера, синдром Райли-Дея, семейная вегетососудистая дистония, синдром Русси-Леви, синдром Рубинштейна-Тейби (RSTS), синдром Ретта (RTS), синдром Рубинштейна-Тейби, синдром Рубинштейна-Тейби, синдром Сака-Барабаса, болезнь SADDAN, семейный синдром саркомы Ли и Фраумени, синдром Ли-Фраумени, синдром SBLA (синдром саркомы, опухолей молочной железы, лейкоза и надпочечников), синдром Ли-Фраумени, спинальная и бульбарная мышечная атрофия (SBMA), шваннома, слухового нерва, двусторонняя, нейрофиброматоз II тип, синдром Шварца-Джампела, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCIDX1), врожденный SED, врожденная спондилоэпифизарная дисплазия, SED Струдвика, спондилоэпиметафизарная дисплазия, типа Струдвика, спондилоэпифизарная дисплазия, врожденная (SEDC), дисплазия спондилоэпиметафизарная (SEMD), типа Струдвика SEMD, сенильная деменция, тяжелая ахондроплазия с задержкой развития и черным акантозом, болезнь SADDAN, синдром Шпринтцена, синдром X-сцепленной умственной отсталости Сидериуса, вызванный мутациями в гене PHF8, скелетно-кожно-мозговой синдром, нарушения пигментации кожи, спинально-мышечная артрофия (SMA), спондило-метаэпифизарная дисплазия (SMED) (любого типа, например, типа Струдвика, I типа), синдром Смита-Лемли-Опитца, синдром Смит-Магенис, южноафриканская генетическая порфирия, детский восходящий спастический паралич, детский восходящий наследственный спастический паралич, речевые и коммуникативные нарушения, сфинголипидоз, Тей-Сакс, болезнь Тей-Сакса, спинальная и бульбарная мышечная атрофия, спинальная мышечная артрофия, спинальная мышечная артрофия, дистального типа V, дистальная наследственная моторная нейропатия, спинальная мышечная артрофия, дистальная с преобладанием верхних конечностей, дистальная наследственная моторная нейропатия, спиноцереbellарная атаксия, спондилоэпифизарная врожденная дисплазия, спондилоэпифизарная дисплазия, коллаgenoпатия (любого типа, например, II и XI типов), спондилоэпиметафизарная дисплазия, спондилометафизарная дисплазия (SMD), спондилоэпиметафизарная дисплазия, губчатая дегенерация центральной нервной системы, губчатая дегенерация мозга, губчатая дегенерации белого вещества в грудном возрасте, спорадическая первичная легочная гипертензия, синдром SSB, синдром стальных волос, болезнь Менкеса, болезнь Штейнерта, миотоническая дистрофия, синдром миотонической дистрофии Штейнерта, миотоническая дистрофия, синдром Стиклера, инсульт, CADASIL синдром, синдром Струдвика, подострая нейропатическая болезнь Гоше, шведская генетическая порфирия, острая перемежающаяся порфирия, острая перемежающаяся порфирия, дисплазия хряща по типу швейцарского сыра, дисплазия Книста, болезнь Тей-Сакса, TD - танатофорная карликовость, танатофорная дисплазия, TD с прямыми бедренными костями и черепом в форме трилистника, танатофорная дисплазия 2 типа, Телеангиэктазия, мозжечково-окулокутанная, атаксия телеангиэктазия, синдром тестикулярной феминизации, синдром нечувствительности к андрогенам, дефицит тетрагидриобиптерина, синдром тестикулярной феминизации (TFM), синдром нечувствительности к андрогенам, талассемия промежуточная, бета-талассемия, Большая талассемия, бета-талассемия, танатофорная дисплазия, тромбофилия вследствие дефицита кофактора активированного протеина C, Лейденского типа, тромбофилий с Лейденской мутацией фактора V, заболевание щитовидной железы, Томакулезная нейропатия, наследственная нейропатия со склонностью к параличам от сдавления, полный дефицит ГФРТ, синдрому Леша-Нихена, полный дефицит гипоксантигуанин-фосфорибозилтрансферазы, синдром Леша-Нихена, синдром Тричера Коллинза, триада хрупких костей, синдром тройной X, синдром тройной X хромосомы, Трисомия 21 Трисомия X, синдром Труазье-Ано-Шоффара, гемохроматоз, болезнь Тей-Сакса (TSD), комплекс туберозного склероза (TSC), Туберозный склероз, подобная форма синдрома Тернера, синдром Нуан, заболевание, вызванное дефицитом УДФ-галактозо-4-эпимеразы, галактоземия, заболевание, вызванное дефицитом УДФ-глюкозо-4-эпимеразы, галактоземия, дефицит УДФ-глюкозо-гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы, галактоземия, Недифференцированная глухота, внесиндромная глухота, дефицит UPS, острая перемежающаяся порфирия, рак мочевого пузыря, дефицит UROD, дефицит уропорфириногендекарбоксилазы, дефицит уропорфириногенсинтазы, острая перемежающаяся порфирия, синдром Ушера, дефицит УТФ-гексозо-1-фосфатуридилтрансферазы, галактоземия, синдром Ван Богарта-Бертрана, синдром Ван дер Хуве, велокардиофасциальный синдром, синдром VHL, болезнь фон Гиппеля-Линдау, нарушение зрения и слепота, синдром Альстрема, болезнь ван Богарта-Бертрана, болезнь фон Гиппеля-Линдау, болезнь фон Реклингхаузена-Аппельбаума, гемохроматоз, болезнь фон Реклингхаузена,

нейрофиброматоз 1 типа, болезнь Вролика, несовершенный остеогенез, синдром Ваарденбурга, синдром Варбурга-Сью-Фледелиуса, Микро-синдром, болезнь Вилсона (WD), синдром Вайссенбахера-Цваймюллера, болезнь Верднига-Хоффмана, спинальная мышечная атрофия, синдром Уильямса, болезнь Вилсона, болезнь Вильсона, болезнь Уилсона, синдром Вольфа-Хиршхорна, периодическая болезнь Вольфа, синдром Вайссенбахера-Цваймюллера (WZS), пигментная керодерма, X-сцепленная умственная отсталость и макроорхидизм, синдромов ломкой X-хросомы, X-сцепленная первичная гиперурикемия, синдром Леша-Нихена, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия, X-сцепленная спинальная бульбарная мышечная атрофия, спинальная и бульбарная мышечная атрофия, X-сцепленная энзимопатия с гиперурикемией, синдром Леша-Нихена, X-ТКИД, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия (XLSA), X-ТКИД, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, X-сцепленная сидеробластная анемия (XLSA), XSCID, X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит, XXX синдром, синдромов тройной X, XXXX синдром, XXXXX синдром, XXXXX, синдром ХХУ, трисомия ХХУ, синдром Клайнфельтера, синдром ХУУ, нарушения триплетных повторов или их любые комбинации.

В вариантах осуществления специфические модуляции пост-транскрипционного контроля служат в качестве мишени для модуляции, модификации, повышения или снижения активности путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования генома. Например, модуляторы посттранскрипционного контроля могут включать PARN, PAN, CPSF, CstF, PAP, PABP, PAB2, CFI, CFII, РНК-трифосфатазу, РНК-гуанилтрансферазу, РНК-метилтрансферазу, SAM-синтазу, убиквитин-конъюгирующий фермент E2R, SR-белки SFRS1-SFR11, белки hnRNP (например,

HNRNPA0, HNRNPA1,

HNRNPA1L1, HNRNPA1L2, HNRNPA2, HNRNPA2B1, HNRNPAB, HNRNPB1, HNRNPC, HNRNPCL1, HNRNPD, HNRPDL, HNRNPF, HNRNHP1, HNRNPH2, HNRNPH3, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPLL, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HNRNPUL1, HNRNPUL2, HNRNPUL3, ADAR, Mex 67, Mtr2, Nab2, Dead-бокс геликазы, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, GEF, GCN2, PKR, HRI, PERK, eEF1, eEF2, GCN, eRF3, ARE-специфические связывающие белки, EXRN1, DCP1, DCP2, RCK/p54, CPEB, eIF4E, микроRNA и миРНК, DICER, Ago

белки, белки нонсен-опосредованного расщепления мРНК, UPF3A, UPF3BeIF4A3, MLN51, Y14/MAGOH, MG-1, SMG-5, SMG-6, SMG-7 или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления активность генетических путей, связанных с клеточным циклом, модулируют, повышают или снижают введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования. Примеры путей и генов, связанных с клеточным циклом, включают ATM, PMS2, FAS-L, MRE11, MLH1, FasR, NBS1, MSH6, Trail-L, RAD50, MSH2, Trail-R, 53BP1, RFC, TNF-Ct, P53, PCNA, TNF-R1, CHK1, MSH3, FADD, E2F1, MutS, гомолог, TRADD, PML, MutL, гомолог, R1P1, FANCD2, экзонуклеазу, MyD88, SMC1, ДНК, полимеразу, дельта, IRAK, BLM1, (POLD1, POLD2, POLD3, NIL, BRCA1 и POLD4, гены, ИКК, H2AX, кодирующие, субъединицы), NFκβ, ATR, топоизомеразу, 1, Iκβα, RPA, топоизомеразу, 2, IAP, ATRIP, РНКазу H1, каспазу, 3, RAD9, лигазу, 1, каспазу, 6, RAD1, DNA, полимеразу, 1, каспазу, 7, HUS, ДНК, полимеразу, 3, каспазу, 8, RAD17, примазу, каспазу, 10, RFC, хеликазу, HDAC1, CHK1, одиночную цепь, связывающую, HDAC2, TLK1, белки, цитохром, C, CDC25, Bcl-xL, STAT3, STAT5, DFF45, Vcl-2, ENDO-G, PI3K, Akt, Calpain, Bad, Bax, убиквитин-опосредуемый протеолиз, гипоксия, пролиферация клеток,

HIF-1α, MAPK, E1, HERC1,

TRAF6, HIF-1β, MAPKK, E2, UBE2Q, MEKK1, Ref1, MAPKKK, E3, UBE2R, COP1, HSP90, c-Met, 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, Rb1, UBE2G2, HERC2, Cdc20, RACK1, Raf-1, UBE2I, HERC3, Cdh1, PTB, A-Raf, UBE2J1, HERC4, Apcl, Hur, B-raf, UBE2J2, UBE4A, Apc2, PHD2, MEK1/2, UBE2L3, UBE4B, Apc3, SSAT2, ERK1/2, UBE2L6, CHIP, Apc4, SSAT1, Ets, UBE2M, CYC4, Apc5, GSK3, Elk1, UBE2N, PPR19, Apc6, CBP, SAP1, UBE20, UIP5, Apc7, FOXO4, cPLA2, WWPI, Mdm2, Apc8, F1H-1, WWP2, паркин, Apc9, TRIP, 12, Trim32, Ape, 10, NEED4, Trim37, Ape, 11, ARF-BP1, SIAH-1, Ape, 12, EDD1, PML, выживание, клеток, цикл, остановка, SMAD1, P21, SMAD5, BAX, SAMD8, MDR, LEF1, DRAIL, IGFBP3, TCF3, GADD45, TCF4, P300, HAT1, PI3, Akt, GF1

или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления активность генов, связанных с ангиогенезом, модулируют,

повышают или снижают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку(и). Примерные гены и генетические пути, связанные с ангиогенезом и подобными ангиогенезу состояниями, включают

VEGF,  
VEGFR2, SHC, E2F7, VEGFB, VEGFR3, PI3, VEGFC, Nrp 1, PIP3, EGFDIP3, DAG, GRB2,  
SOS, Akt, PB, PKC, Ras, RAF1, DAG, eNOS, NO, ERK1, ER2, cPLA2, ME1, MEK2

или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления активность генетических путей и/или генов, связанных с митохондриальной функцией, модулируют, повышают или снижают путем введения ингибитора ДНК-ПК и системы геномного редактирования в клетку(и). Примерные гены и генетические пути, связанные с митохондриальной функцией, включают аминотрансферазу малатдегидрогеназы, гидратазу, деацилазу, дегидрогеназу, карбоксилазу, мутазу, нарушения окисления жирных кислот окисления лейцина изолейцина (дефицит ферментов пути окисления) аминотрансферазы, OСТN2 разветвленной цепи, FATP1-6 аминотрансферазу 2, аминотрансферазу 2, митохондриальную CPT-1, САСТ изобутирил-КоА 2-метилбутирил-КоА, дегидрогеназу CPT-II, SCAD (кетокислот с разветвленной цепью, MCAD, кетокислот MCAD, комплекс VLCAD дегидрогеназы), альфа-ETF гидратазу, бета-ETF ГМГ-КоА-лиаза 2-метил-3-ОН-SCHAD бутирил-КоА, LCHAD дегидрогеназу, MTP 3-оксотиолазу, LKAT, DECR 1, HMGCS2, HMGCL или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления модулируют, повышают или снижают активность генетических путей и/или генов, связанных с повреждением ДНК или геномной нестабильностью. Примерные гены и генетические пути, связанные с путями и/или генами, ассоциированными с повреждением ДНК и геномной нестабильностью, включают

53BP1, BLM, MBD2, ДНК, лигазу, 4, MDC1, H2AX, XLF,  
SMC1, 53BP1, Rad50, P53, P53, Artemis, Rad27, TdT, APE1, PMS2, APE2, UvrA, RecA,  
MLH1, NEIL1, UvrB, SSB, MSH6, NEIL2, UvrC, Mrell, MSH2, NEIL3, XPC, Rad50, RFC,  
XRCC1, Rad23B, Nbsl, PCNA, PNKP, CEN2, CtIP, MSH3, Tdpl, DDB1, RPA, MutS, APTX,  
XPE, Rad51, MutL, ДНК, полимеразу  $\beta$  CSA, Rad52, ДНК полимеразу  $\delta$ , CSB, Rad54,  
Топоизомеразу, 1, ДНК, TFT1H, BRCA1, Топоизомеразу, 2, PCNA, XPB, BRCA2, РНКазу  
H1, FEN1, XPD, Exo1, лигазу 1, RFC, XPA, BLM, ДНК, полимеразу, 1, PAR, 1, RPA,  
TopIlla, ДНК, Lig1, XPG, GEN1, примазу, Lig3, ERCC1 Yen1 геликазу, UNG, XPF, Slx1,  
SSBs, MUTY ДНК полимеразу  $\delta$ , Slx4, SMUG ДНК полимеразу  $\epsilon$ , Mus8, MBD4, Emel,  
Dssl, ASH1L, SETD4, DQT1L, SETD5, EHMT1, SETD6, EHMT2, SETD7, EZH1, SETD8,  
EZH2, SETD9, MLL, SETDB1, MLL2, SETDB2, MLL3, SETMAR, MLL4, SMYD, 1, MLL5,  
SMYD2, NSD, 1, SMYD3, PRDM2, SMYD4, SET, SMYD5, SETBP1, SUV39H1, SETD 1A,  
SUV39H2, SETD 1B, SUV420H1, SETD2, SUV420 H2, SETD3

или их любые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления гены, кодирующие факторы транскрипции млекопитающих, модулируют, повышают, снижают или вводят в клетку. Примерные факторы транскрипции человека включают

AFF4, AFF3, AFF2, AFF1, AR, TFAP2B, TFAP2D, TFAP2C, TFAP2E, TFAP2A, JARID2, KDM5D, ARID4A, ARID4B, KDM5A, ARID3A, KDM5B, KDM5C, ARID5B, ARID3B, ARID2, ARID5A, ARID3C, ARID1A, ARID1B, HIF1A, NPAS1, NPAS3, NPAS4, MLXIPL, ARNTL2, MXD1, AHRR, TFE3, HES2, MNT, TCF3, SREBF1, TFAP4, TCFL5, LYL1, USF2, TFEC, AHR, MLX, MYF6, MYF5, SIM1, TFEB, HAND1, HES1, ID2, MYCL1, ID3, TCF21, MXI1, SOHLH2, MYOG, TWIST1, NEUROG3, BHLHE41, NEUROD4, MXD4, BHLHE23, TCF15, MAX, ID1, MYOD1, ARNTL, BHLHE40, MYCN, CLOCK, HEY2, MYC, ASCL1, TCF12, ARNT, HES6, FERD3L, MSGN1, USF1, TAL1, NEUROD1, TCF23, HEYL, HAND2, NEUROD6, HEY1, SOHLH1, MESP1, PTF1A, ATOH8, NPAS2, NEUROD2, NHLH1, ID4, ATOH1, ARNT2, HES3, MLXIP, ASCL3, KIAA2018, OLIG3, NHLH2, NEUROG2, MSC, HES7, ATOH7, BHLHA15, BHLHE22, NEUROG1, FIGLA, ASCL2, OLIG1, TAL2, 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, CBF, CAMTA2, CAMTA1, EBF4, EBF3, EBF1, EBF2, NR2F6, NR2F1, NR2F2, GRHL2, TFCEP2L1, GRHL1, TFCEP2, UBP1, GRHL3, YBX2, CSDE1, CSDA, YBX1, LIN28A, CARHSP1, CSDC2, LIN28B, NFIX, NFIC, NFIB, NFIA, CUX2, ONECUT2, CUX1, ONECUT1, SATB1, ONECUT3, SATB2, DMRT3, DMRT1, DMRTC2, DMRTA2, DMRTB1, DMRT2, DMRTA1, E2F2, E2F1, E2F3, TFDP2, E2F8, E2F5, E2F7, E2F6, TFDP3, TFDP1, E2F4, NR1H3, NR1H2, ETV1, ETV7, SPI1, ELF4, ETV2, ERF, ELF2, ELK3, ETV3, ELF1, SPDEF, ELK1, ETS1, EHF, ELF5, ETV6, SPIB, FLI1, GABPA, ERG, ETS2, ELK4, ELF3, FEV, SPIC, ETV4, ETV5, FOXN3, FOXC1, FOXJ2, FOXF1, FOXN1, FOXM1, FOXPI1, FOXO3, FOXA2, FOXP2, FOXJ1, FOXP4, FOXF2, FOXN4, FOXK2, FOXO1, FOXH1, FOXQ1, FOXK1, FOXI1, FOXD4, FOXA3, FOXN2, FOXB1, FOXG1, FOXR1, FOXL1, FOXC2, FOXE1, FOXS1, FOXL2, FOXO4, FOXD4L1, FOXD4L4, FOXD2, FOXI2, FOXE3, FOXD3, FOXD4L3, FOXR2, FOXJ3, FOXO6, FOXB2, FOXD4L5, FOXD4L6, FOXD4L2, KIAA0415, FOXA1, FOXP3, GCM2, GCM1, NR3C1, GTF2IRD1, GTF2I, GTF2IRD2B, GTF2IRD2, SOX8, SOX30, PMS1, CIC, TCF7, TOX4, SOX10, HMGXB4, HBP1, TFAM, UBTF, WHSC1, SOX6, HMGXB3, BBX, TOX2, SOX4, SOX21, SOX9, SOX15, SOX5, SOX3, LEF1, HMG20A, SOX13, TCF7L2, SSRP1, TCF7L1, SOX17, SOX14, PINX1, SOX7,

SOX11, SOX12, SOX2, SOX1, SRY, SOX18, UBTFL1, UBTFL2, TOX, HMGB1, HMGB2, PBRM1, TOX3, SMARCE1, HMG20B, HMGB3, HMGA2, HMGA1, ARX, HOXA11, MEOX1, DLX6, ISL1, HOXC8, BARX2, ALX4, GSC2, DLX3, PITX1, HOXA9, HOXA10, LHX5, LASS4, ZFH4, SIX4, VSX1, ADNP, 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, ZFH3, 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, HSF2, HSF1, LCORL, LCOR, IRF6, IRF1, IRF3, IRF5, IRF4, IRF8, IRF2, IRF7, IRF9, MBD3, BAZ2B, MBD4, SETDB2, MBD1, MECP2, SETDB1, MBD2, BAZ2A, SMAD7, SMAD5, SMAD9, SMAD6, SMAD4, SMAD3, SMAD1, SMAD2, ZZZ3, RCOR1, CDC5L, MYBL2, DNAJC2, TADA2A, RCOR3, MYB, TERF2, DMTF1, DNAJC1, NCOR1, TERF1, MIER3, MYSM1, SNAPC4, RCOR2, TADA2B, MYBL1, TERF1P2, NCOR2, CCDC79, SMARCC1, SMARCC2, TTF1, C11orf9, NFYA, NFYC, NFYB, NRF1, NR4A3, NR4A1, NR4A2, ESR1, NR0B2, NR0B1, PREB, EAF2, SPZ1, TP63, TP73, TP53, PAX6, PAX7, PAX2, PAX4, PAX8, PAX1, PAX3, PAX5, PAX9, SUB1, POU2F2, POU1F1, POU4F3, POU6F2, POU2F3, POU2F1, POU4F2, POU4F1, POU6F1, POU3F2, POU3F1, POU3F4, POU3F3, POU5F1, POU5F1B, PPAR, PPARG, PPARA, PGR, PROX1, PROX2, NR2E1, NR5A2, NR2C1, NR5A1, NR6A1, ESRRA, NR2C2, RFX3, RFX2, RFX4, RFX1, RFX5, RFX7, RFX6, RFX8, NFATC3, NFKB2, NFATC4, NFATC2, NFAT5, RELB, NFKB1, NFATC1, REL, RELA, RORA, RORC, NR1D2, RORB, RUNX3, RUNX1, SP100, SP140, GMEB2, SP110, AIRE, GMEB1, DEAF1, SP140L, LOC729991-MEF2B, MEF2A, SRF, MEF2D, MEF2B, STAT1, STAT5A, STAT4, STAT6, STAT3, STAT2, STAT5B, TBX21, TBX5, TBX15, TBX18, TBX2, TBX4, TBX22, TBX3, TBR1, TBX19, TBX6, EOMES, T, TBX20, TBX10, MGA, TBX1, TEAD3, TEAD2, TEAD1, TEAD4, CREBL2, NFE2L3, CREB3L3, FOSL2, NFE2L1, CREM, DBP, CREB3, HLF, BACH2, ATF2, NFE2L2, ATF6, CREB1, ATF1, NFE2, FOSB, ATF4, NRL, JUND, JDP2, CREB3L4, BATF, BACH1, CREB3L1, NFIL3, TEF, BATF2, ATF5, FOS, JUNB, DDIT3, FOSL1, JUN, MAF, CREB3L2,

MAFA, MAFF, MAFG, MAFK, MAFB, ATF6B, CRX, OTX1, OTX2, THAP3, THAP10, THAP1, PRKRIR, THAP8, THAP9, THAP11, THAP2, THAP6, THAP4, THAP5, THAP7, NR1H4, NR2E3, RARB, HNF4A, VDR, ESRRB, THRA, NR1D1, RARA, ESR2, NR1I3, NR1I2, THRB, NR3C2, HNF4G, RARG, RXRA, ESRRG, RXRB, TSC22D1, TSC22D3, TSC22D4, TSC22D2, TULP3, TULP2, TULP1, TULP4, TUB, ZBTB33, ZBTB32, ZBTB11, MYNN, ZBTB25, PATZ1, ZBTB16, ZBTB24, BCL6, ZBTB47, ZBTB17, ZBTB45, GZF1, ZBTB1, ZBTB46, ZBTB8A, ZBTB7B, BCL6B, ZBTB49, ZBTB43, HIC2, ZBTB26, ZNF131, ZNF295, ZBTB4, ZBTB34, ZBTB38, HIC1, ZBTB41, ZBTB7A, ZNF238, ZBTB42, ZBTB2, ZBTB20, ZBTB40, ZBTB7C, ZBTB37, ZBTB3, ZBTB6, ZBTB44, ZFP161, ZBTB12, ZBTB48, ZBTB10, ZBED4, ZBED3, ZBED2, C11orf95, ZBED1, IKZF5, ZNF821, ZNF451, ZNF195, ZFX, ZNF263, ZNF200, HIVEP2, WIZ, ZNF582, SNAI2, ZFP64, IKZF2, ZIC2, ZNF800, PRDM1, PRDM6, ZFP112, ZNF275, ZNF76, ZFAT, KLF6, ZFY, ZXDC, GLI2, ZNF532, ZNF37A, ZNF510, ZNF506, ZNF324, ZNF671, ZNF416, ZNF586, ZNF446, ZNF8, ZNF264, REST, MECOM, ZNF213, ZNF343, ZNF302, ZNF268, ZNF10, HIVEP1, ZNF184, MZF1, SALL4, ZNF516, KLF8, KLF5, ZNF629, ZNF423, CTCF, ZNF500, ZNF174, SALL1, MAZ, ZNF419, OVOL3, ZNF175, ZNF14, ZNF574, ZNF85, SP4, ZKSCAN1, GLI3, GLIS3, KLF3, PRDM4, GLI1, PRDM13, ZNF142, PRDM2, ZNF684, ZNF541, KLF7, PLAGL1, ZNF430, KLF12, KLF9, ZNF410, BCL11A, EGR1, ZFP30, TSHZ3, ZNF549, ZSCAN18, ZNF211, ZNF639, ZSCAN20, GTF3A, ZNF205, ZNF644, EGR2, IKZF4, CTCFL, ZNF831, SNAI1, ZNF576, ZNF45, TRERF1, ZNF391, RREB1, ZNF133, OVOL2, ZNF436, PLAGL2, GLIS2, ZNF384, ZNF484, HIVEP3, BCL11B, KLF2, ZNF780B, FEZF1, KLF16, ZSCAN10, ZNF557, ZNF337, PRDM12, ZNF317, ZNF426, ZNF331, ZNF236, ZNF341, ZNF227, ZNF141, ZNF304, ZSCAN5A, ZNF132, ZNF20, EGR4, ZNF670, VEZF1, KLF4, ZFP37, ZNF189, ZNF193, ZNF280D, PRDM5, ZNF740, ZIC5, ZSCAN29, ZNF710, ZNF434, ZNF287, ZIM3, PRDM15, ZFP14, ZNF787, ZNF473, ZNF614, PRDM16, ZNF697, ZNF687, OSR1, ZNF514, ZNF660, ZNF300, RBAK, ZNF92, ZNF157, ZNF182, ZNF41, ZNF711, PRDM14, ZNF7, ZNF214, ZNF215, SALL3, ZNF827, ZNF547, ZNF773, ZNF776, ZNF256, ZSCAN1, ZNF837, PRDM8, ZNF117, ZIC1, FEZF2, ZNF599, ZNF18, KLF10, ZKSCAN2, ZNF689, ZIC3, ZNF19, ZSCAN12, ZNF276, ZNF283, ZNF221, ZNF225, ZNF230, ZNF222, ZNF234, ZNF233, ZNF235, ZNF362, ZNF208, ZNF714, ZNF394, ZNF333, ZNF382, IKZF3, ZNF577, ZNF653, ZNF75A, GFII1, ZNF281, ZNF496, ZNF2, ZNF513, ZNF148, KLF15, ZNF691, ZNF589, PRDM9, ZNF12, SP8, OSR2, ZNF367, ZNF22, GFII1B, ZNF219, SALL2, ZNF319, ZNF202, ZNF143, ZNF3, ZSCAN21, ZNF606, SP2, ZNF91, ZNF23, ZNF226, ZNF229, ZNF180, ZNF668, ZNF646, ZNF641, ZNF610, ZNF528, ZNF701, ZNF526, ZNF146, ZNF444, ZNF83, ZNF558, ZNF232, E4F1, ZNF597, INSM2, ZNF30, ZNF507, ZNF354A, ZEB2, ZNF32, KLF13, ZFPM2, ZNF764, ZNF768, ZNF35, ZNF778, ZNF212, ZNF282, PRDM10, SP7, SCRT1, ZNF16, ZNF296, ZNF160, ZNF415, ZNF672, ZNF692, ZNF439, ZNF440, ZNF581, ZNF524, ZNF562, ZNF561, ZNF584, ZNF274, ZIK1, ZNF540, ZNF570, KLF17, ZNF217, ZNF57, ZNF556, ZNF554, KLF11, HINFP, ZNF24, ZNF596, OVOL1, SP3, ZNF621, ZNF680, BNC2, ZNF483, ZNF449, INSM1, ZNF417, ZNF791, ZNF80, GLIS1, ZNF497,

KLF14, ZNF266, ZIC4, ZNF408, ZNF519, ZNF25, ZNF77, ZNF169, ZNF613, ZNF683, ZNF135, ZSCAN2, ZNF575, ZNF491, ZNF620, ZNF619, ZNF354C, ZNF114, ZNF366, ZNF454, ZNF543, ZNF354B, ZNF223, ZNF713, ZNF852, ZNF552, ZFP42, ZNF664, EGR3, ZFPM1, ZNF784, ZNF648, FIZ1, ZNF771, TSHZ1, ZNF48, ZNF816, ZNF571, ZSCAN4, ZNF594, ZFP3, ZNF443, ZNF792, ZNF572, ZNF707, ZNF746, ZNF322A, ZNF467, ZNF678, ZFP41, HKR1, PLAG1, ZNF329, ZNF101, ZNF716, ZNF708, ZSCAN22, ZNF662, ZNF320, ZNF623, ZNF530, ZNF285, ZFP1, WT1, ZFP90, ZNF479, ZNF445, ZNF74, SP1, SNAI3, ZNF696, IKZF1, ZNF267, ZNF566, ZNF224, ZNF529, ZNF284, ZNF749, ZNF17, ZNF555, ZNF75D, ZNF501, ZNF197, ZNF396, ZFP91, ZNF732, ZNF397, ZSCAN30, ZNF546, ZNF286A, ZKSCAN4, ZNF70, ZNF643, ZNF642, ZSCAN23, ZNF490, ZNF626, ZNF793, ZNF383, ZNF669, ZNF559, ZNF177, ZNF548, MTF1, ZNF322B, ZNF563, ZNF292, ZNF567, SP6, ZNF573, ZNF527, ZNF33A, ZNF600, ZKSCAN3, ZNF676, ZNF699, ZNF250, ZNF79, ZNF681, ZNF766, ZNF107, ZNF471, ZNF836, ZNF493, ZNF167, ZNF565, ZNF34, ZNF781, ZNF140, ZNF774, ZNF658, ZNF765, ZNF124, ZNF569, ZNF777, ZNF775, ZNF799, ZNF782, ZNF846, ZNF136, ZKSCAN5, ZNF502, ZFP62, ZNF33B, ZNF512B, ZNF431, ZNF418, ZNF700, ZNF239, ZSCAN16, ZFP28, ZNF705A, ZNF585A, ZNF138, ZNF429, ZNF470, ZNF100, ZNF398, ZNF498, ZNF441, ZNF420, ZNF763, ZNF679, ZNF682, ZNF772, ZNF257, ZNF785, ZSCAN5B, ZNF165, ZNF655, ZNF98, ZNF786, ZNF517, ZNF675, ZNF860, ZNF628, ZNF665, ZNF624, ZNF841, ZNF615, ZNF350, ZNF432, ZNF433, ZNF460, ZNF81, ZNF780A, ZNF461, ZNF181, LOC100287841, ZNF44, ZNF790, ZNF677, ZNF823, ZNF311, ZNF347, ZNF71, ZNF121, ZNF335, ZNF560, ZNF273, ZNF84, ZNF667, ZNF649, ZNF248, ZNF544, ZNF770, ZNF737, ZNF251, ZNF607, ZNF334, ZXDA, ZNF485, ZIM2, PEG3, ZNF192, ZNF442, ZNF813, ZNF26, ZNF69, ZNF583, ZNF568, ZXDB, ZNF480, ZNF587, ZNF808, ZNF43, ZNF28, ZNF627, ZNF789, ZNF536, ZNF534, ZNF652, ZNF521, ZNF358, ZFP2, SP5, ZNF814, ZNF551, ZNF805, ZSCAN5C, ZNF468, ZNF616, ZFP57, ZNF155, ZNF783, ZNF425, ZNF580, ZNF611, ZNF254, ZNF625, ZNF134, ZNF845, ZNF99, ZNF253, ZNF90, ZNF93, ZNF486, REPIN1, LOC100131539, ZNF705D, LOC100132396, ZNF705G, SCRT2, ZNF407, SP9, ZNF579, ZNF880, ZNF630, ZNF844, ZNF469, ZNF717, ZNF865, ZNF492, ZNF688, YY2, ZNF878, ZNF879, ZNF736, ZNF323, ZNF709, ZNF512, ZNF585B, ZNF154, ZNF324B, ZNF564, ZFP82, GLI4, ZNF674, ZNF345, ZNF550, KLF1, YY1, MYST2, ST18, L3MBTL4, MYT1L, MYT1, L3MBTL1, MTA3, GATA1, TRPS1, GATA3, GATA5, GATA4, GATA6, GATAD2B, GATAD1, GATA2, MTA1, ZGLP1, MTA2, RERE, C16orf5, LITAF, PIAS1, PIAS2, PIAS4, ZMIZ1, ZMIZ2, PIAS3, RNF138, NFX1, NFXL1

или их любые комбинации.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления подвергаемая манипуляции клетка выбрана из фибробластов, моноцитарных клеток-предшественников, В-клеток, экзокринных клеток, панкреатических клеток-предшественников, эндокринных клеток-предшественников, гепатобластов, миобластов или преадипоцитов. В некоторых вариантах осуществления клетку подвергают манипуляции (например, превращению

или дифференцировке) в мышечные клетки, эритроидно-мегакариоцитарные клетки, эозинофилы, иПС клетки, макрофаги, Т-клетки, островковые бета-клетки, нейроны, кардиомиоциты, клетки крови, эндокринные клетки-предшественники, экзокринные клетки-предшественники, протоковые клетки, ацинарные клетки, альфа-клетки, бета-клетки, дельта-клетки, ПП клетки, гепатоциты, холангиоциты, ангиобласты, мезангиобласты или бурые адипоциты.

В некоторых вариантах осуществления клетка является мышечной клеткой, эритроидно-мегакариоцитарной клеткой, эозинофилом, иПС клеткой, макрофагом, Т-клеткой, островковой бета-клеткой, нейрональной, кардиомиоцитом, клеткой крови, эндокринной клеткой-предшественником, экзокринной клеткой-предшественником, протоковой клеткой, ацинарной клеткой, альфа-клеткой, бета-клеткой, дельта-клеткой, ПП клеткой, гепатоцитом, холангиоцитом или белым или бурым адипоцитом.

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

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

В некоторых вариантах осуществления клетка является мышечной клеткой, эритроидно-мегакариоцитарной клеткой, эозинофилом, иПС клеткой, макрофагом, Т-клеткой, островковой бета-клеткой, нейрональной, кардиомиоцитом, клеткой крови, эндокринной клеткой-предшественником, экзокринной клеткой-предшественником, протоковой клеткой, ацинарной клеткой, альфа-клеткой, бета-клеткой, дельта-клеткой, ПП клеткой, гепатоцитом, холангиоцитом или белым или бурым адипоцитом.

#### **Введение ингибиторов ДНК-ПК и системы редактирования гена в клетку(и)**

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

Систему редактирования гена могут вводить в клетку(и) любым способом, известным в уровне техники. Например, могут использоваться любые способы доставки нуклеиновых кислот или белков, известные в уровне техники. Систему редактирования гена вводят (например, доставляют) в клетку посредством нуклеиновой кислоты, кодирующей компоненты системы редактирования гена. Систему редактирования гена могут вводить в клетку с помощью вирусных или невирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления используют вирусные векторы. Вирусные векторы могут быть ретровирусными (например, на основе вируса лейкоза мышей, ВИЧ или лентивирусными) или ДНК-вирусными (например, на основе аденовируса, вируса простого герпеса и аденоассоциированного вируса). В некоторых вариантах осуществления способы трансфекции (например, способы невирусной доставки) используют для введения системы редактирования генома в клетку. Способы трансфекции включают контакт клетки с DEAE-декстраном, фосфатом кальция, липосомами или электропорацию плазмиды в клетку. Дополнительные способы невирусной доставки включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или липид: нуклеиновая кислота конъюгаты, голую ДНК, голую РНК, искусственные вирионы и улучшенный средствами захват ДНК. Сонопорация с использованием, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mag) также может использоваться для доставки нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления одну или более нуклеиновых кислот доставляют в виде мРНК. В некоторых вариантах осуществления для повышения эффективности трансляции и/или стабильности мРНК используются экпированные мРНК. В некоторых вариантах осуществления используются экпы ARCA (антиреверсный аналог экпа) или их варианты. См. патенты США US 7074596 и US 8153773.

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

В вариантах осуществления эндонуклеаза (например, Cas, Cpf1 и т.п.) транскрибируется с ДНК, а гРНК представлена в виде РНК.

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

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

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

гРНК представлена в виде РНК.

Дополнительные системы доставки нуклеиновых кислот включают системы, предложенные компаниями Amaha Biosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) и Copernicus Therapeutics Inc. (см., например, US6008336). Липофекция описана, например, в патентах США 5049386; 4946787 и 4897355), реактивы для липофекции доступны в продаже (например, Transfectam™, Lipofectin™ и Lipofectamine™ RNAiMAX). Катионные и нейтральные липиды, подходящие для эффективной, опосредованной распознаванием рецептора липофекции полинуклеотидов, включают описанные в Feigner, WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (введение *ex vivo*) или ткани-мишени (введение *in vivo*).

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

Дополнительные методы доставки включают использование упаковки подлежащих доставке нуклеиновых кислот в носители для доставки EnGeneIC (EDV). Такие EDV специфично доставляют в ткани-мишени при использовании биспецифических антител, где одно плечо антитела обладает специфичностью к ткани-мишени, а другое обладает специфичностью к EDV. Антитело переносит EDV к поверхности клетки-мишени, после чего EDV переносится в клетку посредством эндоцитоза. После проникновения в клетку содержимое высвобождается (см. MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27(7):643) Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); патенты США 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 4946787).

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

В некоторых вариантах осуществления, в которых используется транзентная экспрессия, могут использоваться системы на основе аденовирусов. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов могут обеспечивать очень высокую эффективность трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С такими векторами получены высокие титры и высокие уровни экспрессии. Этот вектор можно получать в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов ("AAV") также используют для трансдукции клеток нуклеиновыми кислотами-мишенями, например, для получения *in vitro* нуклеиновых кислот и пептидов и для способов генотерапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West et al., Virology 160:38-47 (1987); патент США 4797368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)). Конструирование рекомбинантных векторов AAV описаны в ряде публикаций, включая патент США 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 введение в клетку(и) ингибитора ДНК-ПК осуществляют путем культивирования выделенной клетки(ок) в присутствии ингибитора ДНК-ПК и любой подходящей среды, которая позволяет проникать ингибитору ДНК-ПК в клеточную мембрану и/или ядро клетки.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК вводят в клетку(и) *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. В некотором варианте осуществления ингибитор ДНК-ПК подвергают контакту с клеткой(ами) в течение приблизительно 5 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 промежуточного периода времени. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК подвергают контакту с клеткой(ами) в течение приблизительно 1,5 недель, 2,0 недель, 2,5 недель, 3,0 недель, 3,5 недель, 4 недель или любого промежуточного периода времени. Ингибитор ДНК-ПК могут вводить повторно при замене среды культивирования клеток. Ингибитор ДНК-ПК можно подвергать контакту с клеткой до, во время или после введения компонентов системы редактирования генома.

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

В некоторых вариантах осуществления редактирующие ген компоненты доставляют в клетку(и) с помощью одного или более векторов или в форме РНК, мРНК или, в случае компонента эндонуклеазы, в виде очищенного белка или мРНК (например, белка Cas9). Один или более векторов могут включать вирусные векторы, плазмиды или оцДНК. Вирусные векторы могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса или их любые комбинации. В некоторых вариантах осуществления редактирующие ген компоненты доставляют посредством РНК или синтетической РНК.

В некоторых вариантах осуществления введение ингибиторов ДНК-ПК в клетку вместе с системой

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления введение ингибитора ДНК-ПК и системы редактирования гена в популяцию клеток приводит к большему выживанию клетки по сравнению с исходным состоянием, в котором в популяцию клеток вводят только систему редактирования гена, но не вводят ингибитор ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ДНК-ПК, приводящий к большему выживанию клеток, представляет собой соединение формулы (III-E-1) или (III-E-2) или его фармацевтически приемлемые соли.

В некоторых вариантах осуществления клетку синхронизируют в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла до, после или во время введения ингибитора ДНК-ПК. В некоторых вариантах осуществления клетку синхронизируют в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла до, после или во время введения редактирующих ген компонентов. Синхронизация клетки в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла может быть выполнена любым способом, известным в уровне техники. В качестве неограничивающего примера средства, которые могут использоваться для синхронизации клетки в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла, включают афидиколин, гидроксикарбамид, ловастатин, мимозин, нокодазол, тимидин или их любые комбинации (см., Lin et al., *Elife*. 2014 Dec 15; 3:2014). В некоторых вариантах осуществления средства для синхронизации клеток могут вводить в любое время во время процесса редактирования гена.

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

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы ДНК-ПК и/или система редактирования генома включены в набор с инструкциями по применению. Набор может содержать любую систему редактирования генома и/или ингибитор ДНК-ПК и инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществ-

вления ингибитор ДНК-ПК является любым из соединений, представленных структурной формулой (III-E-1) или (III-E-2). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системы на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo. Система редактирования генома может быть предоставлена в наборе в любой форме, например, в виде плазмиды, вектора, ДНК или РНК конструкции.

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

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

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

#### **Способы скрининга редактирования генома**

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

ПЦР-праймеры могут быть сконструированы для селективной амплификации немодифицированных и модифицированных генетических областей, с получением ампликонов разной длины в зависимости от статуса генетической модификации. Затем ампликоны могут быть разделены в геле, и эффективность HDR оценена с помощью денситометрии при использовании Bio-Imager. В альтернативе, новая ПЦР-технология, быстрая цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), может использоваться для одновременного измерения событий HDR и NHEJ в образцах после редактирования генома. См., например, Miyaoka et al., "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing", Scientific Reports, 6, 2016. Другие способы, которые могут использовать для скрининга клеток на геномные модификации, включают секвенирование по Сангеру, глубокое секвенирование и ОТ-ПЦР.

#### **Получение соединений согласно изобретению**

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

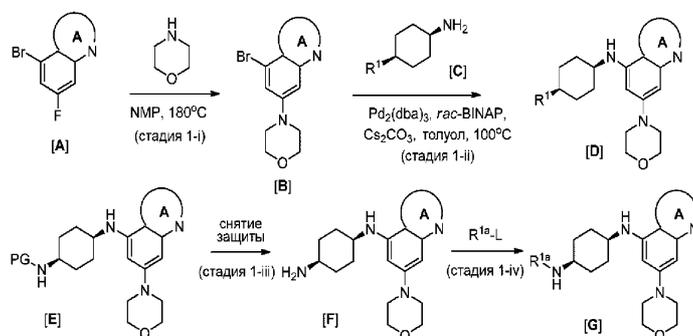
VPin	пинаколборонат
Солевой раствор	насыщенный раствор NaCl в воде
ДХМ	Дихлорметан
DIAD	диизопропилазодикарбоксилат
DIEA	диизопропилэтиламин
DMA	диметилацетамид
DMФА	диметилформамид
DMCO	диметилсульфоксид
DTT	дитиотреитол
ЭРИ-МС	Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией
Et <sub>2</sub> O	этиловый эфир
EtOAc	этилацетат
EtOH	этиловый спирт
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	Изопропанол
LAN	алюмогидрид лития
ЖХ-МС	жидкостной хроматография/масс-спектрометрия
LDA	диизопропилэтиламин лития
Me	метил
MeOH	метанол
MsCl	метансульфонилхлорид
MTBE	метил-трет-бутиловый эфир
NMP	N-метилпирролидин
Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	трис(добензилиденацетон)дипалладий (0)
Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	1,1'-бис(дифенилфосфино)-ферроцен-дихлорпалладий
PG	защитная группа
Ph	фенил
(рац)-BINAP	рацемический 2,2'-бис(дифенилфосфино)-1,1'-бинафтил
RockPhos	ди-трет-бутил(2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-[1,1'-бибензил]-2-ил)фосфин
КТ или кт	комнатная температура
СФХ	сверхкритическая флюидная хроматография
SPhos	2-дициклогексилфосфино-2',6'-диметоксибибензил
TBAI	иодид тетрабутиламмония
tBu	трет-бутил
ТГФ	тетрагидрофуран
ТЭА	триэтиламин
TMEDA	тетраметилэтилендиамин
VPhos	[3-(2-дициклогексилфосфанилфенил)-2,4-диметокси-фенил]сульфонил оксинатрий

### Общие методики синтеза

В большинстве случаев соединения согласно изобретению могут быть получены способами, описанными в настоящем документе, или другими способами, известными специалистам в данной области.

Пример 1. Общее получение соединений формулы G

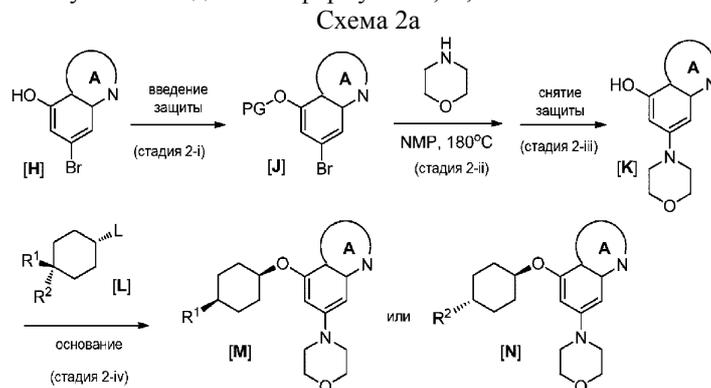
Схема 1



Соединения формулы (III-E-1) или (III-E-2), где X представляет собой NH, могут быть получены, как показано в общем виде ниже на схеме 1. Таким образом, как показано в стадии 1-i схемы 1, гетероарильные соединения формулы A могут реагировать с морфолином или аналогом морфолина при нагревании смеси в полярном апротонном растворителе с получением соединения формулы B. При использовании катализируемого палладием сочетания типа Бухвальда-Хартвига с фосфиновым лигандом, как по-

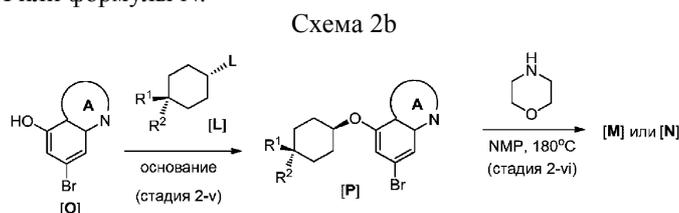
казано в стадии 1-ii схемы 1, соединение формулы В может реагировать с аминокциклогексанами формулы С с получением соединений формулы D, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> имеют значение, описанное в другой части настоящего документа. В одном примере при получении монозащищенных мезо-циклогексан-1,4-диаминов формулы E, удаление защитной группы приводит к соединениям формулы F, как показано в стадии 1-iii схемы 1. Полученный свободный амин может затем реагировать с различными соединениями, имеющими группы, способные реагировать с аминами (например, R<sup>1a</sup>-L, где L является уходящей группой, такой как хлор, бром, иод, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат; или где L является реакционноспособной карбонилсодержащей группой, такой как активная сложноэфирная или изоцианатная группа), с получением соединения формулы G, как показано в стадии 1-iv схемы 1.

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

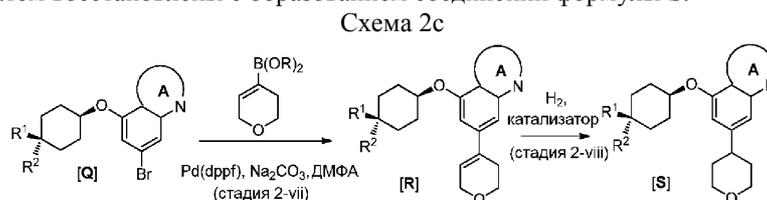


Соединения (III-E-1) или (III-E-2), где X представляет собой O, могут быть получены, как показано в общем виде ниже на схемах 2a и 2b. Таким образом, как показано в стадии 2-i схемы 2a, гидроксильная группа гетероарильных соединений формулы H может быть защищена с получением соединения формулы J, которое может затем реагировать с морфолином или аналогом морфолина при нагревании смеси в полярном апротонном растворителе, с получением соединения формулы K после удаления защитной группы, как показано в стадиях 2-ii и 2-iii схемы 2a. Затем, как показано в стадии 2-iv схемы 2a, соединение формулы K может реагировать с соединением формулы L при условиях, достаточных, чтобы вызвать SN<sub>2</sub> вытеснение его уходящей группы (например, где L является уходящей группой, такой как хлор, бром, иод, толуолсульфонат, метансульфонат или трифторметансульфонат), с получением соединения формулы M или формулы N, в зависимости от того, является ли водородом R<sup>1</sup> или R<sup>2</sup>. В тех случаях, когда R<sup>1</sup> или R<sup>2</sup> являются защищенными атомами азота или кислорода, соединения согласно изобретению могут быть получены при удалении защитной группы и последующей синтетической манипуляции с образовавшимся свободным амином/спиртом.

В альтернативе, как показано на схеме 2b, гидроксильная группа соединения формулы O может реагировать с соединением формулы L, с получением конденсированного бициклогетероарилбромида формулы P, который может затем реагировать с морфолином или аналогом морфолина с получением соединения формулы M или формулы N.

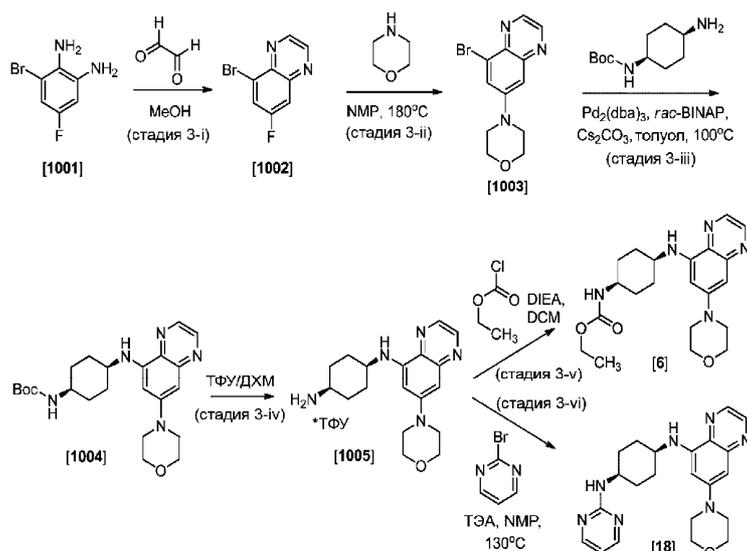


В альтернативе, как показано на схеме 2c, соединения согласно изобретению, в которых Кольцо В является дигидропирановым кольцом, могут быть получены в реакции соединений формулы Q с диалкил-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)боронатами, с получением соединений формулы R. Соединения формулы R могут быть затем восстановлены с образованием соединений формулы S.



Пример 3. Получение этил-(4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)карбамата (соединения 6) и N-(7-морфолинохиноксалин-5-ил)-N<sup>4</sup>-(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина (соединения 18)

Схема 3



Как показано в стадии 3-*i* схемы 3, к раствору 3-бром-5-фтор-бензол-1,2-диамина (соединения 1001, 1,11 г, 5,41 ммоль) в метаноле (11 мл) добавляли глиоксаль (1,57 мл, 40% в/об, 10,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре под азотом. Через 2 ч образовывался желтый осадок. Реакционную смесь разбавляли водой (20 мл), перемешивали еще 5 мин, фильтровали и собранное твердое вещество сушили в глубоком вакууме с получением 5-бром-7-фторхиноксалина (соединения 1002, 868 мг, выход 70,6%): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 9,06 (с, 2H), 8,36 (дд, J=8,5, 2,7 Гц, 1H), 8,00 (дд, J=9,2, 2,7 Гц, 1H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=227,14.

Как показано в стадии 3-*ii* схемы 3, к раствору 5-бром-7-фторхиноксалина (4,5 г, 19,8 ммоль) в NMP (67,5 мл) добавляли морфолин (3,1 мл, 35,6 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 140°C и перемешивали в течение 15 ч. После охлаждения смесь вливали в воду (200 мл), экстрагировали этилацетатом (2×100 мл), сушили над сульфатом магния, фильтровали, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (градиент 10% EtOAc/гексаны) с получением 4-(8-бромхиноксалин-6-ил)морфолина (соединения 1003, 3,86 г, выход 66%) в виде желтого твердого вещества: <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 8,82 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,73 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,12 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,27 (д, J=2,4 Гц, 1H), 3,87-3,69 (м, 4H), 3,44-3,34 (м, 4H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=227,14.

Как показано в стадии 3-*iii* схемы 3, смесь 4-(8-бромхиноксалин-6-ил)морфолина (1,57 г, 5,34 ммоль), трет-бутил-N-(4-аминоциклогексил)карбамата (1,37 г, 6,40 ммоль), (rac)-BINAP (664 мг, 1,07 ммоль), карбоната цезия (5,22 г, 16,0 ммоль) и Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (489 мг, 0,534 ммоль) в толуоле (50 мл) нагревали при 100°C в течение 12 ч. После охлаждения смесь разбавляли этилацетатом (150 мл) и водой (25 мл), затем фильтровали через диатомит и промывали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (градиент 0→60% EtOAc/гексаны) с получением трет-бутил(-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)карбамата (соединения 1004, 1,83 г, выход 83,2%): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,35 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,60 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,34 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,11 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,60 (с, 1H), 3,97-3,86 (м, 4H), 3,67 (с, 2H), 3,41-3,25 (м, 4H), 1,85 (д, J=3,0 Гц, 5H), 1,74-1,57 (м, 3H), 1,45 (с, 9H).

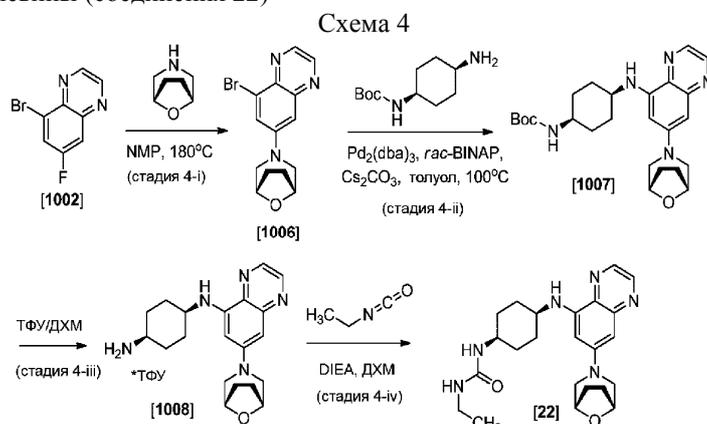
Как показано в стадии 3-*iv* схемы 3, к раствору трет-бутил(-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)-карбамата (900 мг, 2,00 ммоль) в дихлорметане (16 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (3 мл, 38,9 ммоль). Полученную черную реакционную смесь перемешивали под атмосферой азота при комнатной температуре в течение 2 ч. Насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (150 мл) медленно добавляли, пока цвет не изменялся с черного до оранжевого. Смесь экстрагировали дихлорметаном (2×100 мл) и объединенную органическую фазу промывали солевым раствором (50 мл), сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении с получением N<sup>1</sup>-(7-морфолинохиноксалин-5-ил)циклогексан-1,4-диамина, трифторацетата (соединения 1005): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,36 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,59 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,34 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,20 (д, J=7,9 Гц, 1H), 3,95-3,84 (м, 4H), 3,69 (с, 1H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,93 (д, J=8,9 Гц, 1H), 2,09-1,87 (м, 2H), 1,90-1,68 (м, 6H), 1,58 (дд, J=11,2, 8,7 Гц, 2H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=328,34. Это соединение использовали в таком виде без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 3-*v* схемы 3, к раствору N<sup>1</sup>-(7-морфолинохиноксалин-5-ил)циклогексан-1,4-диамина (25 мг, 0,07 ммоль) и диизопропилэтиламина (18,0 мг, 24,3 мкл, 0,14 ммоль) в дихлорметане (750 мкл) добавляли этилхлорформиат (11,4 мг, 10,0 мкл, 0,105 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч, разбавляли дихлорметаном (10 мл), промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл), сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении. Полу-

ченный остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ хроматографии при использовании в качестве элюента градиента 10-90% ацетонитрила/воды (0,1% ТФУ) с получением этил-(4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)карбамата (соединения 6, 14 мг, выход 50%):  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,65 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 8,36 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 6,61 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 6,35 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 6,10 (д,  $J=7,6$  Гц, 1H), 4,72 (с, 1H), 4,12 (к,  $J=7,0$  Гц, 2H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,68 (с, 2H), 3,42-3,23 (м, 4H), 1,93-1,78 (м, 6H), 1,69 (дд,  $J=15,0, 6,3$  Гц, 2H), 1,25 (т,  $J=7,1$  Гц, 3H); ЭРИ-МС ( $M+H^+$ )=400,17.

Как показано в стадии 3-*vi* схемы 3, смесь  $N^1$ -(7-морфолинохиноксалин-5-ил)циклогексан-1,4-диамина (185 мг, 0,56 ммоль), 2-бромпиримидина (93 мг, 0,58 ммоль) и триэтиламина (143 мг, 1,97 мкл, 1,41 ммоль) в 1 метилпирролидин-2-оне (3 мл) нагревали до 130°C и перемешивали в течение 15 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь разбавляли этилацетатом (70 мл) и метил-трет-бутиловым эфиром (20 мл), промывали водой (3×20 мл), промывали солевым раствором (15 мл), сушили над сульфатом натрия, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (градиент 10% EtOAc/гексаны) с получением  $N^1$ -(7-морфолинохиноксалин-5-ил)- $N^4$ -(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина (соединения 18, 102 мг, выход 45%):  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,65 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 8,37 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 8,27 (д,  $J=4,8$  Гц, 2H), 6,60 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 6,51 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 6,36 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 6,15 (д,  $J=7,8$  Гц, 1H), 5,20 (д,  $J=7,7$  Гц, 1H), 4,04 (д,  $J=7,9$  Гц, 1H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,70 (с, 1H), 3,39-3,24 (м, 4H), 1,94 (дд,  $J=13,7, 4,4$  Гц, 6H), 1,78 (дт,  $J=28,8, 16,1$  Гц, 2H); ЭРИ-МС ( $M+H^+$ )=328,34.

Пример 4. Получение 1-(4-((7-(8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)хиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)-3-этилмочевины (соединения 22)



Как показано в стадии 4-*i* схемы 4, к раствору 5-бром-7-фторхиноксалина (соединения 1002, 150 мг, 0,66 ммоль) в NMP (2,3 мл) добавляли 8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октан (178 мг, 1,2 ммоль) при КТ. Реакционную смесь герметично закрывали в сосуде для микроволнового синтеза и нагревали при 180°C в течение 20 мин. После охлаждения до КТ и вливания в воду, водную фазу экстрагировали EtOAc (3×). Объединенные экстракты сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-100% EtOAc/гексаны) с получением 3-(8-бромхиноксалин-6-ил)-8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октана (соединения 1006, 87 мг, выход 41%) в виде темно-оранжевого масла: ЭРИ-МС ( $M+H^+$ )=320,07.

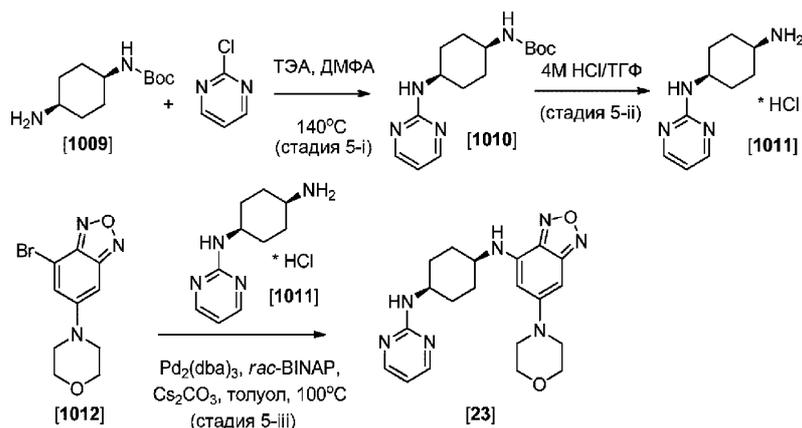
Как показано в стадии 4-*ii* схемы 4, дегазированный раствор 3-(8-бромхиноксалин-6-ил)-8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октана (261 мг, 0,815 ммоль), трет-бутил-N-(4-аминоциклогексил)карбамата (210 мг, 0,98 ммоль), *rac*-BINAP (102 мг, 0,163 ммоль),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (797 мг, 2,45 ммоль) и  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (75 мг, 0,0815 ммоль) в толуоле (10,5 мл) нагревали при 100°C (температура масляной бани) в закрытой пробирке для микроволнового синтеза в течение 15 ч. После охлаждения смесь наносили непосредственно на хроматографическую колонку и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-100% EtOAc/гексаны) с получением трет-бутил-(4-((7-(8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)хиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)-карбамата (соединения 1007, 141 мг, выход 36%) в виде белого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,49 (с, 1H), 8,23 (д,  $J=1,5$  Гц, 1H), 6,48 (с, 1H), 6,18 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 6,06 (с, 1H), 4,52 (с, 1H), 4,47 (с, 2H), 3,60 (с, 2H), 3,45 (д,  $J=11,6$  Гц, 2H), 3,14-3,12 (м, 2H), 1,96-1,84 (м, 4H), 1,79 (с, 5H), 1,54 (с, 3H) и 1,38 (с, 9H) м.д.; ЭРИ-МС ( $M+H^+$ )=453,96.

Как показано в стадии 4-*iii* схемы 4, к раствору соединения 1007 (141 мг, 0,295 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2,5 мл) добавляли ТФУ (656 мг, 443 мкл, 5,75 ммоль) при КТ. Полученный черный раствор перемешивали в течение 2 ч, после чего реакцию останавливали добавлением насыщенного раствора  $\text{NaHCO}_3$ , пока черный цвет постепенно не переходил в оранжевый. Реакционную смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×), объединенные органические экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривали досуха с получением  $N^1$ -(7-(8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)хиноксалин-5-ил)циклогексан-1,4-диамина, трифторацетата (соединения 1008): ЭРИ-МС ( $M+H^+$ )=354,20. Этот материал использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 4-iv схемы 4, к раствору соединения 1008 (45 мг, 0,071 ммоль) и DIEA (36,5 мг, 49,0 мкл, 0,28 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,4 мл) добавляли этилизоцианат (20 мг, 0,28 ммоль) при КТ. Раствор перемешивали при этой температуре в течение 15 ч, а затем наносили непосредственно на хроматографическую колонку и очищали с помощью хроматографа среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-100%  $\text{EtOAc}$ /гексаны) с получением 1-(4-((7-(8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)хиноксалин-5-ил)амино)циклогексил)-3-этилмочевины (соединения 22, 8 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,54 (с, 1H), 8,22 (с, 1H), 6,43 (с, 1H), 6,19 (с, 1H), 6,02 (с, 1H), 4,47 (с, 2H), 4,38 (д,  $J=5,2$  Гц, 1H), 4,28 (с, 1H), 3,74 (с, 1H), 3,60 (с, 1H), 3,42 (с, 4H), 3,14-3,09 (м, 4H), 2,05-1,87 (м, 3H), 1,79 (с, 3H), 1,55 (д,  $J=7,1$  Гц, 2H) и 1,21-1,05 (м, 5H) м.д.; ЭРИ-МС ( $\text{M}+\text{H}^+$ )=425,35.

Пример 5. Получение  $\text{N}^1$ -(6-морфолино-бензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)- $\text{N}^4$ -(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина (соединения 23)

Схема 5

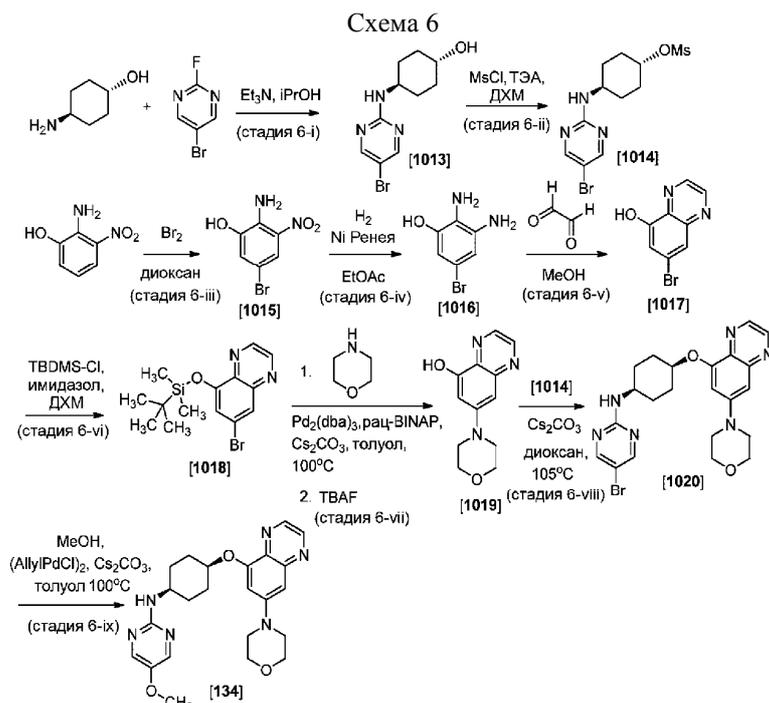


Как показано в стадии 5-i схемы 5, смесь трет-бутил-((цис)-4-аминоциклогексил)карбамата (соединения 1009, 490 мг, 2,3 ммоль), 2-хлорпиримидина (262 мг, 2,3 ммоль) и ТЭА (463 мг, 637 мкл, 4,6 ммоль) в ДМФА (10 мл) подвергали микроволновому облучению в течение 20 мин в  $150^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь разбавляли с  $\text{EtOAc}$ , промывали  $\text{H}_2\text{O}$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-50%  $\text{EtOAc}$ /гексаны) с получением трет-бутил-((цис)-4-((пиримидин-2-иламино)циклогексил)карбамата (соединение 1010) в виде белого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,28 (д,  $J=4,8$  Гц, 2H), 6,53 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 5,12 (с, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,99 (дк,  $J=7,0, 3,5$  Гц, 1H), 3,65 (с, 1H), 1,83 (тк,  $J=10,2, 3,6$  Гц, 5H), 1,66 (с, 8H), 8,13-7,91 (м, 3H), 1,47 (с, 9H).

Как показано в стадии 5-ii схемы 5, к соединению 1010 добавляли  $\text{HCl}$  (3 мл, 4M в ТГФ, 12 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин и выпаривали при пониженном давлении с получением (цис)- $\text{N}^1$ -(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина, гидрохлорида (соединения 1011). Этот материал использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 5-iii схемы 5, смесь 4-бром-6-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазола (соединения 1012, 147 мг, 0,5 ммоль), гидрохлорида (цис)- $\text{N}^1$ -(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина (120 мг, 0,6 ммоль), (рац)-BINAP (32 мг, 0,05 ммоль),  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (24 мг, 0,026 ммоль) и карбоната цезия (506 мг, 1,55 ммоль) в толуоле (5 мл) барботировали азотом и перемешивали в течение ночи при  $90^\circ\text{C}$  под атмосферой азота. Смесь фильтровали через слой диатомита, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-80%  $\text{EtOAc}$ /гексаны) с получением (цис)- $\text{N}^1$ -(6-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)- $\text{N}^4$ -(пиримидин-2-ил)циклогексан-1,4-диамина (соединения 23) в виде оранжевого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,20 (д,  $J=4,9$  Гц, 2H), 6,46 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 6,05 (д,  $J=1,6$  Гц, 1H), 5,82 (с, 1H), 5,24 (с, 1H), 4,82 (д,  $J=7,0$  Гц, 1H), 3,98 (с, 1H), 3,85-3,72 (м, 4H), 3,60 (с, 1H), 3,23-3,06 (м, 4H), 1,95-1,62 (м, 8H).

Пример 6. Получение 5-метокси-N-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин (соединения 134)



Как показано в стадии 6-*i* схемы 6, к смеси 5-бром-2-фторпиримидина (1 г, 5,651 ммоль) в *i*PrOH (10 мл) добавляли ТЭА (1,143 г, 1,574 мл, 11,30 ммоль) и транс-4-аминоциклогексан-1-ол (650,8 мг, 5,651 ммоль). Смесь обрабатывали в мироволновом реакторе в течение 20 мин при 150°C, выпаривали при пониженном давлении, разбавляли EtOAc, промывали водой и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После удаления летучих веществ при пониженном давлении остаток очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-80% EtOAc/гексаны) с получением (транс)-4-((5-бромпиримидин-2-ил)амино)циклогексанола (соединения 1013, 1,2 г): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (с, 2H), 5,03 (д, J=8,1 Гц, 1H), 3,91-3,49 (м, 2H), 2,31-1,90 (м, 4H), 1,56-1,19 (м, 4H).

Как показано в стадии 6-*ii* схемы 6, к соединению 1013 (1,2 г, 4,41 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли ТЭА (1,134 г, 1,84 мл, 13,2 ммоль) и MsCl (505 мг, 341 мкл, 4,41 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-80% EtOAc/гексаны) с получением транс-4-((5-бромпиримидин-2-ил)амино)циклогексил-метансульфоната (соединения 1014): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,29 (с, 2H), 5,03 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,70 (тт, J=10,6, 3,9 Гц, 1H), 3,80 (дтт, J=11,2, 7,6, 3,7 Гц, 1H), 3,04 (с, 3H), 2,30-2,12 (м, 4H), 1,93-1,69 (м, 2H), 1,51-1,33 (м, 2H).

Как показано в стадии 6-*iii* схемы 6, к раствору 2-амино-3-нитрофенола (5,00 г, 32,4 ммоль) в диоксане (50 мл) добавляли бром (6,22 г, 2,01 мл, 38,9 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 ч с образованием осадка, который собирали и промывали диоксаном и эфиром. Полученное желтое твердое вещество обрабатывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub>, экстрагировали EtOAc (3×). Объединенную органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением 2-амино-5-бром-3-нитрофенола (соединения 1015) в виде коричневого твердого вещества. Этот материал использовали в таком виде в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 6-*iv* схемы 6, к раствору 2-амино-5-бром-3-нитрофенола (7,5 г, 31,8 ммоль) в этилацетате (60 мл) добавляли никель Ренея (1,90 г, 214 мкл, 32,4 ммоль) и встряхивали реакционную смесь в течение 2 ч под атмосферой H<sub>2</sub> при 207 кПа (30 фунтов на кв. дюйм). После фильтрации и сушки над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> смесь выпаривали при пониженном давлении с получением 2,3-диамино-5-бромфенола (соединения 1016), которое использовали в таком виде в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 6-*v* схемы 6, 2,3-диамино-5-бромфенол (6,0 г, 29,5 ммоль) растворяли в метаноле и к этому раствору добавляли глиоксаль (3,77 г, 2,98 мл, 64,9 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении до минимального объема, полученное коричневое твердое вещество собирали фильтрацией и сушили в глубоком вакууме с получением 7-бромхиноксалин-5-ола (соединения 1017), который использовали в таком виде в последующих реакциях без дополнительной очистки.

Как показано в стадии 6-*vi* схемы 6, в раствор 7-бромхиноксалин-5-ола (2,0 г, 8,89 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли имидазол (1,82 г, 26,7 ммоль) и трет-бутилдиметилсилилхлорид (1,34 г, 1,65 мл, 8,89 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-20%

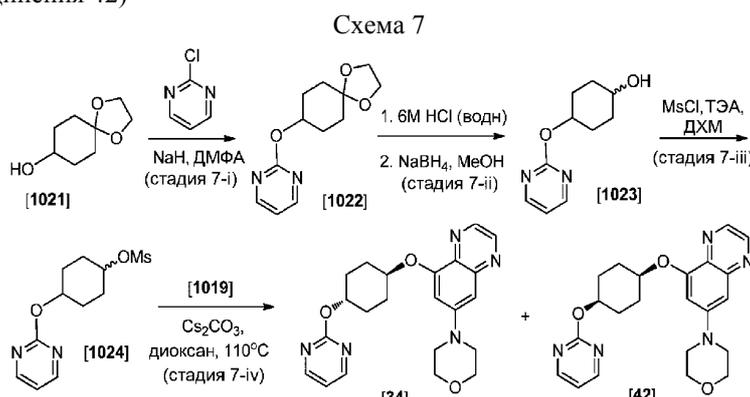
EtOAc/гексаны) с получением 7-бром-5-(трет-бутилдиметилсилил)окси)хиноксалина (соединения 1018) в виде бесцветного масла:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,69 (к,  $J=1,8$  Гц, 2H), 7,80 (д,  $J=2,1$  Гц, 1H), 7,22 (д,  $J=2,1$  Гц, 1H), 0,96 (с, 9H), 0,81 (с, 7H).

Как показано в стадии 6-vii схемы 6, смесь 7-бром-5-(трет-бутилдиметилсилил)окси)хиноксалина (700 мг, 2,06 ммоль), морфолина (270 мг, 270 мкл, 3,09 ммоль),  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (94,50 мг, 0,1032 ммоль), (рац)-BINAP (129 мг, 0,206 ммоль), карбоната цезия (2,02 г, 6,19 ммоль) в толуоле (7 мл) барботировали азотом в течение 10 мин. Затем смесь нагревали в течение ночи при  $100^\circ\text{C}$ . После охлаждения реакцию смесь разбавляли EtOAc, фильтровали через слой диатомита, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-30% EtOAc/гексаны) с получением 7-морфолинохиноксалин-5-ола. Это соединение (450 мг, 1,3 ммоль) растворяли в ТГФ (20 мл) и добавляли фторид тетра-*n*-бутиламмония (539 мг, 2,06 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 0,5 ч, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-100% EtOAc/гексаны) с получением 7-морфолинохиноксалин-5-ола (соединения 1019) в виде желтого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,75 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 8,46 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,70 (д,  $J=41,8$  Гц, 1H), 7,01 (д,  $J=2,6$  Гц, 1H), 6,89 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 4,12-3,78 (м, 4H), 3,51-3,24 (м, 4H).

Как показано в стадии 6-viii схемы 6, раствор 7-морфолинохиноксалин-5-ола (100 мг, 0,432 ммоль), (транс)-4-((5-бромпиридин-2-ил)амино)циклогексилметансульфоната (соединения 1014, 303 мг, 0,865 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (282 мг, 0,865 ммоль) в диоксане (1,0 мл) перемешивали в течение 16 ч при  $105^\circ\text{C}$ . После охлаждения реакцию смесь разбавляли EtOAc, фильтровали через диатомит, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-5% MeOH/ДХМ) с получением 5-бром-*N*-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексил)пиридин-2-амин (соединения 1020, 110 мг) в виде желтой пены:  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,70 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 8,64 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 8,29 (с, 2H), 6,98 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 6,92 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 5,29 (д,  $J=8,3$  Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,04-3,84 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 2,22 (с, 2H), 1,92 (д,  $J=4,9$  Гц, 6H).

Как показано в стадии 6-ix схемы 6, смесь 5-бром-*N*-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексил)пиридин-2-амин (75 мг, 0,155 ммоль), карбоната цезия (101 мг, 0,309 ммоль), димера хлорида аллилпалладия (II) (0,28 мг, 0,0015 ммоль), RockPhos (2,17 мг, 0,0046 ммоль) и MeOH (9,9 мг, 12,5 мкл, 0,31 ммоль) в толуоле (2 мл) барботировали азотом и нагревали до  $100^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc, фильтровали через слой диатомита и выпаривали при пониженном давлении. Очистка с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-8% MeOH/ДХМ) давала 5-метокси-*N*-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексил)пиридин-2-амин (соединения 134, 43 мг):  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,70 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 8,63 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 8,07 (с, 2H), 6,96 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 6,92 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 5,01 (д,  $J=8,1$  Гц, 1H), 4,80 (к,  $J=5,6$ , 4,2 Гц, 1H), 4,03-3,87 (м, 5H), 3,80 (с, 3H), 3,42-3,27 (м, 4H), 2,29-2,10 (м, 2H), 1,99-1,82 (м, 6H).

Пример 7. Получение 4-(8-(((транс)-4-(пиридин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-6-ил)морфолина (соединения 34) и 4-(8-(((цис)-4-(пиридин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-6-ил)морфолина (соединения 42)



Как показано в стадии 7-i схемы 7, к раствору 1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-ола (соединения 1021, 1,0 г, 6,32 ммоль) в ДМФА (10 мл) добавляли NaH (370 мг, 9,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, после чего добавляли 2-хлорпиридин (869 мг, 7,59 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при КТ и затем нагревали до  $100^\circ\text{C}$  в течение 9 ч. После охлаждения смесь разбавляли EtOAc, промывали  $\text{H}_2\text{O}$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (0-40% EtOAc/гексаны) с получением 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илокси)пиридина (соединения 1022) в виде бесцветного масла:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц, Хлороформ-*d*)  $\delta$  8,52 (д,  $J=4,8$  Гц, 2H), 6,92 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 5,15 (дд,  $J=10,7$ , 6,5, 4,2 Гц, 1H), 4,05-3,87 (м, 4H), 2,14-1,85 (м, 6H), 1,79-1,65 (м, 2H); ЭРИ-МС ( $\text{M}+\text{H}^+$ )=237,12.

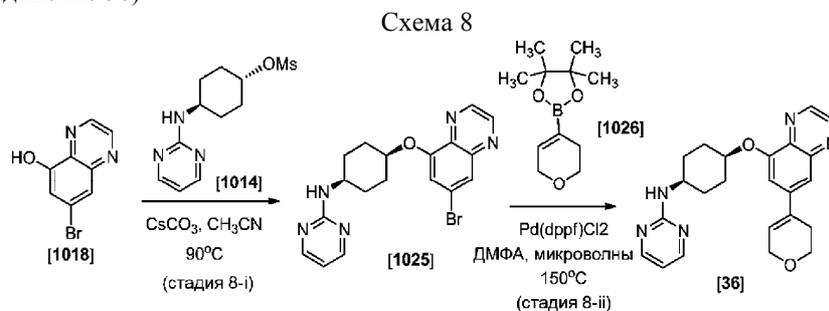
Как показано в стадии 7-ii схемы 7, к 2-(1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илокси)пиридину (620 мг,

2,624 ммоль) добавляли HCl (4,0 мл 6 М, 8,86 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Затем рН смеси нейтрализовали нас. раствором NaHCO<sub>3</sub> (водн.) и выпаривали смесь при пониженном давлении в виде метанольной азеотропной смеси. К остатку добавляли ДХМ (30 мл) с образованием осадка, после чего перемешивали еще в течение 20 мин. Твердую фазу отфильтровывали, и маточную жидкость выпаривали при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в метаноле и добавляли твердый борогидрид натрия (151 мг, 3,99 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 ч и останавливали реакцию HCl (6М, 0,70 мл). Перемешивание продолжали до прекращения выделения газа. Смесь доводили приблизительно до рН 8 1Н гидроксидом натрия и экстрагировали EtOAc (20 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и выпаривали при пониженном давлении с получением 4-(пиримидин-2-илокси)циклогексанола (соединения 1023, 248 мг, выход 64%) в виде смеси (цис)- и (транс)-изомеров. Аликвоту 12 мг образца очищали с помощью препаративной обращено-фазовой ВЭЖХ хроматографии (в градиенте 10-90% CH<sub>3</sub>CN/воды, содержащей 0,1% ТФУ) с разделением изомеров: (транс)-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола - <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ 8,54 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,95 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,05 (тг, J=9,4, 4,0 Гц, 1H), 3,91-3,75 (м, 1H), 2,26-1,99 (м, 4H), 1,76-1,41 (м, 4H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)= 195,07, (цис)-4-пиримидин-2-илоксициклогексанола - <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=4,9 Гц, 2H), 7,04 (т, J=4,9 Гц, 1H), 5,21 (тг, J=5,3, 2,6 Гц, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,85 (р, J=5,9 Гц, 1H), 2,17-2,02 (м, 2H), 1,88-1,67 (м, 6H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=195,07. Оставшийся материал использовали в последующих реакциях в виде цис/транс смеси.

Как показано в стадии 7-iii схемы 7, к раствору смеси цис/транс 4-пиримидин-2-илоксициклогексанола (244 мг, 1,256 ммоль) и триэтиламина (350 мкл, 2,51 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли метансульфонилхлорид (145 мкл, 1,87 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-20% EtOAc/дихлорметана) с получением 4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (соединения 1024, 239 мг, выход 70%) в виде смеси цис/транс изомеров: <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ 8,51 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,93 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,13 (дк, J=9,9, 3,0 Гц, 1H), 4,87 (р, J=3,8 Гц, 1H), 3,04 (д, J=2,4 Гц, 3H), 2,28-1,99 (м, 4H), 1,99-1,74 (м, 4H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=273,52.

Как показано в стадии 7-iv схемы 7, смесь (4-пиримидин-2-илоксициклогексил)метансульфоната (105 мг, 0,386 ммоль), 7-морфолинохиноксалин-5-ола (178,3 мг, 0,7712 ммоль) и Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (125,6 мг, 0,3856 ммоль) в диоксане (1,5 мл) герметично закрывали в пробирке для микроволнового синтеза объемом 5 мл и нагревали до 110°C в течение 14 ч в масляной бане. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc и фильтровали через диатомит, после чего промывали этилацетатом. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении и очищали остаток с помощью препаративной обращено-фазовой ВЭЖХ (в градиенте 10-90% CH<sub>3</sub>CN/воды, содержащей 0,1% ТФУ). Фракции, содержащие смесь цис и транс-изомеров, дополнительно очищали с помощью СФХ при использовании хиральной колонки OJ и элюировали 40% MeOH в CO<sub>2</sub> с получением 21 мг 4-(8-(((транс)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-6-ил)морфолина (соединения 34): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, хлороформ-d) δ 8,69 (дд, J=3,4, 1,9 Гц, 1H), 8,62 (дд, J=3,6, 1,9 Гц, 1H), 8,51 (дд, J=4,8, 2,2 Гц, 2H), 7,01-6,83 (м, 3H), 5,18 (тг, J=7,0, 3,4 Гц, 1H), 4,79 (тг, J=6,9, 3,1 Гц, 1H), 4,00-3,85 (м, 4H), 3,34 (дк, J=4,8, 2,6 Гц, 4H), 2,44-2,16 (м, 4H), 1,92 (тдд, J=16,4, 7,7, 2,8 Гц, 4H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=408,56, и 22 мг 4-(8-(((цис)-4-(пиримидин-2-илокси)циклогексил)окси)хиноксалин-6-ил)морфолина (соединения 42): <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,52 (д, J=4,8 Гц, 2H), 7,01-6,87 (м, 3H), 5,17 (ддт, J=8,7, 6,7, 3,4 Гц, 1H), 4,76-4,58 (м, 1H), 4,00-3,87 (м, 4H), 3,40-3,27 (м, 4H), 2,43-2,22 (м, 4H), 2,05-1,87 (м, 2H), 1,86-1,71 (м, 2H); ЭРИ-МС (M+H<sup>+</sup>)=408,56.

Пример 8. N-[(цис)-4-[7-(3,6-дигидро-2Н-пиран-4-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]пиримидин-2-амин (соединение 36)



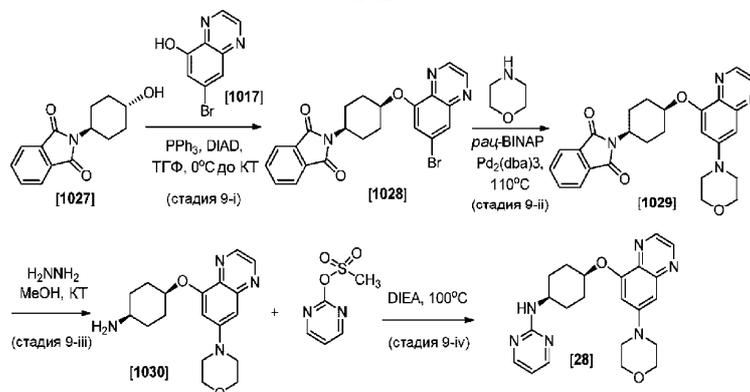
Как показано в стадии 8-i схемы 8, к смеси 7-бромхиноксалин-5-ола (соединения 1018, 200 мг, 0,89 ммоль) и карбоната цезия (579 мг, 1,78 ммоль) в NMP (4,0 мл) добавляли (транс)-4-(пиримидин-2-иламино)циклогексилметансульфонат (соединения 1014, 241,1 мг, 0,8887 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при 90°C и в это время добавляли еще 0,5 экв. соединения 1014 (241 мг, 0,89 ммоль). После перемешивания при 90°C в течение еще 6 ч реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали H<sub>2</sub>O, суши-

ли над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (0-5%  $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$ ) с получением N-(цис)-4-((7-бромхиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин (соединения 1025):  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,01-8,77 (м, 2H), 8,29 (д,  $J=4,8$  Гц, 2H), 7,89 (д,  $J=1,9$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 6,53 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 5,43-5,22 (м, 1H), 4,79 (тд,  $J=5,2, 2,5$  Гц, 1H), 4,18-3,95 (м, 1H), 3,51 (с, 1H), 2,22 (тд,  $J=10,2, 9,6, 5,4$  Гц, 2H), 2,09-1,86 (м, 6H).

Как показано в стадии 8-ii схемы 8, смесь N-(цис)-4-((7-бромхиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин (соединения 1025, 52 мг, 0,1299 ммоль),  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (10,61 мг, 0,01299 ммоль), 2-(3,6-дигидро-2H-пиран-4-ил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (соединения 1026, 27,3 мг, 0,13 ммоль),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (195 мкл 2М (водн) раствора, 0,39 ммоль) в ДМФА (1 мл) барботировали азотом в течение 10 мин. Смесь подвергали микроволновому облучению в течение 20 мин при  $150^\circ\text{C}$ . После охлаждения смесь разбавляли  $\text{EtOAc}$ , промывали  $\text{H}_2\text{O}$ , сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (0-5%  $\text{MeOH}/\text{ДХМ}$ ) с получением N-[(цис)-4-[7-(3,6-дигидро-2H-пиран-4-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]пиримидин-2-амин (соединения 36) в виде почти белого твердого вещества:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,94-8,76 (м, 2H), 8,29 (д,  $J=4,8$  Гц, 2H), 7,67 (д,  $J=1,7$  Гц, 1H), 6,53 (т,  $J=4,8$  Гц, 1H), 6,37 (тт,  $J=3,1, 1,5$  Гц, 1H), 5,30 (д,  $J=7,9$  Гц, 1H), 4,87 (дт,  $J=7,5, 3,6$  Гц, 1H), 4,43 (к,  $J=2,8$  Гц, 2H), 4,02 (т,  $J=5,5$  Гц, 3H), 2,68 (дкд,  $J=6,0, 3,4, 3,0, 1,8$  Гц, 2H), 2,35-2,11 (м, 2H), 2,07-1,84 (м, 6H); ЭРИ-МС ( $\text{M}+\text{H}^+$ )=404,2.

Пример 9. N-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин (соединение 28)

Схема 9



Как показано в стадии 9-i схемы 9, 7-бромхиноксалин-5-ол (соединение 1017, 5,4 г, 24,0 ммоль), 2-(транс)-4-гидроксициклогексилизоиндолин-1,3-дион (5,607 г, 22,86 ммоль) и трифенилфосфин (8,994 г, 7,945 мл, 34,29 ммоль) растворяли в безводном ТГФ и охлаждали колбу в ледяной бане. По каплям добавляли DIAD (6,93 г, 6,64 мл, 34,3 ммоль) и реакцию перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 5 мин, после чего нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь выпаривали при пониженном давлении, а остаток обрабатывали  $\text{Et}_2\text{O}$  и перемешивали в течение 0,5 ч при КТ, осадок отфильтровывали, фильтрат выпаривали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью хроматографии средней давления на силикагеле (в градиенте 0-50%  $\text{EtOAc}/\text{гексаны}$ ) с получением 2-[(цис)-4-(7-бромхиноксалин-5-ил)оксициклогексил]-изоиндолин-1,3-диона (соединения 1028, 6,2 г, выход 60%):  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,95 (д,  $J=1,8$  Гц, 1H), 8,86 (д,  $J=1,8$  Гц, 1H), 7,91 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,88-7,80 (м, 2H), 7,77-7,68 (м, 2H), 7,31 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 4,96 (т,  $J=2,9$  Гц, 1H), 4,29 (тт,  $J=12,5, 3,8$  Гц, 1H), 2,88 (кд,  $J=12,9, 3,6$  Гц, 2H), 2,54-2,32 (м, 2H), 1,94-1,61 (м, 4H).

Как показано в стадии 9-ii схемы 9, в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, смесь 2-[4-(7-бромхиноксалин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (6,2 г, 12,34 ммоль), морфолина (1,61 г, 1,62 мл, 18,5 ммоль) и  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (12,06 г, 37,0 ммоль) в безводном толуоле (73 мл) обрабатывали рац-BINAP (768,4 мг, 1,234 ммоль) и  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (565 мг, 0,617 ммоль). Реакционную смесь нагревали при  $110^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. После охлаждения до комнатной температуры смесь фильтровали через диатомит и выпаривали при пониженном давлении. Остаток растирали в  $\text{Et}_2\text{O}$ , твердую фазу собирали с помощью фильтрацией и промывали  $\text{Et}_2\text{O}$  с получением 2-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексилизоиндолин-1,3-диона (соединения 1029, 4,2 г) в виде желтого твердого вещества. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (в градиенте 0-100%  $\text{EtOAc}/\text{гексаны}$ ) с получением дополнительных 300 мг соединения 1029:  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,76-8,63 (м, 2H), 7,85 (дд,  $J=5,4, 3,1$  Гц, 2H), 7,79-7,60 (м, 2H), 7,09 (д,  $J=2,6$  Гц, 1H), 6,99 (д,  $J=2,5$  Гц, 1H), 5,06 (т,  $J=2,8$  Гц, 1H), 4,27 (тт,  $J=12,3, 3,8$  Гц, 1H), 4,02-3,85 (м, 4H), 3,49-3,27 (м, 4H), 3,03-2,75 (м, 2H), 2,37 (д,  $J=14,0$  Гц, 2H), 1,83-1,56 (м, 4H).

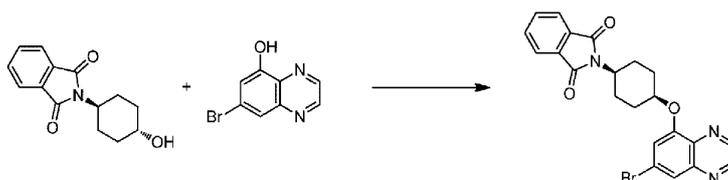
Как показано в стадии 9-iii схемы 9, к суспензии 2-[(цис)-4-(7-морфолинохиноксалин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (2,3 г, 5,02 ммоль) в  $\text{MeOH}$  (25 мл) добавляли гидразин (321 мг, 315 мкл, 10,0 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 18 ч при КТ, за это время исход-

ная суспензия становилась гомогенной, после чего образовывался осадок. Добавляли Et<sub>2</sub>O (30 мл) и реакционную смесь перемешивали еще 30 мин. Осадок отфильтровывали, фильтрат выпаривали при пониженном давлении, остаток обрабатывали ДХМ (30 мл) и оставшиеся твердые вещества удаляли с помощью фильтрации. Фильтрат выпаривали при пониженном давлении с получением (цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексанамин (соединения 1030), который использовали в таком виде в последующих реакциях: <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,00-4,67 (м, 3H), 4,03-3,81 (м, 4H), 3,49 (с, 1H), 3,43-3,25 (м, 4H), 2,88 (к, J=6,2 Гц, 2H), 2,36-1,96 (м, 6H).

Как показано в стадии 9-iv схемы 9, к раствору (цис)-4-(7-морфолинохиноксалин-5-ил)оксициклогексанамин (415 мг, 1,264 ммоль) и 2-метилсульфонилпиримидина (400 мг, 2,53 ммоль) добавляли DIEA (490 мг, 661 мкл, 3,79 ммоль), реакционную смесь герметично закрывали в сосуде и нагревали до 100°C в течение 16 ч. После этого летучие вещества удаляли в токе азота и неочищенный остаток растворяли в минимальном количестве ДХМ. Очистка в помощью хроматографии среднего давления на силикагеле (0-10% MeOH/ДХМ, 1% Et<sub>3</sub>N] давала N-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин, содержащий в качестве примеси гидрохлорид триэтиламина. Растворенный в ДХМ продукт перемешивали с амином на силикагеле (Silabond amine® 40-63 мкм). Смесь ловушки отфильтровывали, выпаривали при пониженном давлении и сушили в глубоком вакууме с получением N-(цис)-4-((7-морфолинохиноксалин-5-ил)окси)циклогексилпиримидин-2-амин (соединения 28, 435 мг): <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,27 (с, 1H), 8,26 (с, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,50 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,08-3,97 (м, 1H), 3,94-3,86 (м, 4H), 3,37-3,28 (м, 4H), 2,20 (д, J=9,1 Гц, 2H), 1,95-1,85 (м, 6H).

Пример 10. Получение N-[4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]пиримидин-2-амин (соединения 291)

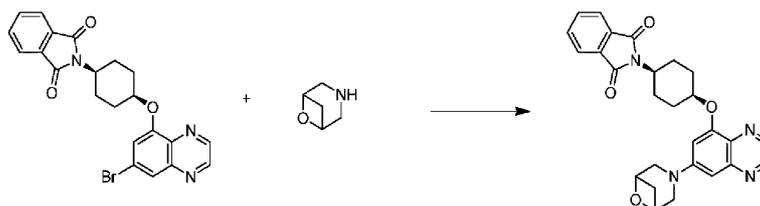
Схема 10a



К смеси 7-бромхиноксалин-5-ола (47,53 г, 211,2 ммоль), 2-(4-гидроксициклогексил)изоиндолин-1,3-диона (52,41 г, 213,7 ммоль) и PPh<sub>3</sub> (87,31 г, 332,9 ммоль) в ТГФ (740 мл) при 21°C порциями добавляли трет-бутил-(N<sub>z</sub>)-N-трет-бутоксикарбонилиминокарбамат (DTBAD) (79,51 г, 328,0 ммоль) в течение 40 мин, поддерживая температуру ниже 30°C, и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще в течение 20 ч.

Реакцию выпаривали в вакууме. Остывшее красновато-коричневое вязкое масло растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> и фильтровали через слой силикагеля на стеклянной колонке с применением сжатого воздуха (носитель получали при использовании 1 л сухого силикагеля, суспендированного в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Носитель элюировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, фракции объединяли и выпаривали в вакууме с получением красно-коричневого вязкого масла/пены, которое затем растворяли в 700 мл MeOH перед осаждением. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтровали, промывали холодным MeOH (500 мл) и Et<sub>2</sub>O (100 мл), затем сушили в вакууме с получением рыжевато-коричневого твердого вещества, которое суспендировали в 300 мл MeOH и нагревали с обратным холодильником в течение 10 мин. Суспензию охлаждали до комнатной температуры и фильтровали, промывали дополнительным количеством MeOH и Et<sub>2</sub>O (4:1) и сушили в вакууме с получением 2-[4-(7-бромхиноксалин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (58,43 г, 126,6 ммоль, 59,94%). <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,96 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,86 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,91 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,89-7,82 (м, 2H), 7,78-7,67 (м, 2H), 7,30 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 4,29 (тт, J=12,5, 3,7 Гц, 1H), 2,87 (кд, J=13,1, 3,5 Гц, 2H), 2,44 (д, J=15,2 Гц, 2H), 1,80 (т, J=14,1 Гц, 2H), 1,67 (д, 2H). ЭРИ-МС m/z: вычисл. 451,05316, найдено 452,19 (M+1)<sup>+</sup>; время удерживания: 0,92 мин.

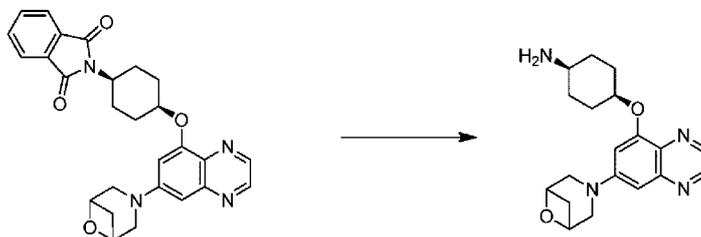
Схема 10b



Смесь 2-[4-(7-бромхиноксалин-5-ил)оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (1 г, 2,211 ммоль), 6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептана, HCl (180 мг, 1,328 ммоль), карбоната цезия (2,161 г, 6,633 ммоль), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (202,5 мг, 0,2211 ммоль) и рац-BINAP (275,3 мг, 0,4422 ммоль) в диоксане (5 мл) перемешивали

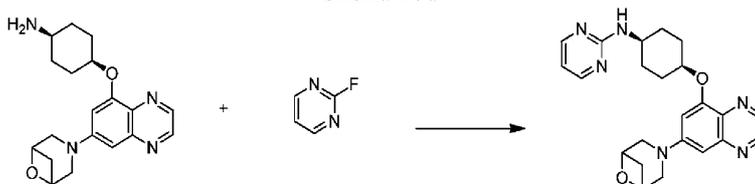
в течение ночи при 70°C, затем нагревали в микроволновом реакторе в течение 15 мин при 150°C. Затем реакцию разбавляли метилхлоридом, фильтровали через целит и выпаривали. Колоночная флеш-хроматография на силикагеле (0-5% MeOH/ДХМ) давала 2-[4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]изоиндолин-1,3-дион (750 мг, 72,1%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали в следующей реакции.

Схема 10с



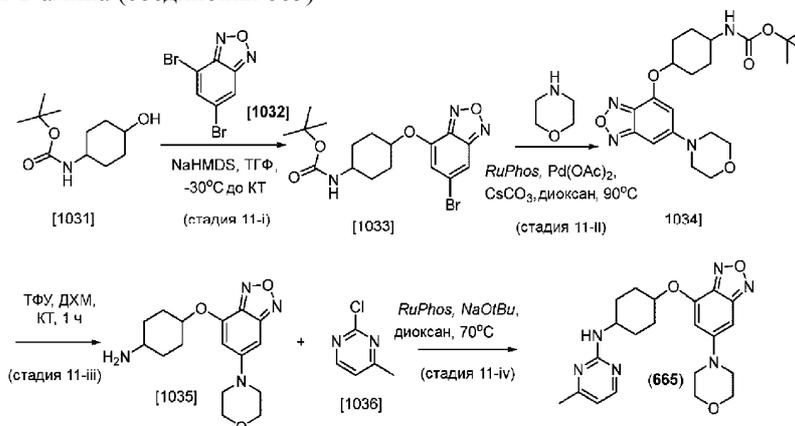
К раствору 2-[4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]изоиндолин-1,3-диона (800 мг, 1,700 ммоль) в EtOH (10 мл) добавляли гидразин моногидрат (85,10 мг, 83,35 мкл, 1700 ммоль) и перемешивали реакцию при нагревании с обратным холодильником в течение ночи, после чего выпаривали, разбавляли ДХМ и фильтровали. Фильтрат выпаривали и очищали на 40 г картридже с силикагелем 0-50% (20% NH<sub>3</sub>/MeOH) с получением 4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексан-амина (450 мг, 77,8%) в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,65 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,53 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,83 (к, J=2,6 Гц, 2H), 4,83 (т, J=6,0 Гц, 4H), 3,87-3,60 (м, 5H), 3,34 (дт, J=8,7, 6,6 Гц, 1H), 3,01-2,83 (м, 1H), 2,23 (дк, J=11,3, 5,8, 4,8 Гц, 2H), 2,07 (д, J=8,7 Гц, 1H), 1,92-1,62 (м, 6H).

Схема 10d



Смесь 4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексан-амина (190 мг, 0,5581 ммоль), 2-фторпиримидина (60 мг, 0,6118 ммоль) и DIEA (200 мкл, 1,148 ммоль) в 2-пропаноле (2 мл) нагревали в микроволновом реакторе в течение 20 мин при 150°C. Реакционную смесь выпаривали и затем очищали на 12 г картридже с силикагелем 0-6% MeOH/ДХМ, с получением N-[4-[7-(6-окса-3-азабицикло[3.1.1]гептан-3-ил)хиноксалин-5-ил]оксициклогексил]пиримидин-2-амина (120,2 мг, 48,9%) в виде желтого твердого вещества. Масса +1: 419,23; Время удерживания: 0,72; Данные ЯМР: <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,42 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,30 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,04 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,65-6,56 (м, 2H), 6,28 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,99 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,60 (д, J=6,5 Гц, 3H), 3,79 (дд, J=8,2, 4,0 Гц, 0H), 3,62-3,38 (м, 4H), 3,17-3,03 (м, 1H), 2,07-1,90 (м, 2H), 1,89-1,59 (м, 7H).

Пример 11. Получение 4-метил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]пиримидин-2-амина (соединения 665)



Смесь 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазола (3 г, 10,80 ммоль) и трет-бутил-N-(4-гидроксициклогексил)карбамата (2,5 г, 11,61 ммоль) растворяли в ТГФ (60 мл) и охлаждали до -30°C. К смеси по каплям добавляли бис(триметилсилил)амид натрия (NaHMDS, 23 мл 1 М, 23,00 ммоль) в течение 10 мин, при этом раствор становился темно-синим. Смесь перемешивали в течение 30 мин при -20-0°C и 30 мин при КТ. ЖХ-МС показала только требуемый пик продукта без исходного материала. Охлаждали до 0°C,

приливали 10% раствор лимонной кислоты, экстрагировали EtOAc, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали. Очищали 0-40% EtOAc/гептаном. Получали 1,9 г (42%) трет-бутил-((1s,4s)-4-((6-бромбензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)окси)циклогексил)карбамат (C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

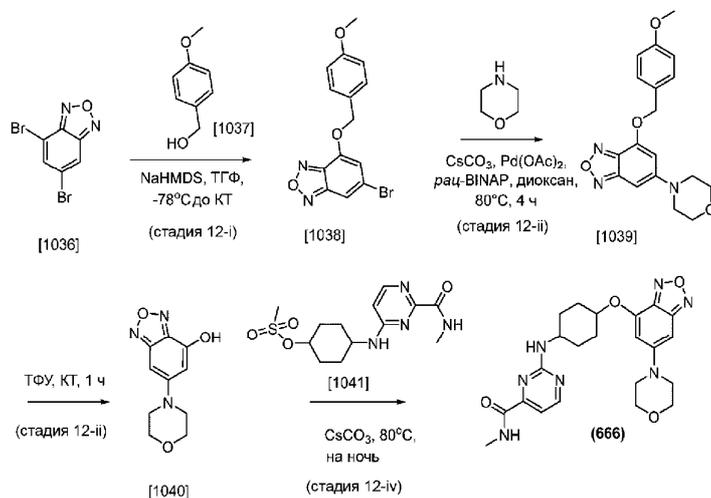
Смесь трет-бутил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]карбамата (2,6 г, 6,306 ммоль), карбоната цезия (4 г, 12,28 ммоль), диацетоксипалладия (140 мг, 0,6236 ммоль), RuPhos (580 мг, 1,243 ммоль) и морфолина (900 мкл, 10,32 ммоль) в диоксане (30 мл) барботировали N<sub>2</sub> в течение 5 мин. Смесь перемешивали в течение 3 ч при 90°C. ЖХ-МС показала требуемый продукт. Смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита, выпаривали и очищали на 80 г картридже с силикагелем при элюировании 0-80% EtOAc/гептаном с получением трет-бутил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]карбамата (2,1 г, 80%). <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 6,42 (д, J=12,3, 1,7 Гц, 2H), 4,86 (с, 1H), 4,58 (с, 1H), 4,00-3,86 (м, 4H), 3,38-3,18 (м, 4H), 2,28-2,08 (м, 2H), 1,94-1,62 (м, 6H), 1,42 (с, 9H).

трет-Бутил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]карбамат:

В раствор трет-бутил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]карбамата (3,5 г, 8,363 ммоль) в ДХМ (30 мл) добавляли ТФУ (приблизительно 953,6 мг, 644,3 мкл, 8,363 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч. Смесь выпаривали и очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании 0-10% (7Н NH<sub>3</sub>/MeOH/ДХМ). Получали 4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексанамин (2,5 г, 94%) ЭРИ-МС m/z вычисл. 318,1692, найдено 319,2 (M+1)<sup>+</sup>; время удерживания: 0,55 мин.

Во флакон для микроволнового синтеза вносили 4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексанамин (1 г, 3,141 ммоль), 2-хлор-4-метилпиримидин (600 мг, 4,667 ммоль), RockPhos G3 (80 мг, 0,3175 ммоль) и диоксан (10 мл). К смеси добавляли NaOtBu (4 мл 2 М, 8000 ммоль). Смесь перемешивали в течение 15 мин при 70°C. ЖХ-МС показала полное превращение, с получением 4-метил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]пиримидин-2-амин. Смесь разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита, выпаривали и очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании 0-10% MeOH/ДХМ с получением продукта. Продукт растирали с Et<sub>2</sub>O и сушили в вакууме. 4-метил-N-[4-[(6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)окси]циклогексил]пиримидин-2-амин (795,3 мг, 59%), <sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,16 (д, J=5,1 Гц, 1H), 6,49 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,47-6,40 (м, 2H), 5,07 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,32-3,24 (м, 4H), 2,34 (с, 3H), 2,25-2,08 (м, 2H), 2,04-1,74 (м, 6H), ЭРИ-МС m/z вычисл. 410,20663, найдено 411,3 (M+1)<sup>+</sup>; время удерживания: 0,63 мин.

Получение N-метил-2-((4-((6-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)окси)циклогексил)амино)пиримидин-4-карбоксамид (соединение (666))



К смеси 4,6-дибром-2,1,3-бензоксадиазола (1 г, 3,598 ммоль), (4-метоксифенил)метанола (500 мкл, 4,010 ммоль) в ТГФ (20 мл) при -78°C по каплям добавляли NaHMDS (4 мл 1 М, 4000 ммоль). Раствор становился синим. Смесь перемешивали при -78°C в течение 30 мин. Смеси позволяли нагреться до КТ и перемешивали в течение 1 ч при КТ. ЖХ-МС показала пик продукта и отсутствие исходного материала. ТСХ показала немного менее полярное пятно, чем исходный материал. Реакцию останавливали нас. NH<sub>4</sub>Cl, экстрагировали EtOAc, промывали H<sub>2</sub>O, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и выпаривали. Продукт очищали на 40 г картридже с силикагелем при элюировании 0-30% EtOAc с получением 6-бром-4-[(4-метоксифенил)метокси]-2,1,3-бензоксадиазола (850 мг, 70%) в виде желтоватого твердого вещества. <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,48 (д, J=1,2 Гц, 1H), 7,38-7,19 (м, 2H), 6,94-6,74 (м, 2H), 6,57 (д, J=1,1 Гц, 1H), 5,11 (с, 2H), 3,68 (д, J=9,4 Гц, 3H).

Смесь 6-бром-4-[(4-метоксифенил)метокси]-2,1,3-бензоксадиазола (830 мг, 2,476 ммоль), карбоната цезия (2,4 г, 7,366 ммоль), Pd(OAc)<sub>2</sub> (50 мг, 0,2227 ммоль), рац-BINAP (300 мг, 0,4818 ммоль) и морфолина (300 мкл, 3,440 ммоль) в диоксане (10 мл) барботировали N<sub>2</sub> в течение 10 мин. Смесь нагревали до

80°C. Смесь перемешивали в течение 4,5 ч при 80°C. ЖХ-МС показала чистый продукт. Смесь охлаждали до кт, разбавляли ДХМ, фильтровали через слой целита и выпаривали. Продукт очищали на 40 г картридже с силикагелем 0-70% EtOAc/ДХМ с получением 4-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазола (750 мг, 89%). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (д, J=8,7 Гц, 2H), 7,03-6,87 (м, 2H), 6,48 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,40 (д, J=1,6 Гц, 1H), 5,30 (д, J=13,5 Гц, 2H), 3,99-3,75 (м, 7H), 3,31-3,17 (м, 4H).

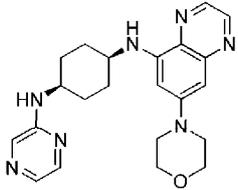
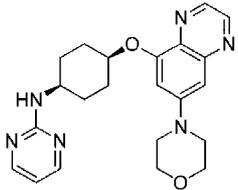
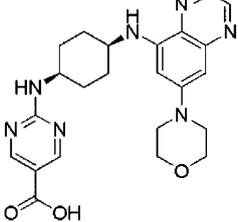
В раствор 4-[(4-метоксифенил)метокси]-6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазола (750 мг, 2,197 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли ТФУ (2 мл, 25,96 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч. Смесь выпаривали и продукт очищали на 12 г картридже с силикагелем при элюировании 0-10% MeOH/ДХМ, 6-Морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ол (400 мг, 82%) получали в виде желтой пены.

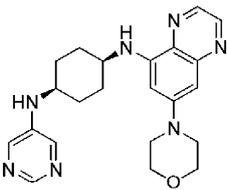
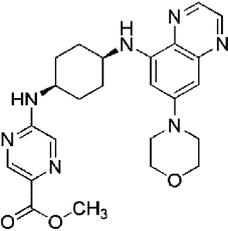
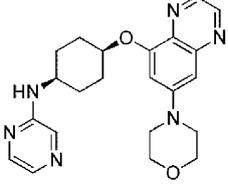
Смесь 6-морфолино-2,1,3-бензоксадиазол-4-ола (50 мг, 0,2260 ммоль), [4-[[4-(метилкарбамоил)пиримидин-2-ил]амино]-ДМФА, гексил]метансульфоната (240 мг, 0,7308 ммоль) и карбоната цезия (250 мг, 0,7673 ммоль) в ДМФА (1 мл) перемешивали в течение ночи при 80°C. ЖХ-МС показала требуемый продукт. Смесь разбавляли ДХМ и H<sub>2</sub>O, экстрагировали ДХМ, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, выпаривали. Продукт очищали на 4 г картридже с силикагелем при элюировании 0-5% MeOH/ДХМ с получением требуемого продукта N-метил-2-((4-((6-морфолинобензо[с][1,2,5]оксадиазол-4-ил)окси)циклогексил)амино)пиримидин-4-карбоксамида (41,8 мг, 39%). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,50 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,34 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,50 (д, J=1,3 Гц, 1H), 6,43 (д, J=1,5 Гц, 1H), 5,21 (д, J=7,2 Гц, 1H), 4,96 (с, 1H), 4,04 (с, 1H), 3,94-3,81 (м, 4H), 3,33-3,17 (м, 4H), 3,01 (т, J=9,9 Гц, 3H), 2,19 (д, J=8,2 Гц, 2H), 2,06-1,78 (м, 6H), ЭРИ-МС m/z вычисл. 453,21246, найдено 454,39 (M+1)<sup>+</sup>; время удерживания: 0,72 мин.

В табл. 1 и 2 представлены аналитические данные для некоторых соединений формулы (III-E-1, и III-E-2) (пустые ячейки означают, что анализ не проводили).

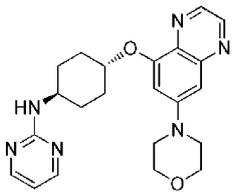
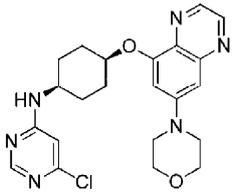
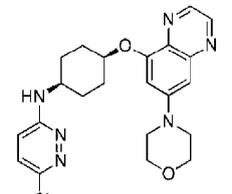
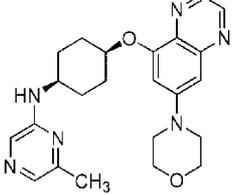
Таблица 1

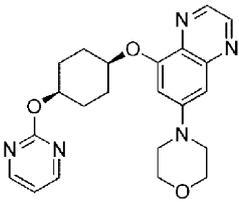
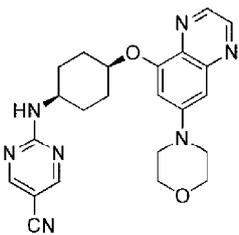
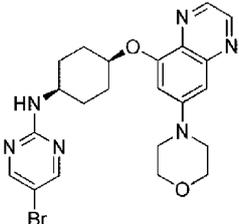
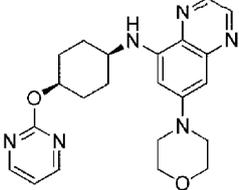
Соед.	Структура соединения	ЭРИ-МС (M+N)	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, если не указано иное) пики ЯМР приведены как δ значения
18		406,48	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,37 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,27 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,60 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,51 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,36 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,15 (д, J=7,8 Гц, 1H), 5,20 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,04 (д, J=7,9 Гц, 1H), 3,96-3,82 (м, 4H), 3,70 (с, 1H), 3,39-3,24 (м, 4H), 1,94 (дд, J=13,7, 4,4 Гц, 6H), 1,78 (дт, J=28,8, 16,1 Гц, 2H)
23		396,2	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,20 (д, J=4,9 Гц, 2H), 6,46 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,05 (д, J=1,6 Гц, 1H), 5,82 (с, 1H), 5,24 (с, 1H), 4,82 (д, J=7,0 Гц, 1H), 3,98 (с, 1H), 3,85-3,72 (м, 4H), 3,60 (с, 1H), 3,23-3,06 (м, 4H), 1,95-1,62 (м, 8H), [2]
24		405,59	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,65 (с, 1H), 8,37 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,08 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,41 (т, J=7,7 Гц, 1H), 6,61 (с, 1H), 6,58-6,53 (м, 1H), 6,46-6,30 (м, 2H), 6,15 (д, J=7,3 Гц, 1H), 4,56 (с, 1H), 3,98-3,78 (м, 5H), 3,76-3,61 (м, 1H), 3,42-3,24 (м, 4H), 1,97 (д, J=29,6 Гц, 6H), 1,86-1,66 (м, 2H)

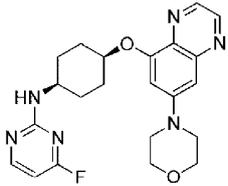
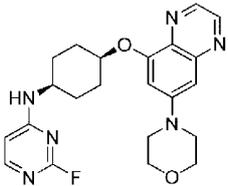
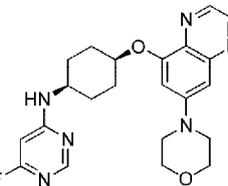
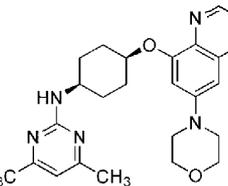
27		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,65 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,36 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,98 (дд, J=2,8, 1,5 Гц, 1H), 7,88 (д, J=1,5 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,8 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,17 (с, 1H), 8,69-8,61 (м, 1H), 4,60 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,08-3,83 (м, 5H), 8,71-8,57 (м, 1H), 3,73 (т, J=6,9 Гц, 1H), 3,40-3,25 (м, 4H), 1,96 (г, J=4,9 Гц, 6H), 1,77 (к, J=7,4, 6,1 Гц, 2H)</p>
28		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,77-8,59 (м, 2H), 8,29 (д, J=4,9 Гц, 2H), 7,01-6,87 (м, 2H), 6,61-6,48 (м, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,05 (с, 1H), 3,93 (т, J=4,8 Гц, 4H), 3,35 (т, J=4,8 Гц, 4H), 2,23 (д, J=13,1 Гц, 2H), 2,05-1,82 (м, 6H)</p>
29		<p>(DMCO-d<sub>6</sub>) δ 12,65 (с, 1H), 8,69 (д, J=2,0 Гц, 2H), 8,43 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,00 (д, J=7,9 Гц, 1H), 6,54 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,48 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,17 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,06 (с, 1H), 3,77 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,29 (с, 5H), 2,04-1,46 (м, 8H)</p>

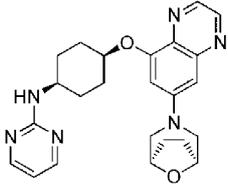
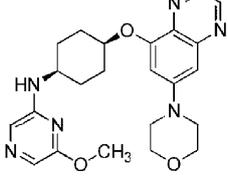
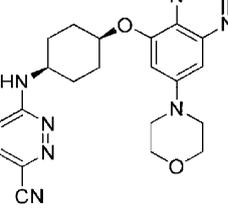
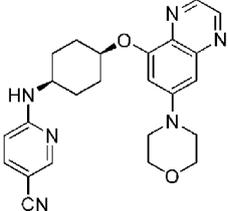
30		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,66 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,37 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,13 (с, 2H), 6,63 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,14 (д, J=7,6 Гц, 1H), 3,96-3,86 (м, 4H), 3,76 (д, J=7,7 Гц, 2H), 3,54 (д, J=8,3 Гц, 1H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,02-1,86 (м, 6H), 1,76 (к, J=8,9, 8,3 Гц, 2H)</p>
32		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,78 (д, J=1,3 Гц, 1H), 8,66 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,37 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,91 (д, J=1,3 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,16 (д, J=7,6 Гц, 1H), 5,13 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,10 (с, 1H), 3,99-3,86 (м, 7H), 3,76 (с, 1H), 3,39-3,28 (м, 4H), 1,98 (г, J=4,8 Гц, 6H), 1,80 (т, J=8,7 Гц, 2H)</p>
33		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (дд, J=2,8, 1,5 Гц, 1H), 7,94-7,85 (м, 1H), 7,79 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,14 (д, J=1,0 Гц, 1H), 7,03-6,87 (м, 2H), 4,82 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,70 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,03-3,86 (м, 4H), 3,51 (с, 1H), 3,43-3,30 (м, 4H), 2,35-1,81 (м, 8H)</p>

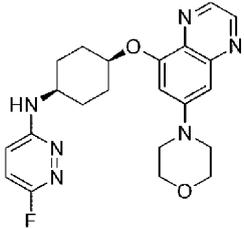
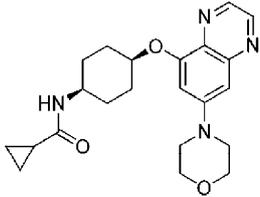
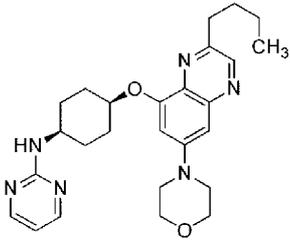


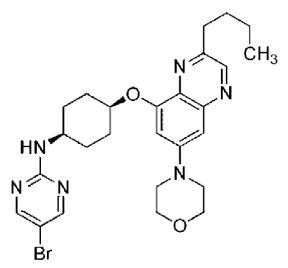
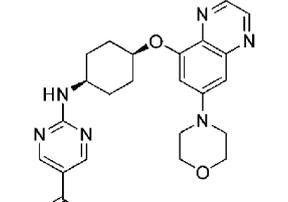
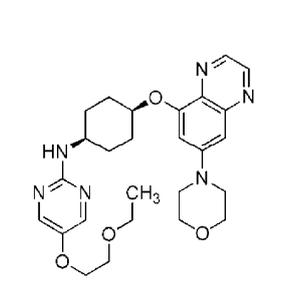
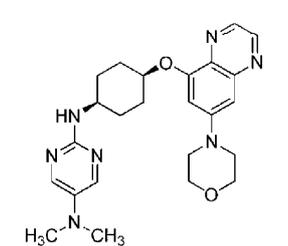
38		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,20 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,87 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,46 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 4,45 (тт, J=10,7, 3,6 Гц, 1H), 3,95-3,77 (м, 5H), 3,32-3,19 (м, 4H), 2,34-2,10 (м, 4H), 1,82 (дт, J=12,9, 10,0 Гц, 2H), 1,45-1,20 (м, 2H)</p>
39		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,37 (с, 1H), 6,98 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,36 (д, J=1,0 Гц, 1H), 4,91-4,76 (м, 1H), 4,00-3,88 (м, 4H), 3,45-3,24 (м, 4H), 2,34-2,17 (м, 2H), 2,03-1,84 (м, 6H)</p>
40		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,15 (д, J=9,3 Гц, 1H), 7,00-6,87 (м, 2H), 6,64 (д, J=9,3 Гц, 1H), 4,89-4,76 (м, 2H), 4,11-4,03 (м, 1H), 4,00-3,83 (м, 4H), 3,40-3,24 (м, 4H), 2,23 (дк, J=12,9, 6,3, 5,6 Гц, 2H), 2,02-1,79 (м, 6H)</p>
41		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,58 (д, J=23,6 Гц, 2H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,84 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,73 (с, 2H), 3,93-3,72 (м, 5H), 3,34-3,18 (м, 4H), 2,29 (с, 3H), 2,15 (м, 2H), 1,84 (м, 6H)</p>

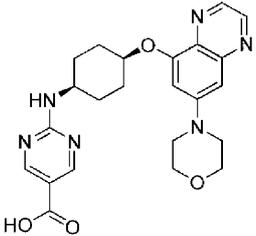
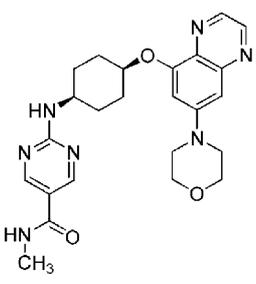
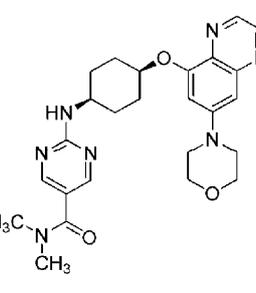
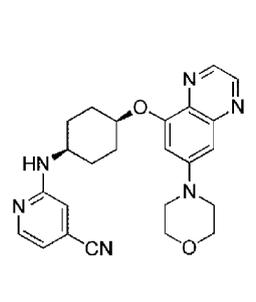
42		408,56 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,52 (д, J=4,8 Гц, 2H), 7,01-6,87 (м, 3H), 5,17 (ддт, J=8,7, 6,7, 3,4 Гц, 1H), 4,76-4,58 (м, 1H), 4,00-3,87 (м, 4H), 3,40-3,27 (м, 4H), 2,43-2,22 (м, 4H), 2,05-1,87 (м, 2H), 1,86-1,71 (м, 2H)
44		432,6 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,54 (д, J=2,9 Гц, 1H), 8,47 (д, J=3,0 Гц, 1H), 6,99 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,81 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,84 (дт, J=5,3, 2,8 Гц, 1H), 4,13-4,05 (м, 1H), 4,00-3,84 (м, 4H), 3,43-3,30 (м, 4H), 2,32-2,17 (м, 2H), 2,02-1,85 (м, 6H)
45		485,26 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,29 (с, 2H), 6,98 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,29 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,04-3,84 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 2,22 (с, 2H), 1,92 (д, J=4,9 Гц, 6H)
46		407,57 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,52 (д, J=4,8 Гц, 2H), 8,37 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,92 (т, J=4,8 Гц, 1H), 6,62 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,38 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,16 (с, 1H), 5,27 (с, 1H), 4,06-3,78 (м, 4H), 3,64 (с, 1H), 3,48-3,20 (м, 4H), 2,14 (с, 2H), 2,04-1,80 (м, 4H)

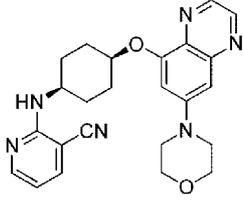
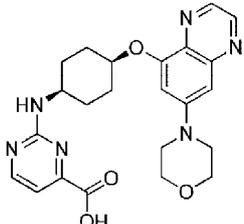
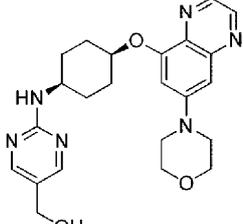
49		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (с, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,20 (с, 1H), 5,19 (шс, 1H), 4,81 (шс, 1H), 3,96-3,84 (м, 4H), 3,40-3,27 (м, 4H), 2,29-2,14 (м, 2H), 1,99-1,81 (м, 6H)</p>
50		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,30 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,84 (с, 1H), 5,42 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 3,99-3,82 (м, 4H), 3,39-3,24 (м, 4H), 2,31-2,19 (м, 2H), 2,08-1,72 (м, 8H)</p>
51		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,30 (д, J=2,1 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,84 (с, 1H), 5,42 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 3,99-3,82 (м, 4H), 3,39-3,24 (м, 4H), 2,31-2,19 (м, 2H), 2,08-1,72 (м, 8H)</p>
52		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (д, J=1,4 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,93 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 6,28 (с, 1H), 5,06 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,06 (шс, 1H), 3,97-3,84 (м, 4H), 3,38-3,25 (м, 4H), 2,27 (с, 6H), 2,18-2,09 (м, 2H), 1,94-1,83 (м, 7H)</p>

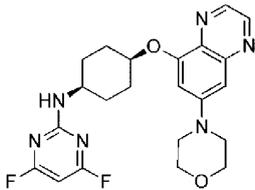
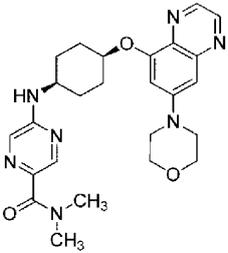
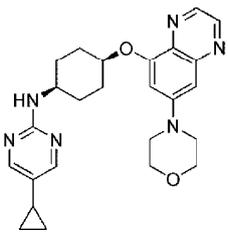
53		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ, 9 Гц, 1H), 8,28 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,85 (т, J=1,9 Гц, 2H), 6,51 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,29 (д, J=6,3 Гц, 1H), 4,80 (дк, J=5,5, 2,8 Гц, 1H), 4,57 (д, J=3,9 Гц, 2H), 4,02 (т, J=6,2 Гц, 1H), 3,54-3,43 (м, 2H), 3,19 (дд, J=11,6, 2,6 Гц, 2H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,08-1,85 (м, 10H)</p>
54		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,45 (д, J=7,8 Гц, 2H), 7,02-6,81 (м, 2H), 4,78 (ддд, J=7,3, 5,6, 3,1 Гц, 1H), 4,66 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,01-3,78 (м, 7H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,30-2,08 (м, 2H), 1,94 (г, J=8,8, 8,2 Гц, 6H)</p>
55		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,73 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,42 (д, J=9,3 Гц, 1H), 6,96 (дд, J=19,6, 2,5 Гц, 2H), 6,65 (д, J=9,3 Гц, 1H), 5,40 (с, 1H), 4,86 (с, 1H), 3,94 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,37 (дд, J=6,0, 3,7 Гц, 4H), 2,27 (д, J=12,7 Гц, 2H), 2,05-1,80 (м, 6H)</p>
59		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,36 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,54 (дд, J=8,8, 2,2 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=8,7 Гц, 1H), 5,11 (с, 1H), 4,80 (с, 1H), 3,94 (с, 1H), 3,94-3,79 (м, 4H), 3,38-3,25 (м, 4H), 2,32-2,12 (м, 2H), 2,02-1,78 (м, 6H)</p>

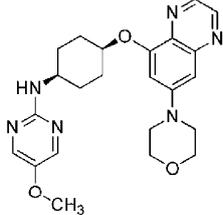
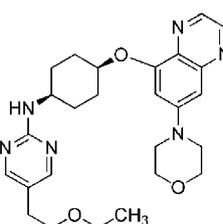
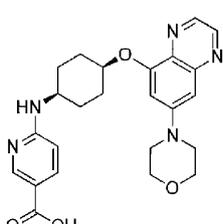
60		425,23	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,06-6,88 (м, 3H), 6,80 (дд, J=9,4, 6,3 Гц, 1H), 4,97-4,71 (м, 2H), 4,14 (к, J=7,1 Гц, 1H), 4,01-3,85 (м, 4H), 3,44-3,24 (м, 4H), 2,23 (д, J=10,7 Гц, 2H), 1,96 (дт, J=11,0, 7,6 Гц, 6H)
61		397,15	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,87 (с, 1H), 5,78-5,64 (м, 1H), 4,73 (с, 1H), 4,01 (с, 1H), 3,97-3,78 (м, 4H), 3,43-3,18 (м, 4H), 2,26-2,05 (м, 2H), 1,98-1,73 (м, 6H), 1,36-1,26 (м, 1H), 1,01-0,92 (м, 2H), 0,78-0,67 (м, 2H)
63		463,54	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,53 (с, 1H), 8,29 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,52 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,25 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,07 (д, J=20,4 Гц, 1H), 3,98-3,85 (м, 4H), 3,43-3,21 (м, 4H), 3,05-2,83 (м, 2H), 2,30-2,14 (м, 1H), 2,03-1,71 (м, 7H), 1,45 (дк, J=14,5, 7,3 Гц, 2H), 0,98 (т, J=7,3 Гц, 3H)

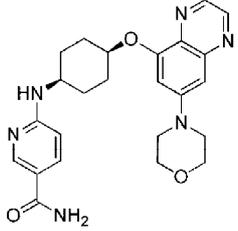
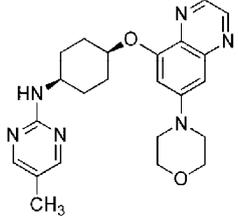
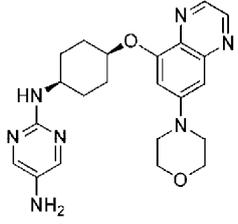
64		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,55 (с, 1H), 8,29 (д, J=1,5 Гц, 2H), 7,05-6,93 (м, 1H), 6,85 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,49 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,8 Гц, 1H), 4,03-3,81 (м, 5H), 3,45-3,27 (м, 4H), 2,98 (дд, J=8,5, 7,0 Гц, 2H), 2,32-2,09 (м, 2H), 2,00-1,71 (м, 8H), 1,56-1,34 (м, 2H), 0,98 (тд, J=7,3, 3,3 Гц, 3H)</p>
65		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,76-8,66 (м, 3H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,99-6,87 (м, 2H), 5,71 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,11 (с, 1H), 3,92 (т, J=4,9 Гц, 4H), 3,34 (т, J=4,9 Гц, 4H), 2,22 (д, J=10,2 Гц, 2H), 2,02-1,85 (м, 6H)</p>
66		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,77 (д, J=2,3 Гц, 1H), 8,72 (д, J=2,3 Гц, 1H), 7,12 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,02 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,92 (с, 1H), 4,18-4,08 (м, 2H), 3,93 (т, J=4,9 Гц, 4H), 3,85-3,76 (м, 2H), 3,60 (к, J=7,0 Гц, 2H), 3,47 (т, J=4,9 Гц, 4H), 2,26 (д, J=13,3 Гц, 2H), 2,07 (т, J=10,5 Гц, 2H), 2,01-1,72 (м, 2H), 1,26 (т, J=7,0 Гц, 4H)</p>
67		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,02 (с, 1H), 6,94 (дд, J=12,2, 2,5 Гц, 2H), 5,32 (с, 2H), 4,87 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,01-3,86 (м, 4H), 3,36 (к, J=5,4, 4,7 Гц, 4H), 2,83 (с, 6H), 2,19 (с, 2H), 1,92 (д, J=4,8 Гц, 6H)</p>

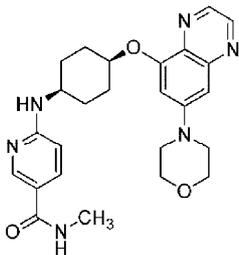
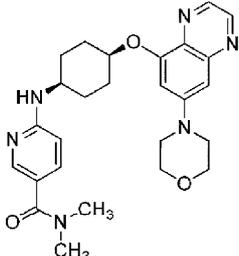
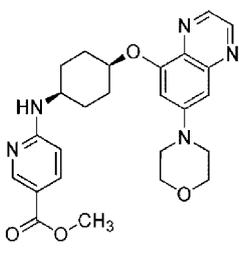
69		451,21	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 9,05 (с, 1H), 8,88-8,71 (м, 3H), 8,49 (с, 1H), 7,06 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,3 Гц, 1H), 4,85 (с, 1H), 4,17 (с, 1H), 3,93 (т, J=4,8 Гц, 4H), 3,42 (т, J=4,9 Гц, 4H), 2,25-2,10 (м, 2H), 1,95 (д, J=11,9 Гц, 4H)
71		464,4	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,79-8,64 (м, 3H), 8,59 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,99-6,88 (м, 2H), 6,19 (к, J=4,7 Гц, 1H), 5,90 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,81 (дк, J=5,3, 2,7 Гц, 1H), 4,08 (кд, J=8,2, 6,5, 2,3 Гц, 1H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,93 (д, J=4,8 Гц, 3H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,06-1,79 (м, 6H)
72		478,39	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 3,97-3,87 (м, 4H), 3,39-3,29 (м, 4H), 3,10 (с, 6H), 2,22 (дт, J=11,3, 5,1 Гц, 2H), 1,94 (дд, J=8,3, 3,9 Гц, 6H), 4,12-4,01 (м, 1H), 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,46 (с, 2H), 7,00-6,87 (м, 2H), 5,57 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,81 (дк, J=5,1, 2,4 Гц, 1H)
84		431,19	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,19 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,70 (дд, J=5,1, 1,2 Гц, 1H), 6,56 (с, 1H), 4,87 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 3,96-3,88 (м, 4H), 3,85 (с, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,28-2,14 (м, 2H), 2,00-1,85 (м, 6H)

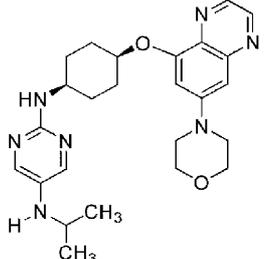
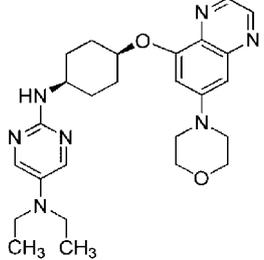
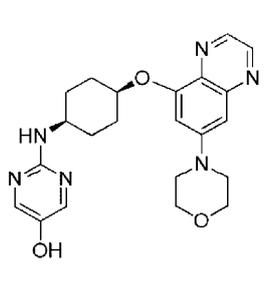
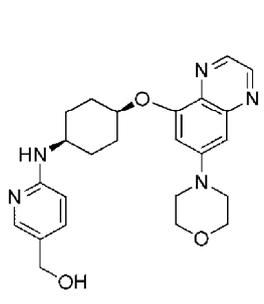
87		431,2 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,20 (дд, J=5,0, 1,9 Гц, 1H), 7,57 (дд, J=7,6, 1,9 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,51 (дд, J=7,6, 4,9 Гц, 1H), 5,12 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,83-4,71 (м, 0H), 4,24-4,03 (м, 1H), 3,92-3,77 (м, 4H), 3,35-3,19 (м, 4H), 2,28-2,10 (м, 2H), 1,88 (тд, J=8,3, 6,8, 3,9 Гц, 6H)
93		451,21 (метанол-d <sub>4</sub> ) δ 8,69 (д, J=2,2 Гц, 1H), 8,59 (д, J=2,2 Гц, 1H), 8,53 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,19 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,15 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,87 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,95 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,10 (с, 1H), 3,95-3,82 (м, 4H), 3,47-3,37 (м, 4H), 2,20 (д, J=10,1 Гц, 2H), 2,04-1,81 (м, 6H)
94		437,44 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,29 (с, 2H), 6,98-6,87 (м, 2H), 5,36 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,79 (к, J=5,2, 4,0 Гц, 1H), 4,52 (с, 2H), 4,01 (дд, J=8,1, 4,3 Гц, 1H), 3,95-3,84 (м, 4H), 3,39-3,28 (м, 4H), 2,25-2,12 (м, 2H), 1,99-1,82 (м, 6H)

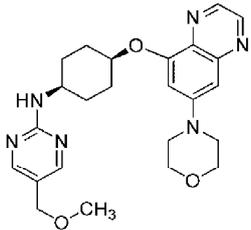
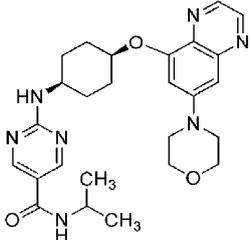
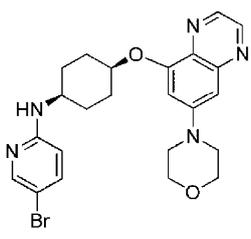
104		<p>443,38</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,73 (с, 1H), 8,68 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,99 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,69 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,76 (с, 1H), 3,84 (дд, J=5,9, 3,9 Гц, 4H), 3,38 (дд, J=6,0, 3,9 Гц, 4H), 2,15 (д, J=11,1 Гц, 2H), 1,96-1,67 (м, 6H)</p>
108		<p>478,26</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,49 (д, J=1,4 Гц, 1H), 7,77 (д, J=1,4 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,1, 2,5 Гц, 2H), 5,03 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,81 (тт, J=5,3, 2,6 Гц, 1H), 4,09-3,98 (м, 1H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,39-3,26 (м, 4H), 3,19 (с, 3H), 3,12 (с, 3H), 2,22 (дт, J=11,2, 4,9 Гц, 2H), 2,02-1,82 (м, 6H)</p>
109		<p>447,02</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,10 (д, J=0,5 Гц, 2H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,13 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,06-3,86 (м, 5H), 3,35 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 2,27-2,14 (м, 2H), 1,92 (д, J=5,1 Гц, 6H), 1,79-1,44 (м, 6H), 1,28 (т, J=7,1 Гц, 1H), 1,03-0,83 (м, 2H), 0,68-0,51 (м, 2H)</p>

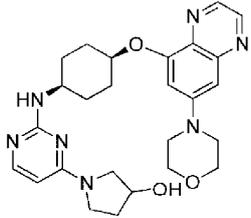
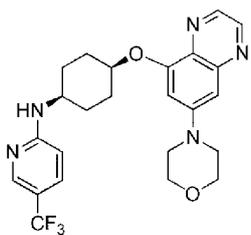
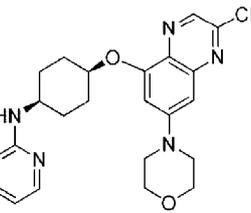
134		<p>437,3</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,07 (с, 2H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,99 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,81 (д, J=5,9 Гц, 1H), 3,93 (дд, J=6,0, 3,7 Гц, 5H), 3,81 (с, 3H), 3,45-3,24 (м, 4H), 2,21 (д, J=8,6 Гц, 2H), 2,05-1,78 (м, 6H)</p>
135		<p>479,2</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,19 (с, 2H), 6,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,12 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,81 (д, J=5,6 Гц, 1H), 4,09-3,85 (м, 5H), 3,63-3,41 (м, 4H), 3,43-3,26 (м, 4H), 2,69 (т, J=6,6 Гц, 2H), 2,33-2,13 (м, 2H), 2,03-1,83 (м, 6H), 1,21 (т, J=7,0 Гц, 3H)</p>
139		<p>450,17</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,74 (д, J=1,9 Гц, 2H), 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,03 (дд, J=8,9, 2,0 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=8,9 Гц, 1H), 6,05 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 3,99-3,88 (м, 4H), 3,84 (с, 1H), 3,39-3,27 (м, 4H), 2,31-2,17 (м, 2H), 2,08-1,98 (м, 2H), 1,98-1,82 (м, 4H)</p>

140		<p>449,19</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,53 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,88 (дд, J=8,8, 2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,39 (д, J=8,7 Гц, 1H), 5,61 (с, 2H), 4,97 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,02-3,82 (м, 5H), 3,42-3,26 (м, 4H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,00-1,81 (м, 6H)</p>
142		<p>421,2</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,14 (д, J=0,8 Гц, 2H), 7,01-6,90 (м, 2H), 4,81 (тд, J=5,6, 2,7 Гц, 1H), 4,08-3,84 (м, 5H), 3,43-3,26 (м, 4H), 2,25-2,10 (м, 5H), 2,02-1,83 (м, 6H)</p>
143		<p>422,25</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,02 (с, 2H), 6,95 (дд, J=11,8, 2,5 Гц, 2H), 4,81 (с, 2H), 4,08-3,85 (м, 5H), 3,41-3,30 (м, 4H), 2,20 (д, J=10,1 Гц, 2H), 1,95 (д, J=19,7 Гц, 6H), 1H NMR (300 МГц, Метанол-d<sub>4</sub>) 8,68 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,56 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,93 (с, 2H), 7,11 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,88 (д, J=2,4 Гц, 1H), 3,96-3,71 (м, 5H), 3,37 (дд, J=5,8, 3,9 Гц, 4H), 2,27-2,04 (м, 2H), 1,98-1,74 (м, 6H), [2]</p>

144		<p>463,2</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,47 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,84 (дд, J=8,7, 2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,37 (д, J=8,7 Гц, 1H), 5,94 (д, J=3,9 Гц, 1H), 4,92 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 3,98-3,84 (м, 5H), 3,39-3,26 (м, 4H), 2,98 (д, J=4,8 Гц, 3H), 2,27-2,12 (м, 2H), 1,97-1,83 (м, 6H)</p>
145		<p>477,2</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,20 (с, 1H), 7,61 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,43 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 3,98-3,81 (м, 5H), 3,40-3,27 (м, 4H), 3,09 (с, 6H), 2,27-2,15 (м, 2H), 1,99-1,83 (м, 6H)</p>
146		<p>464,17</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,76 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (дд, J=8,8, 2,2 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,38 (д, J=8,9 Гц, 1H), 5,13 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,11-3,73 (м, 8H), 3,44-3,27 (м, 4H), 2,30-2,17 (м, 2H), 2,07-1,79 (м, 6H)</p>

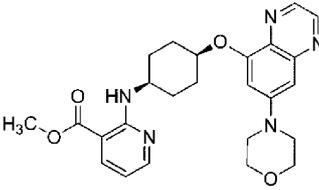
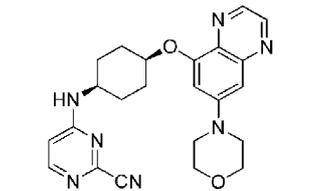
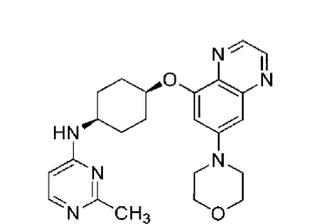
152		464,21	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,94 (с, 2H), 6,99-6,90 (м, 2H), 4,82 (с, 1H), 4,05-3,87 (м, 5H), 3,44 (к, J=6,3 Гц, 1H), 3,39-3,26 (м, 4H), 2,23 (д, J=12,4 Гц, 2H), 2,03-1,82 (м, 6H), 1,23 (д, J=6,3 Гц, 6H)
155		478,3	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,02-6,89 (м, 2H), 4,83 (с, 1H), 4,08-3,87 (м, 5H), 3,44-3,33 (м, 4H), 3,27 (д, J=26,0 Гц, 4H), 2,23 (д, J=9,8 Гц, 2H), 2,05-1,80 (м, 6H), 1,14 (с, 6H)
158			(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,41 (с, 2H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,93 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,32 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,07 (с, 1H), 4,00-3,88 (м, 4H), 3,43-3,29 (м, 4H), 2,22 (с, 2H), 2,06-1,81 (м, 6H)
160		436,2	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,05 (д, J=2,2 Гц, 1H), 7,46 (дд, J=8,5, 2,3 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,39 (д, J=8,6 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,53 (с, 2H), 3,95-3,87 (м, 5H), 3,36-3,32 (м, 4H), 2,25-2,12 (м, 2H), 1,90 (д, J=4,4 Гц, 6H)

161		<p>451,28</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,26 (с, 2H), 6,95 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,6 Гц, 1H), 5,23 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,8 Гц, 1H), 4,26 (с, 2H), 4,03 (с, 1H), 3,97-3,85 (м, 4H), 3,44-3,21 (м, 7H), 2,32-2,09 (м, 2H), 2,06-1,70 (м, 6H)</p>
162		<p>492,29</p> <p>(DMCO-d<sub>6</sub>) δ 8,81-8,64 (м, 3H), 8,58 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,76 (д, J=7,4 Гц, 1H), 7,14 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,84 (д, J=2,3 Гц, 1H), 4,92 (с, 1H), 3,98-3,84 (м, 1H), 4,05 (дк, J=13,5, 6,7 Гц, 1H), 3,79 (д, J=9,6 Гц, 4H), 3,32 (д, J=8,2 Гц, 4H), 2,06 (д, J=11,8 Гц, 2H), 1,96-1,66 (м, 6H), 1,14 (д, J=6,6 Гц, 6H)</p>
164		<p>484,12</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,52 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,01 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,35 (дд, J=8,8, 2,5 Гц, 1H), 6,86 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,80 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,20 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,68 (с, 1H), 4,47 (д, J=8,0 Гц, 1H), 3,92-3,80 (м, 4H), 3,74 (с, 1H), 3,34-3,14 (м, 4H), 2,18-2,02 (м, 2H), 1,94-1,67 (м, 6H)</p>

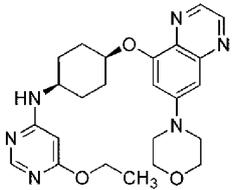
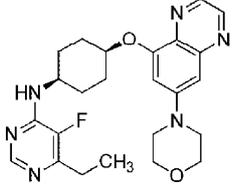
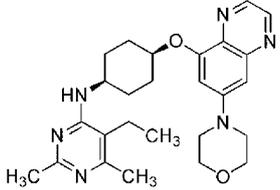
187		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,70 (с, 1H), 6,96 (к, J=2,6 Гц, 2H), 5,75 (д, J=6,5 Гц, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,65 (с, 1H), 3,93 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,63 (с, 4H), 3,36 (дд, J=6,1, 3,7 Гц, 4H), 2,14 (с, 2H), 1,95 (д, J=31,2 Гц, 6H)</p>
189		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,32 (с, 1H), 7,56 (д, J=6,7 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,40 (д, J=8,7 Гц, 1H), 4,96 (с, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,01-3,84 (м, 5H), 3,42-3,24 (м, 4H), 2,21 (д, J=8,4 Гц, 2H), 1,92 (д, J=6,4 Гц, 6H)</p>
190		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,52 (с, 1H), 8,29 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,52 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,36 (с, 1H), 4,79 (дк, J=5,6, 2,9 Гц, 1H), 4,04 (дп, J=8,0, 3,8 Гц, 1H), 3,97-3,85 (м, 4H), 3,38-3,26 (м, 4H), 2,70 (с, 3H), 2,29-2,11 (м, 2H), 2,00-1,78 (м, 6H)</p>

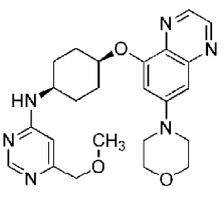
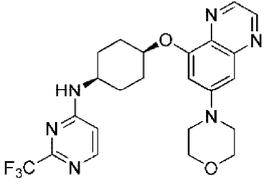
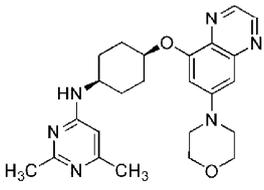
191		421,24	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,52 (с, 1H), 8,29 (д, J=4,8 Гц, 2H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,85 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,53 (т, J=4,8 Гц, 1H), 5,42 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,80 (дк, J=5,9, 2,9 Гц, 1H), 4,11-3,98 (м, 1H), 3,91 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,42-3,21 (м, 4H), 2,71 (с, 3H), 2,31-2,07 (м, 2H), 2,04-1,77 (м, 6H)
193		524,21	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,95 (с, 2H), 7,05-6,88 (м, 2H), 4,92 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 3,93 (т, J=4,8 Гц, 5H), 3,60-3,44 (м, 4H), 3,37 (д, J=10,5 Гц, 9H), 2,20 (д, J=6,9 Гц, 2H), 1,91 (д, J=4,6 Гц, 6H)
194		437,23	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,28 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,74-5,58 (м, 1H), 5,16 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,82 (дк, J=5,4, 2,7 Гц, 1H), 4,06-3,85 (м, 7H), 3,70 (д, J=14,0 Гц, 1H), 3,42-3,28 (м, 4H), 2,30-2,16 (м, 2H), 1,99-1,75 (м, 6H)
195		431,22	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,43 (дд, J=8,6, 7,2 Гц, 1H), 7,02-6,86 (м, 3H), 6,55 (дд, J=8,6, 0,8 Гц, 1H), 4,80 (д, J=6,6 Гц, 2H), 4,10-3,81 (м, 5H), 3,47-3,25 (м, 4H), 2,30-2,11 (м, 2H), 1,99-1,81 (м, 6H)

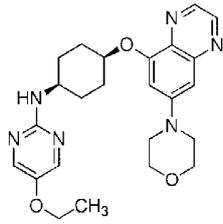
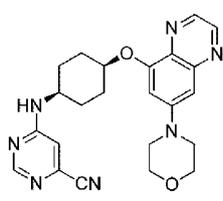
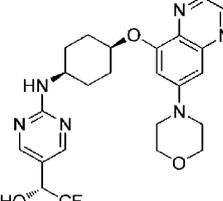
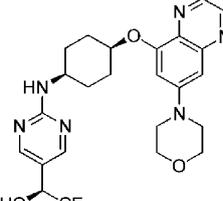
196		463,27	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,61 (д, J=9,4 Гц, 1H), 7,41 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,05-6,87 (м, 2H), 6,65 (с, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,04-3,87 (м, 7H), 3,74 (с, 1H), 3,43-3,27 (м, 4H), 2,21 (д, J=10,8 Гц, 2H), 1,98 (д, J=23,5 Гц, 6H)
197		421,69	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,13-8,04 (м, 1H), 7,67 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,99-6,93 (м, 2H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,33 (д, J=8,7 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 3,99-3,65 (м, 7H), 3,39-3,27 (м, 4H), 2,25-2,10 (м, 2H), 1,96-1,82 (м, 6H)
198		532,11	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,57 (д, J=2,1 Гц, 1H), 7,89 (дд, J=8,9, 2,3 Гц, 1H), 6,95 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 6,62 (д, J=9,0 Гц, 1H), 5,99 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,18 (с, 1H), 4,03-3,81 (м, 4H), 3,76-3,60 (м, 4H), 3,42-3,25 (м, 4H), 2,62-2,44 (м, 4H), 2,36 (с, 3H), 2,29-2,14 (м, 2H), 1,99-1,84 (м, 6H)
199		533,01	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,73-8,65 (м, 3H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,93 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,23-4,09 (м, 1H), 3,97-3,88 (м, 8H), 3,40-3,25 (м, 4H), 2,53-2,42 (м, 4H), 2,34 (с, 3H), 2,26-2,18 (м, 2H), 1,97-1,83 (м, 6H)
200		549,17	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,51-7,42 (м, 2H), 6,98-6,85 (м, 3H), 6,07 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,25-4,11 (м, 1H), 3,99-3,85 (м, 4H), 3,40-3,27 (м, 4H), 3,26-3,14 (м, 4H), 2,67-2,52 (м, 4H), 2,36 (с, 3H), 2,28-2,13 (м, 2H), 1,98-1,84 (м, 6H)
201		549,1	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 9,47 (с, 1H), 8,68 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,56 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,21-8,11 (м, 1H), 6,97-6,85 (м, 4H), 4,82 (с, 1H), 4,23-4,07 (м, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,38-3,29 (м, 4H), 3,03 (с, 4H), 2,65 (с, 4H), 2,37-2,25 (м, 5H), 2,02-1,84 (м, 6H)

202		<p>464,13</p> <p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,27 (дд, J=4,7, 1,9 Гц, 1H), 8,19 (с, 1H), 8,11 (д, J=6,8 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,51 (дд, J=7,4, 4,9 Гц, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,30 (с, 1H), 4,02-3,90 (м, 4H), 3,88 (с, 3H), 3,41-3,26 (м, 4H), 2,29-2,11 (м, 2H), 2,11-1,85 (м, 6H)</p>
203		<p>432,58</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,15 (с, 1H), 6,93 (дд, J=17,9, 2,5 Гц, 2H), 6,43 (д, J=6,1 Гц, 1H), 5,20 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,00-3,82 (м, 4H), 3,44-3,25 (м, 4H), 2,23 (д, J=11,2 Гц, 2H), 1,91 (с, 6H)</p>
204		<p>421,65</p> <p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,09 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,1, 2,5 Гц, 2H), 6,15 (д, J=6,0 Гц, 1H), 5,10 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,81 (тд, J=5,5, 2,7 Гц, 1H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,49 (с, 1H), 3,39-3,27 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,03-1,80 (м, 6H)</p>

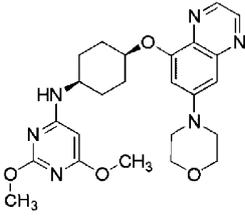
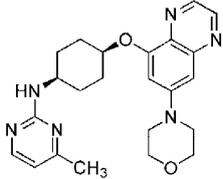
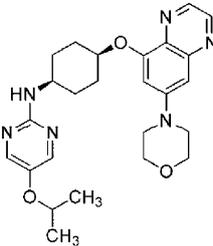
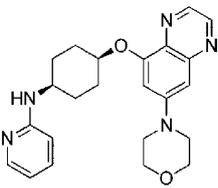
205		436,63	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (дд, J=5,3, 1,9 Гц, 1H), 8,19-8,06 (м, 1H), 6,99-6,84 (м, 2H), 5,34-5,21 (м, 1H), 4,76 (д, J=9,7 Гц, 3H), 3,92 (т, J=4,9 Гц, 4H), 3,81 (с, 1H), 3,33 (дд, J=5,7, 4,1 Гц, 4H), 2,87 (д, J=5,2 Гц, 3H), 2,19 (д, J=8,5 Гц, 2H), 1,88 (дд, J=13,3, 5,1 Гц, 6H)
206		436,18	(400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,82 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,09 (дд, J=8,9, 3,0 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,37 (д, J=8,8 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,29 (мс, 1H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,85-3,79 (м, 1H), 3,77 (с, 3H), 3,41-3,24 (м, 4H), 2,27-2,12 (м, 2H), 1,97-1,79 (м, 6H)
207			(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,44 (с, 1H), 6,98 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,82 (д, J=4,7 Гц, 1H), 5,56 (д, J=30,8 Гц, 1H), 4,83 (д, J=5,2 Гц, 1H), 4,04 (с, 2H), 3,97-3,84 (м, 4H), 3,44-3,29 (м, 4H), 2,23 (д, J=8,2 Гц, 2H), 2,02-1,77 (м, 6H)
208		435,6	(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,16 (с, 2H), 7,00-6,84 (м, 2H), 5,32 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,03 (с, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,43-3,32 (м, 4H), 2,49 (к, J=7,6 Гц, 2H), 2,21 (д, J=8,8 Гц, 2H), 2,06-1,75 (м, 6H), 1,21 (т, J=7,6 Гц, 3H)
209			(CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (с, 2H), 7,01-6,88 (м, 2H), 5,30 (д, J=9,0 Гц, 1H), 4,81 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,02 (с, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,42-3,29 (м, 4H), 2,78 (р, J=6,9 Гц, 1H), 2,31-2,14 (м, 2H), 2,01-1,83 (м, 6H), 1,25 (д, J=6,9 Гц, 6H)
210		450,17	(400 МГц, метанол-d <sub>4</sub> ) δ 8,69 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,57 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,92 (д, J=6,2 Гц, 1H), 7,17-7,10 (м, 2H), 7,02 (д, J=7,1 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,93 (с, 1H), 3,93-3,87 (м, 4H), 3,84-3,79 (м, 1H), 3,44-3,37 (м, 4H), 2,24-2,15 (м, 2H), 1,97-1,82 (м, 6H)

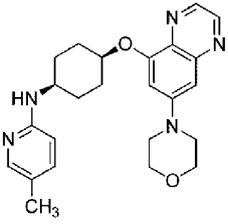
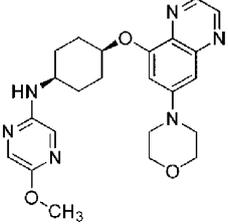
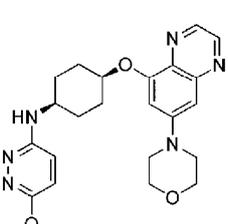
215		451,21 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,25 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=17,1, 2,5 Гц, 2H), 5,64 (д, J=0,9 Гц, 1H), 5,00 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,80 (дк, J=5,5, 2,7 Гц, 1H), 4,33 (к, J=7,1 Гц, 2H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,71 (с, 1H), 3,38-3,29 (м, 4H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,03-1,80 (м, 6H), 1,37 (т, J=7,1 Гц, 3H)
219		471,06 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,03 (с, 1H), 5,00 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 3,92 (д, J=9,3 Гц, 7H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,28-2,13 (м, 2H), 1,92 (д, J=18,6 Гц, 6H)
223		435,18 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,94 (дд, J=15,2, 2,5 Гц, 2H), 6,07 (с, 1H), 4,82 (дт, J=5,8, 3,0 Гц, 1H), 4,02-3,83 (м, 4H), 3,77-3,57 (м, 1H), 3,43-3,28 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 2,30-2,16 (м, 2H), 2,05-1,78 (м, 6H)
224		475,02 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,27 (с, 1H), 6,98 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,44 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,84 (с, 1H), 3,93 (дд, J=6,0, 3,7 Гц, 4H), 3,43-3,25 (м, 4H), 2,23 (с, 2H), 2,08-1,83 (м, 6H)

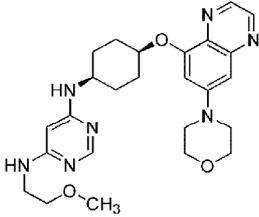
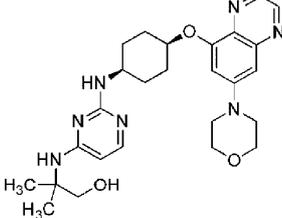
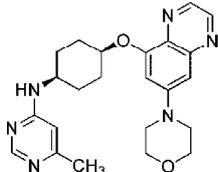
225		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,49 (д, J=1,1 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,7, 2,5 Гц, 2H), 6,45 (д, J=1,2 Гц, 1H), 5,01 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,39 (д, J=0,9 Гц, 2H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,49 (с, 3H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,22 (д, J=9,4 Гц, 2H), 1,99-1,87 (м, 6H)</p>
226		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,75 (д, J=5,6 Гц, 1H), 4,66 (с, 1H), 4,32 (с, 1H), 4,00-3,83 (м, 4H), 3,43-3,22 (м, 4H), 2,46 (д, J=15,1 Гц, 5H), 2,36 (с, 3H), 2,19 (к, J=6,3, 3,9 Гц, 2H), 1,12 (т, J=7,6 Гц, 3H)</p>
227		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,33 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,04-6,87 (м, 2H), 5,15 (с, 1H), 4,82 (дк, J=5,2, 2,6 Гц, 1H), 4,24 (дт, J=8,3, 4,7 Гц, 1H), 4,03-3,86 (м, 4H), 3,44-3,28 (м, 4H), 2,74 (кд, J=7,6, 2,3 Гц, 2H), 2,24 (дк, J=9,6, 4,6 Гц, 2H), 2,09-1,85 (м, 6H), 1,29 (т, J=7,6 Гц, 3H)</p>

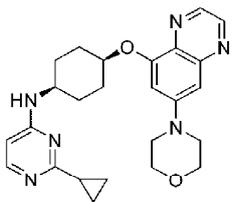
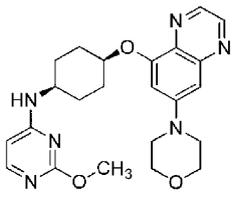
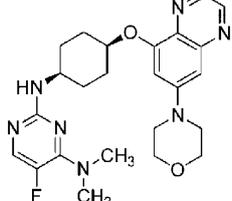
233		451,2 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,06 (с, 2H), 7,01-6,86 (м, 2H), 5,00 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,6 Гц, 1H), 4,10-3,82 (м, 7H), 3,42-3,26 (м, 5H), 2,20 (д, J=8,2 Гц, 2H), 2,01-1,80 (м, 6H), 1,39 (т, J=7,0 Гц, 3H)
234		432,17 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (т, J=1,9 Гц, 2H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,70 (д, J=1,2 Гц, 1H), 4,85 (д, J=4,9 Гц, 1H), 3,98-3,84 (м, 4H), 3,42-3,26 (м, 4H), 2,33-2,17 (м, 2H), 2,01-1,77 (м, 5H)
235		505,04 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,59 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,36 (с, 2H), 6,97-6,86 (м, 2H), 5,53 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,96-4,72 (м, 3H), 4,09-3,86 (м, 5H), 3,33 (дд, J=5,8, 4,0 Гц, 4H), 2,28-2,10 (м, 2H), 1,98-1,78 (м, 6H)
236		505,17 (CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,59 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,36 (с, 2H), 6,97-6,86 (м, 2H), 5,53 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,96-4,72 (м, 3H), 4,09-3,86 (м, 5H), 3,33 (дд, J=5,8, 4,0 Гц, 4H), 2,28-2,10 (м, 2H), 1,98-1,78 (м, 6H)

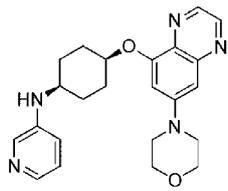
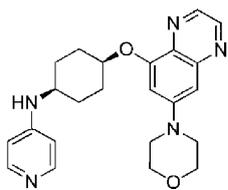
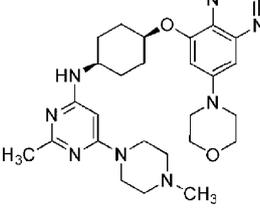
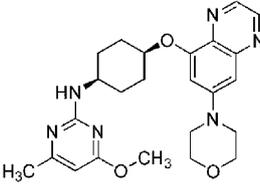


245		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,53 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,84 (дд, J=18,2, 2,5 Гц, 2H), 5,26 (с, 1H), 4,78 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,68 (д, J=5,6 Гц, 1H), 3,82 (т, J=4,0 Гц, 10H), 3,30-3,15 (м, 4H), 2,10 (к, J=6,2, 5,7 Гц, 2H), 1,94-1,69 (м, 6H)</p>
246		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,06 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,94-6,78 (м, 2H), 6,32 (д, J=5,0 Гц, 1H), 5,09 (с, 1H), 4,70 (д, J=6,0 Гц, 1H), 3,95 (с, 1H), 3,91-3,77 (м, 5H), 3,37-3,13 (м, 4H), 2,20-2,00 (м, 2H), 1,94-1,71 (м, 6H)</p>
247		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (т, J=2,4 Гц, 1H), 8,05 (с, 2H), 7,04-6,87 (м, 2H), 5,20 (с, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,30 (р, J=6,1 Гц, 1H), 4,05-3,81 (м, 4H), 3,44-3,27 (м, 4H), 2,22 (т, J=7,3 Гц, 2H), 1,93 (д, J=4,6 Гц, 6H), 1,33 (д, J=6,1 Гц, 6H)</p>
254		<p>(400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,15-8,04 (м, 1H), 7,46-7,39 (м, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,93 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,60-6,52 (м, 1H), 6,41 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,68 (с, 1H), 3,98-3,85 (м, 5H), 3,41-3,30 (м, 4H), 2,27-2,15 (м, 2H), 1,97-1,86 (м, 6H)</p>

256		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,80 (д, J=1,5 Гц, 1H), 7,47 (д, J=1,5 Гц, 1H), 7,02-6,86 (м, 2H), 4,80 (с, 1H), 4,27 (д, J=8,3 Гц, 1H), 4,00-3,72 (м, 7H), 3,35 (дд, J=6,0, 3,8 Гц, 4H), 2,23 (с, 2H), 2,02-1,80 (м, 6H)</p>
257		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (дд, J=1,9, 0,7 Гц, 1H), 7,99-7,88 (м, 1H), 7,02-6,87 (м, 2H), 6,34 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,40 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,03-3,75 (м, 5H), 3,35 (дд, J=6,0, 3,7 Гц, 4H), 2,18 (с, 5H), 2,03-1,81 (м, 6H)</p>
260		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=14,5, 2,5 Гц, 2H), 6,79 (д, J=9,4 Гц, 1H), 6,64 (д, J=9,4 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,5 Гц, 1H), 4,27 (д, J=7,5 Гц, 1H), 4,14 (с, 1H), 4,02 (с, 3H), 3,98-3,88 (м, 4H), 3,42-3,29 (м, 4H), 2,31-2,12 (м, 2H), 1,95 (ддд, J=17,2, 9,2, 6,0 Гц, 6H)</p>

263		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,11 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=15,5, 2,5 Гц, 2H), 5,30 (д, J=1,0 Гц, 1H), 5,16 (с, 1H), 4,95 (с, 1H), -0,17 - -0,23 (м, 9H), 4,80 (с, 1H), 3,92 (дд, J=5,9, 3,7 Гц, 4H), 3,74 (с, 1H), 3,57 (дд, J=5,6, 4,6 Гц, 2H), 3,50-3,29 (м, 9H), 2,20 (д, J=9,1 Гц, 2H), 1,93 (д, J=13,1 Гц, 6H)</p>
264		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,76 (д, J=5,8 Гц, 1H), 7,02-6,86 (м, 2H), 5,66 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,5 Гц, 1H), 4,63 (с, 1H), 3,97-3,84 (м, 5H), 1,30-1,20 (м, 1H), 3,64 (с, 2H), 3,38-3,28 (м, 4H), 1,37 (с, 6H), 5,16-4,86 (м, 1H), 2,24-2,13 (м, 2H), 1,96-1,82 (м, 6H)</p>
265		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,47 (д, J=1,1 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,7, 2,5 Гц, 2H), 6,17 (т, J=0,9 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 4,81 (тд, J=5,3, 2,5 Гц, 1H), 4,07-3,83 (м, 5H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,34 (с, 3H), 2,21 (дт, J=11,1, 5,1 Гц, 2H), 2,04-1,76 (м, 6H)</p>

267		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,03 (д, J=6,1 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=18,6, 2,5 Гц, 2H), 6,13 (д, J=6,1 Гц, 1H), 5,09 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,03-3,78 (м, 5H), 3,34 (дд, J=6,0, 3,8 Гц, 4H), 2,20 (д, J=8,1 Гц, 2H), 1,96 (с, 7H), 1,10 (д, J=2,8 Гц, 2H), 1,00 (д, J=8,0 Гц, 2H)</p>
268		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,95 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,92 (дд, J=17,9, 2,5 Гц, 2H), 5,99 (д, J=5,9 Гц, 1H), 5,01 (с, 1H), 4,79 (дт, J=6,9, 3,4 Гц, 1H), 3,91 (д, J=8,7 Гц, 8H), 3,43-3,25 (м, 4H), 2,32-2,09 (м, 2H), 2,05-1,74 (м, 6H)</p>
269		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,70 (д, J=6,8 Гц, 1H), 6,92 (дд, J=14,4, 2,5 Гц, 2H), 4,86 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,75 (дт, J=8,6, 4,0 Гц, 1H), 3,97-3,87 (м, 5H), 3,38-3,28 (м, 4H), 3,14 (д, J=2,2 Гц, 6H), 2,24-2,07 (м, 2H), 2,02-1,79 (м, 6H)</p>

272		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,04 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,94 (дд, J=4,7, 1,3 Гц, 1H), 7,11 (дд, J=8,3, 4,7 Гц, 1H), 7,00-6,84 (м, 3H), 4,78 (с, 1H), 3,98-3,88 (м, 4H), 3,85 (д, J=8,1 Гц, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,27-2,15 (м, 2H), 1,97-1,84 (м, 6H)</p>
273		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (д, J=6,3 Гц, 2H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,51-6,42 (м, 2H), 4,79 (с, 1H), 4,47 (д, J=7,7 Гц, 1H), 3,98-3,86 (м, 4H), 3,56 (с, 1H), 3,39-3,26 (м, 4H), 2,27-2,15 (м, 2H), 2,01-1,79 (м, 6H)</p>
275		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93-6,77 (м, 2H), 5,20 (с, 1H), 4,78-4,60 (м, 2H), 3,92-3,79 (м, 5H), 3,64 (с, 0H), 3,51 (т, J=5,1 Гц, 4H), 3,36-3,16 (м, 4H), 2,40 (т, J=5,1 Гц, 4H), 2,27 (д, J=4,8 Гц, 6H), 2,16-2,02 (м, 2H), 1,81 (к, J=8,1, 5,7 Гц, 6H)</p>
276		<p>(CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,87 (с, 1H), 5,13 (с, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,04 (с, 1H), 3,98-3,89 (м, 4H), 3,87 (с, 3H), 3,41-3,23 (м, 4H), 2,25 (с, 3H), 2,23-2,09 (м, 2H), 1,99-1,80 (м, 6H)</p>

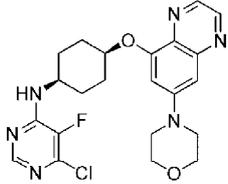
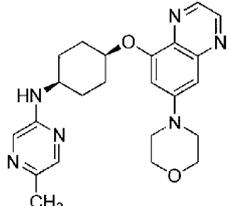
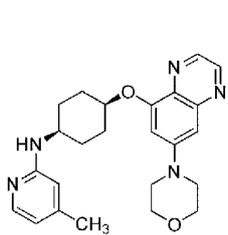
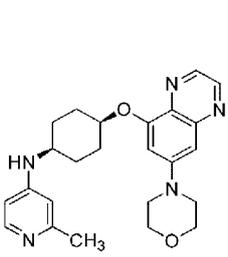
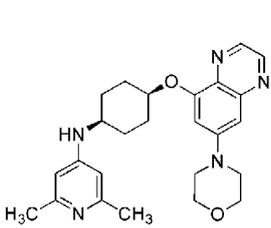
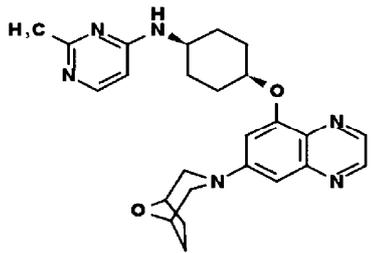
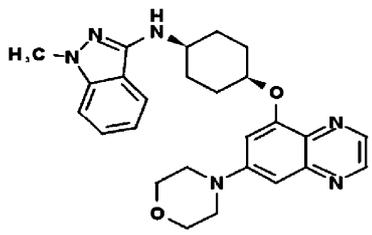
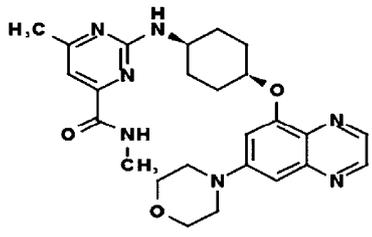
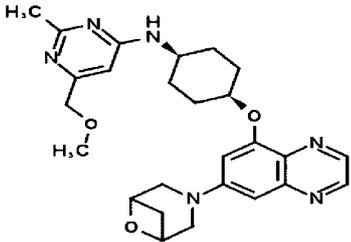
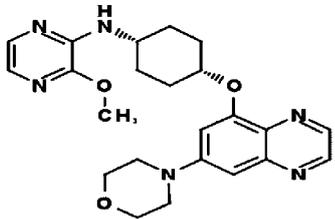
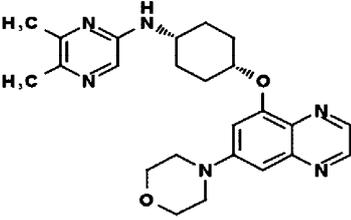
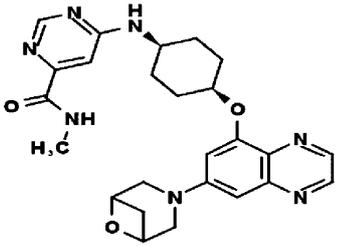
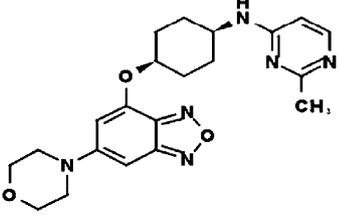
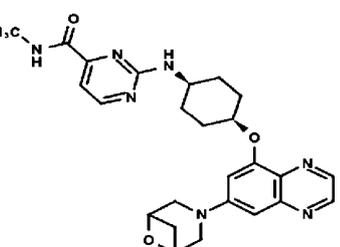
277		<p>459,08 (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,17 (д, J=0,9 Гц, 1H), 6,94 (дд, J=15,8, 2,5 Гц, 2H), 5,31 (с, 1H), 4,83 (дп, J=4,6, 2,5 Гц, 1H), 4,22 (кп, J=8,5, 4,9 Гц, 1H), 4,03-3,87 (м, 4H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,25 (тд, J=7,9, 6,6, 3,9 Гц, 2H), 2,09-1,80 (м, 6H)</p>
282		<p>421,2 (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,93-7,74 (м, 2H), 7,04-6,82 (м, 2H), 4,80 (с, 1H), 4,50 (д, J=8,1 Гц, 1H), 3,93 (дд, J=6,4, 3,4 Гц, 5H), 3,41-3,25 (м, 4H), 2,51-2,33 (м, 3H), 2,23 (с, 2H), 2,04-1,82 (м, 6H)</p>
283		<p>420,2 (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,88 (дд, J=5,3, 0,7 Гц, 1H), 6,95-6,79 (м, 2H), 6,32 (ддд, J=5,2, 1,5, 0,7 Гц, 1H), 6,12 (дт, J=1,6, 0,8 Гц, 1H), 4,71 (д, J=5,9 Гц, 1H), 4,40 (д, J=8,2 Гц, 1H), 3,98-3,67 (м, 4H), 3,35-3,17 (м, 4H), 2,15 (с, 4H), 1,83 (д, J=5,2 Гц, 5H)</p>
285		<p>420,57 (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,08 (д, J=5,7 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,30 (с, 1H), 6,28 (дд, J=5,7, 2,2 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,19 (д, J=7,7 Гц, 1H), 3,97-3,82 (м, 4H), 3,53 (с, 1H), 3,40-3,24 (м, 4H), 2,41 (с, 3H), 2,27-2,11 (м, 2H), 1,92-1,84 (м, 6H)</p>
286		<p>434,56 (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,15 (с, 2H), 4,77 (с, 1H), 4,12 (д, J=7,8 Гц, 1H), 3,99-3,81 (м, 4H), 3,53 (с, 1H), 3,40-3,23 (м, 4H), 2,36 (д, J=14,5 Гц, 6H), 2,25-2,14 (м, 2H), 1,89 (т, J=7,8 Гц, 6H)</p>

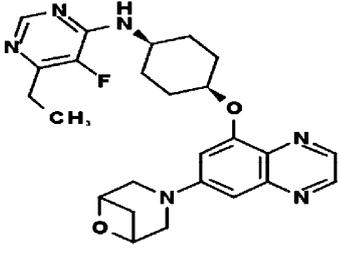
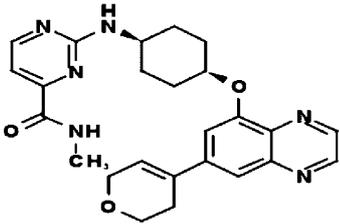
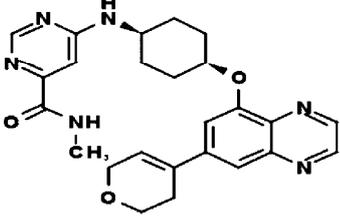
Таблица 2

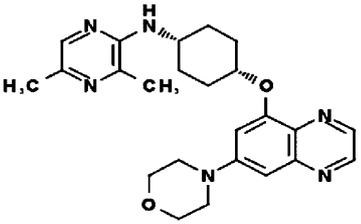
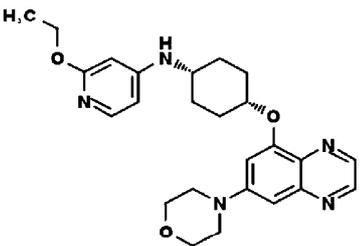
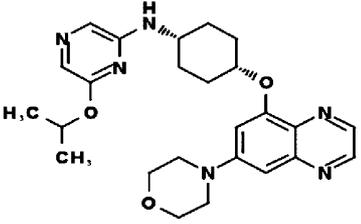
Соед.	Структура соединения	ЭРИ-МС (М+Н)	<sup>1</sup> Н-ЯМР
287		478,3	<sup>1</sup> Н-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1Н), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1Н), 8,33 (с, 1Н), 6,94 (дд, J=14,3, 2,5 Гц, 2Н), 5,80 (д, J=4,9 Гц, 1Н), 5,42 (д, J=8,1 Гц, 1Н), 4,88-4,74 (м, 1Н), 4,08 (с, 2Н), 3,99-3,86 (м, 4Н), 3,50 (с, 3Н), 3,42-3,28 (м, 4Н), 3,01 (дд, J=18,4, 5,0 Гц, 3Н), 2,54 (с, 3Н), 2,28-2,08 (м, 2Н), 2,03-1,79 (м, 6Н),
291		419,23 [1]	<sup>1</sup> Н-ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 8,42 (д, J=1,9 Гц, 1Н), 8,30 (д, J=1,9 Гц, 1Н), 8,04 (д, J=4,8 Гц, 2Н), 6,65-6,56 (м, 2Н), 6,28 (т, J=4,8 Гц, 1Н), 4,99 (д, J=8,1 Гц, 1Н), 4,60 (д, J=6,5 Гц, 3Н), 3,79 (дд, J=8,2, 4,0 Гц, 0Н), 3,62-3,38 (м, 4Н), 3,17-3,03 (м, 1Н), 2,07-1,90 (м, 2Н), 1,89-1,59 (м, 7Н),
294		410,35	<sup>1</sup> Н-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,10 (д, J=6,0 Гц, 1Н), 7,36-7,28 (м, 1Н), 6,65 (д, J=2,0 Гц, 1Н), 6,13 (д, J=6,0 Гц, 1Н), 4,81 (д, J=8,0 Гц, 1Н), 4,00-3,80 (м, 6Н), 3,80-3,56 (м, 1Н), 3,29 (дд, J=5,8, 3,8 Гц, 4Н), 3,02-2,84 (м, 2Н), 2,48 (с, 3Н), 2,36 (тд, J=11,4, 10,9, 2,5 Гц, 2Н), 2,14-1,98 (м, 2Н), 1,70-1,46 (м, 2Н),
295		450,2	<sup>1</sup> Н-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,98-8,78 (м, 2Н), 8,33 (д, J=1,9 Гц, 1Н), 7,67 (д, J=1,8 Гц, 1Н), 7,30 (д, J=1,8 Гц, 1Н), 6,49-6,31 (м, 1Н), 5,07 (д, J=7,6 Гц, 1Н), 4,87 (д, J=5,5 Гц, 1Н), 4,43 (к, J=2,8 Гц, 2Н), 4,24 (с, 1Н), 4,02 (т, J=5,4 Гц, 2Н), 2,71 (дтд, J=13,1, 7,7, 2,7 Гц, 4Н), 2,26 (дт, J=10,4, 5,3 Гц, 2Н), 1,97 (д, J=5,3 Гц, 6Н), 1,28 (т, J=7,6 Гц, 3Н),

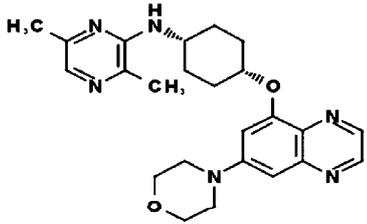
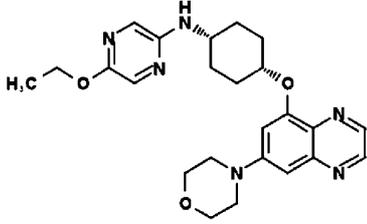
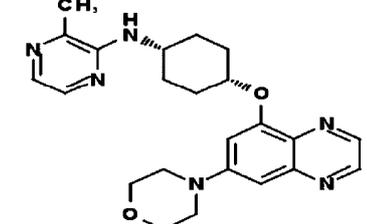
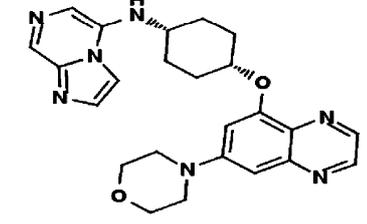
297		447 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,49 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,02 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,78 (дд, J=10,1, 2,5 Гц, 2H), 6,08 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,96 (с, 1H), 4,74 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,49 (д, J=2,3 Гц, 2H), 3,41 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,12 (дд, J=11,6, 2,5 Гц, 2H), 2,43 (с, 3H), 2,14 (дд, J=9,6, 4,9 Гц, 2H), 1,98-1,68 (м, 10H),
298		459,4 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,65 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,53 (дт, J=8,1, 1,0 Гц, 1H), 7,35 (ддд, J=8,1, 6,8, 1,1 Гц, 1H), 7,20 (дт, J=8,5, 0,9 Гц, 1H), 7,07-6,89 (м, 3H), 4,79 (тд, J=6,1, 3,1 Гц, 1H), 4,02-3,91 (м, 4H), 3,87 (с, 3H), 3,43-3,25 (м, 4H), 2,34-2,15 (м, 2H), 2,10-1,88 (м, 6H),
308		478,64 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,23 (с, 1H), 6,95 (дд, J=14,0, 2,5 Гц, 2H), 5,23 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,09 (с, 1H), 3,94 (дд, J=6,1, 3,6 Гц, 4H), 3,43-3,23 (м, 4H), 3,02 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,31-2,12 (м, 2H), 1,95 (п, J=10,0 Гц, 6H),

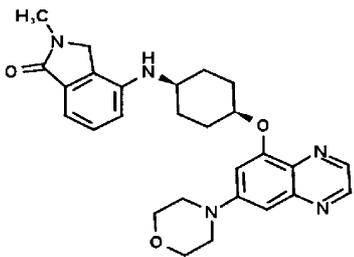
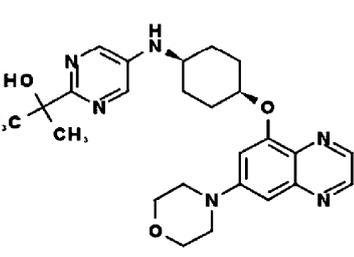
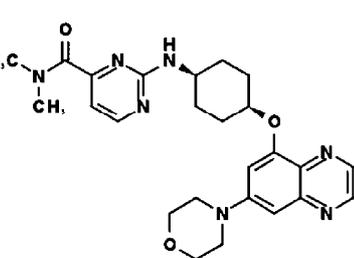
309		477,54 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,85 (с, 2H), 6,30 (с, 1H), 5,06 (д, J=16,2 Гц, 1H), 4,85 (д, J=6,5 Гц, 3H), 4,44-4,30 (м, 2H), 4,14 (к, J=7,1 Гц, 1H), 3,89-3,60 (м, 5H), 3,50 (с, 3H), 3,35 (к, J=7,2 Гц, 1H), 2,49 (с, 3H), 2,24 (д, J=8,7 Гц, 2H), 2,08 (д, J=7,7 Гц, 2H), 1,92 (к, J=9,6, 6,9 Гц, 6H), 1,28 (т, J=7,1 Гц, 2H),
312		437,33 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,65 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,57 (д, J=3,2 Гц, 1H), 7,35-7,28 (м, 2H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,23 (с, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,20 (с, 1H), 4,01 (с, 3H), 3,98-3,84 (м, 4H), 3,44-3,29 (м, 4H), 2,27-2,14 (м, 2H), 2,05-1,85 (м, 6H),
314		435,32 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,66 (с, 1H), 6,94 (дд, J=14,9, 2,4 Гц, 2H), 4,84-4,74 (м, 1H), 4,47 (с, 1H), 4,02-3,87 (м, 4H), 3,87-3,75 (м, 1H), 3,47-3,21 (м, 4H), 2,38 (д, J=4,0 Гц, 6H), 2,26-2,13 (м, 2H), 2,01-1,78 (м, 6H),

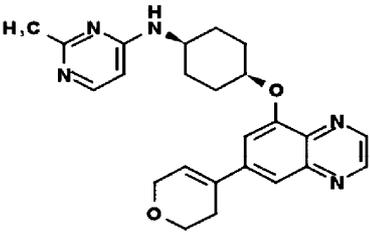
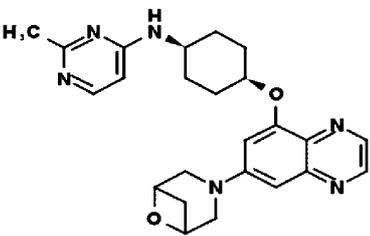
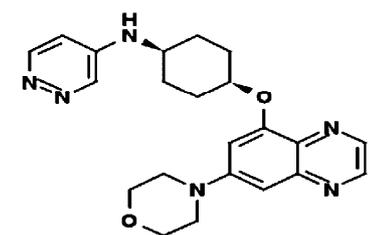
315		476,23	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,59-8,46 (м, 2H), 7,98 (с, 1H), 7,18 (с, 1H), 6,85 (с, 2H), 4,85 (д, J=6,6 Гц, 2H), 3,90-3,62 (м, 5H), 3,35 (д, J=8,2 Гц, 1H), 3,03 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,27 (с, 2H), 2,13-1,80 (м, 7H), 1,0,58 (с, 2H)
316		411,34	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,14 (д, J=6,2 Гц, 1H), 6,50 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,43 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,21 (д, J=6,2 Гц, 1H), 4,98 (с, 1H), 4,01-3,81 (м, 5H), 3,37-3,18 (м, 5H), 2,54 (с, 3H), 2,20 (д, J=9,1 Гц, 3H), 2,05-1,71 (м, 6H)
317		476,55	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62-8,41 (м, 2H), 7,79 (с, 1H), 7,33 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,85 (к, J=2,6 Гц, 3H), 4,85 (д, J=6,3 Гц, 4H), 4,08 (с, 0H), 3,88-3,58 (м, 5H), 3,35 (к, J=6,8 Гц, 1H), 3,03 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,36-2,13 (м, 2H), 2,15-1,84 (м, 6H)

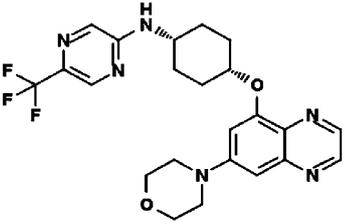
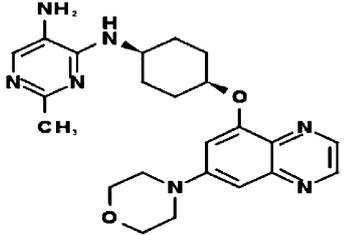
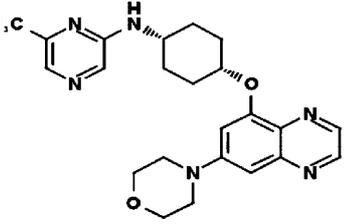
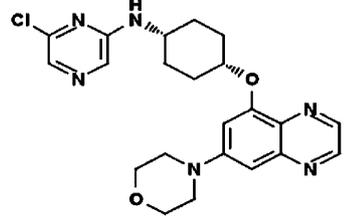
318		465,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,56 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,33 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,85 (с, 2H), 5,07 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,86 (д, J=6,4 Гц, 4H), 4,23 (с, 2H), 3,90-3,62 (м, 4H), 3,35 (к, J=7,1 Гц, 1H), 2,73 (кд, J=7,6, 2,3 Гц, 2H), 2,27 (д, J=10,1 Гц, 3H), 2,12-1,82 (м, 6H), 1,28 (т, J=7,6 Гц, 3H),
319		461,38 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,83 (дт, J=6,4, 1,4 Гц, 2H), 8,51 (д, J=4,7 Гц, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,68 (д, J=1,7 Гц, 1H), 7,34 (дд, J=4,9, 0,9 Гц, 1H), 6,38 (с, 1H), 5,32 (д, J=0,9 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,43 (к, J=2,8 Гц, 2H), 4,17-3,94 (м, 3H), 3,03 (дд, J=5,1, 1,0 Гц, 3H), 2,76-2,59 (м, 2H), 2,23 (д, J=12,7 Гц, 2H), 1,98 (д, J=7,7 Гц, 6H),
321		461,63 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,81-8,67 (м, 2H), 8,42 (с, 1H), 7,89 (с, 1H), 7,58 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,09 (с, 1H), 6,28 (дк, J=3,0, 1,6 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,33 (к, J=2,8 Гц, 2H), 3,92 (т, J=5,4 Гц, 2H), 2,93 (д, J=5,1 Гц, 3H), 2,67-2,48 (м, 2H), 2,18 (д, J=11,3 Гц, 2H), 1,98-1,73 (м, 6H),

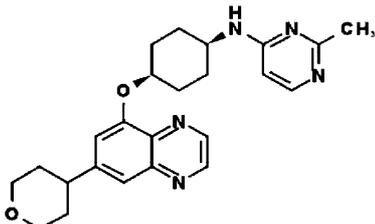
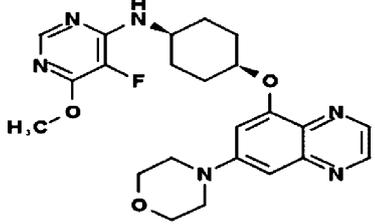
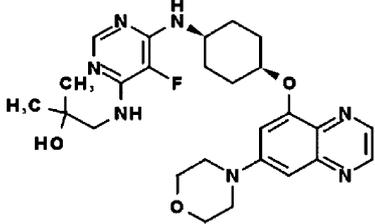
323		435,33	
324		450,35	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDC13) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,79 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,13 (дд, J=5,9, 2,1 Гц, 1H), 5,87 (д, J=2,0 Гц, 1H), 4,87-4,70 Гц, 1H), 4,32 (к, J=7,1 Гц, 2H), 4,21 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,05-3,81 (м, 4H), 3,60-3,45 (м, 1H), 3,45-3,24 (м, 4H), 2,33-2,10 (м, 2H), 2,02-1,77 (м, 6H), 1,39 (т, J=7,1 Гц, 3H), [2]
332		465,36	

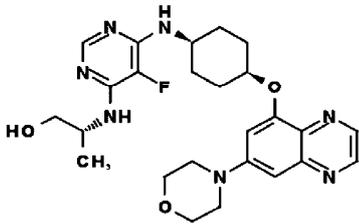
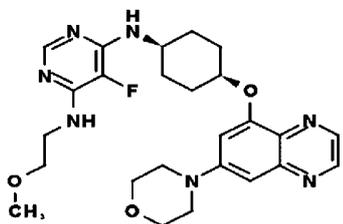
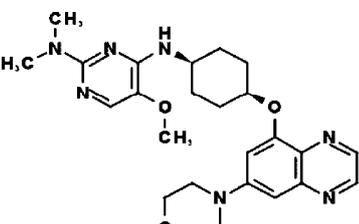
333		435, 33	
334		451, 36	
335		421, 37	
336		446, 35	

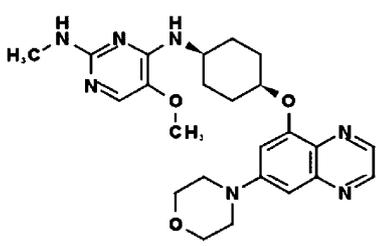
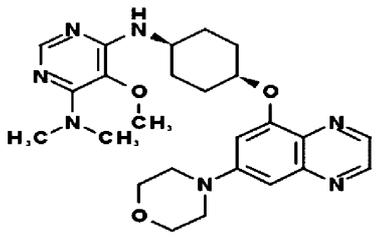
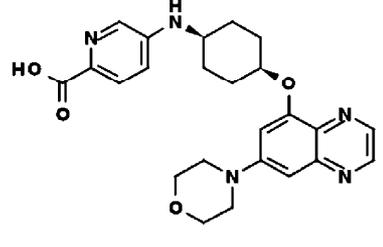
340		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,73 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,59 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,25 (м, 1H), 7,14 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89-6,78 (м, 3H), 5,47 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,94 (м, 1H), 4,29 (с, 2H), 3,79 (м, 4H), 3,51 (м, 1H), 3,06 (с, 3H), 2,09 (м, 2H), 1,81 (м, 6H),
341		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,58 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,17 (с, 2H), 7,15 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,06 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,92 (м, 1H), 4,77 (с, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,50 (м, 1H), 3,30 (м, 4H), 2,02 (м, 2H), 1,80 (м, 6H), 1,42 (с, 6H),
351		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,38 (д, J=4,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=14,5, 2,4 Гц, 2H), 6,68 (д, J=4,9 Гц, 1H), 5,28 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,22- 3,86 (м, 5H), 3,34 (т, J=4,8 Гц, 4H), 3,17-2,97 (м, 6H), 2,20 (с, 2H), 1,91 (д, J=5,1 Гц, 6H),

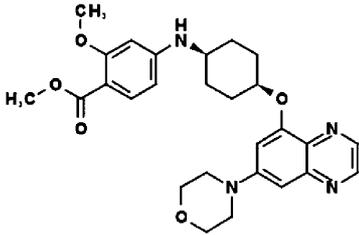
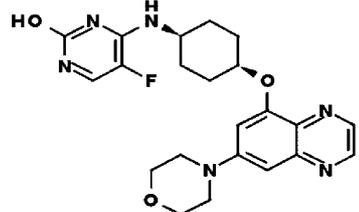
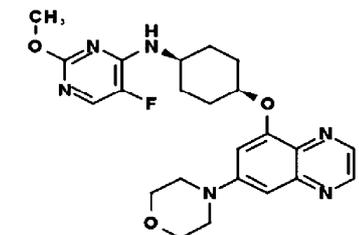
352		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) $\delta$ 8,91-8,75 (м, 2H), 8,11 (д, $J=5,9$ Гц, 1H), 7,68 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 6,37 (тт, $J=3,0, 1,5$ Гц, 1H), 6,16 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 4,99 (с, 1H), 4,88 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 4,43 (к, $J=2,8$ Гц, 2H), 4,02 (т, $J=5,4$ Гц, 2H), 3,85 (с, 1H), 2,77-2,64 (м, 2H), 2,51 (с, 3H), 2,23 (д, $J=13,2$ Гц, 2H), 2,03-1,82 (м, 6H),
353		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) $\delta$ 8,67 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 8,54 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 8,11 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 6,85 (с, 2H), 6,16 (д, $J=6,0$ Гц, 1H), 5,00 (с, 1H), 4,85 (д, $J=6,5$ Гц, 3H), 3,93-3,57 (м, 5H), 3,35 (к, $J=7,1$ Гц, 1H), 2,62 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 2,50 (с, 3H), 2,24 (д, $J=8,9$ Гц, 2H), 2,01-1,81 (м, 6H),
354		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, ДМСО-d6) $\delta$ 8,73 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 8,61 (д, $J=3,1$ Гц, 1H), 8,58 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 8,47 (д, $J=6,2$ Гц, 1H), 7,15 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,99 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 6,83 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 6,65 (м, 1H), 4,94 (м, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,55 (м, 1H), 3,35 (м, 4H), 2,03 (м, 2H), 1,78 (м, 6H),

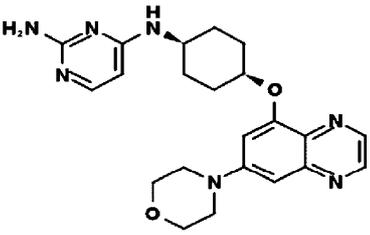
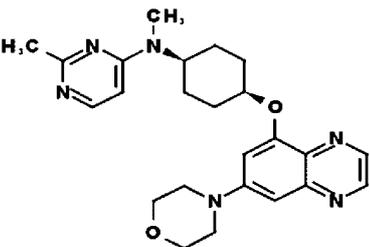
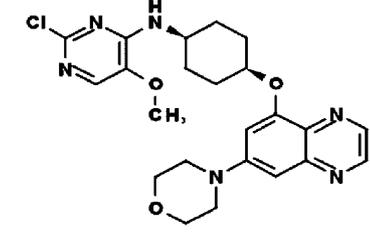
366		475,56	
369		436,5	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (п, J=1,9 Гц, 1H), 7,71 (с, 1H), 6,94 (дд, J=14,6, 2,5 Гц, 2H), 5,09 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,4 Гц, 1H), 4,29 (с, 2H), 4,01-3,84 (м, 4H), 3,45-3,28 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,21 (к, J=6,1 Гц, 2H), 1,95 (дт, J=10,0, 4,1 Гц, 6H),
373		421,51	<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,70 (д, J=5,0 Гц, 2H), 6,97 (д, J=1,6 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,1 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,65 (с, 1H), 3,99-3,85 (м, 5H), 3,40-3,30 (м, 4H), 2,37 (с, 3H), 2,28-2,16 (м, 2H), 2,01-1,82 (м, 6H),
374		441,45	

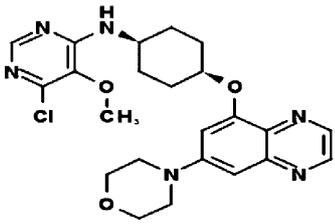
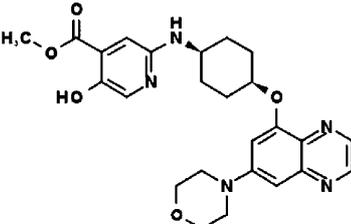
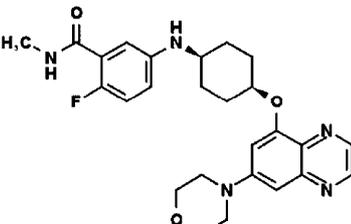
375		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,81-8,67 (м, 2H), 8,01 (д, J=6,0 Гц, 1H), 7,46 (дд, J=1,7, 0,7 Гц, 1H), 6,98 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,06 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,80 (д, J=38,5 Гц, 2H), 4,13-3,97 (м, 3H), 3,51 (тд, J=11,3, 3,5 Гц, 2H), 2,99-2,80 (м, 1H), 2,41 (с, 3H), 2,21-2,03 (м, 2H), 1,94-1,70 (м, 7H),</p>
376		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,07 (с, 1H), 6,93 (дд, J=17,0, 2,5 Гц, 2H), 4,98-4,71 (м, 2H), 4,17 (с, 1H), 4,00 (с, 3H), 3,92 (дд, J=5,8, 3,9 Гц, 4H), 3,42-3,26 (м, 4H), 2,22 (д, J=9,5 Гц, 2H), 1,93 (дд, J=6,1, 2,4 Гц, 6H),</p>
377		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,95 (д, J=1,2 Гц, 1H), 6,92 (дд, J=16,9, 2,5 Гц, 2H), 4,98 (с, 1H), 4,81-4,66 (м, 2H), 4,16 (с, 1H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,46 (д, J=6,1 Гц, 2H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,19 (д, J=12,5 Гц, 2H), 1,91 (д, J=5,4 Гц, 6H), 1,26 (с, 6H), 0,94-0,83 (м, 1H),</p>

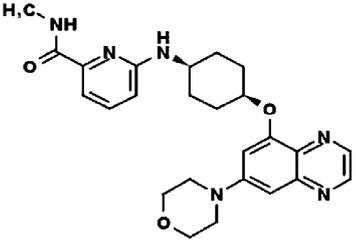
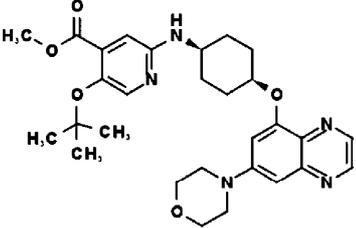
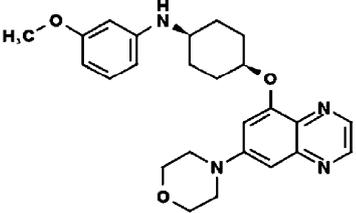
380		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,00-7,91 (м, 1H), 6,92 (дд, J=17,2, 2,5 Гц, 2H), 4,87-4,64 (м, 2H), 4,59 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,16 (ддт, J=9,7, 6,8, 3,7 Гц, 2H), 4,01-3,85 (м, 4H), 3,75 (д, J=11,2 Гц, 1H), 3,58 (дд, J=10,9, 7,0 Гц, 1H), 3,48-3,23 (м, 4H), 2,36-2,07 (м, 2H), 1,91 (д, J=5,5 Гц, 6H), 1,28 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,97-0,78 (м, 1H),
382		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,00 (с, 1H), 6,92 (дд, J=16,5, 2,5 Гц, 2H), 4,92 (с, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,64 (д, J=8,5 Гц, 1H), 4,16 (с, 1H), 4,03-3,82 (м, 4H), 3,65 (к, J=5,8, 5,4 Гц, 2H), 3,56 (ддд, J=5,6, 4,7, 1,0 Гц, 2H), 3,48-3,21 (м, 7H), 2,19 (д, J=10,1 Гц, 2H), 1,91 (д, J=5,4 Гц, 6H),
386		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,49 (с, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,25 (с, 1H), 4,72 (с, 1H), 4,18 (с, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,77 (с, 3H), 3,39-3,30 (м, 4H), 3,10 (с, 6H), 2,21-2,12 (м, 2H), 2,02-1,85 (м, 6H),

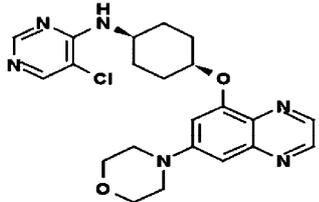
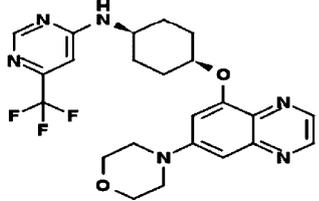
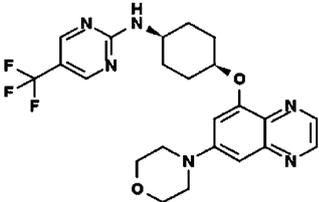
387		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,49 (с, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,25 (с, 1H), 4,72 (с, 1H), 4,18 (с, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,77 (с, 3H), 3,39-3,30 (м, 4H), 3,10 (с, 6H), 2,21-2,12 (м, 2H), 2,02-1,85 (м, 6H),
388		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,04 (с, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,15 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,14 (с, 1H), 3,97-3,83 (м, 4H), 3,59 (с, 3H), 3,38-3,28 (м, 4H), 3,09 (с, 6H), 2,25-2,13 (м, 2H), 2,00-1,83 (м, 6H),
393		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,73 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,58 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,10 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,97 (д, J=8,9 Гц, 1H), 7,38 (дд, J=9,0, 2,7 Гц, 1H), 7,16 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,84 (д, J=2,3 Гц, 1H), 4,96 (м, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,66 (м, 1H), 3,3 (м, 4H), 2,14-1,95 (м, 2H), 1,81 (м, 5H),

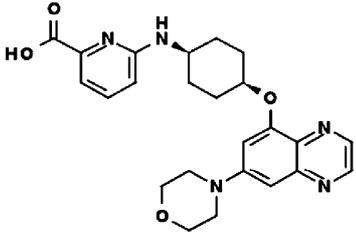
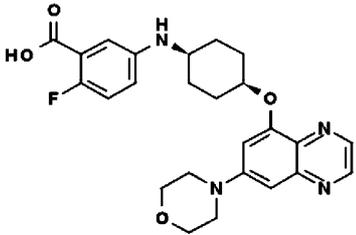
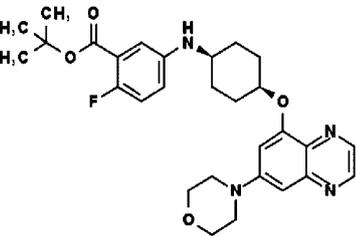
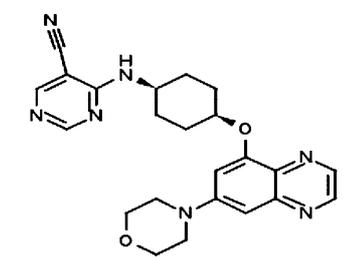
394		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,58 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,54 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,14 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,48 (д, J=7,7 Гц, 1H), 6,30-6,18 (м, 2H), 4,92 (м, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,74 (с, 3H), 3,66 (с, 3H), 3,55 (м, 1H), 3,34 (м, 4H), 2,03 (м, 2H), 1,78 (м, 6H),
395		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,53 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,13 (д, J=5,3 Гц, 1H), 6,84 (дд, J=20,0, 2,4 Гц, 2H), 5,40 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,72 (с, 1H), 4,31 (д, J=7,0 Гц, 1H), 3,83 (дд, J=5,8, 3,8 Гц, 4H), 3,26 (т, J=4,9 Гц, 4H), 2,14 (д, J=12,3 Гц, 2H), 1,95-1,68 (м, 6H),
396		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,72 (д, J=2,9 Гц, 1H), 6,87 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,03 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,71 (с, 1H), 4,16 (с, 2H), 3,83 (к, J=3,9, 3,1 Гц, 7H), 3,32-3,21 (м, 4H), 2,13 (д, J=11,2 Гц, 2H), 1,83 (т, J=6,5 Гц, 6H),

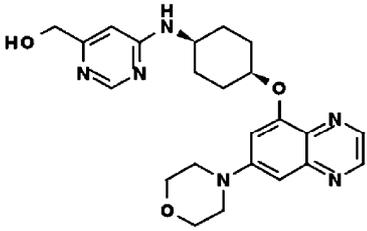
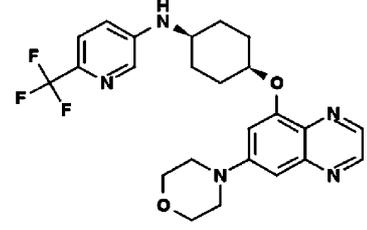
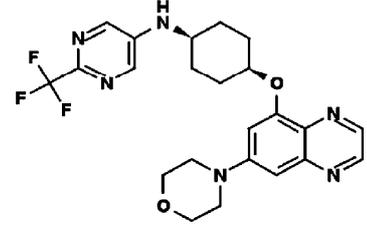
397		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,89 (д, J=5,8 Гц, 1H), 7,02-6,88 (м, 2H), 5,79 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,61 (с, 2H), 4,08-3,88 (м, 5H), 3,35 (дд, J=5,6, 4,1 Гц, 4H), 2,27-2,09 (м, 2H), 1,91 (д, J=5,0 Гц, 6H),
399		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,08 (д, J=6,3 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,23 (д, J=6,3 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,69 (с, 1H), 4,00-3,83 (м, 4H), 3,45-3,24 (м, 4H), 2,98 (с, 3H), 2,50 (с, 3H), 2,45-2,30 (м, 2H), 1,92-1,64 (м, 6H),
401		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,51 (с, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,56 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,25 (с, 1H), 3,96-3,89 (м, 4H), 3,88 (с, 3H), 3,47-3,23 (м, 4H), 2,29-2,06 (м, 2H), 2,06-1,78 (м, 6H),

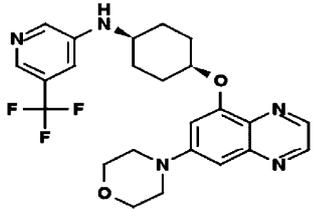
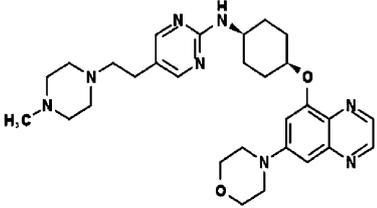
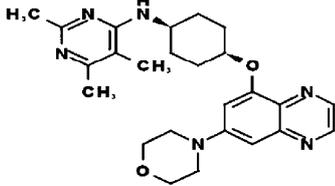
402		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,14 (с, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,52 (д, J=8,6 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,18 (с, 1H), 3,96-3,89 (м, 4H), 3,89 (с, 3H), 3,41-3,27 (м, 4H), 2,31-2,14 (м, 2H), 2,03-1,83 (м, 6H),
404		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,15 (д, J=2,5 Гц, 1H), 7,01 (с, 1H), 6,84 (д, J=2,3 Гц, 1H), 4,94 (м, 1H), 3,75 (м, 8H), 3,34 (м, 4H), 2,05 (м, 2H), 1,86-1,70 (м, 6H),
405		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d <sub>6</sub> ) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,01 (м, 1H), 7,14 (с, 1H), 7,01-6,90 (м, 1H), 6,82 (м, 2H), 6,71 (м, 1H), 5,70 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,91 (м, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,34 (м, 5H), 2,74 (д, J=4,6 Гц, 3H), 2,02 (м, 2H), 1,76 (м, 6H),

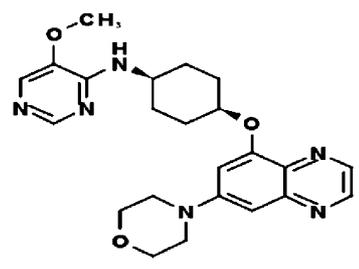
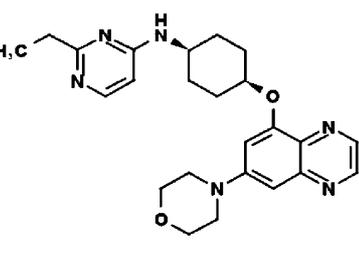
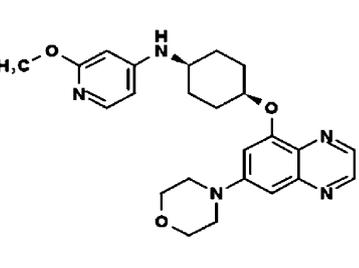
406		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,58 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,27 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,46 (дд, J=8,4, 7,1 Гц, 1H), 7,15 (л, J=2,4 Гц, 1H), 7,10 (дд, J=7,1, 0,9 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,75 (д, J=7,8 Гц, 1H), 6,68 (дд, J=8,4, 0,9 Гц, 1H), 4,91 (м, 1H), 4,14 (м, 1H), 3,80 (м, 4H), 3,35 (м, 4H), 2,82 (д, J=4,9 Гц, 3H), 2,03 (м, 2H), 1,93-1,73 (м, 6H),</p>
407		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) ротамеры, δ 9,07 (м, 1H), 8,89 (м, 1H), 8,75 (м, 1H), 7,47 (м, 1H), 6,96 (с, 1H), 4,95 (м, 1H), 3,97 (м, 4H), 3,82 (м, 4H), 3,38 (с, 3H), 2,24 (м, 8H), 1,60 (с, 9H),</p>
408		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,13 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,94 (т, J=8,0 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,26-6,14 (м, 2H), 6,10-6,03 (м, 1H), 5,57 (д, J=7,8 Гц, 1H), 4,90 (м, 1H), 3,79 (м, 4H), 3,66 (с, 3H), 3,33 (м, 4H), 2,03 (м, 2H), 1,77 (м, 6H),</p>

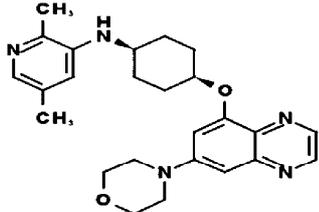
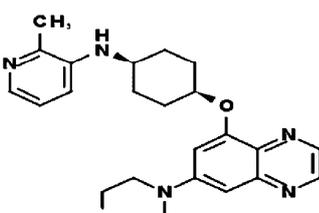
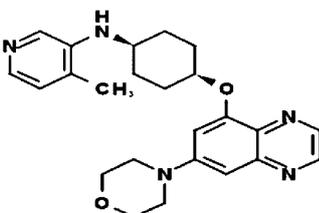
409		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,47 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,47 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,31-4,19 (м, 1H), 4,02-3,79 (м, 4H), 3,48-3,24 (м, 4H), 2,32-2,17 (м, 2H), 2,09-1,79 (м, 6H),
417		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) $\delta$ 8,81-8,55 (м, 3H), 6,94 (дд, J=17,2, 2,5 Гц, 2H), 6,65 (д, J=1,1 Гц, 1H), 4,84 (тд, J=5,1, 2,4 Гц, 1H), 4,01-3,86 (м, 4H), 3,42-3,29 (м, 4H), 2,35-2,11 (м, 2H), 2,03-1,82 (м, 6H),
418		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) $\delta$ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,49 (д, J=4,9 Гц, 1H), 7,04-6,89 (м, 2H), 6,81 (д, J=4,9 Гц, 1H), 5,54 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,80 (д, J=5,2 Гц, 1H), 4,17-3,98 (м, 1H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,42-3,31 (м, 4H), 2,33-2,12 (м, 2H), 2,06-1,72 (м, 6H),

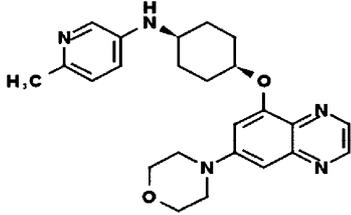
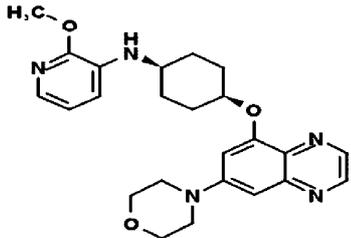
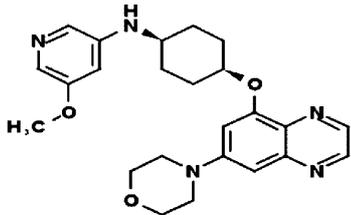
419		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) ротамеры $\delta$ 8,82 (д, $J=2,9$ Гц, 1H), 8,74 (м, 1H), 8,00 (м, 1H), 7,55-7,47 (м, 1H), 7,25 (м, 1H), 7,14 (м, 1H), 7,05 (м, 1H), 3,97 (м, 5H), 3,47 (м, 5H), 2,30 (с, 2H), 2,0 (м, 6H),
420		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, ДМСО-d6) $\delta$ 8,73 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 8,58 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,27-6,96 (м, 4H), 6,83 (д, $J=2,3$ Гц, 1H), 4,92 (м, 1H), 3,85-3,74 (м, 4H), 3,45 (м, 1H), 3,34 (м, 4H), 2,05 (м, 2H), 1,76 (м, 6H),
421		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, ДМСО-d6) $\delta$ 8,93 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 8,80 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,20 (с, 1H), 7,13-6,85 (м, 4H), 4,92 (м, 1H), 3,86-3,79 (м, 4H), 3,32 (м, 5H), 2,09 (м, 2H), 1,90-1,73 (м, 6H), 1,55 (с, 9H),
422		$^1\text{H-NMR}$ (300 МГц, Хлороформ-d) $\delta$ 8,72-8,52 (м, 3H), 8,38 (с, 1H), 6,87 (дд, $J=15,7$ , 2,5 Гц, 2H), 5,50 (д, $J=7,9$ Гц, 1H), 4,79 (п, $J=3,5$ Гц, 1H), 4,20 (дп, $J=14,0$ , 5,2, 4,7 Гц, 1H), 3,90-3,76 (м, 4H), 3,32-3,22 (м, 4H), 2,29-2,07 (м, 2H), 1,99-1,71 (м, 6H),

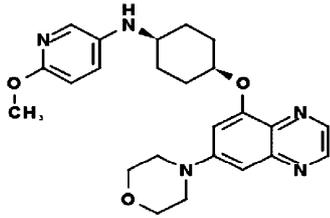
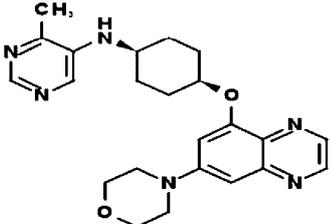
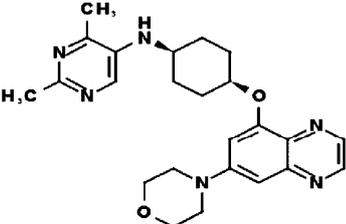
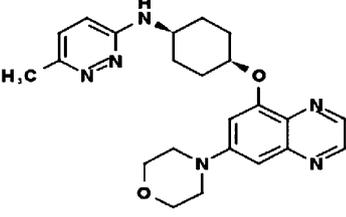
424		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,52 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,46-8,35 (м, 1H), 6,84 (дд, J=16,8, 2,5 Гц, 2H), 6,28-6,20 (м, 1H), 5,08 (с, 1H), 4,72 (д, J=5,2 Гц, 1H), 4,58-4,43 (м, 2H), 3,93-3,77 (м, 4H), 3,34-3,19 (м, 4H), 2,14 (дд, J=9,6, 5,4 Гц, 2H), 1,93-1,73 (м, 6H),</p>
427		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,94-8,63 (м, 2H), 8,07 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,45 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,14-6,87 (м, 3H), 4,84 (м, 1H), 3,99-3,87 (м, 4H), 3,62-3,48 (м, 1H), 3,35 (дт, J=42,8, 4,8 Гц, 4H), 2,32-2,14 (м, 2H), 1,91 (д, J=17,8 Гц, 6H),</p>
428		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,81-8,64 (м, 2H), 8,20 (с, 2H), 7,08 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,90-4,82 (м, 1H), 4,42 (м, 1H), 3,98-3,88 (м, 4H), 3,57 (м, 1H), 3,45-3,26 (м, 4H), 2,33-2,18 (м, 2H), 2,04-1,82 (м, 6H),</p>

429		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,42 (м, 1H), 8,16-8,08 (м, 1H), 7,20 (с, 1H), 7,04-6,98 (м, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,84 (м, 1H), 4,01-3,87 (м, 4H), 3,54 (м, 1H), 3,42-3,26 (м, 4H), 2,33-2,19 (м, 2H), 2,08-1,80 (м, 6H),
430		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,15 (с, 2H), 7,03-6,85 (м, 2H), 5,09 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 3,92 (дд, J=5,9, 3,7 Гц, 5H), 3,40-3,24 (м, 4H), 2,71-2,33 (м, 8H), 2,30 (с, 3H), 2,20 (с, 2H), 1,91 (д, J=5,0 Гц, 6H), 1,26 (д, J=3,1 Гц, 4H),
436		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,88-4,70 (м, 2H), 4,32 (с, 1H), 3,98-3,85 (м, 4H), 3,41-3,27 (м, 4H), 2,53 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,99 (с, 3H), 1,94-1,88 (м, 6H),

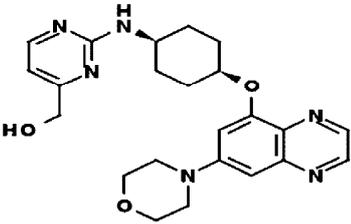
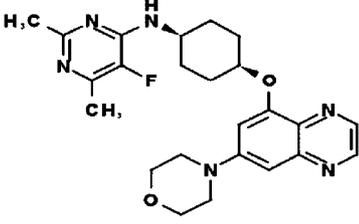
438		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,72 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,72 (с, 1H), 6,94 (дд, J=16,4, 2,5 Гц, 2H), 5,45 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,76 (д, J=6,6 Гц, 1H), 4,26 (с, 1H), 4,01-3,85 (м, 7H), 3,44-3,28 (м, 4H), 2,30-2,11 (м, 2H), 2,08-1,82 (м, 6H),
439		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,14 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,98 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,17 (д, J=6,0 Гц, 1H), 5,05 (с, 1H), 4,01-3,70 (м, 5H), 3,42-3,25 (м, 4H), 2,77 (к, J=7,6 Гц, 2H), 2,32-2,16 (м, 2H), 2,04-1,80 (м, 6H), 1,32 (т, J=7,6 Гц, 3H),
440		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,81 (д, J=6,3 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,6 Гц, 1H), 6,24 (д, J=6,2 Гц, 1H), 5,92 (с, 1H), 4,80 (м, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,95-3,87 (м, 4H), 3,54 (м, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,23 (м, 2H), 2,00-1,81 (м, 6H),

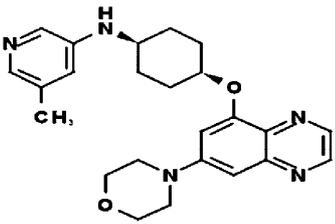
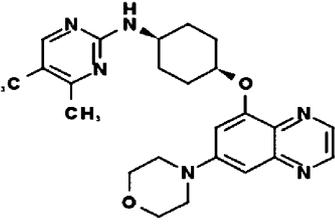
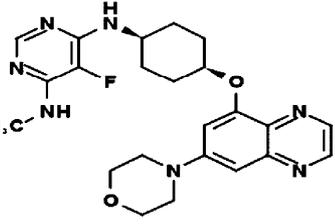
441		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) ротамеры, δ 8,80 (д, 1H), 8,73 (д, 1H), 7,73 (с, 1H), 7,16-6,99 (м, 3H), 4,91 (м, 1H), 3,95 (м, 4H), 3,55 (м, 1H), 3,37 (м, 4H), 2,73 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 2,29 (м, 2H), 2,13 (м, 6H),
442		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,89 (дд, J=5,0, 1,4 Гц, 1H), 7,19-7,10 (м, 1H), 7,03-6,95 (м, 2H), 6,92 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,80 (м, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,79 (м, 1H), 3,51 (м, 1H), 3,38-3,29 (м, 4H), 2,51 (м, 3H), 2,25 (м, 2H), 2,00-1,87 (м, 6H),
443		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,01 (с, 1H), 7,89 (д, J=4,8 Гц, 1H), 7,03 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,78 (м, 1H), 3,98-3,86 (м, 4H), 3,61 (м, 2H), 3,39-3,28 (м, 4H), 2,30-2,15 (м, 5H), 1,93 (м, 6H),

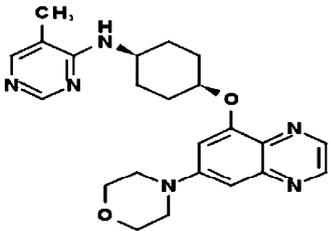
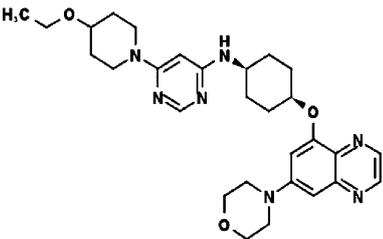
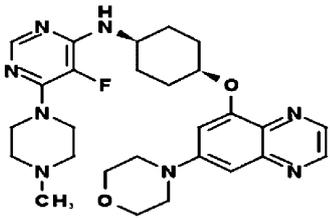
444		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,03 (дд, J=2,7, 0,9 Гц, 1H), 7,12-7,00 (м, 2H), 6,95 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,79 (м, 1H), 4,08-3,87 (м, 5H), 3,49 (м, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,53 (с, 3H), 2,21 (м, 2H), 1,84 (д, J=6,8 Гц, 6H),
445		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,65 (м, 1H), 8,40 (м, 1H), 7,50 (дд, J=4,5, 2,2 Гц, 1H), 7,03 (с, 1H), 6,92 (с, 1H), 6,80 (м, 2H), 4,76 (м, 1H), 4,08 (с, 3H), 3,93 (м, 5H), 3,49 (м, 1H), 3,42-3,30 (м, 4H), 2,20 (м, 2H), 1,92 (м, 6H),
446		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,71 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,65 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,55 (т, J=2,4 Гц, 1H), 4,79 (м, 1H), 4,13 (м, 1H), 3,92 (м, 4H), 3,85 (с, 3H), 3,48 (м, 1H), 3,38-3,29 (м, 4H), 2,22 (м, 2H), 1,98-1,88 (м, 6H),

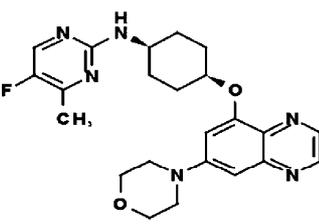
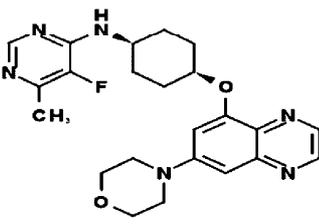
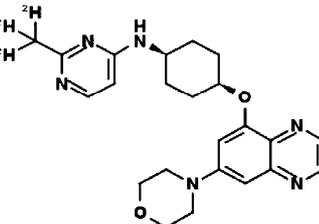
447		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,15 (м, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (м, 1H), 6,64 (д, J=8,8 Гц, 1H), 4,80 (м, 1H), 3,90 (м, 7H), 3,45-3,26 (м, 5H), 2,24-2,12 (м, 2H), 1,98-1,81 (м, 6H),</p>
448		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,78 (дд, J=4,0, 2,0 Гц, 1H), 8,66 (д, J=2,1 Гц, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,02 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,88 (м, 1H), 3,93 (м, 4H), 3,55 (м, 1H), 3,40 (м, 4H), 3,29 (м, 1H), 2,58 (с, 3H), 2,28 (м, 2H), 2,07 (м, 6H),</p>
449		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) роламеры, δ 8,85 (д, 1H), 8,67 (д, 1H), 7,92 (д, 1H), 7,07-6,96 (м, 2H), 4,91 (м, 1H), 4,01-3,88 (м, 4H), 3,53-3,24 (м, 5H), 2,87 (с, 3H), 2,64 (с, 3H), 2,04-1,76 (м, 6H),</p>
450		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,21 (д, J=9,2 Гц, 1H), 6,99-6,87 (м, 3H), 4,87 (м, 1H), 3,98-3,82 (м, 5H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,51 (с, 3H), 2,30-2,22 (м, 2H), 2,11-1,84 (м, 6H),</p>

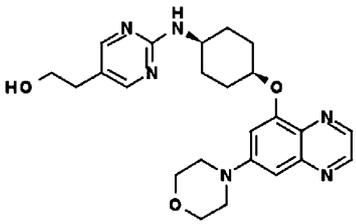
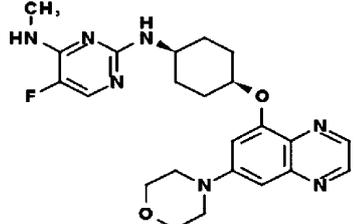
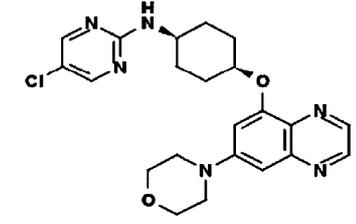
451		421,56	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) ротамеры, δ 8,92 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,77 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,30 (м, 2H), 7,02-6,90 (м, 2H), 4,86 (м, 1H), 3,94 (м, 4H), 3,52-3,26 (м, 5H), 2,78 (с, 3H), 2,26 (д, J=11,8 Гц, 2H), 1,90 (м, 6H),
453		450,43	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,69 (с, 1H), 8,62 (с, 1H), 7,89 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,94 (с, 1H), 6,89 (с, 1H), 5,64 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,87-4,66 (м, 2H), 3,98-3,83 (м, 4H), 3,44-3,24 (м, 4H), 3,13 (с, 6H), 2,26-2,10 (м, 2H), 2,04-1,75 (м, 6H),
454		436,34	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,61 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,52 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,69 (с, 1H), 6,86 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,80 (д, J=2,2 Гц, 1H), 5,62 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,83 (с, 1H), 4,69 (с, 1H), 3,91-3,74 (м, 4H), 3,36-3,10 (м, 4H), 2,86 (д, J=5,0 Гц, 3H), 2,22-2,03 (м, 2H), 1,91-1,72 (м, 6H),
455		447,41	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,05 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,39 (д, J=5,2 Гц, 1H), 5,13 (шд, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,10-3,96 (м, 1H), 3,95-3,83 (м, 4H), 3,40-3,24 (м, 4H), 2,26-2,09 (м, 2H), 1,97-1,76 (м, 7H), 1,10-1,00 (м, 2H), 1,00-0,91 (м, 2H),
456		465,29	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,23 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,04 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,21 (с, 1H), 4,02-3,82 (м, 4H), 3,44-3,26 (м, 4H), 2,33-2,10 (м, 3H), 2,06-1,82 (м, 6H), 1,19-1,11 (м, 2H), 1,06-0,97 (м, 2H),

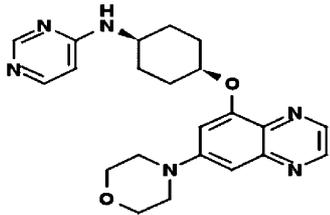
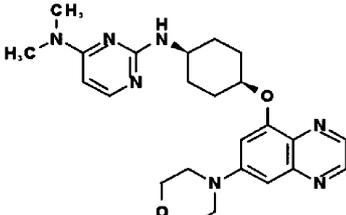
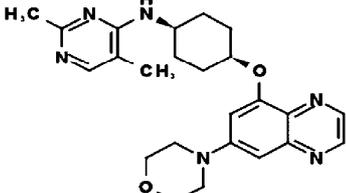
457		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,21 (д, J=51H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (п, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,21 (д, J=5,1 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,45 (д, J=5,1 Гц, 1H), 5,33 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,85-4,74 (м, 1H), 4,56 (с, 2H), 4,12-4,00 (м, 1H), 3,95-3,86 (м, 4H), 3,66 (с, 1H), 3,39-3,27 (м, 4H), 2,18 (дд, J=14,1, 8,4 Гц, 2H), 2,01-1,83 (м, 6H),
463		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,95 (д, J=7,1 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,23 (д, J=3,8 Гц, 1H), 3,99-3,82 (м, 4H), 3,42-3,25 (м, 4H), 2,45 (д, J=0,6 Гц, 3H), 2,30 (д, J=2,8 Гц, 3H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,99-1,86 (м, 6H),

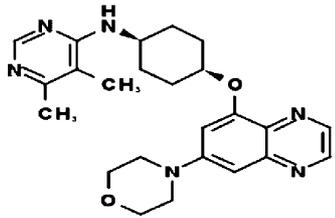
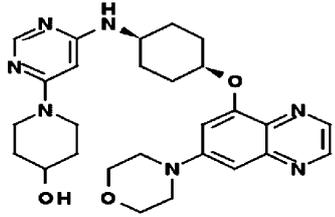
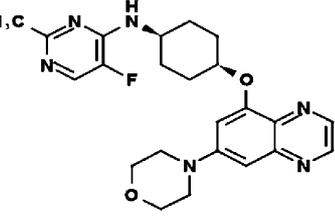
465		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,86 (д, J=2,7 Гц, 1H), 7,78 (с, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,78 (т, J=2,1 Гц, 1H), 4,78 (м, 1H), 4,00-3,86 (м, 4H), 3,50 (с, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,28 (с, 3H), 2,25-2,14 (м, 2H), 1,95-1,85 (м, 6H),</p>
467		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,95 (с, 1H), 6,94 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,00 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,83-4,74 (м, 1H), 4,07-3,96 (м, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,29 (с, 3H), 2,22-2,12 (м, 2H), 2,07 (с, 3H), 1,93-1,85 (м, 6H),</p>
469		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,03 (с, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,67 (с, 1H), 4,60 (с, 1H), 4,16 (с, 1H), 4,00-3,82 (м, 4H), 3,41-3,25 (м, 4H), 3,04 (д, J=5,0 Гц, 3H), 2,28-2,11 (м, 2H), 1,99-1,84 (м, 6H),</p>

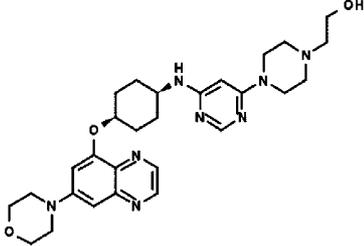
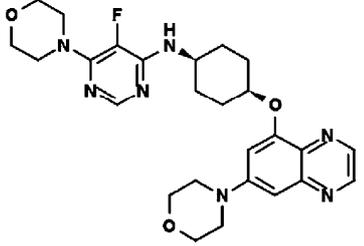
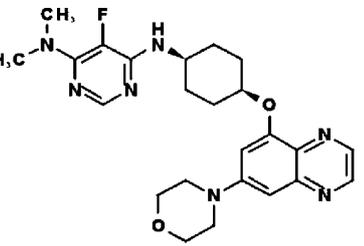
471		421,35 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,91 (д, J=13,5 Гц, 1H), 6,93-6,78 (м, 2H), 4,71 (с, 1H), 4,57 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,22 (с, 1H), 3,91-3,78 (м, 4H), 3,33-3,19 (м, 4H), 2,16 (д, J=6,6 Гц, 2H), 1,96 (с, 3H), 1,91-1,77 (м, 6H),
472		534,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,10 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,92-6,77 (м, 2H), 5,36 (дд, J=7,9, 0,9 Гц, 1H), 4,71 (к, J=5,2, 4,2 Гц, 2H), 3,97-3,69 (м, 7H), 3,58-3,37 (м, 4H), 3,30-3,03 (м, 6H), 2,22-2,04 (м, 2H), 1,93-1,73 (м, 6H), 1,52 (ддд, J=12,8, 8,9, 3,8 Гц, 2H), 1,28-1,16 (м, 3H),
474		523,31 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl3) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,82 (д, J=5,5 Гц, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,15 (с, 1H), 3,96-3,85 (м, 4H), 3,76-3,65 (м, 4H), 3,38-3,26 (м, 4H), 2,59-2,45 (м, 4H), 2,34 (с, 3H), 2,27-2,13 (м, 2H), 1,96-1,85 (м, 6H),

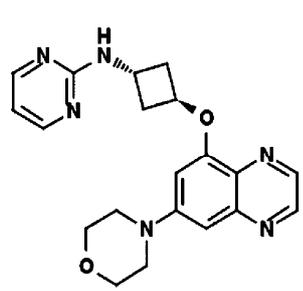
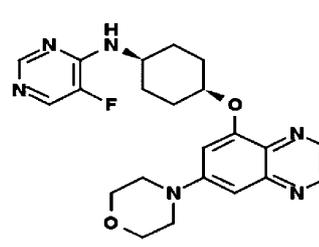
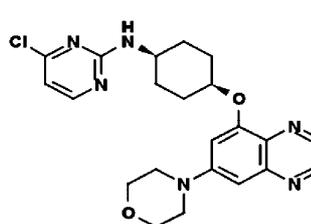
476		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,03 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,18-5,04 (м, 1H), 4,80 (с, 1H), 3,99-3,90 (м, 5H), 3,40-3,32 (м, 4H), 2,36 (д, J=2,4 Гц, 3H), 2,23-2,15 (м, 2H), 1,95-1,85 (м, 6H),
477		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,26 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,07 (д, J=7,2 Гц, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,30-4,13 (м, 1H), 3,98-3,83 (м, 4H), 3,38-3,26 (м, 4H), 2,36 (д, J=2,8 Гц, 3H), 2,29-2,16 (м, 2H), 1,97-1,85 (м, 6H),
478		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,64 (т, J=9,6 Гц, 1H), 8,53 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,02 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,07 (д, J=6,0 Гц, 1H), 4,91 (с, 1H), 4,73 (с, 1H), 3,83 (дд, J=17,8, 12,9 Гц, 5H), 3,25 (дд, J=17,8, 13,0 Гц, 4H), 2,14 (дд, J=8,9, 5,0 Гц, 2H), 1,91-1,76 (м, 6H),

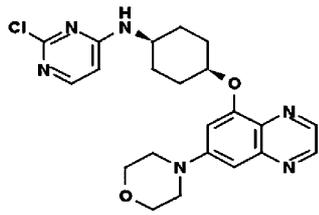
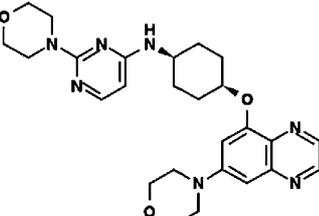
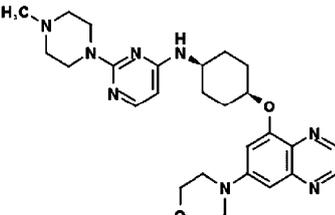
481		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (с, 2H), 6,99-6,87 (м, 2H), 5,16 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,03-3,87 (м, 5H), 3,80 (т, J=6,5 Гц, 2H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,67 (т, J=6,5 Гц, 2H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,90 (т, J=6,5 Гц, 6H),</p>
482		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,65 (д, J=3,6 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,14 (с, 1H), 4,90 (с, 1H), 4,76 (с, 1H), 4,01-3,87 (м, 5H), 3,39-3,31 (м, 4H), 3,01 (д, J=5,0 Гц, 3H), 2,23-2,12 (м, 2H), 1,99-1,81 (м, 6H),</p>
485		<p><sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,20 (с, 2H), 6,96 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,27 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,01-3,84 (м, 5H), 3,40-3,25 (м, 4H), 2,25-2,12 (м, 2H), 1,97-1,82 (м, 6H),</p>

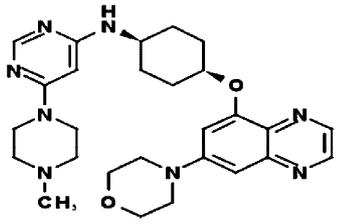
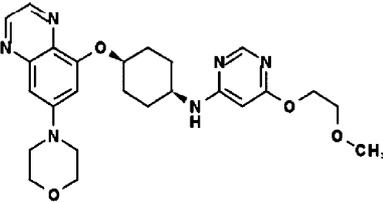
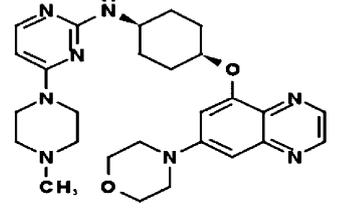
486		407 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,08 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,83 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,24 (дд, J=6,0, 1,1 Гц, 1H), 4,88 (с, 1H), 4,78-4,67 (м, 1H), 3,87-3,82 (м, 4H), 3,25 (дд, J=13,6, 8,8 Гц, 4H), 2,15 (дд, J=8,8, 5,1 Гц, 2H), 1,90-1,78 (м, 6H),
489		450,34 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,85 (д, J=6,1 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,81 (д, J=6,1 Гц, 1H), 4,92 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,02 (с, 1H), 3,97-3,86 (м, 4H), 3,32 (дд, J=17,6, 12,8 Гц, 4H), 3,04 (с, 6H), 2,18 (дд, J=24,2, 17,3 Гц, 2H),
490		435,35 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,87 (д, J=0,7 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,67 (с, 1H), 4,41-4,28 (м, 1H), 3,96-3,88 (м, 4H), 3,38-3,30 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,28-2,16 (м, 2H), 2,00 (с, 3H), 1,98-1,90 (м, 6H),

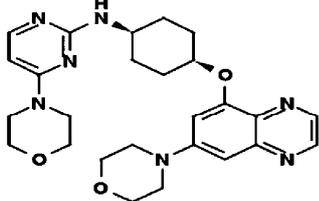
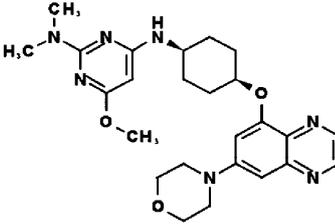
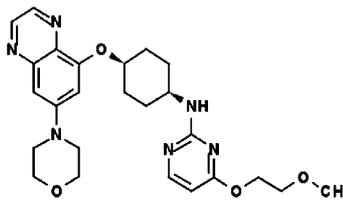
491		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,42 (с, 1H), 6,95 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 4,79 (с, 2H), 4,28 (с, 1H), 3,98-3,86 (м, 4H), 3,40-3,28 (м, 4H), 2,42 (с, 3H), 2,30-2,16 (м, 2H), 2,02 (с, 3H), 1,99-1,89 (м, 6H),
492		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,20 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,47 (д, J=1,0 Гц, 1H), 4,76 (д, J=23,9 Гц, 2H), 4,12-3,75 (м, 7H), 3,41-3,28 (м, 4H), 3,20 (ддд, J=13,2, 9,6, 3,2 Гц, 2H), 2,20 (д, J=6,9 Гц, 2H), 1,91 (д, J=5,2 Гц, 6H),
494		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,82 (д, J=3,4 Гц, 1H), 6,88 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,82 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,96 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,72 (д, J=3,1 Гц, 1H), 4,18 (с, 1H), 3,90-3,78 (м, 4H), 3,35-3,19 (м, 4H), 2,41 (д, J=0,9 Гц, 3H), 2,13 (к, J=6,4 Гц, 2H), 1,84 (т, J=6,3 Гц, 6H),

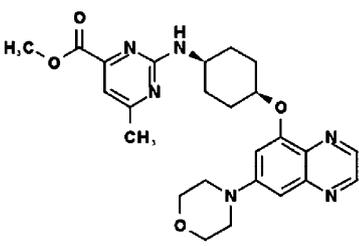
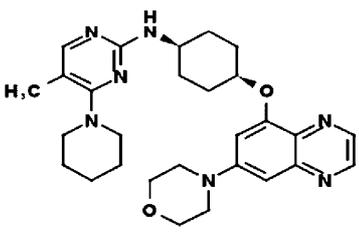
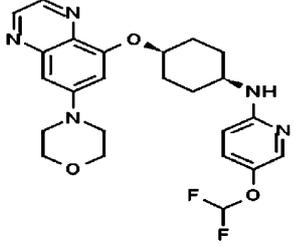
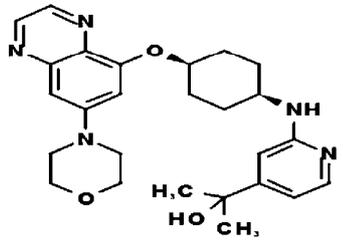
499		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,19 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,4, 2,5 Гц, 2H), 5,42 (д, J=1,0 Гц, 1H), 4,87-4,67 (м, 2H), 4,01-3,77 (м, 5H), 3,61 (дт, J=27,3, 5,1 Гц, 6H), 3,41-3,26 (м, 4H), 2,73 (т, J=5,3 Гц, 1H), 2,59 (ддд, J=6,2, 5,0, 3,7 Гц, 6H), 2,19 (д, J=6,6 Гц, 2H), 1,89 (т, J=5,2 Гц, 6H),
511		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,93 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,85 (дд, J=16,5, 2,5 Гц, 2H), 4,74 (ддд, J=21,7, 7,5, 3,9 Гц, 2H), 4,09 (п, J=7,7, 7,2 Гц, 1H), 3,92-3,79 (м, 4H), 3,71 (дд, J=5,7, 3,7 Гц, 4H), 3,57 (дд, J=5,7, 3,7 Гц, 4H), 3,34-3,20 (м, 4H), 2,15 (тп, J=11,0, 10,0, 6,2 Гц, 2H), 1,94-1,79 (м, 6H),
512		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,00-6,85 (м, 2H), 4,77 (д, J=6,6 Гц, 2H), 4,14 (к, J=7,2 Гц, 1H), 4,03-3,87 (м, 4H), 3,78-3,64 (м, 1H), 3,43-3,28 (м, 4H), 3,15 (д, J=2,5 Гц, 6H), 2,98-2,84 (м, 1H), 2,20 (д, J=11,9 Гц, 2H), 1,94 (п, J=5,8, 5,3 Гц, 6H),

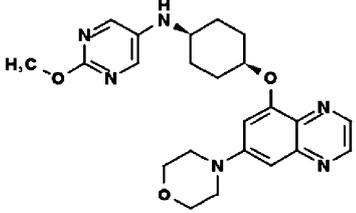
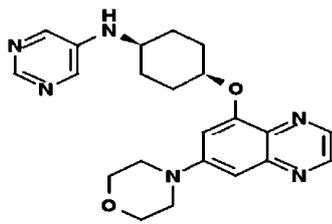
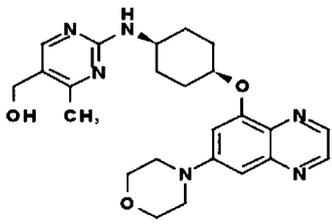
525		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,31 (с, 1H), 8,30 (с, 1H), 6,93 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,64-6,54 (м, 2H), 5,38 (д, J=5,1 Гц, 1H), 5,17-5,07 (м, 1H), 4,68-4,56 (м, 1H), 3,95-3,85 (м, 4H), 3,35-3,27 (м, 4H), 2,94 (ддд, J=13,4, 8,2, 5,1 Гц, 2H), 2,59 (ддд, J=13,9, 7,0, 4,5 Гц, 2H),
531		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,64 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,39 (дд, J=2,7, 0,5 Гц, 1H), 8,04 (д, J=3,4 Гц, 1H), 6,97 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,5 Гц, 1H), 5,15 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,83 (дк, J=5,1, 2,6 Гц, 1H), 4,25 (дд, J=8,1, 4,6 Гц, 1H), 3,98-3,88 (м, 4H), 3,39-3,28 (м, 4H), 2,34-2,17 (м, 2H), 2,03-1,84 (м, 6H),
532		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,13 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,54 (д, J=5,2 Гц, 1H), 5,36 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,03 (с, 1H), 3,97-3,84 (м, 4H), 3,41-3,23 (м, 4H), 2,26-2,12 (м, 2H), 1,98-1,81 (м, 6H),

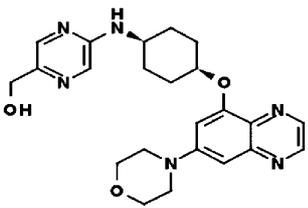
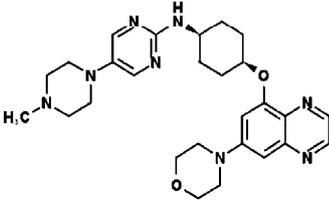
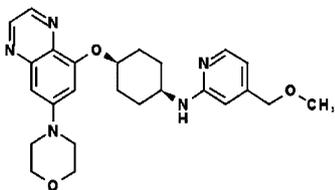
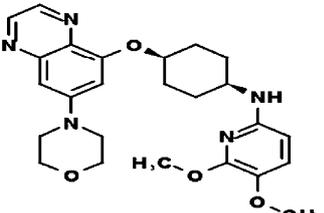
533		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (с, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,22 (д, J=5,9 Гц, 1H), 5,22 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,03 (дт, J=12,1, 6,2 Гц, 1H), 3,94-3,86 (м, 4H), 3,40-3,26 (м, 4H), 2,27-2,13 (м, 2H), 1,90 (т, J=17,4 Гц, 6H),
534		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 7,89 (д, J=5,5 Гц, 1H), 6,95 (с, 1H), 6,89 (с, 1H), 5,71 (д, J=5,8 Гц, 1H), 4,76 (с, 2H), 4,01-3,81 (м, 5H), 3,74 (с, 8H), 3,41-3,26 (м, 4H), 2,26-2,12 (м, 2H), 1,98-1,81 (м, 6H),
535		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,88 (д, J=5,7 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 5,67 (д, J=5,8 Гц, 1H), 4,84-4,63 (м, 2H), 3,99-3,83 (м, 5H), 3,82-3,73 (м, 4H), 3,37-3,27 (м, 4H), 2,49-2,40 (м, 4H), 2,33 (с, 3H), 2,23-2,11 (м, 2H), 1,96-1,82 (м, 6H),

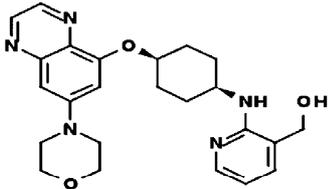
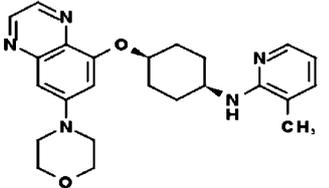
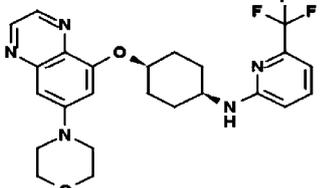
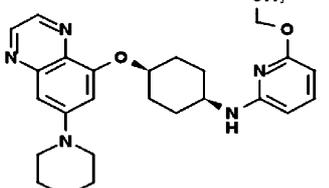
537		505,35 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,7 Гц, 1H), 8,18 (с, 1H), 6,95 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,90 (с, 1H), 5,42 (с, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,71 (д, J=8,3 Гц, 1H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,83 (с, 1H), 3,65-3,48 (м, 4H), 3,41-3,24 (м, 4H), 2,54-2,42 (м, 4H), 2,33 (с, 3H), 2,25-2,11 (м, 2H), 1,97-1,82 (м, 6H),
539		481,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,76-1,97 (м, 6H), 2,15-2,26 (м, 2H), 3,31-3,35 (м, 4H), 3,43 (с, 3H), 3,61-3,72 (м, 3H), 3,90-3,93 (м, 4H), 4,45-4,48 (м, 2H), 4,76-4,82 (м, 1H), 4,94 (д, J=7,1 Гц, 1H), 5,73 (с, 1H), 6,89 (д, J=2,
547		505,4 <sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,90 (д, J=6,0 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,92 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,89 (д, J=6,1 Гц, 1H), 4,96 (с, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,08-3,98 (м, 1H), 3,96-3,87 (м, 4H), 3,70-3,53 (м, 4H), 3,43-3,27 (м, 4H), 2,53-2,42 (м, 4H), 2,35 (с, 3H), 2,25-2,13 (м, 2H), 2,00-1,85 (м, 6H),

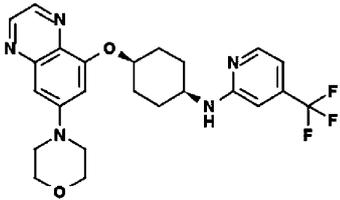
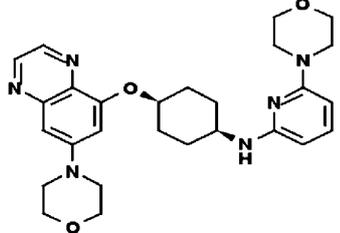
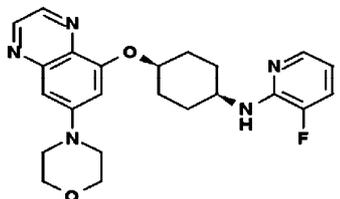
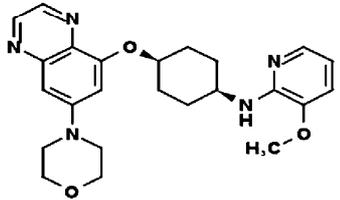
548		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,93 (д, J=5,9 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,3 Гц, 1H), 5,87 (д, J=6,1 Гц, 1H), 4,97 (с, 1H), 4,77 (с, 1H), 4,02 (с, 1H), 3,97-3,88 (м, 4H), 3,83-3,70 (м, 4H), 3,63-3,52 (м, 4H), 3,39-3,27 (м, 4H), 2,25-2,12 (м, 2H), 2,01-1,85 (м, 6H),
553		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=17,8, 2,5 Гц, 2H), 5,07 (с, 1H), 4,78 (д, J=6,2 Гц, 1H), 4,68 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,03-3,90 (м, 4H), 3,87 (с, 3H), 3,71 (с, 1H), 3,42-3,28 (м, 4H), 3,13 (с, 6H), 2,27-2,00 (м, 2H), 2,00-1,79 (м, 6H),
558		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,84-1,99 (м, 6H), 2,11-2,25 (м, 2H), 3,32-3,36 (м, 4H), 3,43 (с, 3H), 3,70-3,73 (м, 2H), 3,90-3,93 (м, 4H), 3,96-4,07 (м, 1H), 4,41-4,44 (м, 2H), 4,72-4,80 (м, 1H), 5,10 (шс, 1H), 6,06 (д, J=5,6

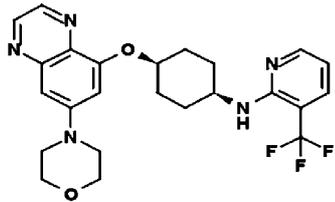
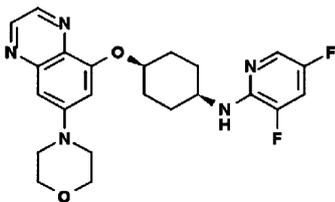
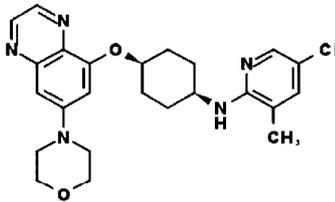
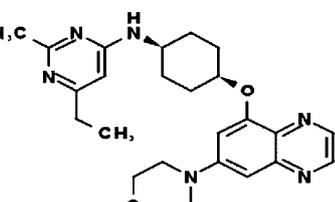
565		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,47 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93 (с, 1H), 6,86-6,72 (м, 2H), 5,25 (с, 1H), 4,66 (с, 1H), 4,05-3,90 (м, 1H), 3,86-3,71 (м, 7H), 3,30-3,09 (м, 4H), 2,27 (д, J=2,2 Гц, 3H), 2,04 (д, J=9,2 Гц, 2H), 1,75 (д, J=4,8 Гц, 6H),
567		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,74 (с, 1H), 7,00-6,89 (м, 2H), 4,91 (с, 1H), 4,76 (д, J=6,1 Гц, 1H), 4,04-3,93 (м, 5H), 3,43-3,28 (м, 4H), 2,26-2,14 (м, 2H), 2,08 (д, J=0,8 Гц, 3H), 2,00-1,92 (м, 6H), 1,69 (д, J=21,2 Гц, 10H),
572		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,82-1,99 (м, 6H), 2,14-2,28 (м, 2H), 3,32-3,35 (м, 4H), 3,80-3,88 (м, 1H), 3,90-3,93 (м, 4H), 4,70-4,83 (м, 2H), 6,37 (д, J=8,8 Гц, 1H), 6,38 (ш, J=73,8 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,95 (д, J=
573		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,52 (с, 6H), 1,73 (шс, 1H), 1,85-1,96 (м, 6H), 2,11-2,25 (м, 2H), 3,30-3,36 (м, 4H), 3,88-4,00 (м, 5H), 4,55 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,74-4,81 (м, 1H), 6,52 (с, 1H), 6,57 (дд, J=5,4, 1,4 Гц, 1H), 6,90 (д,

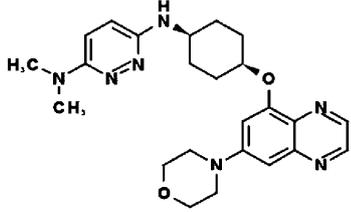
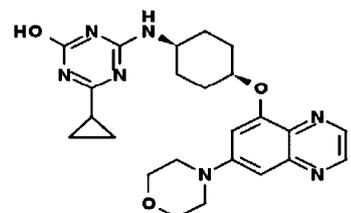
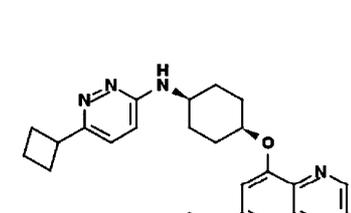
574		437,42	<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,99 (с, 2H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,01-3,84 (м, 7H), 3,41 (с, 2H), 3,37-3,27 (м, 4H), 2,26-2,14 (м, 2H), 1,93-1,81 (м, 6H),
575		407,35	<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,13 (с, 2H), 6,98 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H), 4,86-4,73 (м, 1H), 3,95-3,88 (м, 4H), 3,56-3,49 (м, 1H), 3,39-3,31 (м, 4H), 2,30-2,18 (м, 2H), 1,97-1,84 (м, 6H),
576		450,13	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,13 (с, 1H), 7,01-6,87 (м, 2H), 4,81 (с, 1H), 4,57 (с, 2H), 4,06 (с, 1H), 3,99-3,87 (м, 4H), 3,35 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 2,45 (с, 3H), 2,20 (д, J=8,0 Гц, 2H), 1,93 (д, J=5,1 Гц, 6H),

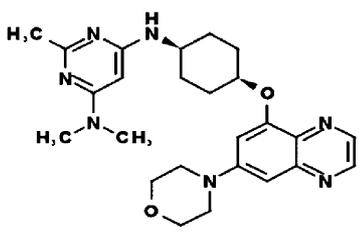
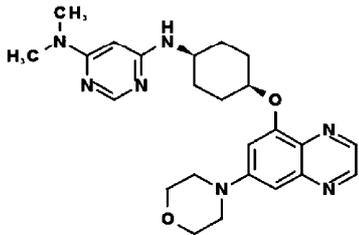
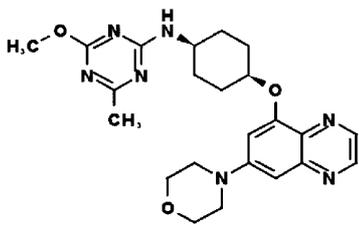
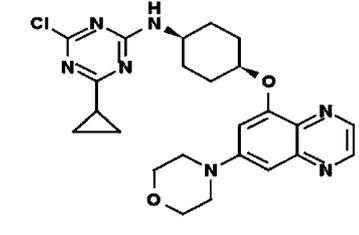
577		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,02 (д, J=1,4 Гц, 1H), 7,87 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,94 (дд, J=16,2, 2,5 Гц, 2H), 4,89-4,71 (м, 2H), 4,65 (с, 2H), 4,06-3,85 (м, 4H), 3,40-3,27 (м, 4H), 2,23 (пт, J=11,5, 5,5 Гц, 2H), 2,04-1,80 (м, 6H),
579		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (с, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,07 (с, 2H), 6,94 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 4,96 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 4,02-3,81 (м, 5H), 3,47-3,19 (м, 5H), 3,19-2,83 (м, 4H), 2,76-2,52 (м, 3H), 2,37 (с, 3H), 2,26-2,11 (м, 2H), 2,03-1,82 (м, 6H),
582		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,83 ñ 1,96 (м, 6H), 2,14-2,26 (м, 2H), 3,30-3,36 (м, 4H), 3,41 (с, 3H), 3,87 ñ 3,95 (м, 5H), 4,36 (с, 2H), 4,59-4,89 (м, 2H), 6,38 (с, 1H), 6,48 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4
583		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,84-2,00 (м, 6H), 2,09-2,24 (м, 2H), 3,30-3,37 (м, 4H), 3,64-3,74 (м, 1H), 3,78 (с, 3H), 3,89-3,95 (м, 7H), 4,71-4,79 (м, 1H), 5,88 (д, J=8,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H)

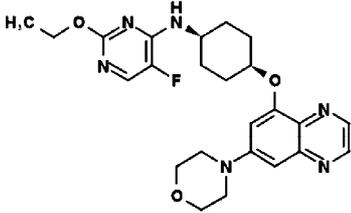
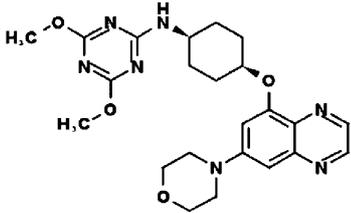
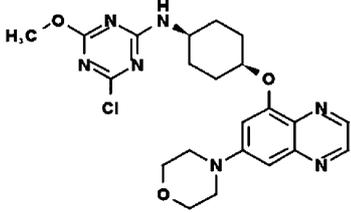
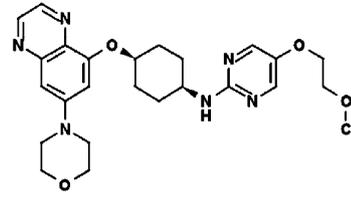
584		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,86-2,04 (м, 6H), 2,12-2,26 (м, 2H), 3,28-3,39 (м, 4H), 3,88-3,96 (м, 4H), 4,26 (шс, 1H), 4,62 (с, 2H), 4,69-4,78 (м, 1H), 5,56 (шс, 1H), 6,50 (т, J=5,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93 (д, J
586		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,88 ñ 2,01 (м, 6H), 2,10 (с, 3H), 2,15-2,25 (м, 2H), 3,30-3,37 (м, 4H), 3,89 ñ 3,95 (м, 4H), 4,25 (шс, 2H), 4,71-4,78 (м, 1H), 6,51 (дд, J=6,8, 5,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,3 Гц, 1
587		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,82-1,98 (м, 6H), 2,12-2,26 (м, 2H), 3,25-3,43 (м, 4H), 3,82-3,98 (м, 5H), 4,80 (шс, 2H), 6,52 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,87-6,93 (м, 2H), 6,95-7,00 (м, 1H), 7,50 (т, J=7,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,2 Гц, 1
588		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,38 (т, J=7,0 Гц, 3H), 1,83-2,00 (м, 6H), 2,11-2,24 (м, 2H), 3,30-3,37 (м, 4H), 3,75-3,85 (м, 1H), 3,89-3,94 (м, 4H), 4,25 (к, J=7,0 Гц, 2H), 4,42-4,54 (м, 1H), 4,72-4,79 (м, 1H), 5,94 (д, J=7,7 H

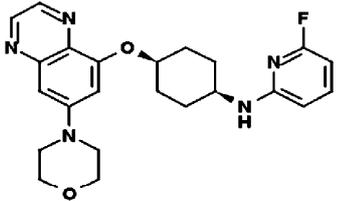
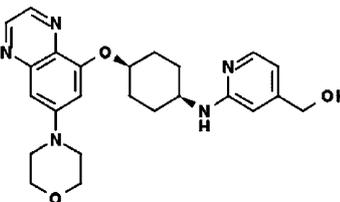
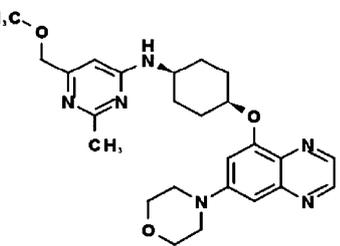
589		474,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,86-1,99 (м, 6H), 2,16-2,27 (м, 2H), 3,31-3,36 (м, 4H), 3,88-3,95 (м, 5H), 4,77-4,84 (м, 1H), 4,90 (шс, 1H), 6,55 (с, 1H), 6,72 (д, J=5,0 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,
590		491,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,82-1,98 (м, 6H), 2,10-2,22 (м, 2H), 3,31-3,35 (м, 4H), 3,41-3,45 (м, 4H), 3,69-3,82 (м, 5H), 3,90-3,93 (м, 4H), 4,43 (д, J=7,7 Гц, 1H), 4,70-4,77 (м, 1H), 5,81 (д, J=8,0 Гц, 1H), 5,90 (д, J=8,0 H
591		424,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,88-2,00 (м, 6H), 2,13-2,28 (м, 2H), 3,29-3,38 (м, 4H), 3,88-3,95 (м, 4H), 4,21 (шс, 1H), 4,62-4,84 (м, 2H), 6,45-6,54 (м, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,07-7,18 (м, 1H),
592		436,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,84-2,03 (м, 6H), 2,11-2,24 (м, 2H), 3,30-3,37 (м, 4H), 3,84 (с, 3H), 3,89-3,95 (м, 4H), 4,17-4,29 (м, 1H), 4,67-4,76 (м, 1H), 5,08 (д, J=7,4 Гц, 1H), 6,50 (дд, J=7,3, 5,2 Гц, 1H), 6,82 (д, J=7,4 Гц

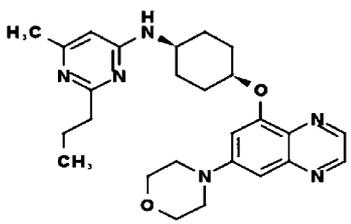
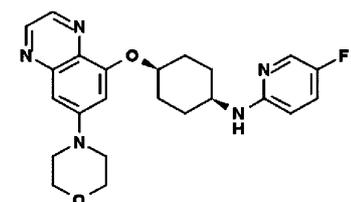
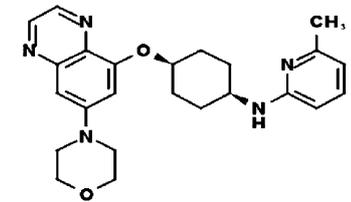
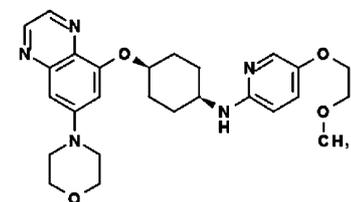
593		474,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,86-2,00 (м, 6H), 2,13-2,26 (м, 2H), 3,30-3,38 (м, 4H), 3,88-3,97 (м, 4H), 4,22-4,35 (м, 1H), 4,73-4,80 (м, 1H), 4,89-4,99 (м, 1H), 6,60 (дд, J=7,1, 5,1 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,96 (д, J=
594		442,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,85-2,00 (м, 6H), 2,11-2,28 (м, 2H), 3,29-3,39 (м, 4H), 3,87-3,97 (м, 4H), 4,06-4,18 (м, 1H), 4,56 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,73-4,81 (м, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,05 (ддд, J=
595		434,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,88-2,02 (м, 6H), 2,08 (с, 3H), 2,15 (с, 3H), 2,14-2,24 (м, 2H), 3,31-3,36 (м, 4H), 3,89-3,95 (м, 4H), 4,03-4,16 (м, 1H), 4,23 (шс, 1H), 4,69-4,77 (м, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,4 Гц
597		449,23 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,07-6,87 (м, 2H), 6,02 (с, 1H), 4,83 (д, J=5,5 Гц, 1H), 4,03-3,81 (м, 5H), 3,44-3,25 (м, 4H), 2,72-2,57 (м, 1H), 2,51 (с, 3H), 2,29-2,11 (м, 2H), 2,05-1,72 (м, 6H), 1,27 (т, J=7,6 Гц, 3H),

598		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93-6,72 (м, 3H), 6,55 (с, 1H), 4,71 (с, 1H), 4,01 (с, 1H), 3,92-3,76 (м, 4H), 3,34-3,18 (м, 4H), 2,98 (с, 6H), 2,07 (д, J=24,1 Гц, 2H), 1,87 (д, J=9,2 Гц, 6H),
600		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,62 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,00-6,85 (м, 2H), 5,44 (д, J=8,5 Гц, 1H), 4,78 (с, 1H), 3,93 (т, J=4,8 Гц, 4H), 3,35 (т, J=4,9 Гц, 4H), 3,06-2,91 (м, 1H), 2,15 (д, J=26,6 Гц, 2H), 1,89 (с, 6H), 1,30-0,94 (м, 4H),
601		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,06 (д, J=9,1 Гц, 1H), 6,98-6,86 (м, 2H), 6,58 (д, J=9,1 Гц, 1H), 4,81 (дк, J=5,5, 2,7 Гц, 1H), 4,52 (с, 1H), 4,17 (д, J=5,0 Гц, 1H), 4,01-3,87 (м, 4H), 3,67 (дк, J=8,9, 8,1 Гц, 1H), 3,43-3,30 (м, 4H), 2,47-2,29 (м, 4H), 2,22 (дт, J=11,9, 5,5 Гц, 2H), 2,05-1,82 (м, 6H),

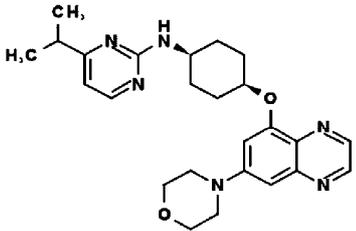
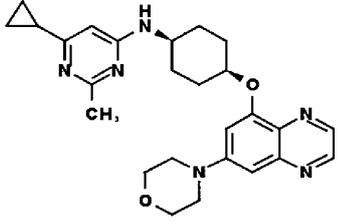
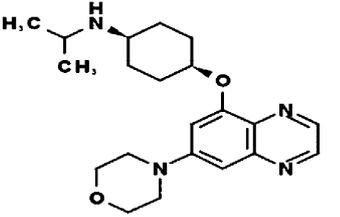
602		464,1 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,04-6,92 (м, 2H), 4,82 (д, J=3,0 Гц, 1H), 3,93 (дд, J=5,9, 3,8 Гц, 4H), 3,65 (д, J=8,7 Гц, 1H), 3,44-3,29 (м, 4H), 3,08 (с, 6H), 2,39 (с, 3H), 2,21 (д, J=14,4 Гц, 2H), 1,92 (дт, J=17,0, 10,7 Гц, 6H),
603		450,1 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,02-6,86 (м, 2H), 4,81 (с, 2H), 4,00-3,76 (м, 5H), 3,42-3,26 (м, 4H), 3,07 (с, 6H), 2,20 (к, J=6,3, 5,8 Гц, 2H), 2,01-1,79 (м, 6H),
604		452,1 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,53 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,87 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,81 (д, J=2,6 Гц, 1H), 4,71 (с, 1H), 3,94-3,72 (м, 7H), 3,25 (дд, J=5,8, 3,8 Гц, 4H), 2,29 (д, J=10,4 Гц, 3H), 2,21-2,02 (м, 2H), 1,93-1,71 (м, 6H),
605		482,3

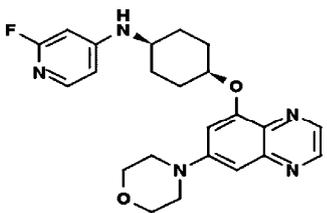
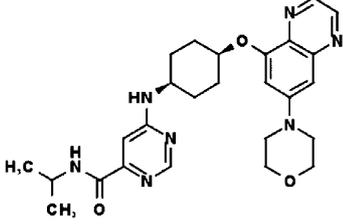
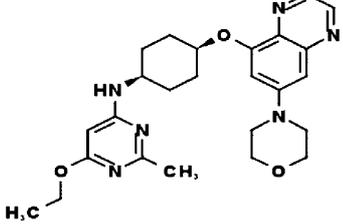
607		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,79 (д, J=2,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=17,8, 2,5 Гц, 2H), 5,19-5,07 (м, 1H), 4,80 (дт, J=6,7, 3,4 Гц, 1H), 4,32 (к, J=7,1 Гц, 3H), 3,98-3,87 (м, 4H), 3,41-3,29 (м, 4H), 2,30-2,13 (м, 2H), 2,03-1,84 (м, 6H), 1,41 (т, J=7,1 Гц, 3H),
608		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,94 (дд, J=18,9, 2,5 Гц, 2H), 5,42 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,22-4,06 (м, 1H), 4,03-3,89 (м, 10H), 3,42-3,22 (м, 4H), 2,19 (м, 2H), 2,01-1,79 (м, 6H),
609		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,72 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,03-6,84 (м, 2H), 5,66 (д, J=9,1 Гц, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,09-3,84 (м, 7H), 3,35 (дд, J=5,5, 3,6 Гц, 4H), 2,20 (с, 2H), 1,91 (д, J=6,4 Гц, 6H),
612		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,83-1,96 (м, 6H), 2,14-2,24 (м, 2H), 3,31-3,35 (м, 4H), 3,44 (с, 3H), 3,69-3,72 (м, 2H), 3,89-3,95 (м, 5H), 4,06-4,09 (м, 2H), 4,74-4,83 (м, 1H), 5,04-5,15 (м, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,94 (д,

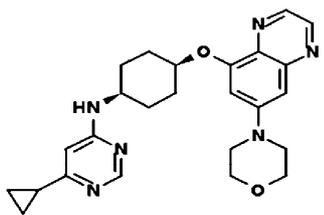
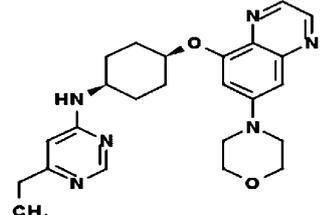
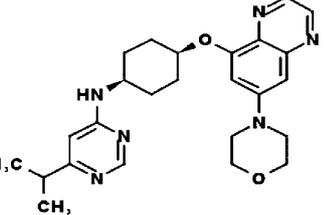
614		424,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,83-1,95 (м, 6H), 2,12-2,26 (м, 2H), 3,30-3,40 (м, 4H), 3,85-3,96 (м, 5H), 4,55-4,68 (м, 1H), 4,74-4,82 (м, 1H), 6,10 (дд, J=7,7, 1,8 Гц, 1H), 6,18 (дд, J=8,0, 1,8 Гц, 1H), 6,90 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6 (с, 1H)
615		436,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,82-2,10 (м, 7H), 2,14-2,29 (м, 2H), 3,26-3,40 (м, 4H), 3,82-4,05 (м, 5H), 4,64 (с, 2H), 4,75-4,84 (м, 1H), 4,85-5,13 (м, 1H), 6,46 (с, 1H), 6,51 (д, J=5,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,94 (д, 1H)
616		465,1 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (дд, J=16,6, 2,5 Гц, 2H), 6,30 (с, 1H), 5,02 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,38 (д, J=0,9 Гц, 2H), 3,99-3,83 (м, 5H), 3,39-3,24 (м, 4H), 2,49 (с, 3H), 2,33-2,11 (м, 2H), 1,91 (к, J=9,0, 6,9 Гц, 6H)

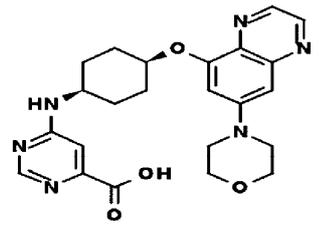
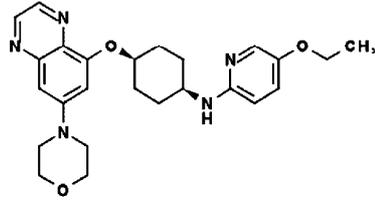
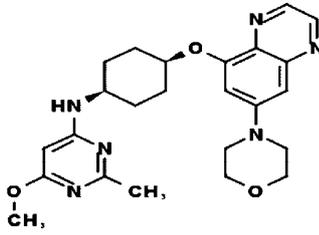
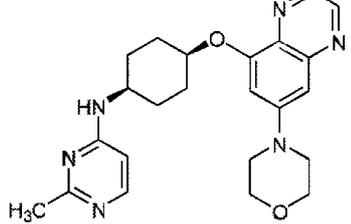
618		463,13 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,55 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,86 (дд, J=16,5, 2,5 Гц, 2H), 5,94 (с, 1H), 4,73 (с, 1H), 3,85 (дд, J=5,9, 3,7 Гц, 4H), 3,35-3,20 (м, 4H), 2,67-2,51 (м, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,09 (д, J=36,8 Гц, 3H), 1,94-1,59 (м, 6H), 0,91 (т, J=7,4 Гц, 3H),
622		424,2 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3): м.д. 1,81-1,98 (м, 6H), 2,13-2,25 (м, 2H), 3,29-3,38 (м, 4H), 3,75-3,85 (м, 1H), 3,88-3,96 (м, 4H), 4,56-4,71 (м, 1H), 4,75-4,83 (м, 1H), 6,36 (дд, J=9,1, 3,3 Гц, 1H), 6,90 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,95 (д, J =
623		420,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3): м.д. 1,80-1,98 (м, 6H), 2,13-2,23 (м, 2H), 2,38 (с, 3H), 3,25-3,37 (м, 4H), 3,62-3,77 (м, 1H), 3,88-3,97 (м, 4H), 4,76-4,83 (м, 1H), 6,23 (д, J=7,9 Гц, 1H), 6,43 (д, J=7,3 Гц, 1H), 6,91 (д, J=2,5 Гц, 1H)
625		480,3 <sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl3): м.д. 1,81-1,95 (м, 6H), 2,11-2,26 (м, 2H), 3,31-3,35 (м, 4H), 3,44 (с, 3H), 3,69-3,73 (м, 2H), 3,76-3,84 (м, 1H), 3,89-3,93 (м, 4H), 4,04-4,08 (м, 2H), 4,44 (шс, 1H), 4,74-4,81 (м, 1H), 6,37 (д, J=8,9

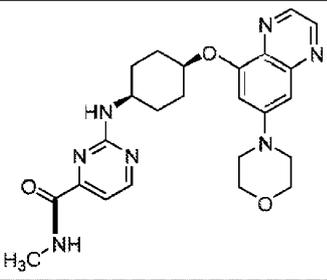
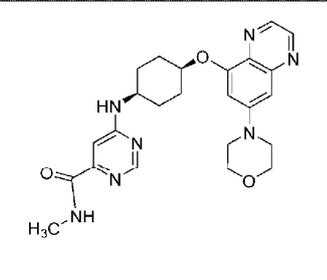
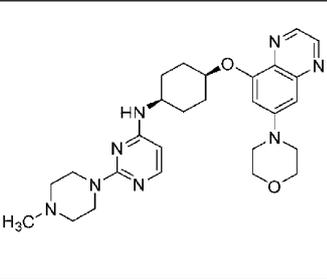
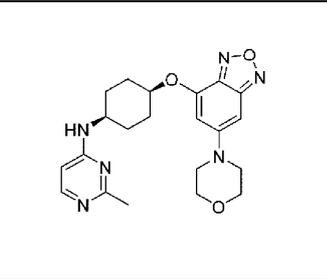
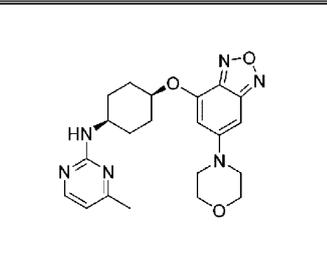
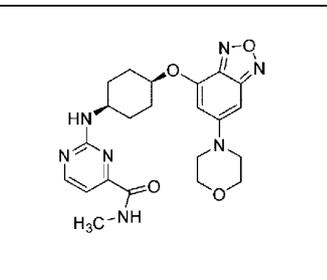
626		504,3	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,81-1,98 (м, 6H), 2,12-2,25 (м, 2H), 2,37-2,48 (м, 3H), 2,58-2,77 (м, 4H), 3,04-3,16 (м, 4H), 3,28-3,37 (м, 4H), 3,77-3,85 (м, 1H), 3,87-3,97 (м, 4H), 4,32-4,51 (м, 1H), 4,73-4,83 (м, 1H), 6,38 (
627		436,3	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,81-2,03 (м, 7H), 2,12-2,28 (м, 2H), 3,28-3,39 (м, 4H), 3,81 (с, 3H), 3,87-3,98 (м, 5H), 4,76-4,84 (м, 1H), 5,87 (д, J=1,5 Гц, 1H), 6,21 (дд, J=5,9, 1,5 Гц, 1H), 6,91 (д, J=1,7 Гц, 1H), 6,95 (д, J=1,7
629		518,4	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,62 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,15-7,93 (м, 1H), 7,40 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,88 (с, 1H), 6,84 (с, 1H), 6,34 (д, J=8,6 Гц, 1H), 4,83-4,56 (м, 2H), 4,40-4,22 (м, 1H), 4,00-3,62 (м, 5H), 3,47-3,04 (м, 7H), 2,24-2,02 (м, 2H), 1,96-1,70 (м, 6H),
630		504,22	<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,68 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,59 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,06 (с, 1H), 7,55 (д, J=8,3 Гц, 1H), 6,94 (д, J=2,3 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,2 Гц, 1H), 6,41 (д, J=8,7 Гц, 1H), 4,88 (дд, J=13,4, 6,7 Гц, 1H), 4,85-4,71 (м, 2H), 3,98-3,85 (м, 5H), 3,39-3,28 (м, 4H), 2,25-2,12 (м, 2H), 1,94-1,82 (м, 6H),
633		435,2	<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,18 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,01-6,88 (м, 2H), 6,42 (д, J=5,1 Гц, 1H), 5,15 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,79 (д, J=5,7 Гц, 1H), 4,17-4,00 (м, 1H), 3,98-3,83 (м, 4H), 3,67 (тд, J=6,7, 4,0 Гц, 1H), 3,42-3,31 (м, 4H), 2,59 (к, J=7,6 Гц, 2H), 2,20 (к, J=6,1 Гц, 2H), 2,03-1,86 (м, 6H), 1,26 (т, J=7,6 Гц, 3H),

634		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,71 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,19 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,01-6,88 (м, 2H), 6,42 (д, J=5,2 Гц, 1H), 5,14 (д, J=7,9 Гц, 1H), 4,80 (дт, J=7,8, 3,8 Гц, 1H), 4,06 (д, J=4,1 Гц, 0H), 3,99-3,85 (м, 4H), 3,46-3,24 (м, 4H), 2,78 (гепт, J=7,0 Гц, 1H), 2,34-2,11 (м, 2H), 2,04-1,81 (м, 7H), 1,25 (д, J=7,0 Гц, 6H),
636		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,63 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,54 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,86 (дд, J=16,2, 2,5 Гц, 2H), 5,85 (с, 1H), 4,75 (д, J=5,5 Гц, 1H), 3,96-3,76 (м, 4H), 3,34-3,19 (м, 4H), 2,41 (с, 3H), 2,13 (д, J=8,5 Гц, 2H), 1,82 (κ, J=10,2, 8,8 Гц, 6H), 1,58-1,33 (м, 3H), 1,03-0,86 (м, 3H),
641		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,73-8,65 (м, 1H), 8,60 (д, J=1,8 Гц, 1H), 6,93 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,89 (д, J=2,3 Гц, 1H), 4,75 (с, 1H), 3,95-3,87 (м, 4H), 3,39-3,28 (м, 4H), 3,05-2,93 (м, 1H), 2,82-2,69 (м, 1H), 2,24-2,08 (м, 2H), 1,80-1,71 (м, 6H), 1,07 (д, J=6,2 Гц, 6H),

642		<sup>1</sup> H-ЯМР (400 МГц, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 7,78 (д, J=5,8 Гц, 1H), 6,96 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,36-6,26 (м, 1H), 5,99 (д, J=1,9 Гц, 1H), 4,79 (д, J=2,4 Гц, 1H), 4,47 (д, J=7,1 Гц, 1H), 3,99-3,85 (м, 4H), 3,56-3,49 (м, 1H), 3,39-3,26 (м, 4H), 2,28-2,16 (м, 2H), 1,98-1,80 (м, 6H),
643		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,57-8,45 (м, 1H), 7,81 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,18 (д, J=1,2 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,8, 2,5 Гц, 2H), 5,48 (с, 1H), 4,83 (дп, J=4,5, 2,4 Гц, 1H), 4,23 (дп, J=8,3, 6,6 Гц, 1H), 4,00-3,85 (м, 4H), 3,42-3,23 (м, 4H), 2,35-2,15 (м, 2H), 1,97-1,76 (м, 6H), 1,26 (д, J=6,6 Гц, 6H),
644		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=17,5, 2,5 Гц, 2H), 5,47 (с, 1H), 4,90 (с, 1H), 4,31 (к, J=7,1 Гц, 2H), 3,92 (дд, J=5,9, 3,7 Гц, 4H), 3,60 (с, 1H), 3,38-3,28 (м, 4H), 2,40 (с, 3H), 2,19 (д, J=9,4 Гц, 2H), 1,97-1,80 (м, 6H), 1,36 (т, J=7,1 Гц, 3H), 4,83-4,76 (м, 1H),

650		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,62 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,47-8,36 (м, 1H), 6,96 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,90 (д, J=2,5 Гц, 1H), 6,18 (д, J=1,2 Гц, 1H), 4,95-4,73 (м, 2H), 4,04-3,78 (м, 5H), 3,44-3,24 (м, 4H), 2,30-2,12 (м, 2H), 2,03-1,70 (м, 7H), 1,17-0,80 (м, 4H),
651		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,50 (д, J=1,1 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=15,9, 2,5 Гц, 2H), 6,17 (д, J=1,1 Гц, 1H), 4,98 (д, J=8,1 Гц, 1H), 4,86-4,75 (м, 1H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,39-3,29 (м, 4H), 2,61 (к, J=7,6 Гц, 2H), 2,21 (дт, J=11,2, 5,0 Гц, 2H), 2,04-1,82 (м, 6H), 1,25 (т, J=7,6 Гц, 3H),
652		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,70 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,61 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,52 (д, J=1,1 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=16,0, 2,5 Гц, 2H), 6,19-6,12 (м, 1H), 4,91 (д, J=8,0 Гц, 1H), 4,81 (д, J=5,4 Гц, 1H), 4,13-3,77 (м, 5H), 3,40-3,29 (м, 4H), 2,80 (септ, J=6,8 Гц, 1H), 2,27-2,00 (м, 2H), 1,99-1,83 (м, 6H), 1,40-1,12 (м, 6H),

653		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Methanol-d <sub>4</sub> / CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,82-8,68 (м, 2H), 8,61 (д, J=0,8 Гц, 1H), 7,38 (т, J=0,8 Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 5,11-4,99 (м, 1H), 4,47-4,31 (м, 1H), 3,99-3,88 (м, 4H), 3,74-3,58 (м, 4H), 2,37-2,23 (м, 2H), 2,13-1,80 (м, 6H),
658		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, CDCl <sub>3</sub> ): м.д. 1,37 (т, J=7,0 Гц, 3H), 1,84-1,94 (м, 6H), 2,10-2,25 (м, 2H), 3,29-3,38 (м, 4H), 3,75-3,85 (м, 1H), 3,88-3,95 (м, 4H), 3,97 (к, J=7,0 Гц, 2H), 4,22-4,34 (м, 1H), 4,73-4,80 (м, 1H), 6,36 (д, J=9,0 Гц, 1H),
659		<sup>1</sup> H-ЯМР (300 МГц, Хлороформ-d) δ 8,69 (д, J=1,9 Гц, 1H), 8,60 (д, J=1,9 Гц, 1H), 6,92 (дд, J=19,6, 2,5 Гц, 2H), 5,25 (с, 1H), 4,76 (к, J=8,3, 7,2 Гц, 2H), 3,97-3,87 (м, 4H), 3,58-3,28 (м, 8H), 2,40 (с, 3H), 2,24-2,13 (м, 2H), 2,07-1,78 (м, 6H),
660		

661			
662			
663			
664			
665			
666			

#### Биологический анализ соединений согласно изобретению

Пример 11. Анализ ингибирования ДНК-ПК

Соединения подвергали скринингу на их способность ингибировать ДНК-ПК киназу при использовании стандартного радиометрического анализа. Кратко, в этом киназном анализе исследовали перенос концевого  $^{33}\text{P}$ -фосфата в  $^{33}\text{P}$ -АТФ к пептидному субстрату. Анализ проводили в 384-луночных планшетах до конечного объема 50 мкл в лунке, содержащей приблизительно 6 нМ ДНК-ПК, 50 мМ HEPES (pH

7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 0,01% BSA, 1 mM DTT, 10 мкг/мл гидродинамически фрагментированной двухпечечной ДНК (полученной от Sigma), 0,8 мг/мл пептида ДНК-ПК (Glu-Pro-Pro-Leu-Ser-Gln-Glu-Ala-Phe-Ala-Asp-Leu-Trp-Lys-Lys-Lys, полученного от American Peptide) и 100 мкМ АТФ. Таким образом, соединения согласно изобретению растворяли в ДМСО с получением 10 mM исходных стоковых растворов. Затем приготавливали серийные разведения в ДМСО с получением готовых растворов для анализа. Аликвоту 0,75 мкл ДМСО или ингибитора в ДМСО добавляли в каждую лунку с последующим добавлением раствора субстрата АТФ, содержащего <sup>33</sup>P-АТФ (полученный от Perkin Elmer). Реакцию начинали при добавлении пептида ДНК-ПК и дцДНК. Через 45 мин реакцию останавливали 25 мкл 5% фосфорной кислоты. Реакционную смесь переносили в 384-луночные РН планшеты MultiScreen HTS (полученные от Millipore), оставляли для связывания на один час и три раза промывали 1% фосфорной кислотой. После добавления 50 мкл высокоэффективного сцинтиллятора Ultima Gold (полученного от Perkin Elmer), образцы считывали в сцинтилляционном и люминесцентном счетчике для микропланшетов Packard TopCount NXT (Packard BioScience). Значения K<sub>i</sub> вычисляли с помощью макроса Microsoft Excel Solver для аппроксимации данных к кинетической модели для конкурентного ингибирования прочного связывания. Каждое из соединений

18, 23, 24, 27-30, 32-34, 36-42, 44-46, 49-55, 59-61, 63-67, 69, 71, 72, 84, 87, 93, 94, 104, 108, 109, 134, 135, 139, 140, 142-146, 152, 155, 158, 160-162, 164, 187, 189-191, 193-210, 215, 219, 223-227, 233-237, 241-243, 245-247, 254, 256, 257, 260, 263-265, 267-269, 272, 273, 275-277, 282, 283, 285, 286, 287, 291, 295, 297, 298, 308, 309, 312, 314, 315-319, 321, 323, 324, 333-336, 340, 341, 351-354, 366, 369, 373-377, 380, 382, 386-388, 393-397, 399, 401, 402, 404-409, 417-422, 424, 427-430, 436, 438-451, 453-457, 463, 465, 467, 469, 471, 472, 474, 476-478, 481, 482, 485, 486, 489-492, 494, 499, 511, 512, 525, 531-535, 537, 539, 547, 548, 553, 558, 565, 567, 572-577, 579, 582-584, 586-595, 597, 598, 600-605, 607-609, 612, 614-616, 618, 622, 623, 625-627, 629, 630, 633, 634, 636, 642-644, 650-653 и 658-666

имеет K<sub>i</sub> меньше 1,0 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК.

Каждое из соединений

18, 23, 24, 27-30, 32-34, 36-37, 39-41, 44-46, 49-55, 59-61, 63-67, 69, 71, 72, 84, 87, 93, 94, 104, 108, 109, 134, 135, 139, 140, 142-146, 152, 155, 158, 160-162, 164, 187, 189-191, 193-200, 202-210, 215, 219, 223-227, 233-237, 241-243, 245-247, 254, 256, 257, 260, 263-265, 267-269, 272, 273, 275-277, 282, 283, 285, 286, 287, 291, 295, 297, 298, 308, 309, 312, 314, 315-319, 321, 323, 324, 333-336, 340, 341, 351-354, 366, 369, 373-374, 376-377, 380, 382, 386-388, 393-397, 399, 401, 402, 404-409, 417-422, 424, 427-430, 436, 438-451, 453-457, 463, 465, 467, 469, 471, 472, 474, 476-478, 481, 482, 485, 486, 489-492, 494, 499, 511, 512, 531-535, 537, 539, 547, 548, 553, 558, 565, 567, 572-577, 579, 582-584, 586-595, 597, 598, 600-605, 607-609, 612, 614-616, 618, 622, 623, 625-627, 629, 630, 633, 634, 636, 642-644, 650-653 и 658-666

имеет K<sub>i</sub> меньше 0,10 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК. Например, соединения 661, 665 и 666 имеют K<sub>i</sub> 0,001 микромолярного порядка, и соединение 663 имеет K<sub>i</sub> 0,008 микромолярного порядка для ингибирования ДНК-ПК.

### Примеры редактирования генов

Пример 12. Материалы и методы

Методы:

#### Клетки и культура

Бронхиальные эпителиоциты (БЕС) были получены от людей доноров с диагнозом муковисцидоз с генотипом CFTR dF508/dF508.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) были получены из человеческих фибробластов кожи после вирусной трансдукции репрограммирующими факторами Яманаки, Oct4, Sox2, KLF4 и с-Мус. Полученные иПСК могли дифференцироваться в 3 зародышевых слоя и содержали нормальный кариотип с 23 парами хромосом.

Первичные человеческие мобилизованные CD34<sup>+</sup> гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки периферической крови (mPB) были приобретены у

Нemasare или AllCells. Клетки размораживали, промывали и ресуспендировали в полной среде, состоящей из бессывороточной среды CellGro SCGM (CellGenix) и добавки смеси цитокинов (300 нг/мл SCF, 300 нг/мл Flt3L, 100 нг/мл TPO, 60 нг/мл IL-3), при плотности 1-3×10<sup>5</sup> клеток в мл и инкубировали в инкубаторе при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч до электропорации.

Ингибиторы ДНК-ПК:

Соединения ингибиторы ДНК-ПК 661, 663, 665 и 666 использовали в примерах редактирования генов. 10 mM стоковые растворы приготавливали при использовании безводного ДМСО и хранили при -80°C.

## Электропорация:

Используемые синтетические оgPHK были очищены с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) в Synthego и содержали химически модифицированные нуклеотиды (2'-О-метил-3'-фосфоротиоат) в трех концевых положениях на 5' и в 3'-концах. Последовательности оgPHK с модифицированными нуклеотидами подчеркнуты следующим образом:

оgPHK AAVS1:

5'ACCCCACAGUGGGGCCACUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAA  
UAAAGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3'  
(SEQ ID NO: 3).

оgPHK NAV1.7:

5'GGCUGAGCGUCCAUCAACCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAG  
GCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU 3' (SEQ ID  
NO: 4)

mPHK Cas9 была приобретена в TriLink Biotechnologies (L-7206). mPHK Cas9 экспрессирует версию белка Cas9 SF370 Streptococcus pyogenes (CRISPR-ассоциированного белка 9) с сигналами ядерной локализации. mPHK spCas9 также содержит структуру CAP1, полиаденилированный сигнал и модифицированные уридины для получения оптимальных уровней экспрессии в клетках млекопитающих.

Донорные оцОДН были приобретены в IDT. оцОДН содержат 10-нуклеотидную инсерционную последовательность для измерения событий HDR с помощью анализа TIDE, фланкированную 40 нуклеотидами плечей гомологии. оцОДН содержат в общей сложности 90 нуклеотидов и фосфоротиоат-модифицированные нуклеотиды в трех концевых положениях на 5' и 3'-концах. Последовательности донорных оцОДН с подчеркнутыми фосфоротиоат-модифицированными нуклеотидами показаны следующим образом:

AAVS1 PAM:

5'GGGTACTTTTATCTGTCCCTCCACCCACAGTGGGGCCAGAATTCTCAGCTAGGG  
ACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCATCCTTAGG3' (SEQ ID NO: 5)

AAVS1 без PAM:

5'CCTAAGGATGGGGCTTTTCTGTCAACCAATCCTGTCCCTAGCTGAGAATTCTGGCCC  
CACTGTGGGGTGGAGGGGACAGATAAAAGTACCC3' (SEQ ID NO: 6)

NAV1.7 PAM:

5'AGCTGTCCATTGGGGAGCATGAGGGCTGAGCGTCCATCAACTGAGAATTCACAGG  
GAGACCACACCGTTGCAGTCCACAGCACTGTGCAT3' (SEQ ID NO: 7)

NAV1.7 без PAM:

5'ATGCACAGTGCTGTGGACTGCAACGGTGTGGTCTCCCTGGGAATTCTCAGTTGATG  
GACGCTCAGCCCTCATGCTCCCAATGGACAGCT3' (SEQ ID NO: 8)

Все электропорации выполняли на Системе Lonza 4D-Nucleofector™.

Для клеток ВЕС использовали следующие условия электропорации:  $1,8 \times 10^5$  клеток, 250 нг mPHK CAS9, 500 нг оgPHK и 0,66 гм оцОДН в 20 мкл буфера для электропорации P4 с использованием программы CM-138. Электропорированные клетки переносили в 96-луночный планшет, содержащий 100 мкл среды для культивирования ВЕС с добавкой ингибиторов ДНК-ПК, или оставляли без обработки. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>.

Для iPСК использовали следующие условия:  $2,0 \times 10^5$  клеток, 250 нг mPHK CAS9, 500 нг оgPHK и 0,66 гм оцОДН в 20 мкл буфера для электропорации P3 с использованием программы CA-137. Электропорированные клетки переносили в 96-луночный планшет, содержащий 100 мкл среды mTEsR1 (Stem Cell Technologies) с добавкой 10 мкл ингибитора ROCK Y-27632 (Stem Cell Technologies), с или без ингибиторов ДНК-ПК, и затем инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>.

CD34<sup>+</sup> клетки электропорировали через два дня после размораживания. Для электропорации использовали следующие условия:  $2,0 \times 10^6$  клеток, 15 мкг белка Cas9 (Feldan), 15 мкг оgPHK, 1 мкМ оцОДН в 100 мкл буфера для электропорации P3 с использованием программы CA-137. Электропорированные клетки переносили путем их равного деления в восемь лунок 24-луночного планшета, каждая лунка которого содержала различные концентрации ингибиторов ДНК-ПК. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе 5% CO<sub>2</sub> в течение двух дней и оценивали на жизнеспособность клеток и редактирование генов.

Липид-опосредованная трансфекция клеток:

За день до трансфекции, клетки ВЕС сеяли в 96-луночный планшет при плотности клеток  $1 \times E4$  клеток в лунке в среде для культивирования ВЕС. Сначала 0,15 мкл MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA 003) разводили в 5 мкл Opti-MEM и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. В это время 80 нг мРНК Cas9 (Trilink, L-7206), 20 нг оРНК (Synthego) и 1 пикомоль оцОДН добавляли к 5 мкл Opti-MEM и 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 среды для культивирования с ингибиторами ДНК-ПК или без них. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>.

Измерение уровня выживаемости клеток:

Клетки инкубировали с 5 мкг/мл Hoechst 33342 (Life technologies: H3570) и 0,5 мкг/мл йодистого пропидия (PI; Life technologies: P3566) в средах для культивирования в течение 1 ч при 37°C. Клетки визуализировали для измерения Hoechst положительных событий (живых и мертвых клеток) и PI положительных событий (мертвых клеток) при использовании системы High-Content Imaging System (Molecular devices). Относительную выживаемость клеток вычисляли следующим образом: [(Hoescht+события - PI+события) в образце]/[(Hoescht+события - PI+события) в контроле]×100. В качестве контроля использовали ложно трансфиницированные клетки, и выживаемость которых условно приравнивали к 100%.

Выживаемость CD34<sup>+</sup> HSPC клеток измеряли при использовании реагента Cell Titer Glo (CTG) (Promega). 100 мкл суспензии клеток смешивали со 100 мкл полного реагента CTG. Хемилюминесцентный сигнал измеряли с помощью люминометра и % жизнеспособных клеток вычисляли в сравнении с контрольными клетками (клетками, не обработанными ингибиторами ДНК-ПК).

Измерение процента редактирования генов:

Геномную ДНК выделяли путем инкубирования клеток с 50 мкл раствора DNA Quickextract (Epicentre) на лунку 96-луночного планшета в течение 30 мин при 37°C. Клеточный экстракт смешивали и переносили в планшет для ПЦР, а затем инкубировали в течение 6 мин при 65°C и 2 мин при 98°C. Реакции ПЦР проводили с 1 мкл содержащего геномную ДНК раствора при использовании ДНК-полимеразы AccuPrime™ Pfx (ThermoFisher, 12344024). Условия ПЦР были следующими: 4 мин при 94°C (1×), затем 15 с при 94°C, 15 с при 60°C и 1 мин при 60°C (40×). Продукты ПЦР очищали и затем секвенировали по Сэнгеру в GENEWIZ. Для ПЦР использовали следующие пары праймеров, охватывающие сайт-мишень (FW, прямой; RV, обратный). Праймеры, используемые для секвенирования по Сэнгеру, отмечены звездочкой (\*):

AAVS1\_FW: 5' GGACAACCCCAAGTACCCC 3' (SEQ ID NO: 9)

AAVS1\_RV\*: 5' aggatcagtgaaacgacca 3' (SEQ ID NO: 10).

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

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

Хроматограмму каждой последовательности анализировали с использованием программы TIDE (от англ. Tracking of Indels by Decomposition -Определение положения инделов при расщеплении) (<http://tide.nki.nl>) (см. также Brinkman et al., Nucleic Acids Research, Volume 42, Issue 22, 16 December 2014, Pages e168). Образцы с ложной электропорацией использовали в качестве референсной последовательности, при этом параметры устанавливали на индел размером 30 нт, а окно расщепления устанавливали так, чтобы оно охватывало максимально возможное окно с сигналами высокого качества. Общий процент инделов (вставок и делеций) получали непосредственно из кривых TIDE. Частоты HDR соответствовали проценту событий с вставкой 10 нуклеотидов. Частоты NHEJ вычисляли как общий процент инделов - процент HDR. Программу GraphPad Prism 7 использовали для построения графиков и вычисления всей статистической информации.

Пример 13. Ингибиторы ДНК-ПК повышают частоту HDR редактирования генов в клетках ВЕС

На фиг. 1 представлен дизайн систем редактирования генов, используемых в примерах ниже. Для исследования влияния ингибиторов ДНК-ПК на частоту HDR редактирования генов, клетки ВЕС подвергали электропорации с мРНК spCAS9, оРНК NAV1.7 и оцОДН NAV1.7 без PAM и затем инкубировали с разными концентрациями соединения 665 или оставляли без обработки (контроль). Частоту редактирования генов определяли с помощью анализа TIDE через 72 ч после электропорации. Частоту редактирования генов выражали в процентах и относили к HDR и NHEJ. Показатели выживаемости клеток указаны в процентах, где контрольные клетки были приняты за 100%.

Как показано на фиг. 2, ингибитор ДНК-ПК, соединение 665, повышает процент редактирования генов в ВЕС. Для соединения 665 NHEJ IC<sub>50</sub> составила 0,4163 мкМ, HDR EC<sub>50</sub> составила 0,4834 мкМ, и макс. % HDR составил 76,03.

Пример 14: Ингибиторы ДНК-ПК повышают процент HDR редактирования генов в CD34<sup>+</sup> клетках  
Для исследования влияния ингибиторов ДНК-ПК на частоту HDR редактирования генов, mPB CD34<sup>+</sup> клетки подвергали электропорации с RNP (белок spCAS9+оРНК NAV1.7) и оцОДН NAV1.7 без PAM. Затем клетки инкубировали с разными концентрациями соединения 665. Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE через 48 ч после электропорации. Частоту редактирования

генов выражали в процентах и относили к HDR и NHEJ, как показано на фиг. 3А (Донор В) и фиг. 3В (Донор С). Показатели выживаемости клеток указаны в процентах, где контрольные клетки были приняты за 100%.

Как показано на фиг. 3А и 3В, ингибитор ДНК-ПК, соединение 665, повышает частоту редактирования генов в CD34<sup>+</sup> клетках. Значения EC<sub>50</sub> HDR и образования инделов для Донора В составляли 0,28 мкМ и 0,36 мкМ, соответственно.

Пример 15: Ингибиторы ДНК-ПК повышают процент HDR редактирования генов в иПСК

Для исследования влияния ингибиторов ДНК-ПК на частоту HDR редактирования генов, иПСК подвергали электропорации с мРНК spCAS9, огРНК AAVS1 и оцОДН AAVS1 PAM, а затем инкубировали с разными концентрациями Соединения 665 или оставляли без обработки (Контроль). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE через 72 ч после электропорации. Частоту редактирования генов выражали в процентах и относили к HDR и NHEJ. Показатели выживаемости клеток показаны в процентах, где контрольные клетки были приняты за 100%.

Как показано на фиг. 4, ингибитор ДНК-ПК, соединение 665, повышает частоту редактирования генов в иПСК. Для соединения 665 NHEJ IC<sub>50</sub> составляла 1,274 мкМ, HDR EC<sub>50</sub> составляла 0,9337 мкМ, и макс. % HDR составил 26,27.

Пример 16: Определение кинетики редактирования генов при EC<sub>max</sub>

Для исследования кинетику редактирования генов при EC<sub>max</sub>, клетки ВЕС подвергали электропорации с мРНК spCAS9, огРНК AAVS1 и оцОДН AAVS1 PAM и затем инкубировали в разное время с 10 мкМ Соединения 665 или оставляли без обработки (Контроль). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE и выражали в процентах HDR и NHEJ. 10 мкМ является концентрацией максимального повышения (EC<sub>max</sub>) для соединения 665.

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

Пример 17: Определение кинетики редактирования генов при EC<sub>50</sub>

Клетки ВЕС подвергали электропорации с мРНК spCAS9, огРНК AAVS1 и оцОДН AAVS1 PAM и затем инкубировали в разное время с 0,7 мкМ соединения 665 или оставляли без обработки (Контроль). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE и выражали в процентах HDR и NHEJ. 0,7 мкМ является концентрацией 50 повышения (EC<sub>50</sub>) для соединения 665. На фиг. 6 показана динамика ингибирования ДНК-ПК при HDR и NHEJ в клетках ВЕС.

Пример 18. Ингибиторы ДНК-ПК повышают частоту HDR при доставке компонентов редактирования генов путем липид-опосредованной трансфекции в клетках ВЕС

Для исследования влияния липид-опосредованной трансфекции, клетки ВЕС трансфицировали мРНК spCAS9, огРНК AAVS1 и оцОДН AAVS1 PAM и затем инкубировали с разными концентрациями соединения 665 или оставляли без обработки (Контроль). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE через 72 ч после трансфекции. На фиг. 7 показано повышение показателей эффективности HDR при увеличении концентраций соединения 665, доставляемого путем липид-опосредованной трансфекции.

Сводная таблица. Ингибитор ДНК-ПК соединения 665 улучшает HDR-направленное редактирование генов

Соединение 665:

	AAVS1	NaV1.7
Клетки	<u>HDR EC50 (мкМ) и макс. %</u>	
ВЕС	0,70 мкМ	0,48 мкМ
	72%	76%
иПСК	0,93 мкМ	N.D.
	26%	N.D.
CD34 <sup>+</sup>		
Донор А	0,38 мкМ	0,29 мкМ
	84%	81%
Донор В	N.D.	0,28 мкМ
	N.D.	86%
Донор С	0,32 мкМ	0,34 мкМ
	92%	68%

Пример 19.

мРВ CD34<sup>+</sup> клетки подвергали электропорации с RNP (белок spCAS9+огРНК NAV1.7) и оцОДН NAV1.7 без PAM. Затем клетки инкубировали с разными концентрациями соединений 661, 663 и 666.

Эксперименты проводили, как описано в методах выше, за исключением того, что использовали более низкие концентрации  $\alpha$ PHK (5 мкг) и  $\alpha$ ОДН (0,2 мкМ). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE через 48 ч после электропорации. Частоту редактирования генов выражали в процентах и относили к HDR и NHEJ. Результаты для каждого соединения, протестированного на двух отдельных донорах, показаны ниже.

Соединение 661

Соединение 661								
Конц. Соединения (мкМ)	Донор А				Донор D			
	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность
10,00	28	47	18,9	6	13,4	64,2	11,1	11
3,33	32,2	57,8	5,1	47	11,5	76,7	6,4	75
1,11	31,7	59,4	4,2	60	10,8	77,5	6	62
0	11,9	77,4	3,3	100	3,2	76,2	7,5	100

Соединение 663

Соединение 663								
Конц. Соединения (мкМ)	Донор А				Донор D			
	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность
10,00	24,3	46,5	24,1	10	13,9	76,2	1	12
3,33				37	11,3	81,8	1,9	64
1,11	35,7	55,3	4,4	65	8,5	81,3	5,4	83
0	11,9	77,4	3,3	100	3,2	76,2	7,5	100

Соединение 666

Соединение 666								
Конц. Соединения (мкМ)	Донор А				Донор D			
	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность	%HDR	% Индело в	% WT	Жизне-способность
10,00	33,6	52	9,7	36	13,7	69	11,8	34
3,33	32,4	56,5	5,8	42	14,3	73,8	5,3	69
1,11	31,5	58,8	3,5	65	11	77,5	6,2	76
0	11,9	77,4	3,3	100	3,2	76,2	7,5	100

Сводная таблица для соединений 661, 663, 666

	Конц. (мкМ)	Донор А		Донор D	
		%HDR	% NHEJ	%HDR	% NHEJ
Соединение 666	0	11,9	77,4	3,2	76,2
	0,37	23,2	67,3	5,5	79,2
	1,11	31,5	58,8	11	77,5
	10	33,6	52	13,7	69
Соединение 661	0	11,9	77,4	3,2	76,2
	0,37	21,8	66,2	6,9	78,1
	1,11	31,7	59,4	10,8	77,5
	10	28	47	13,4	64,2
Соединение 663	0	11,9	77,4	3,2	76,2
	0,37	24,6	64,8	8,9	79,4
	1,11	35,7	55,3	8,5	81,3
	10	24,3	46,5	13,9	76,2

Пример 20. Ингибиторы ДНК-ПК повышают частоту редактирования генов HDR в CD34<sup>+</sup> клетках

Для исследования влияния ингибиторов ДНК-ПК на частоту HDR редактирования генов, клетки CD34<sup>+</sup> подвергали электропорации с  $\alpha$ PHK spCAS9,  $\alpha$ PHK AAVS1 и  $\alpha$ ОДН AAVS1 без PAM и затем инкубировали с разными концентрациями соединений 666, 661, 663 или оставляли без обработки (контроль). Частоту редактирования генов определяли при использовании анализа TIDE через 72 ч после электропорации. Частоту редактирования генов выражали в процентах и относили к HDR и NHEJ. Показаны

затели выживаемости клеток указаны в процентах, где контрольные клетки были приняты за 100%.

Как показано, ингибиторы ДНК-ПК, соединения 666 (фиг. 8), 661 (фиг. 9) и 663 (фиг. 10), повышают частоту HDR в CD34<sup>+</sup> клетках.

Пример 21. Точное HDR редактирование генов, опосредованное AAV донорами, CRISPR-Cas9 и селективными ингибиторами ДНК-ПК.

На фиг. 11 представлена схема анализа редактирования гена, используемого в данном примере.

#### **Клетки**

Прогениторные клетки легкого (LPC) были получены от людей доноров легкого с диагнозом муковисцидоз. LPC доноров ID 14071 и 14335 содержат CFTR генотипы dF508/dF508 и dF508/G542X, соответственно.

#### **Реагенты для CRISPR-Cas9 редактирования генов**

Синтетические гРНК были приобретены в Synthego. гРНК были очищены с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) и содержали химически модифицированные нуклеотиды (2'-О-метил-3'-фосфоротиоат) в трех концевых положениях на 5' и 3'-концах. гРНК содержат спейсерную последовательность длиной 22 нуклеотида, способствующую специфичному связыванию с сайтом-мишенью, и каркасную последовательность длиной 80 нуклеотидов, которая позволяет связываться с белком saCas9. Полные последовательности гРНК приведены в табл. 3.

мРНК saCas9 были синтезированы в TriLink Biotechnologies. мРНК saCas9 экспрессирует Cas9 Staphylococcus aureus (код в Uniprot J7RUA5) с сигналами ядерной локализации SV40 и нуклеоплазмينا. мРНК saCas9 также содержит структуру CAP1 и сигнал полиаденилирования для получения оптимальных уровней экспрессии в клетках млекопитающих. мРНК saCAS9 была очищена с помощью ВЭЖХ.

#### **AAV донорные конструкции и трансдукции AAV**

AAV донорные конструкции содержат последовательности длиной 500 нуклеотидов левого и правого плечей гомологии относительно сайта расщепления гРНК и уникальную вставку распознавания HDR длиной 10 нуклеотидов. Препараты донорного AAV получали при использовании серотипа AAV6, очищенного и оттитрованного в Vector Biolabs. Титрование AAV было представлено в вирусных геномах на мл. Трансдукцию AAV проводили путем добавления вектора AAV6 в клетки в указанном количестве копий векторного генома на клетку в течение 36 ч при 37°C.

#### **Электропорация**

Электропорацию проводили при помощи системы Lonza 4D-Nucleofector™, сопряженной с 96-луночной системой нанесения. 1,8×E5 клеток LPC ресуспендировали в 20 мкл буфера для электропорации P4 Lonza (V4SP-4096). 20 мкл смеси клеток объединяли с 2 мкл смеси реагентов CRISPR-Cas9, содержащей 1 мкг мРНК saCAS9 и 1 мкг гРНК. 20 мкл клеток и смеси CRISPR-Cas9 переносили в одну лунку 96-луночного планшета для электропорации. Клетки электропорировали при использовании программы CM-138. Часть электропорированных клеток LPC переносили в лунку 384-луночного планшета. Клетки трансдуцировали AAV и ингибитором ДНК-ПК или оставляли без обработки (Контроль) в течение 36 ч в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Геномную ДНК выделяли через 72 ч.

#### **Выделение геномной ДНК**

Геномную ДНК выделяли путем инкубирования клеток в течение 30 мин при 37°C с 50 мкл и 15 мкл раствора DNA Quickextract (Episentre) на лунку 96-луночного и 384-луночного планшета, соответственно. Клеточный экстракт смешивали и переносили в 96-луночный планшет для ПНР, а затем инкубировали в течение 6 мин при 65°C и 2 мин при 98°C. Геномную ДНК сразу использовали в последующих применениях или хранили при 4°C.

#### **Измерение процента инделов**

Мастер-микс для ПЦР Phire Green Hot Start II (F126L, Thermo Scientific) использовали для амплификации фрагмента ДНК, соответствующего генам-мишеням. Реакции ПЦР проводили в соответствии с инструкциями производителя. Коротко, 1,25 мкл раствора геномной ДНК объединяли с 23,5 мкл мастер-микса для ПЦР Phire Green Hot Start II и соответствующими генам-мишеням прямым и обратным праймерами (табл. 4). Один из праймеров связывается вне донорной AAV последовательности, чтобы избежать амплификации AAV донора. Реакции ПЦР проводили согласно следующему протоколу термических циклов: 1) 98°C, 30 с; 2) 98°C 5 с; 3) 62°C 5 с; 4) 72°C 20 с и повтор этапов 2-4 30 раз; 5) 72°C 4 мин. Продукты ПЦР очищали ферментативно. Образцы ДНК секвенировали по Сэнгеру при использовании праймеров для секвенирования, как показано в табл. 4. Каждую хроматограмму секвенирования анализировали с использованием программы TIDE в сравнении с референсными последовательностями (описанными выше). Референсные последовательности были получены из ложно электропорированных образцов. Параметры Tide были установлены так, чтобы охватывать спектр инделов ±30 нуклеотидов сайта разреза гРНК, и окно расщепления было установлено так, чтобы охватывать максимально возможное окно с сигналами высокого качества. Общий процент инделов (вставок и делеций) получали непосредственно из кривых TIDE. Программу GraphPad Prism 7 использовали для построения графиков и вычисления всей статистической информации.

Таблица 3. Последовательности огРНК

VEGFA	AUCCCCUCUUUAGCCAGAGCGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUA CUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAG AUUUU (SEQ ID NO: 13)
EMX1	CAACCACAAACCCACGAGGGGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUA CUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAG AUUUU (SEQ ID NO: 14)
FANCF	CAAGGCCCGGCGCACGGUGGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUA CUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAG AUUUU (SEQ ID NO: 15)
RUNX	AAAGAGAGAUGUAGGGCUAGGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUA CUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAG AUUUU (SEQ ID NO: 16)

Примечание: Каждая огРНК содержит уникальную спейсерную последовательность из 22 нуклеотидов (полужирный), после которой расположена одна и та же каркасная последовательность из 80 нуклеотидов.

Таблица 4. Праймеры для ПЦП и секвенирования

<b>VEGF</b>	AGACGTTCCCTTAGTGC	AGGAGGGAGCAGGAA	ATTCCCTCTTAGCCAG
<b>A</b>	TGGC (SEQ ID NO: 17)	AGTGA (SEQ ID NO: 18)	AGC (SEQ ID NO: 19)
<b>EMX1</b>	TGGCTGTCCAGGCACT GCTC (SEQ ID NO: 20)	GGCCTGTCCTCCCTCA AG (SEQ ID NO: 21)	CAACCACAAACCCACGA GGG (SEQ ID NO: 22)
<b>FANCF</b>	ACACGGATAAAGACGC TGGG (SEQ ID NO: 23)	ACACGGATAAAGACGC TGGG (SEQ ID NO: 24)	CAAGGCCCGGCGCACG GTGG (SEQ ID NO: 25)
<b>RUNX1</b>	AACCCAGCATAGTGGT CAGC (SEQ ID NO: 26)	TCTGTGCATGTGCCTGC TAA (SEQ ID NO: 27)	AAAGAGAGATGTAGGG CTAG (SEQ ID NO: 28)

LPC электропорировали с мРНК saCAS9 вместе с набором огРНК и AAV доноров для направленного воздействия на гены группы комплементации F анемии Фанкони (FANCF), Runt-родственного фактора транскрипции 1 (RUNX1), Пустое дыхальце Гомеобокс 1 (EMX1) и фактора роста эндотелия сосудов A (VEGFA). Клетки инкубировали с ингибитором ДНК-ПК, соединением 665 или оставляли без обработки (Контроль). Общую частоту вставок и делеций (инделов) определяли при использовании анализа TIDE через 72 ч после электропорации. Частоту редактирования генов выражали в процентах и относили к HDR (столбцы) и NHEJ (кружки). События HDR представляли собой количество последовательностей свставкой 10 нуклеотидов. Процент NHEJ вычисляли по следующей формуле: NHEJ=общее количество событий инделов -события HDR. Результаты показаны на фиг. 12.

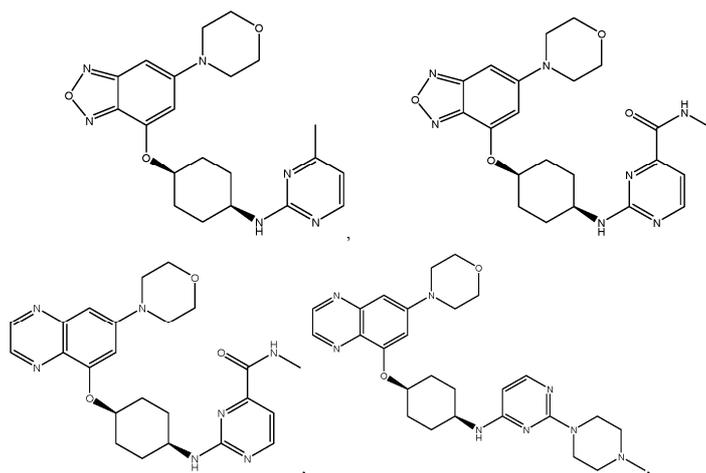
Выводы:

Результаты добавления ингибиторов ДНК-ПК к различным типам клеток и локусам показывают значимое повышение HDR в различных типах клеток и локусах. Улучшение HDR редактирования генов было показано во многих типах клеток, включая ВЕС, iPСК, CD34<sup>+</sup> чПСК (3 отдельных донора). Улучшение редактирования гена HDR было показано в нескольких локусах. Экспериментальные результаты также показали, что доставка с применением липидов и электропорации является эффективной. Примеры электропорации включают ВЕС, iPСК, CD34<sup>+</sup> чПСК и выполнение доставки при использовании системы доставки на основе липидов в ВЕС. Тесную обратную корреляцию между событиями HDR и NHEJ наблюдали в различных локусах, условиях эксперимента и типах клеток.

Хотя вышеизложенное изобретение было описано более подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, специалистам в данной области будет легко понять с учетом принципов настоящего изобретения, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

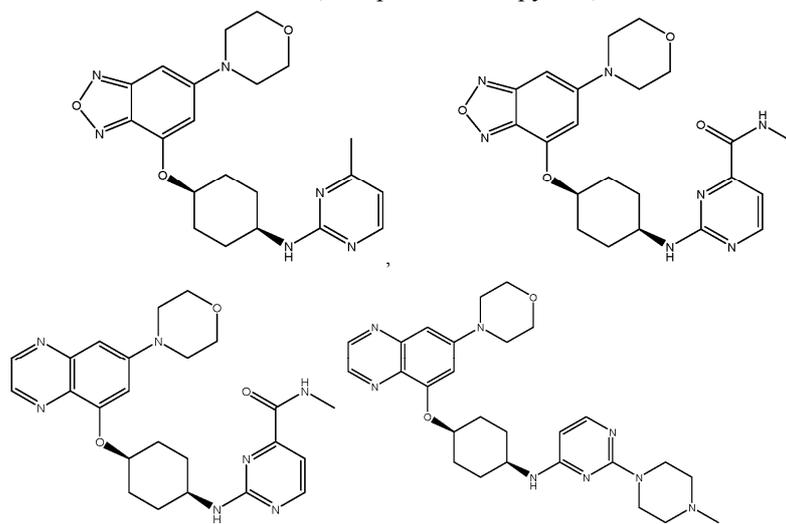
1. Способ репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути направленной гомологией репарации (HDR), включающий  
введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, выбранного из группы, состоящей из



и любой их комбинации, или его фармацевтически приемлемой соли, где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) геномных областей-мишеней, приводя к образованию разрыва ДНК, и где разрыв ДНК восстанавливается, по меньшей мере частично, по пути HDR.

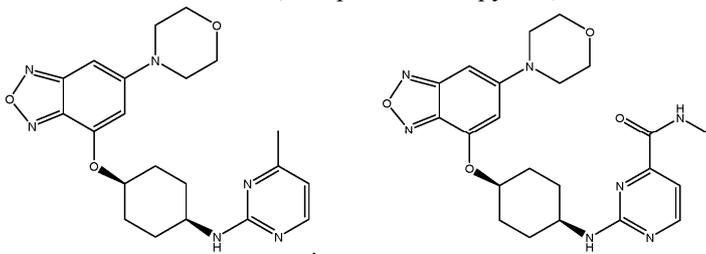
2. Способ ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в одной или более геномных областях-мишенях по пути негомологичного соединения концов (NHEJ), включающий

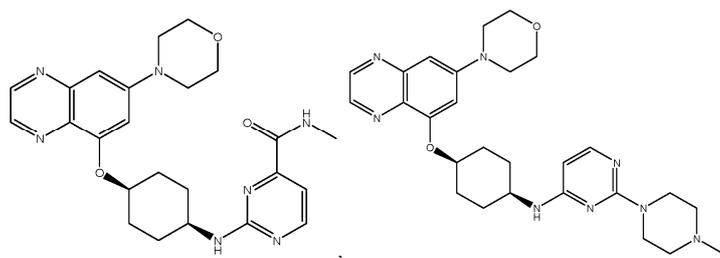
введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, выбранного из группы, состоящей из



и любой их комбинации, или его фармацевтически приемлемой соли, где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней, приводя к разрыву ДНК, и где репарация разрыва ДНК по пути NHEJ ингибирована или подавлена.

3. Способ изменения экспрессии одного или более генов или белков, включающий введение в одну или более клеток, которые включают одну или более геномных областей-мишеней, системы редактирования генома и соединения, выбранного из группы, состоящей из





и любой их комбинации, или его фармацевтически приемлемой соли, где система редактирования генома взаимодействует с нуклеиновой кислотой(ами) одной или более геномных областей-мишеней гена(ов)-мишени(ей), приводя к редактированию одной или более геномных областей-мишеней, и где редактирование изменяет экспрессию нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями).

4. Способ по п.1 или 2, где разрыв ДНК включает двухцепочечный разрыв (ДЦР) ДНК.

5. Способ по п.1, где эффективность редактирования геномных областей-мишеней в одной или более клетках увеличена по сравнению с эффективностью редактирования в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения; или где эффективность репарации разрыва ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути HDR увеличена по сравнению с эффективностью репарации в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

6. Способ по п.2, где эффективность ингибирования или подавления репарации разрыва ДНК в геномных областях-мишенях в одной или более клетках по пути NHEJ увеличена по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения.

7. Способ по п.5 или 6, где:

(i) указанная эффективность увеличена по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз по сравнению с эффективностью в идентичной в других отношениях клетке или клетках, но без соединения; и/или

(ii) указанная эффективность измеряется частотой направленной интеграции полинуклеотида; или

(iii) указанная эффективность измеряется частотой направленного мутагенеза, необязательно где направленный мутагенез включает точечные мутации, делеции и/или вставки.

8. Способ по п.3, где экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), повышена по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клетках до введения, необязательно где указанная экспрессия повышена по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 раз, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению с исходным уровнем экспрессии в одной или более клеток до введения; или

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

9. Способ по п.3, где:

(i) экспрессия нижестоящего гена(ов) и/или белка(ов), связанного с геном(ами)-мишенью(ями), в одной или более клетках по существу устранена.

10. Способ по любому из пп.1-9, где одна или более клеток являются:

(i) культивируемыми клетками; или

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

(iii) клетками *ex vivo* из организма;

необязательно где организмом является млекопитающее или человек.

11. Способ по любому из пп.1-10, где систему редактирования генома и соединение вводят:

(i) одним и тем же путем или

(ii) разными путями, необязательно где систему редактирования генома вводят внутривенно, а соединение вводят перорально.

12. Способ по любому из пп.1-11, где система редактирования генома выбрана из системы на основе мегануклеазы, системы на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системы на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системы на основе CRISPR или системы на основе NgAgo, необязательно где система редактирования генома является системой на основе CRISPR.

13. Способ по п.12, где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf1, необязательно где:

(i) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas и где система CRISPR-Cas содержит:

(a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную

последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (ii) активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas; дополнительно необязательно где:

(a) указанная направляющая РНК и активаторная РНК слиты в виде одной молекулы; или

(b) белок Cas является белком Cas9 II типа, дополнительно необязательно где белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазу или их любые комбинации, или

(ii) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит:

(a) по меньшей мере один элемент гидовой РНК или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую элемент гидовой РНК, где гидовая РНК содержит направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf.

14. Способ по любому из пп.1-13, где систему редактирования генома доставляют одним или более векторами, необязательно где один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК, дополнительно необязательно где вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса.

15. Способ по любому из пп.1-14, где систему редактирования генома доставляют:

(i) синтетической РНК или

(ii) наносоставом.

16. Способ по п.3, где клетка синхронизирована в S или G<sub>2</sub> фазе клеточного цикла.

17. Способ по п.3, где одна или более клеток, которые подвергают введению или контакту с указанным соединением, имеют повышенную выживаемость по сравнению с одной или более клетками, которые не были подвергнуты введению или контакту с указанным соединением.

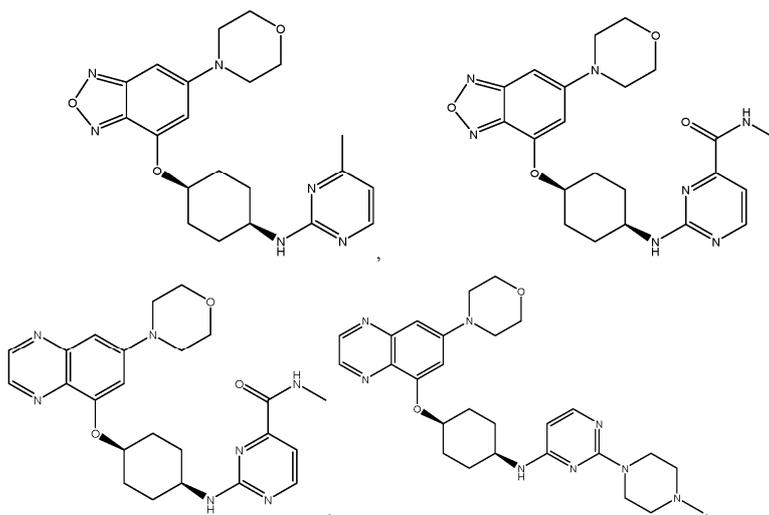
18. Способ по п.3, где систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток одновременно.

19. Способ по п.3, где систему редактирования генома и соединение вводят в одну или более клеток последовательно.

20. Способ по п.3, где систему редактирования генома вводят в одну или более клеток до соединения.

21. Способ по п.3, где соединение вводят в одну или более клеток до системы редактирования генома.

22. Композиция для редактирования одной или более геномных областей-мишеней, содержащая систему редактирования генома и соединение, выбранное из группы, состоящей из



и любой их комбинации, или его фармацевтически приемлемую соль.

23. Композиция по п.22, где система редактирования генома является системой на основе CRISPR, необязательно где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf, необязательно где:

(i) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas и где система CRISPR-Cas содержит:

(a) по меньшей мере один элемент геновой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (ii) активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas, дополнительно необязательно где:

(a) белок Cas является белком Cas9 II типа; или

(b) белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазу или их любую комбинацию; или

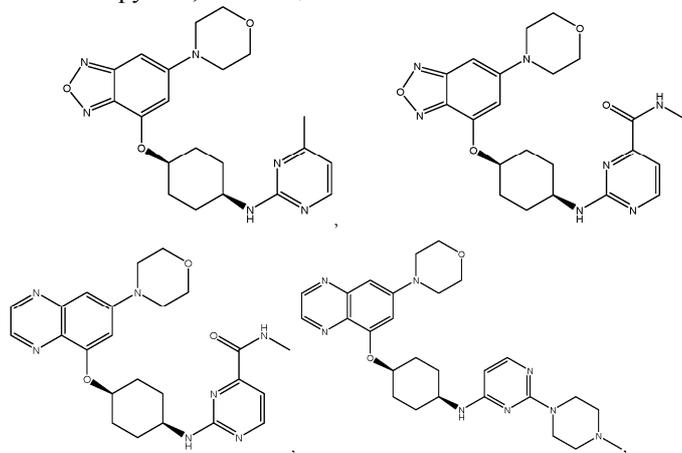
(ii) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит:

(a) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (b) элемент белка Cpf, содержащий белок Cpf, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cpf.

24. Композиция по п.22 или 23, где система редактирования генома включена или упакована в одном или более векторах, необязательно где один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК, дополнительно необязательно где вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса.

25. Композиция по п.22, где система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы, системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системой на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo.

26. Набор для редактирования одной или более геномных областей-мишеней, содержащий систему редактирования генома и соединение, выбранное из группы, состоящей из



и любой их комбинации, или его фармацевтически приемлемую соль.

27. Набор по п.26, где система редактирования генома является системой на основе CRISPR, необязательно где система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas или системой CRISPR-Cpf, необязательно где:

(i) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cas, и где система CRISPR-Cas содержит:

(a) по меньшей мере один элемент геновой РНК, содержащий: (i) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементарную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (ii) активаторную РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая способна гибридизоваться с направляющей РНК, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую активаторную РНК; и (b) элемент белка Cas, содержащий белок Cas или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Cas, дополнительно необязательно где:

(a) белок Cas является белком Cas9 II типа; или

(b) белок Cas9 представляет собой SaCas9, SpCas9, SpCas9n, CAS9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 или D10A никазу или их любую комбинацию; или

(ii) система на основе CRISPR является системой CRISPR-Cpf, и где система CRISPR-Cpf содержит:

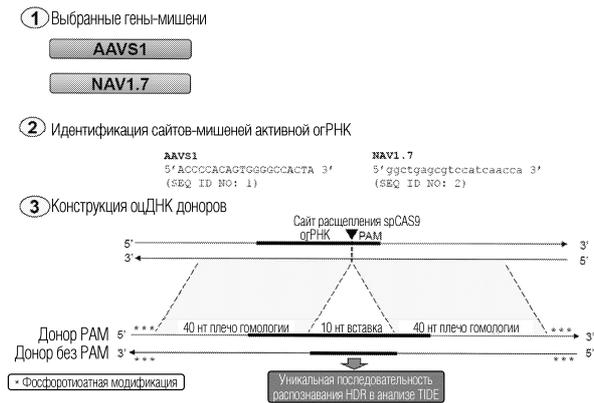
(a) направляющую РНК, содержащую нуклеотидную последовательность, по существу комплементар-

ную нуклеотидной последовательности в одной или более геномных областях-мишенях, или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую направляющую РНК; и (b) элемент белка Crf, содержащий белок Crf или нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность(и), кодирующую белок Crf.

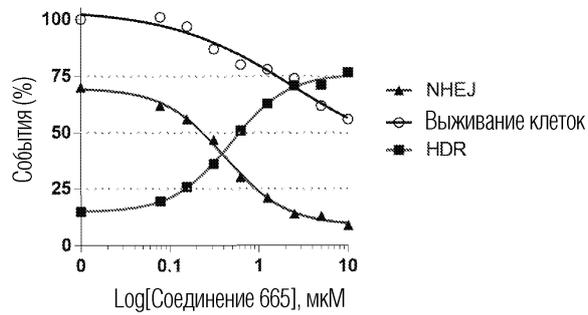
28. Набор по п.26 или 27, где система редактирования генома включена или упакована в одном или более векторах, необязательно где один или более векторов выбраны из вирусных векторов, плазмид или оцДНК, дополнительно необязательно где вирусные векторы выбраны из группы, состоящей из ретровирусных, лентивирусных, аденовирусных векторов, векторов на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса.

29. Набор по п.26, где система редактирования генома является системой на основе мегануклеазы, системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN), системой на основе подобной активаторам транскрипции эффекторной нуклеазы (TALEN), системой на основе CRISPR или системой на основе NgAgo.

Схема анализов редактирования генов

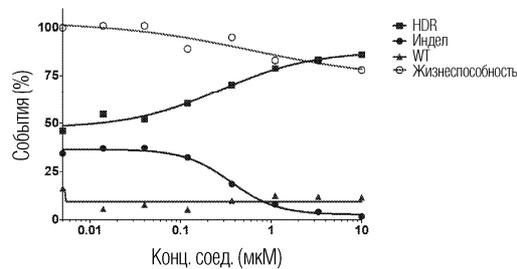


Фиг. 1

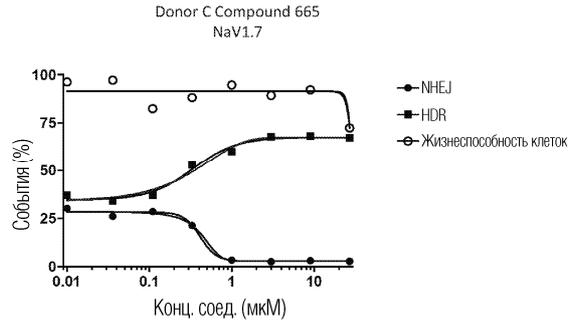


Фиг. 2

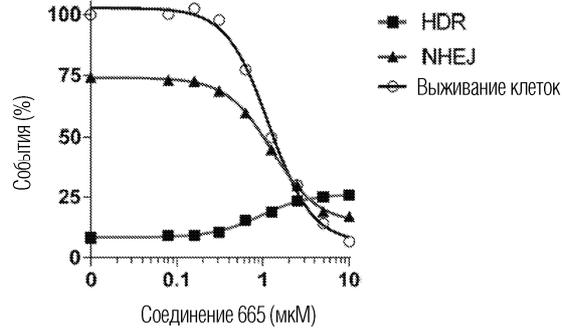
Донор В Соединение 665  
Nav1.7



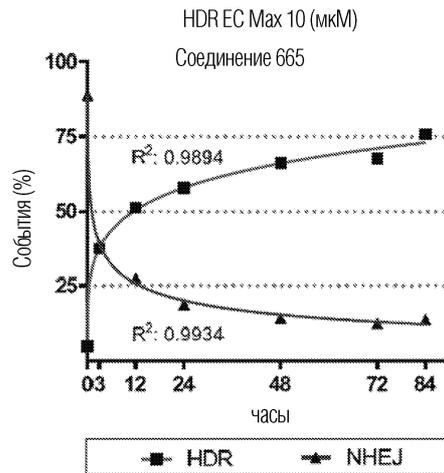
Фиг. 3А



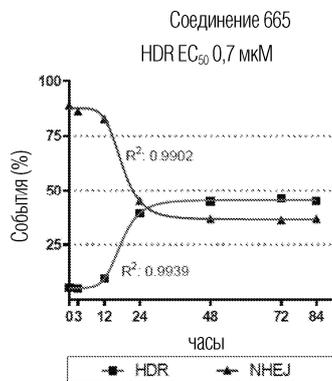
Фиг. 3В



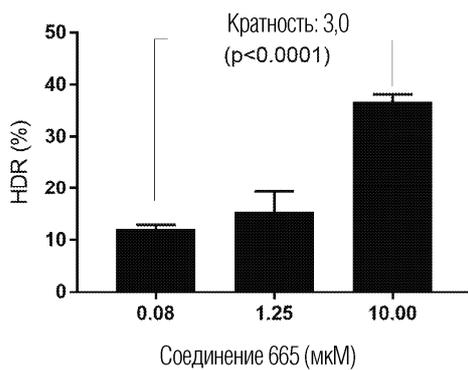
Фиг. 4



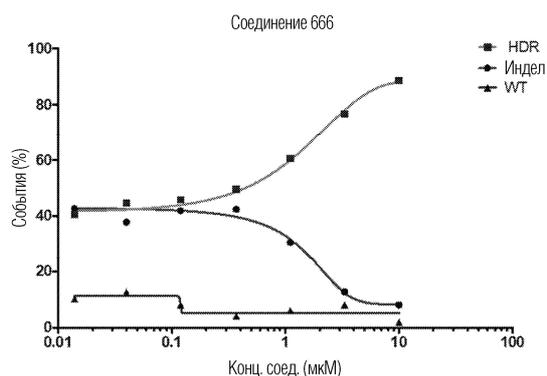
Фиг. 5



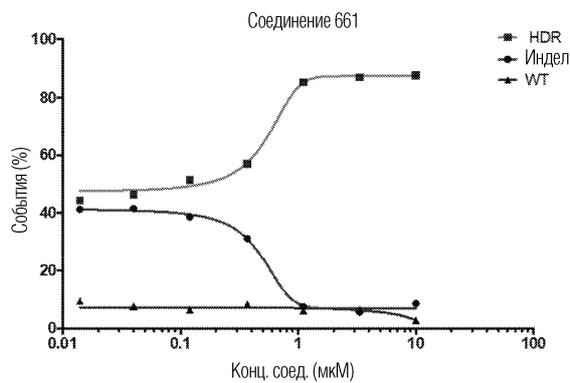
Фиг. 6



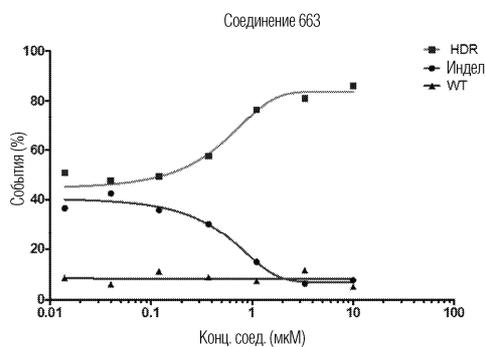
Фиг. 7



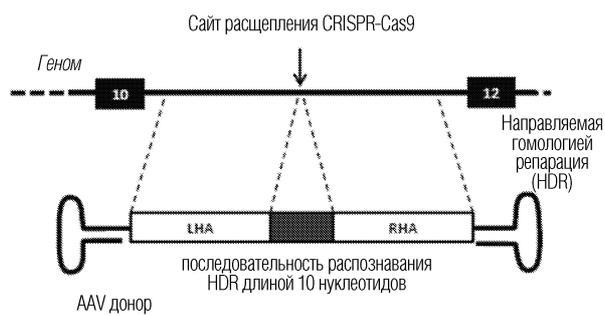
Фиг. 8



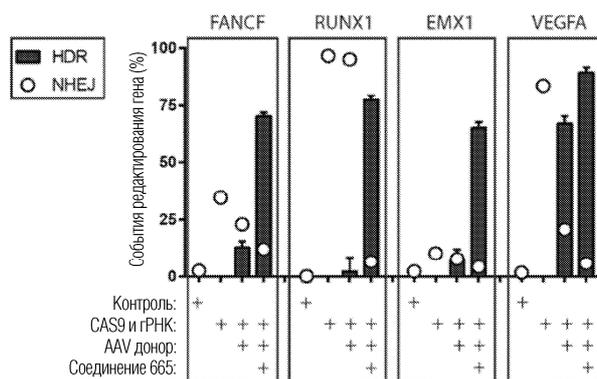
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12