



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111757876 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 22

(21) 申请号 201980015116.3

K · M · 寇特瑞尔 P · S · 查理佛森

(22) 申请日 2019.01.16

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111757876 A

专利代理师 谭玮

(43) 申请公布日 2020.10.09

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07D 403/12 (2006.01)

62/618,339 2018.01.17 US

C07D 401/12 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.08.24

C07D 239/74 (2006.01)

C07D 239/86 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/013788 2019.01.16

C07D 239/88 (2006.01)

C07D 239/94 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/143678 EN 2019.07.25

C07D 417/12 (2006.01)

C07D 491/048 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞

(56) 对比文件

CN 105246883 A, 2016.01.13

审查员 卢梦霞

(72) 发明人 J · P · 麦克斯威尔 K · L · 杰克逊
唐青 M · A · 莫里斯
S · M · 罗恩金 徐金旺

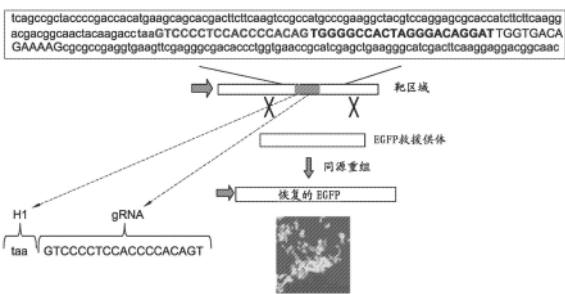
权利要求书7页 说明书183页
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

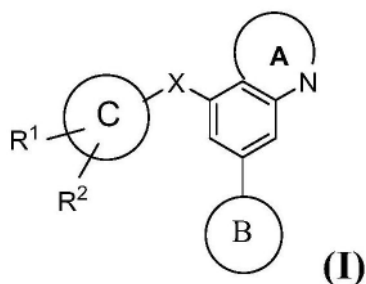
DNA-PK抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及可用作DNA-PK的抑制剂的化合物。本发明还提供了包含所述化合物的药学上可接受的组合物和在各种疾病、病症或障碍的治疗中使用所述组合物的方法。

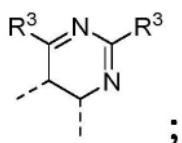


1. 由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐：

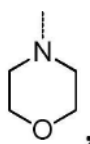


其中

环A是选自以下的芳族环系



环B是选自以下的环系



其中环B任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-OH和C₁₋₄烷基,所

述C₁₋₄烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-OH和-OC₁₋₂烷基的取代基取代;

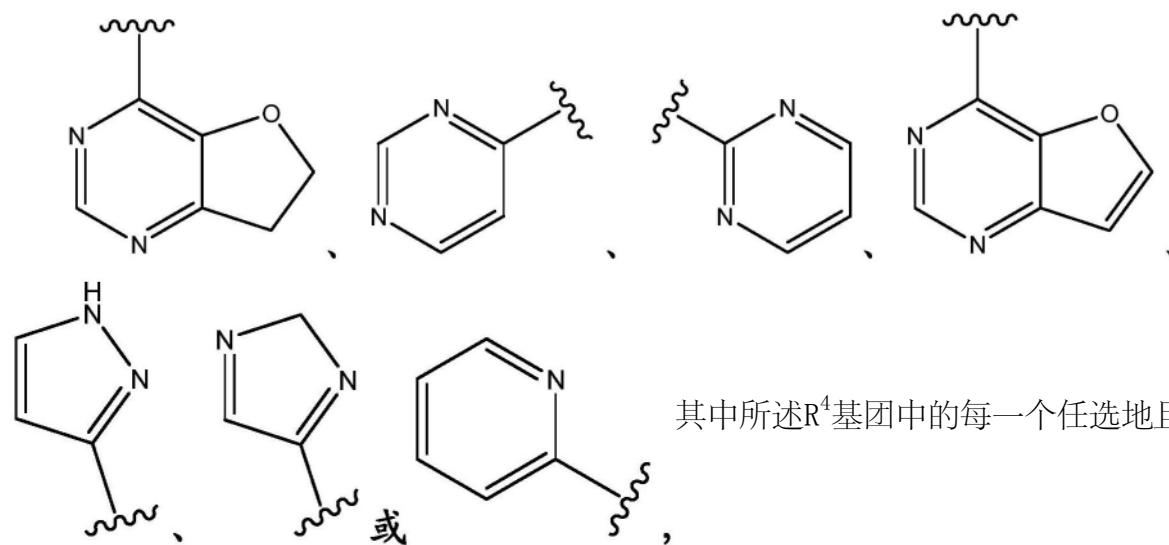
环C是环己基,其中环C任选地被一个或多个取代基进一步取代,所述取代基选自卤素、C₁₋₂烷基、-OH和-OC₁₋₂烷基;

X是-NH-或-O-;

R¹和R²中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴、-C₁₋₄烷基-NHR⁴或-OR⁴,其中R¹和R²不可同时是氢;

每个R³独立地是氢、-C₁₋₄烷基、卤素、-OC₁₋₂烷基、-C(O)OH、-C(O)OC₁₋₂烷基、-CN、-C(O)NHC₁₋₂烷基、-C(O)NH₂、C₃₋₄环烷基或-NRR',其中所述R³烷基和环烷基中的每一个独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、-OH和-OC₁₋₂烷基;

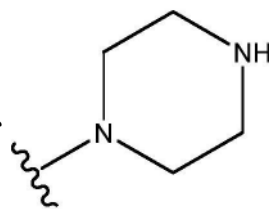
每个R⁴独立地是氢、C₂₋₄烯基、C₂₋₄炔基、C₃₋₁₀环烷基、



其中所述R⁴基团中的每一个任选地且独立

地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、CN、 NO_2 、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 、 $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$ 、 CH_2OR^5 、 $C_{0-4}烷基-C(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-C(O)N(R^5)_2$ 、

$C_{0-4}烷基-C(O)OR^5$ 、 $C_{0-4}烷基-NHC(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-N(R^5)_2$ 、



- $O(C_{1-4}烷基)$

OR^5 、 $-OR^5$ 和氧代,且其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-4} 烷基、-OH、 $-OC_{1-4}烷基$ 、 $-SC_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)C_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)OC_{1-4}烷基$ 和 $-C(O)OC_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基$;和

每个 R^5 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基或苯基,其中每个 R^5 任选地且独立地被一个或多个选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、 $-CH_2OH$ 、-CN、-OH、 $-OC_{1-2}烷基$ 的取代基取代,或2个 R^5 基团与插入氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环;和

R^6 是氢或 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、 $-CH_2OH$ 、-CN、-OH和 $-OC_{1-2}烷基$ 的取代基取代;和

R和 R' 中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,或者R和 R' 与它们所连接的氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^3 独立地是氢、 $-C_{1-4}烷基$ 、卤素、 $-OC_{1-2}烷基$ 、-CN、 $-C_{3-4}环烷基$ 或 $-NRR'$,其中所述 R^3 烷基和环烷基中的每一个独立地是任选取代的。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中

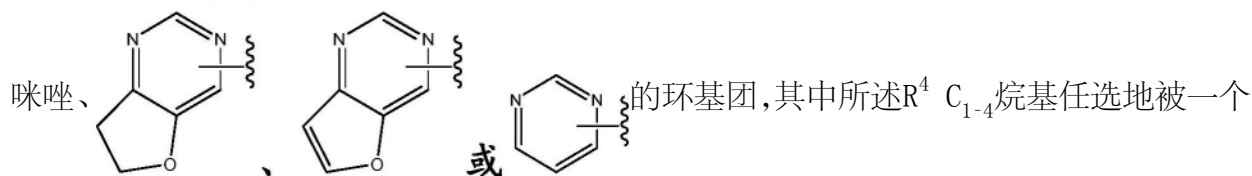
每个 R^4 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自 $C_{1-4}烷基$ 、 $C_{2-4}烯基$ 、 $C_{2-4}炔基$ 或 $C_{3-5}环烷基$ 。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^4 独立地是任选取代的选自咪唑、吡唑、吡啶、嘧啶或呋喃并嘧啶的基团。

5. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^4 独立地是任选取代的选自咪唑、吡唑、嘧啶、呋喃并嘧啶或二氢呋喃并嘧啶的基团。

6. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^4 独立地是氢或任选取代的 $C_{1-4}烷基$ 基团。

7. 根据权利要求1所述的化合物,其中每个 R^4 独立地是 $C_{1-4}烷基$ 或选自 $C_{3-5}环烷基$ 、吡唑、



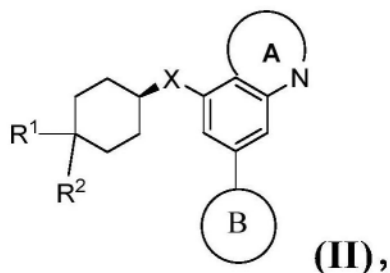
或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F和 $-O(C_{1-4}烷基)$,且其中所述 R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 $C_{1-4}烷基$ 、-CN、 $-O(C_{1-4}烷基)$ 、 $C_{3-6}环烷基$ 、 $C_{0-4}烷基-O-C_{1-4}烷基$ 、 $C(O)NHC_{1-4}烷基$ 、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 和哌嗪,其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、 $C_{1-4}烷基$ 、-OH和 $-OC_{1-4}烷基$ 。

8. 根据权利要求7所述的化合物, 其中所述 R^4 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自-F和-O(C_{1-4} 烷基), 且其中所述 R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自 C_{1-4} 烷基、-O(C_{1-4} 烷基)、 C_{0-4} 烷基-O- C_{1-4} 烷基、C(O)NHC $_{1-4}$ 烷基、C(O)N(C_{1-4} 烷基) $_2$ 和哌嗪, 其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地被一个或多个 C_{1-4} 烷基取代。

9. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 R^1 和 R^2 中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR ^{4} 、-C(O)OR ^{4} 、-NHC(O)R ^{4} 、-NHC(O)OR ^{4} 、-C $_{0-4}$ 烷基-NHR ^{4} 或-OR ^{4} 。

10. 根据权利要求1所述的化合物, 其中X是-O-。

11. 根据权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐, 所述化合物由下式表示:

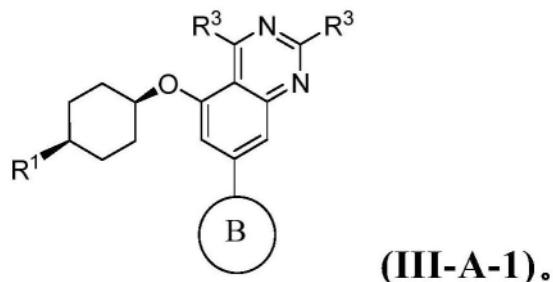


其中

R^1 是-C(O)NHR ^{4} 、-C(O)OR ^{4} 、-NHC(O)R ^{4} 、-NHC(O)OR ^{4} 、-NHC(O)NHR ^{4} 、-NHS(O) $_2$ R ^{4} 、-C $_{0-4}$ 烷基-NHR ^{4} 或-OR ^{4} ; 和

R^2 是氢。

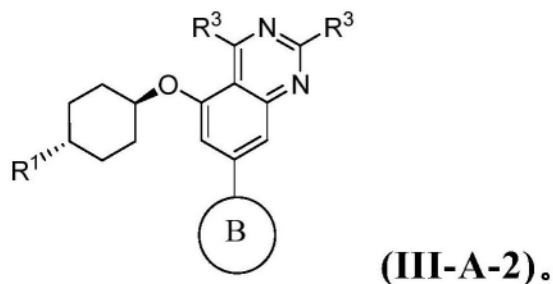
12. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物由下式表示:



13. 根据权利要求12所述的化合物, 其中每个 R^1 独立地是-C(O)NHR ^{4} 、-C(O)OR ^{4} 、-NHC(O)R ^{4} 、-NHC(O)OR ^{4} 、-C $_{1-4}$ 烷基-NHR ^{4} 、-NHR ^{4} 或-OR ^{4} 。

14. 根据权利要求13所述的化合物, 其中 R^1 是-C $_{1-4}$ 烷基-NHR ^{4} 、-NHR ^{4} 或-OR ^{4} 。

15. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物由下式表示:



16. 根据权利要求15所述的化合物, 其中每个 R^1 独立地是-C(O)NHR ^{4} 、-C(O)OR ^{4} 、-NHC(O)R ^{4} 、-NHC(O)OR ^{4} 、-C $_{0-4}$ 烷基-NHR ^{4} 或-OR ^{4} 。

17. 根据权利要求1所述的化合物, 其中

每个 R^3 独立地是氢、甲基、-Cl、-OCH₃、-CN、环丙基、-NHCH₃或-N(CH₃)₂; 和

R^6 是氢或甲基。

18. 化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物选自表1的化合物1、2、3、4、5、6、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、21、22、23、24、25、26、27、28、30、33、36、37、41或42。

19. 药物组合物, 其包含权利要求1-18中的任一项所述的化合物和药学上可接受的赋形剂。

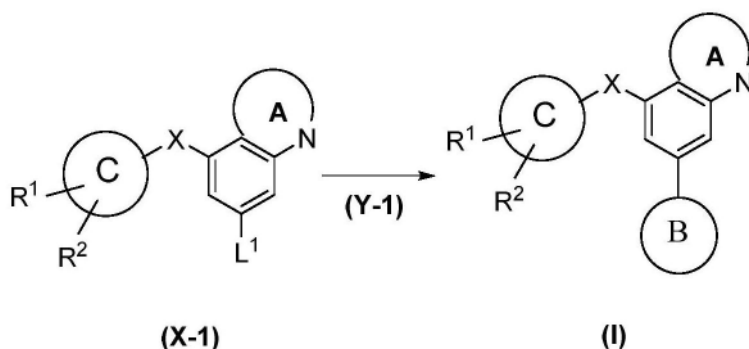
20. 根据权利要求1-18中的任一项所述的化合物或根据权利要求19的药物组合物在制备药物中的用途, 所述药物使细胞对诱导DNA损伤的治疗剂或疾病状态敏感, 包括下述步骤: 使所述细胞接触所述药物。

21. 根据权利要求1-18中的任一项所述的化合物或根据权利要求19的药物组合物在制备药物中的用途, 所述药物增强用于治疗患者中的癌症的治疗方案, 包括下述步骤: 给所述患者施用有效量的所述药物。

22. 根据权利要求1-18中的任一项所述的化合物或根据权利要求19的药物组合物在制备药物中的用途, 所述药物在患者中治疗癌症或抑制癌细胞生长, 包括给所述患者单独地或与一种或多种另外的治疗剂组合地施用有效量的所述药物。

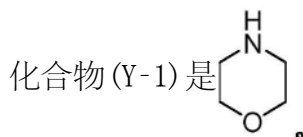
23. 制备权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐的方法, 其中所述方法包括:

使化合物(X-1)与化合物(Y-1)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

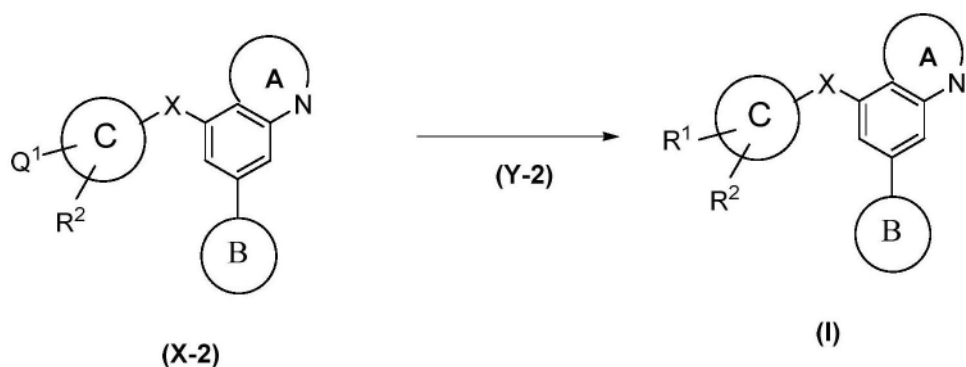
化合物(X-1)的 L^1 是卤素、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯, 且化合物(X-1)的其它变量每个且独立地如在权利要求1中所述; 和



24. 制备权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐的方法,

其中 R^1 是-NHC(O) R^4 、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴或-OR⁴; 和式(I)的其它变量每个且独立地如在权利要求1中所述; 且其中所述方法包括:

使化合物(X-2)与化合物(Y-2)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中

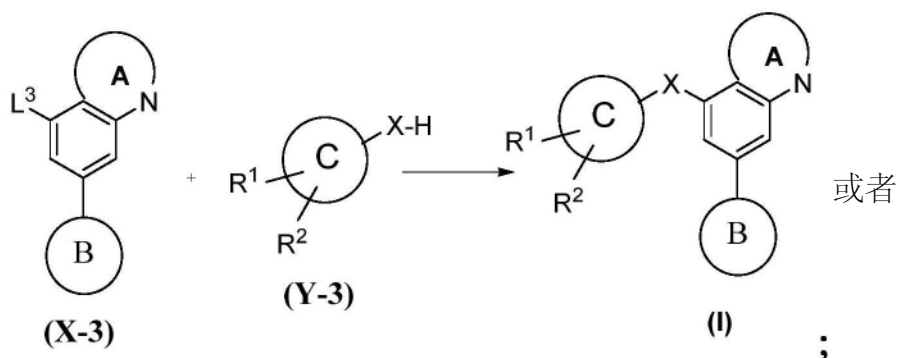
化合物 (X-2) 的 Q^1 是 $-NH_2$ 或 $-OH$, 且化合物 (X-2) 的其它变量每个且独立地如在权利要求 1 中所述; 和

化合物 (Y-2) 是 $R^4-C(O)-L^2$ 、 $R^4-O-C(O)-L^2$ 、 $NHR^4-C(O)-L^2$ 、 $R^4S(O)_2-L^2$ 、 R^4-L^2 、 $R^4C(O)OR^b$ 或 $R^4-N=C=O$, 其中每个 R^4 如在权利要求 1 中所述, L^2 是卤素、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯, 且 R^b 是 C_{1-4} 烷基。

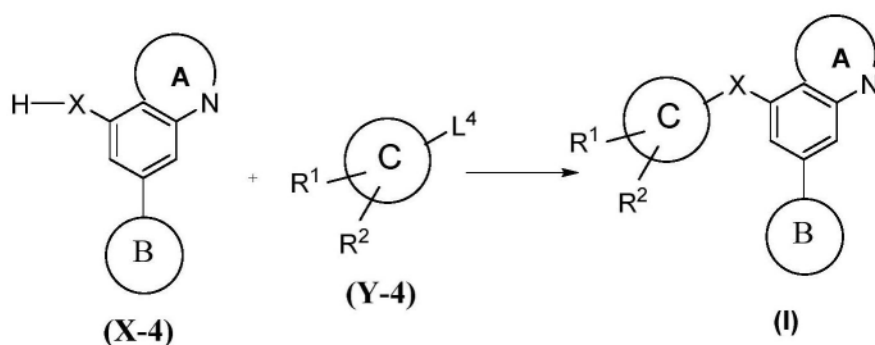
25. 制备权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐的方法,

其中 X 是 $-NH-$ 或 $-O-$, 且式 (I) 的其它变量每个且独立地如在权利要求 1 中所述, 且其中所述方法包括:

(i) 使化合物 (X-3) 与化合物 (Y-3) 反应以形成由式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:



(ii) 使化合物 (X-4) 与化合物 (Y-4) 反应以形成由式 (I) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:

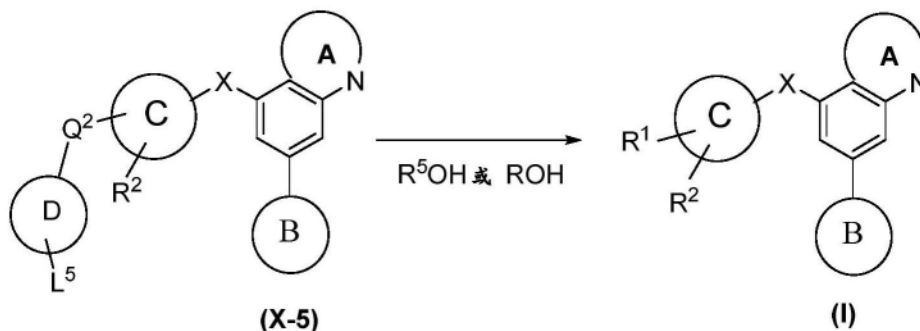


其中 L^3 是卤素; L^4 是卤素、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯, 且其中化合物 (X-3)、(X-4)、(Y-3) 和 (Y-4) 中的每一种的变量每个且独立地如在权利要求 1 中所述。

26. 制备权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐的方法,

其中 R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-NHR^4$ 、 $-C_{1-4}$ 烷基- NHR^4 或 $-OR^4$; R^2 是氢; R^4 中的每一个独立地是被 $-OR^5$ 取代的5-10元杂芳基; R 、 R^5 和式(I)的其它变量每个且独立地如在权利要求1中所述, 前提条件是, R 和 R^5 二者不是氢, 且其中所述方法包括:

使化合物(X-5)与 R^5OH 或 ROH 反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

Q^2 是键、 $-C(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-NHC(O)NH-$ 、 $-NHS(O)_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-C_{1-4}$ 烷基-NH-或 $-O-$,

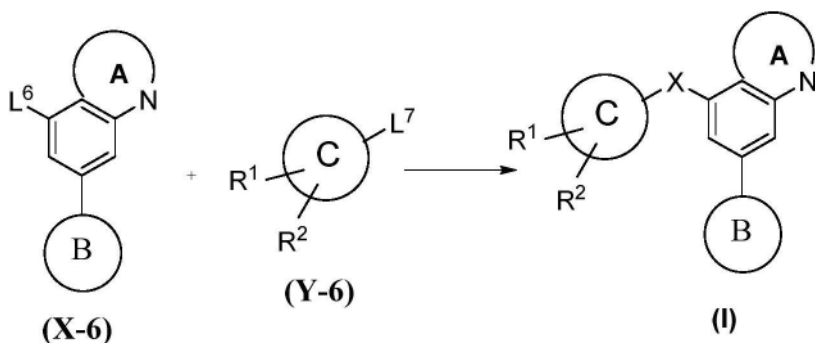
环D是5-10元杂芳基;

L^5 是卤素;和

ROH 的 R 、 R^5OH 的 R^5 和化合物(X-5)的其它变量每个且独立地如在权利要求1中所述, 前提条件是, R 和 R^5 二者不是氢。

27. 制备权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐的方法,

其中 X 是 $-O-$, 且式(I)的其它变量每个且独立地如在权利要求1中所述, 且其中所述方法包括:



其中 L^6 是 $-OH$; L^7 是 $-OH$; 且化合物(X-6)和(Y-6)中的每一种的其余变量每个且独立地如在权利要求1中所述。

28. 基因组编辑系统和权利要求1-18中的任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途, 所述药物编辑一个或多个基因组区域, 包括:

向包含一个或多个基因组区域的一个或多个细胞施用所述药物;

其中所述一个或多个基因组区域被编辑。

29. 基因组编辑系统和权利要求1-18中的任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途, 所述药物经由同源性定向修复(HDR)途径修复一个或多个基因组区

域中的DNA断裂,包括:

向包含一个或多个基因组区域的一个或多个细胞施用所述药物,

其中所述基因组编辑系统与基因组区域的核酸相互作用,导致DNA断裂,且其中所述DNA断裂至少部分地经由HDR途径修复。

30. 基因组编辑系统和权利要求1-18中的任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物抑制或遏制经由非同源末端连接 (NHEJ) 途径对一个或多个基因组区域中的DNA断裂的修复,包括:

向包含一个或多个基因组区域的一个或多个细胞施用所述药物,

其中所述基因组编辑系统与一个或多个基因组区域的核酸相互作用,导致DNA断裂,并且其中经由NHEJ途径的DNA断裂的修复被抑制或遏制。

31. 基因组编辑系统和权利要求1-18中的任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物修饰一个或多个基因或蛋白的表达,包括:

向包含一个或多个基因组区域的一个或多个细胞施用所述药物,

其中所述基因组编辑系统与靶基因的一个或多个基因组区域的核酸相互作用,导致编辑所述一个或多个基因组区域,并且其中所述编辑修饰与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达。

32. 用于编辑一个或多个靶基因组区域的试剂盒或组合物,其包含:

基因组编辑系统;和

权利要求1-18中的任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

DNA-PK抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年1月17日提交的美国临时专利申请号62/618,339的权益,其整个内容特此通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用整体并入。于2019年1月16日创建的ASCII副本命名为14390-688Sequence_listing_ST25.txt且具有5KB大小。

技术领域

[0005] 本发明涉及可用作DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)的抑制剂的化合物。本发明还提供包含本发明化合物的药学上可接受的组合物以及在癌症治疗中使用所述组合物的方法,以及通过向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统来增加基因组编辑效率的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 电离辐射(IR)诱导多种DNA损伤,其中双链断裂(DSB)是最具细胞毒性的。如果未快速和完全修复,这些DSB可经由细胞凋亡和/或有丝分裂突变而导致细胞死亡。除了IR以外,某些化学治疗剂(包括拓扑异构酶II抑制剂、博来霉素和多柔比星)也会引起DSB。这些DNA病变通过DNA损伤响应网络触发一系列复杂的信号,这些信号发挥作用而修复受损的DNA并维持细胞活力和基因组稳定性。在哺乳动物细胞中,DSB的主要修复途径是非同源末端连接途径(Non-Homologous End Joining)(NHEJ)。该途径无论处于细胞周期的哪个阶段均发挥作用,并且不需要模板来重新连接断裂的DNA末端。NHEJ需要许多蛋白和信号传导途径的协作。核心NHEJ机制由Ku70/80异源二聚体和DNA依赖性蛋白激酶的催化亚基(DNA-PKcs或DNA-PK)组成,它们一起构成活性的DNA-PK酶复合物。DNA-PKcs是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的磷脂酰肌醇3-激酶相关激酶(PIKK)家族的一个成员,该家族还包括共济失调毛细血管扩张突变(ATM)激酶、共济失调毛细血管扩张和Rad3相关(ATR)激酶、mTOR和四种PI3K同种型(isoform)。但是,虽然DNA-PKcs属于与ATM和ATR相同的蛋白激酶家族,但后两种激酶通过同源重组(HR)途径发挥用来修复DNA损伤并且局限于细胞周期的S期和G₂期。虽然ATM也被募集到DSB的位点,但ATR被募集到单链DNA断裂的位点。

[0008] 认为NHEJ通过三个关键的步骤开展:识别DSB;进行DNA加工以移除端点(termini)处的不可连接末端或其它损伤形式;以及最后连接DNA末端。DSB的识别如下进行:Ku异源二聚体结合至粗糙的(ragged)DNA末端,然后募集两分子的DNA-PKcs至DSB的相邻侧;这用于保护断裂端点直至募集额外的加工酶。最近的数据支持以下假说:DNA-PKcs使加工酶Artemis以及其自身磷酸化以使DNA末端准备进行另外的加工。在某些情况下,在连接步骤之前可能需要DNA聚合酶来合成新的末端。据信DNA-PKcs的自磷酸化会诱导构象改变,该构象改变使中心DNA结合空穴打开,从DNA释放DNA-PKcs,并促进DNA末端的最终重新连接。

[0009] 一段时间以来已经知道,DNA-PK^{-/-}小鼠对IR的效应高度敏感并且DNA-PKcs的一些非选择性小分子抑制剂可使跨广泛遗传背景集合的多种肿瘤细胞类型放射致敏。虽然预计

DNA-PK的抑制将会使正常细胞在一定程度上放射致敏,但已经观察到这种致敏的程度比对肿瘤细胞的致敏程度低,可能是由于这样的事实:肿瘤细胞具有较高基础水平的内源复制压力和DNA损伤(癌基因诱导的复制压力)并且在肿瘤细胞中的DNA修复机制是更低效的。最重要的是,从DNA-PK抑制剂与精确递送聚焦IR方面的最新进展(包括图像引导的RT (IGRT)和强度调节RT (IMRT))的组合将会赋予改善的治疗窗,更好地免除对正常组织的影响。

[0010] DNA-PK活性的抑制在周期和非周期细胞二者中引起效应。这是极其重要的,因为实体瘤中的大部分细胞在任何给定的时刻是不活跃复制的,这限制了许多靶向细胞周期的药剂的效力。同样令人感兴趣的是最近的报道,该报道表明NHEJ途径的抑制与杀死传统上抗放射性的癌症干细胞(CSC)的能力之间存在强联系。已在一些肿瘤细胞中证实,休眠CSC中的DSB主要通过NHEJ途径激活DNA修复;据信CSC通常处于细胞周期的静止期。这可解释为什么尽管进行了治疗但一半的癌症患者可能会经历局部或远处的肿瘤复发,因为目前的策略不能够有效地靶向CSC。DNA-PK抑制剂可能具有增加这些潜在的转移性祖细胞对IR效应的敏感性以及选择DSB诱导性化学治疗剂的能力。

[0011] 鉴于DNA-PK在DNA修复过程中的参与,特异性的DNA-PK抑制性药物的应用将会充当可增强癌症化学疗法和放射疗法二者的效力的药剂。因此,需要开发可用作DNA-PK的抑制剂的化合物。

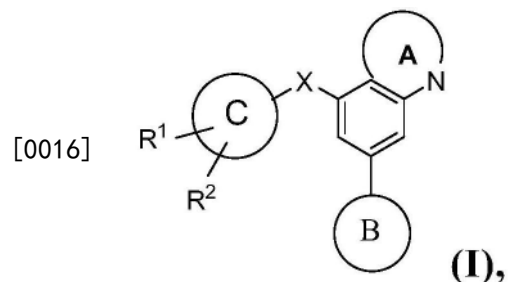
[0012] 另外,需要精确的基因组靶向技术来实现遗传变异的系统工程。基因组编辑系统、尤其是基于CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-内切核酸酶的基因组编辑技术的应用已经在过去几年中呈指数增长。II型CRISPR-Cas9细菌先天免疫系统已成为用于人类基因组的靶向修饰的有效基因组编辑工具(Wiedenheft, B. 2012; Hsu, P.D. 等人. 2014)。近年来,已描述了CRISPR-Cpf基因组编辑系统。基于CRISPR-内切核酸酶的基因组编辑部分地依赖于非同源末端连接(NHEJ)途径和同源定向修复(HDR)途径来修复DNA双链断裂。细胞修复机制对NHEJ的偏好胜过HDR。

[0013] 虽然在一些报告中来自NHEJ的插入或缺失(插入/缺失(indels))的实现高达70%有效性,但HDR的效率仍具有挑战性且比率低于1%。

[0014] 因此,需要增加基因组编辑效率,具体地,HDR效率。特异性DNA-PK抑制性药物的另一种应用是充当增强基因组编辑系统的效力的药剂。

发明内容

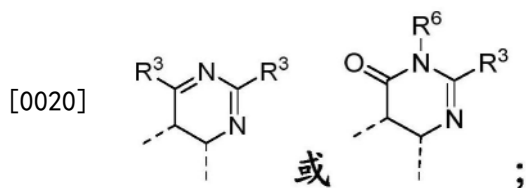
[0015] 已经发现,本发明的化合物及其药学上可接受的组合物可有效作为DNA-PK的抑制剂。因此,在一个方面,本发明表征了由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



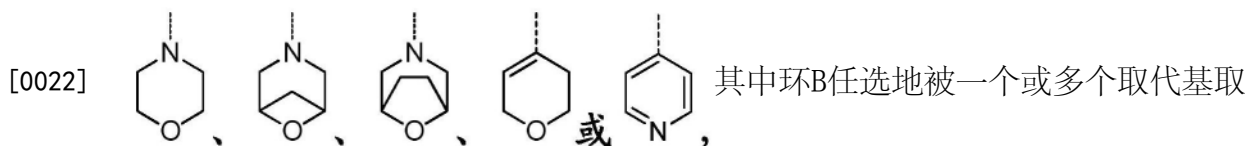
[0017] 其中 R^1 、 R^2 、X、环A、环B和环C中的每一个独立地如本文别处所定义。

[0018] 在一个实施方案中,本发明的化合物由式(I)或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0019] 环A是选自以下的芳族环系



[0021] 环B是选自以下的环系



代,所述取代基选自-F、-OH和 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基的取代基取代;

[0023] 环C是 C_{4-6} 环烷基、5-6元杂芳基或苯基,其中环C任选地被一个或多个取代基进一步取代,所述取代基选自卤素、 C_{1-2} 烷基、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0024] X是-NH-、-O-、- OC_{1-4} 烷基-、-S-或- CH_2 -;

[0025] R^1 和 R^2 中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴、- C_{1-4} 烷基-NHR⁴、-OR⁴或R⁷,其中 R^1 和 R^2 不可同时是氢;

[0026] 每个R³独立地是氢、- C_{1-4} 烷基、卤素、- OC_{1-2} 烷基、-C(O)OH、-C(O) OC_{1-2} 烷基、-CN、-C(O)NHC₁₋₂烷基、-C(O)NH₂、 C_{3-4} 环烷基或-NRR',其中所述R³烷基和环烷基中的每一个独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0027] 每个R⁴独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-10元杂环基,其中所述R⁴基团中的每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、CN、NO₂、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基-O- C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基-O- C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、C(O) OC_{1-4} 烷基、C(O) OC_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基-C(O)NH₂、C(O)NHC₁₋₄烷基、C(O)N(C_{1-4} 烷基)₂、C(O)NH(C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基)、CH₂OR⁵、 C_{0-4} 烷基-C(O)R⁵、 C_{0-4} 烷基-C(O)N(R⁵)₂、 C_{0-4} 烷基-C(O)OR⁵、 C_{0-4} 烷基-NHC(O)R⁵、 C_{0-4} 烷基-N(R⁵)₂、5-6元杂环基、-O(C_{1-4} 烷基)OR⁵、-OR⁵和氧代,且其中所述任选的R⁴取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-4} 烷基、-OH、- OC_{1-4} 烷基、-SC₁₋₄烷基、-C(O) C_{1-4} 烷基、-C(O) OC_{1-4} 烷基和-C(O) OC_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基;和

[0028] 每个R⁵独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、苯基、5-6元杂芳基或4-7元杂环基,其中每个R⁵独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN、-OH、- OC_{1-2} 烷基、5-6元杂芳基和4-7元杂环基,或2个R⁵基团与插入氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环;和

[0029] R⁶是氢或 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-CH₂OH、-CN、-OH和- OC_{1-2} 烷基的取代基取代;

[0030] R⁷是6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-7元杂环基,其中每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN和-OR;和

[0031] R和R'中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,或者R和R'与它们所连接的氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环。

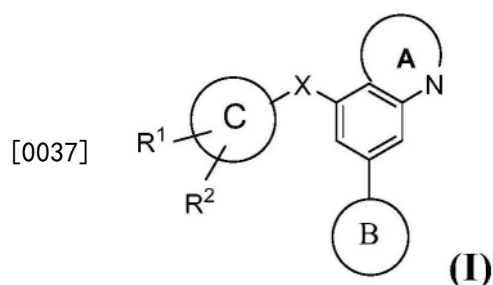
[0032] 或其药学上可接受的盐,其中 R^1 、 R^2 、X、环A、环B和环C中的每一个如本文别处所定义。

[0033] 本发明还提供包含式(I)的化合物以及药学上可接受的载体、辅助剂(adjutant)或媒介物的药物组合物。这些化合物和药物组合物可用于治疗或减轻癌症的严重程度。

[0034] 由本发明提供的化合物和组合物也可用于研究生物学和病理学现象中的DNA-PK;研究由这种激酶介导的细胞内信号转导途径;以及对新激酶抑制剂的对比评价。

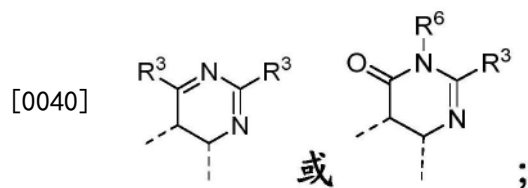
[0035] 本发明还可以通过使用DNA-PK抑制剂抑制NHEJ酶诸如DNA-PK来提高HDR效率。

[0036] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种编辑一个或多个靶基因组区域的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:

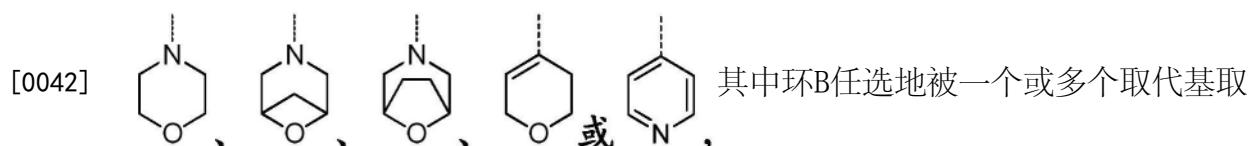


[0038] 其中 R^1 、 R^2 、X、环A、环B和环C中的每一个独立地如本文别处所定义。

[0039] 环A是选自以下的芳族环系



[0041] 环B是选自以下的环系



代,所述取代基选自-F、-OH和 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基的取代基取代;

[0043] 环C是 C_{4-6} 环烷基、5-6元杂芳基或苯基,其中环C任选地被一个或多个取代基进一步取代,所述取代基选自卤素、 C_{1-2} 烷基、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0044] X是-NH-、-O-、- OC_{1-4} 烷基-、-S-或- CH_2 -;

[0045] R^1 和 R^2 中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)R⁴、-NHR⁴、- C_{1-4} 烷基-NHR⁴、-OR⁴或R⁷,其中 R^1 和 R^2 不可同时是氢;

[0046] 每个R³独立地是氢、- C_{1-4} 烷基、卤素、- OC_{1-2} 烷基、-C(O)OH、-C(O) OC_{1-2} 烷基、-CN、-C(O)NHC₁₋₂烷基、-C(O)NH₂、 C_{3-4} 环烷基或-NRR',其中所述R³烷基和环烷基中的每一个独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0047] 每个R⁴独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-10元杂环基,其中所述R⁴基团中的每一个任选地被一个或多个取代基取代,所

述取代基选自 -Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、CN、 NO_2 、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 、 $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$ 、 CH_2OR^5 、 $C_{0-4}烷基-C(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-C(O)N(R^5)_2$ 、 $C_{0-4}烷基-C(O)OR^5$ 、 $C_{0-4}烷基-NHC(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-N(R^5)_2$ 、5-6元杂环基、 $-O(C_{1-4}烷基)OR^5$ 、 $-OR^5$ 和氧代,且其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -F、-Cl、 C_{1-4} 烷基、-OH、 $-OC_{1-4}烷基$ 、 $-SC_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)C_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)OC_{1-4}烷基$ 和 $-C(O)OC_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基$;和

[0048] 每个 R^5 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、苯基、5-6元杂芳基或4-7元杂环基,其中每个 R^5 独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、 $-CH_2OH$ 、-CN、-OH、 $-OC_{1-2}烷基$ 、5-6元杂芳基和4-7元杂环基,或2个 R^5 基团与插入氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环;和

[0049] R^6 是氢或 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自 -F、-Cl、 $-CH_2OH$ 、-CN、-OH和 $-OC_{1-2}烷基$ 的取代基取代;

[0050] R^7 是6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-7元杂环基,其中每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、 $-CH_2OH$ 、-CN和-OR;和

[0051] R和R' 中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,或者R和R' 与它们所连接的氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环。

[0052] 在某些实施方案中,本公开内容还提供了一种经由同源性定向修复(HDR)途径修复一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0053] 基因组编辑系统与靶基因组区域的核酸相互作用,导致DNA断裂,并且其中DNA断裂至少部分地经由HDR途径修复。

[0054] 在某些实施方案中,本公开内容还提供了一种抑制或遏制经由NHEJ途径对一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的修复的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0055] 基因组编辑系统与一个或多个靶基因组区域的核酸相互作用,导致DNA断裂,并且其中经由NHEJ途径的DNA断裂的修复被抑制或遏制。

[0056] 在某些实施方案中,本公开内容还提供了一种修饰一个或多个基因或蛋白的表达的方法,该方法包括向包含一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0057] 基因组编辑系统与靶基因的一个或多个靶基因组区域的核酸相互作用,导致编辑所述一个或多个靶基因组区域,并且其中所述编辑修饰与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达。

[0058] 在某些实施方案中,提供了用于编辑一个或多个靶基因组区域的试剂盒或组合物。在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物包括基因组编辑系统;和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0059] 本发明的其它特征、目的和优点在下面的详细描述中是显而易见的。但是,应当理

解,详细描述尽管指示了本发明的实施方案和方面,但是仅以示例而非限制的方式给出。本领域技术人员从详细描述会明白在本发明范围内的各种改变和修改。

附图说明

[0060] 图1A-1C是与用于监测HDR效率的交通指挥灯报道因子测定(traffic light reporter assay)有关的一系列示意图和序列。

[0061] 图1A描绘了靶向人AAVS1基因座(SBI)的双顺反子构建体的设计。

[0062] 图1B描绘了在用于监测HDR效率的交通指挥灯报道因子测定中使用的细胞系和被靶向的多核苷酸区域。

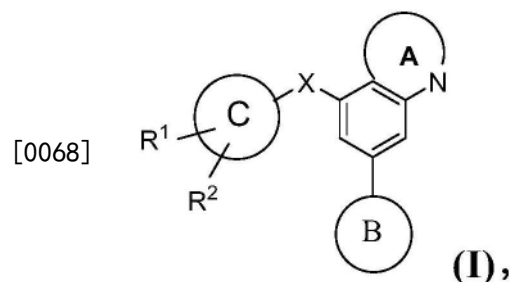
[0063] 图1C是在用于监测HDR效率的交通指挥灯报道因子测定中使用的实验工作流的示意图。

[0064] 发明详述

[0065] 除非另有定义,否则结合本公开内容使用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。通常,本文描述的关于细胞和组织培养、分子生物学和蛋白和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交使用的命名法及其技术是本领域众所周知和常用的那些。关于重组DNA、寡核苷酸合成和组织培养和转化(例如,电穿孔、脂转染)使用标准技术。酶反应和纯化技术根据生产商的说明书进行,或者如本领域常规实现的进行,或者如本文中所述进行。前述技术和操作通常根据本领域众所周知的常规方法执行,并且如在本公开内容中引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所述。参见例如,Sambrook等人.Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989))。关于本文描述的分析化学、合成有机化学和医学和药物化学所使用的命名法及其实验室规程和技术,是本领域众所周知和常用的那些。将标准技术用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送及患者治疗。通常,根据Periodic Table of the Elements,CAS版,和Handbook of Chemistry and Physics,1994年第75版来鉴别化学元素。另外,有机化学的一般原理描述在“Organic Chemistry,” Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999,和“March’s Advanced Organic Chemistry,”第5版,Smith,M.B.和March,J.,编John Wiley&Sons,New York:2001,它们的整个内容特此通过引用并入。如根据本公开内容使用的,除非另有说明,否则在本公开内容中定义的术语应当理解为具有如本文中定义的含义。

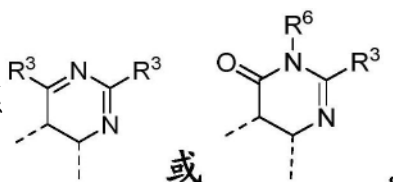
[0066] 本发明的化合物

[0067] 在一个实施方案中,本发明的化合物是由式(I)表示或其药学上可接受的盐:

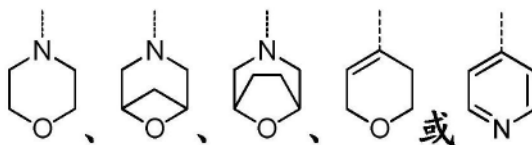


[0069] 其中式(I)的变量各自独立地如下所述。式(I)的第一组变量如下:

[0070] 环A是选自以下的芳族环系



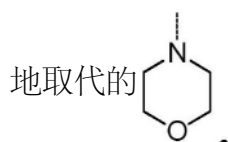
[0071] 环B是任选地取代且选自



任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-OH和C₁₋₄烷基,所述C₁₋₄烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-OH和-OC₁₋₂烷基的取代基取代。在一个具体实施方案中,环B是

任选取代的且选自

在另一个具体实施方案中,环B是任选



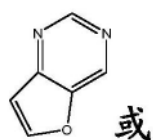
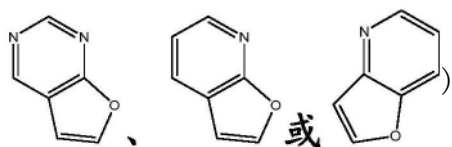
[0072] 环C是C₄₋₆环烷基、5-6元杂芳基或苯基,其中环C任选地被一个或多个取代基进一步取代,所述取代基选自卤素、C₁₋₂烷基、-OH和-OC₁₋₂烷基。在一个具体实施方案中,环C是任选取代的C₄₋₆环烷基或任选取代的5-6元杂芳基。在一个具体实施方案中,环C是任选取代的C₄₋₆环烷基。在一个具体实施方案中,环C是任选取代的5-6元杂芳基或任选取代的苯基。

[0073] X是-NH-、-O-、-OC₁₋₄烷基-、-S-或-CH₂-。在一个具体实施方案中,X是-NH-、-O-、或-CH₂-。在另一个具体实施方案中,X是-NH-或-O-。在另一个具体实施方案中,X是-O-。在另一个具体实施方案中,X是-NH-。在另一个具体实施方案中,X是-OC₁₋₄烷基-。在另一个具体实施方案中,X是-CH₂-。

[0074] R¹和R²中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴、-C₁₋₄烷基-NHR⁴、-OR⁴或R⁷,其中R¹和R²不可同时是氢。在一个具体实施方案中,R¹和R²中的至少一个是-NHR⁴或-OR⁴。在另一个具体实施方案中,R¹和R²中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-C₁₋₄烷基-NHR⁴、-NHR⁴、-OR⁴或R⁷。在另一个具体实施方案中,R²是氢且R¹是-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴、-C₁₋₄烷基-NHR⁴、-OR⁴或R⁷;和R。在另一个具体实施方案中,R²是氢且R¹是-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-C₁₋₄烷基-NHR⁴、-NHR⁴、-OR⁴或R⁷。在另一个具体实施方案中,R²是氢且R¹是-NHR⁴、-OR⁴或R⁷。在另一个具体实施方案中,R²是氢且R¹是-NHR⁴或-OR⁴。

[0075] 每个R³独立地是氢、-C₁₋₄烷基、卤素、-OC₁₋₂烷基、-C(O)OH、-C(O)OC₁₋₂烷基、-CN、-C(O)NHC₁₋₂烷基、-C(O)NH₂、C₃₋₄环烷基或-NRR',其中所述R³烷基和环烷基中的每一个独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、-OH和-OC₁₋₂烷基。在一个具体实施方案中,每个R³独立地是氢、-C₁₋₄烷基、卤素、-OC₁₋₂烷基、-CN、-C₃₋₄环烷基或-NRR',其中所述R³烷基和环烷基中的每一个独立地是任选取代的。在另一个具体实施方案中,每个R³独立地是氢、甲基、-Cl、-OCH₃、-CN、环丙基、-NHCH₃或-N(CH₃)₂。

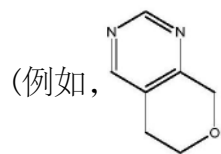
[0076] 每个 R^4 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-10元杂环基。每个 R^4 基团任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、CN、 NO_2 、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- O - C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基- O - C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 、 $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$ 、 CH_2OR^5 、 $C_{0-4}烷基-C(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-C(O)N(R^5)_2$ 、 $C_{0-4}烷基-C(O)OR^5$ 、 $C_{0-4}烷基-NHC(O)R^5$ 、 $C_{0-4}烷基-N(R^5)_2$ 、5-6元杂环基、 $-O(C_{1-4}烷基)OR^5$ 、 $-OR^5$ 和氧代。每个任选的 R^4 取代基任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -F、-Cl、 C_{1-4} 烷基、-OH、 $-OC_{1-4}烷基$ 、 $-SC_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)C_{1-4}烷基$ 、 $-C(O)OC_{1-4}烷基$ 和 $-C(O)OC_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基$ 。 R^4 的杂芳基的具体例子包括吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁**唑、吡啶、呋喃并吡啶(例如,



), 嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶(例如, 吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑和苯并**噁**唑。在一个具体实施方案中, R^4 的 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烯基和 C_{2-4} 炔基中的每一个任选地且独立地被一个或多个选自 -F和 $-O(C_{1-4}烷基)$ 的取代基取代,且 R^4 的 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基和4-10元杂环基中的每一个任选地且独立地被一个或多个 C_{1-4} 烷基、 $-O(C_{1-4}烷基)$ 、 $C_{0-4}烷基-O-C_{1-4}烷基$ 、 $C(O)NHC_{1-4}烷基$ 、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 或哌嗪取代,其中每个任选的 R^4 取代基任选地被一个或多个 C_{1-4} 烷基取代。

[0077] R^4 的杂环基的具体例子包括四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁**唑、嘧

啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶(例如,)、二氢吡喃并嘧啶



(例如,)、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶(例如,)、二

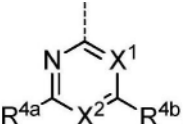
氢呋喃并吡啶(例如,)、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶和异吲哚啉-1,3-二酮。 R^4 取代

基的杂环基团的具体例子包括氧杂环丁烷、氮杂环丁烷、四氢呋喃、二氢吡喃、四氢吡喃、吗啉、哌啶、吡咯烷、哌嗪、呋喃、**噁**唑、**噁**二唑、吡咯、吡唑、三唑、**噁**二唑和四唑。

[0078] 在一个具体实施方案中,每个 R^4 独立地是氢或任选取代的选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-5} 环烷基或苯基的基团。在另一个具体实施方案中,每个 R^4 独立地是任选取代的

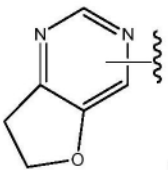
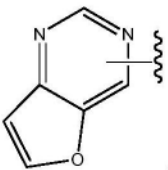
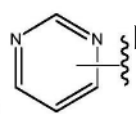
选自吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁唑**、吡啶、呋喃并吡啶、嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并**噁唑**、四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁唑**、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶、二氢吡喃并嘧啶、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶、二氢呋喃并吡啶、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶或异吲哚啉-1,3-二酮的基团。在另一个具体实施方案中,每个 R^4 独立地是任选取代的选自咪唑、吡唑、嘧啶、呋喃并嘧啶、氧杂环丁烷或二氢呋喃并嘧啶的基团。

[0079] 在另一个具体实施方案中,每个 R^4 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自

C_{1-4} 烷基、或选自 C_{3-5} 环烷基、吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁唑**、四

氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁唑**或苯基的环基团,其中 X^1 是N或 CR^{4d} ; X^2 是N或 CR^{4c} ,其中 X^1 和 X^2 不可同时是N; R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 中的每一个独立地是氢、F、Cl、Br、CN、 NO_2 、 C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 、 $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$ 、选自氧杂环丁烷、氮杂环丁烷、四氢呋喃、二氢吡喃、四氢吡喃、吗啉、哌啶或哌嗪的杂环基团,或选自呋喃、**噁唑**、**噁**二唑、吡咯、吡唑、三唑或四唑的杂芳基;或 R^{4c} 和 R^{4a} ,或 R^{4c} 和 R^{4b} ,与插入原子一起,任选地形成二氢呋喃、二氢吡喃或四氢哌啶杂环基团;且 R^{4d} 独立地是氢、F、Cl、Br、CN、 NO_2 、 C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基或 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 。 R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 以及 R^4 的取代基的所述杂环基和杂芳基中的每一个任选地且独立地被一个或多个选自-F、 C_{1-4} 烷基、-OH、- $C(O)C_{1-4}$ 烷基、- $C(O)OC_{1-4}$ 烷基或- $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基的取代基取代;且 R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 以及 R^4 的取代基的烷基和环烷基中的每一个任选地且独立地被一个或多个选自-F和-OH的取代基取代。在一个具体实施方案中, R^{4d} 是氢、CF、CCl、或任选地被一个或多个-F取代的 CC_{1-2} 烷基。

[0080] 在另一个具体实施方案中,每个 R^4 独立地是 C_{1-4} 烷基或选自 C_{3-5} 环烷基、吡唑、咪

唑、氧杂环丁烷、、或的环基团,其中所述 R^4 C_{1-4} 烷基任

选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F和- $O(C_{1-4}烷基)$,且其中每个 R^4 环基团任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、-CN、- $O(C_{1-4}烷基)$ 、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 和哌嗪,其中每个任选的 R^4 取代基任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、 C_{1-4} 烷基、-OH和- OC_{1-4} 烷基。在一个具体实施方案中,所述 R^4 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F和- $O(C_{1-4}烷基)$,且 R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 C_{1-4} 烷基、- $O(C_{1-4}烷基)$ 、 C_{0-4} 烷基- $O-C_{1-4}$ 烷基、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 和哌嗪,其中每个任选的 R^4 取代基任选地被一个或多个 C_{1-4} 烷基取代。

[0081] 每个 R^5 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、苯基、5-6元杂芳基或4-7元杂环基,其中每个 R^5 独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN、-OH、-OC₁₋₂烷基、5-6元杂芳基和4-7元杂环基,或2个 R^5 基团与插入氮原子一起任选地形成吗啉、氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶或哌嗪。 R^5 的任选取代的杂芳基的具体例子包括咪唑、三唑、噻唑、吡啶和嘧啶。 R^5 的任选取代的杂环基的具体例子包括氧杂环丁烷、四氢呋喃和四氢吡喃。

[0082] R^6 是氢或 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-CH₂OH、-CN、-OH和-OC₁₋₂烷基的取代基取代。在一个具体实施方案中, R^6 是氢或甲基。

[0083] R^7 是6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-7元杂环基,其中每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN和-OR。 R^7 的具体例子包括吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁**唑、吡啶、呋喃并吡啶、嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并**噁**唑、四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁**唑、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶、二氢吡喃并嘧啶、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶、二氢呋喃并吡啶、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶和异吲哚啉-1,3-二酮。在一个具体实施方案中, R^7 是任选取代的且选自嘧啶、咪唑、吡唑、噻唑、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并**噁**唑、氧杂环丁烷、二氢呋喃并嘧啶或异吲哚啉-1,3-二酮。在另一个具体实施方案中, R^7 是任选取代的且选自嘧啶、咪唑、吡唑、噻唑、呋喃并嘧啶、氧杂环丁烷、二氢呋喃并嘧啶或异吲哚啉-1,3-二酮。在另一个具体实施方案中, R^7 是任选取代的且选自嘧啶、吡唑、呋喃并嘧啶、噻唑或异吲哚啉-1,3-二酮。

[0084] R和R'中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,或者R和R'与它们所连接的氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环。在一个具体实施方案中,R和R'中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基。在另一个具体实施方案中,R和R'中的每一个独立地是氢或 C_{1-2} 烷基。

[0085] 在式(I)的第二组变量中,每个 R^4 独立地是氢, C_{1-4} 烷基, C_{2-4} 烯基, C_{2-4} 炔基, C_{3-10} 环烷基,苯基,萘,选自吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁**唑、吡啶、呋喃并吡啶、嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑和苯并**噁**唑的5-10元杂芳基,或选自四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁**唑、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶、二氢吡喃并嘧啶、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶、二氢呋喃并吡啶、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶和异吲哚啉-1,3-二酮的4-10元杂环基。每个 R^4 任选地且独立地被取代。在一个具体实施方案中, R^4 取代基的杂环基团是任选取代的且选自氧杂环丁烷、氮杂环丁烷、四氢呋喃、二氢吡喃、四氢吡喃、吗啉、哌啶、吡咯烷、哌嗪、呋喃、**噁**唑、**噁**二唑、吡咯、吡唑、三唑、**噁**二唑或四唑。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组变量中所述。

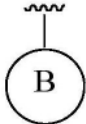
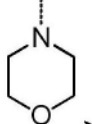
[0086] 在式(I)的第三组变量中,每个 R^5 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-4} 烷基,苯基,选自咪唑、三唑、噻唑、吡啶或嘧啶的5-6元杂芳基,或选自氧杂环丁烷、四氢呋喃或四氢吡喃的4-6元杂环基。每个 R^4 独立地如在式(I)的第二组变量中所述。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组或第二组变量中所述。

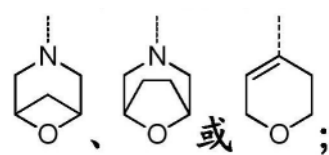
[0087] 在式(I)的第四组变量中,环C是任选取代的 C_{4-6} 环烷基或任选取代的5-6元杂芳

基; R^4 和 R^5 中的每一个独立地如在式(I)的第三组变量中所述;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第三组变量中的任一组中所述。

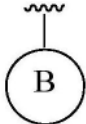
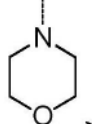
[0088] 在式(I)的第五组变量中,X是-O-或-NH-;环C环C是任选取代的 C_{4-6} 环烷基或任选取代的5-6元杂芳基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第四组变量中的任一组中所述。

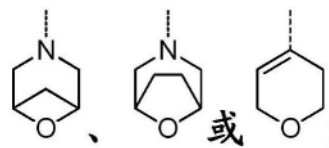
[0089] 在式(I)的第六组变量中,X是-O-或-NH-;环C环C是任选取代的 C_{4-6} 环烷基或任选取代的5-6元杂芳基; R^4 和 R^5 中的每一个独立地如在式(I)的第三组变量中所述;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第五组变量中的任一组中所述。

[0090] 在式(I)的第七组变量中,环B  是任选取代的且选自 、



X是-O-或-NH-;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第六组变量中的任一组中所述。

[0091] 在式(I)的第八组变量中,环B  是任选取代的且选自 、



X是-O-或-NH-;环C环C是任选取代的 C_{4-6} 环烷基或任选取代的5-6元杂芳基; R^4 和 R^5 中的每一个独立地如在式(I)的第三组变量中所述;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第七组变量中的任一组中所述。

[0092] 在式(I)的第九组变量中,每个 R^3 独立地是氢、 $-C_{1-4}$ 烷基、卤素、 $-OC_{1-2}$ 烷基、-CN、 $-C_{3-4}$ 环烷基或-NRR',其中所述 R^3 烷基和环烷基中的每一个独立地是任选取代的;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第八组变量中的任一组中所述。

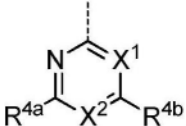
[0093] 在式(I)的第十组变量中,每个 R^4 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-5} 环烷基或苯基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第九组变量中的任一组中所述。

[0094] 在式(I)的第十一组变量中,每个 R^4 独立地是任选取代的选自吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁**唑、吡啶、呋喃并吡啶、嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并**噁**唑、四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁**唑、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶、二氢吡喃并嘧啶、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶、二氢呋喃并吡啶、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶或异吲哚啉-1,3-二酮的基团;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十组变量中的任一组中所述。

[0095] 在式(I)的第十二组变量中,每个 R^4 独立地是任选取代的选自咪唑、吡唑、嘧啶、呋

喃并嘧啶、氧杂环丁烷或二氢呋喃并嘧啶的基团；且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十一组变量中的任一组中所述。

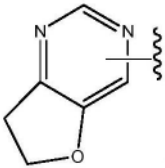
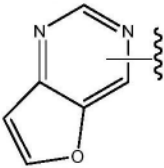
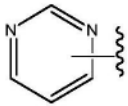
[0096] 在式(I)的第十三组变量中,每个 R^4 独立地是氢或任选取代的基团,所述基团选自

C_{1-4} 烷基,  或选自 C_{3-5} 环烷基、吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、**噁**唑、四氢

呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异**噁**唑或苯基的环基团,其中 X^1 是N或 CR^{4d} ;

[0097] X^2 是N或 CR^{4c} ,其中 X^1 和 X^2 不可同时是N; R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 中的每一个独立地是氢,F,Cl,Br,CN, NO_2 , C_{1-4} 烷基, C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基, C_{0-4} 烷基- O - C_{1-4} 烷基, C_{0-4} 烷基- O - C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基, C_{2-4} 烯基, C_{2-4} 炔基, $C(O)OC_{1-4}$ 烷基, $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基, $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$, $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$,选自氧杂环丁烷、氮杂环丁烷、四氢呋喃、二氢吡喃、四氢吡喃、吗啉、哌啶或哌嗪的杂环基团,或选自呋喃、**噁**唑、**噁**二唑、吡咯、吡唑、三唑或四唑的杂芳基;或 R^{4c} 和 R^{4a} ,或 R^{4c} 和 R^{4b} ,与插入原子一起,任选地形成二氢呋喃、二氢吡喃或四氢哌啶杂环基团; R^{4d} 独立地是氢、F、Cl、Br、CN、 NO_2 、 C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基- O - C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 $C(O)OC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)NH_2$ 、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基或 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$; R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自F,Cl,Br,CN, NO_2 , C_{1-4} 烷基, C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基, C_{0-4} 烷基- O - C_{1-4} 烷基, C_{0-4} 烷基- O - C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基, C_{2-4} 烯基, C_{2-4} 炔基, $C(O)OC_{1-4}$ 烷基, $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基, $C(O)NH_2$, $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基, $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$, $C(O)NH(C_{0-4}烷基-C_{3-5}环烷基)$,选自氧杂环丁烷、氮杂环丁烷、四氢呋喃、二氢吡喃、四氢吡喃、吗啉、哌啶或哌嗪的杂环基团,和选自呋喃、**噁**唑、**噁**二唑、吡咯、吡唑、三唑或四唑的杂芳基; R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 以及 R^4 的取代基的所述杂环基和杂芳基中的每一个任选地且独立地被一个或多个选自-F、 C_{1-4} 烷基、-OH、- $C(O)C_{1-4}$ 烷基、- $C(O)OC_{1-4}$ 烷基或- $C(O)OC_{0-4}$ 烷基- C_{3-5} 环烷基的取代基取代;且 R^{4a} 、 R^{4b} 和 R^{4c} 以及 R^4 的取代基的所述烷基和环烷基中的每一个任选地且独立地被一个或多个选自-F和-OH的取代基取代。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十三组变量中的任一组中所述。

[0098] 在式(I)的第十四组变量中,每个 R^4 独立地是 C_{1-4} 烷基或选自 C_{3-5} 环烷基、吡唑、咪

唑、氧杂环丁烷、、 或  的环基团,其中所述 R^4 C_{1-4} 烷基任

选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F和- $O(C_{1-4}烷基)$,且其中所述 R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、-CN、- $O(C_{1-4}烷基)$ 、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- O - C_{1-4} 烷基、 $C(O)NHC_{1-4}$ 烷基、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 和哌嗪,其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、 C_{1-4} 烷基、-OH和- OC_{1-4} 烷基。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十三组变量中的任一组中所述。

[0099] 在式(I)的第十五组变量中,每个 R^4 独立地如在式(I)的第十四组变量中所述,其中所述 R^4 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F和- $O(C_{1-4}烷基)$,且

R^4 环基团中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 C_{1-4} 烷基、 $-O(C_{1-4}烷基)$ 、 $C_{0-4}烷基-O-C_{1-4}烷基$ 、 $C(O)NHC_{1-4}烷基$ 、 $C(O)N(C_{1-4}烷基)_2$ 和哌嗪,且其中每个任选的 R^4 取代基任选地被一个或多个 C_{1-4} 烷基取代。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十四组变量中的任一组中所述。

[0100] 在式(I)的第十六组变量中, R^1 和 R^2 中的每一个独立地是氢、 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-C_{0-4}烷基-NHR^4$ 、 $-OR^4$ 或 R^7 。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十五组变量中的任一组中所述。

[0101] 在式(I)的第十七组变量中, R^7 是任选取代的且选自吡咯、咪唑、吡唑、三唑、噻唑、异噻唑、、吡啶、呋喃并吡啶、嘧啶、嘧啶酮、吡嗪、哒嗪、喹诺酮、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并、四氢呋喃、氧杂环丁烷、四氢吡喃、二氢异、嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮、二氢呋喃并嘧啶、二氢吡喃并嘧啶、二氢吡咯并嘧啶、四氢吡啶并嘧啶、二氢吡啶并嘧啶、二氢呋喃并吡啶、二氢吡啶并吡啶、四氢蝶啶或异吲哚啉-1,3-二酮。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十六组变量中的任一组中所述。

[0102] 在式(I)的第十八组变量中, R^7 是任选取代的且选自嘧啶、咪唑、吡唑、噻唑、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并、氧杂环丁烷、二氢呋喃并嘧啶或异吲哚啉-1,3-二酮。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十七组变量中的任一组中所述。

[0103] 在式(I)的第十九组变量中, R^7 是任选取代的且选自嘧啶、吡唑、呋喃并嘧啶、噻唑或异吲哚啉-1,3-二酮;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十八组变量中的任一组中所述。

[0104] 在式(I)的第二十组变量中,X是 $-O-$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十八组变量中的任一组中所述。

[0105] 在式(I)的第二十一组变量中,X是 $-NH-$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十八组变量中的任一组中所述。

[0106] 在式(I)的第二十二组变量中,X是 $-CH_2-$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十八组变量中的任一组中所述。

[0107] 在式(I)的第二十三组变量中,X是 $-OC_{1-4}烷基-$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第十八组变量中的任一组中所述。

[0108] 在式(I)的第二十四组变量中,环C是任选取代的 C_{4-6} 环烷基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十三组变量中的任一组中所述。

[0109] 在式(I)的第二十五组变量中,环C是任选取代的环己烷;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十四组变量中的任一组中所述。

[0110] 在式(I)的第二十六组变量中, R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}烷基-NHR^4$ 、 $-OR^4$ 或 R^7 ; R^2 是氢;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十五组变量中的任一组中所述。

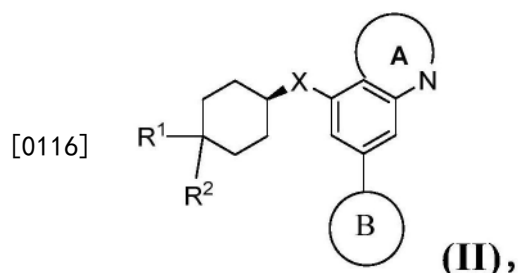
[0111] 在式(I)的第二十七组变量中,每个 R^3 独立地是氢、甲基、 $-Cl$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CN$ 、环丙基、 $-NHCH_3$ 或 $-N(CH_3)_2$; R^6 是氢或甲基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十六组变量中的任一组中所述。

[0112] 在式(I)的第二十八组变量中,环C是任选取代的5-6元杂芳基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0113] 在式(I)的第二十九组变量中,环C是任选取代的苯基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0114] 在式(I)的第三十组变量中,环C是任选取代的苯基;X是 $-OC_{1-4}$ 烷基-;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0115] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式(II)表示或其药学上可接受的盐:

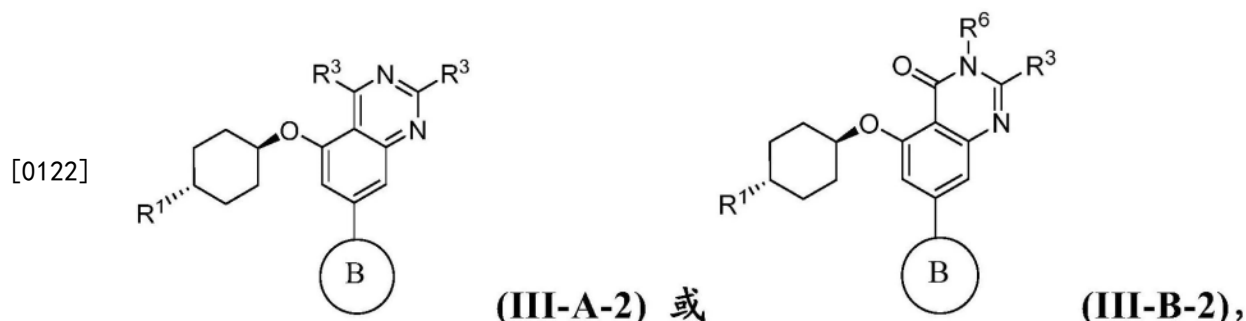
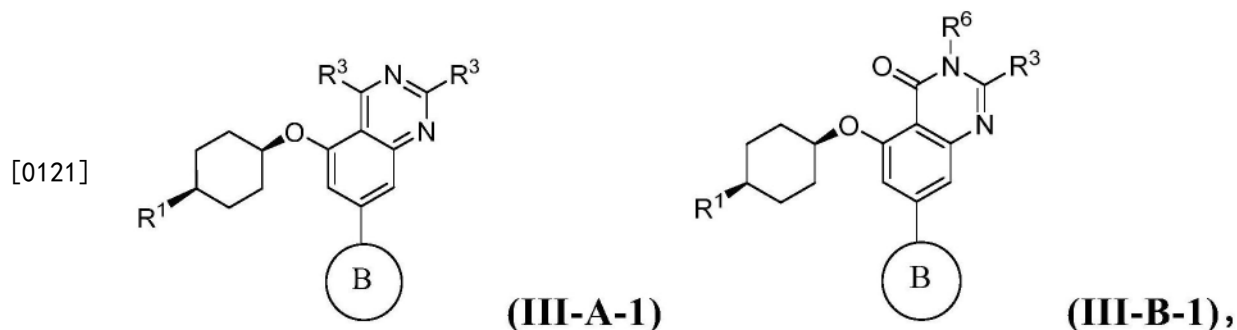


[0117] 其中式(II)的变量各自独立地如下所述。

[0118] 在式(II)的第一组变量中,式(II)的每个变量独立地如上面在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0119] 在式(II)的第二组变量中, R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ;且 R^2 是氢。式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0120] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)表示或其药学上可接受的盐:



[0123] 其中式(II)的变量每个独立地如下所述。

[0124] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组变量中,(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的每个变量独立地如上面在式(I)的第一组至第二十七

组变量中的任一组中所述。

[0125] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第二组变量中, R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

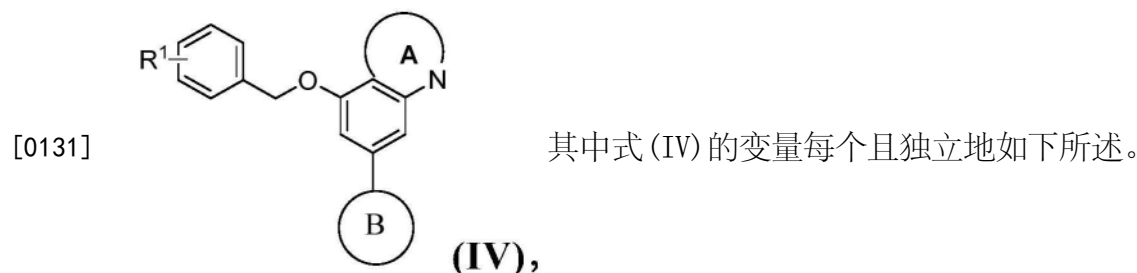
[0126] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第三组变量中, R^1 是 $-C_{1-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-NHR^4$ 或 $-OR^4$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组或第二组变量中的任一组中所述。

[0127] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第四组变量中, R^1 是 $-NHR^4$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第三组变量中的任一组中所述。

[0128] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第五组变量中, R^1 是 $-OR^4$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第四组变量中的任一组中所述。

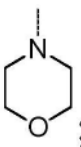
[0129] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第六组变量中, R^3 独立地是氢、甲基、 $-Cl$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CN$ 、环丙基、 $-NHCH_3$ 或 $-N(CH_3)_2$; R^6 是氢或甲基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第五组变量中的任一组中所述。

[0130] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式(IV)表示或其药学上可接受的盐:



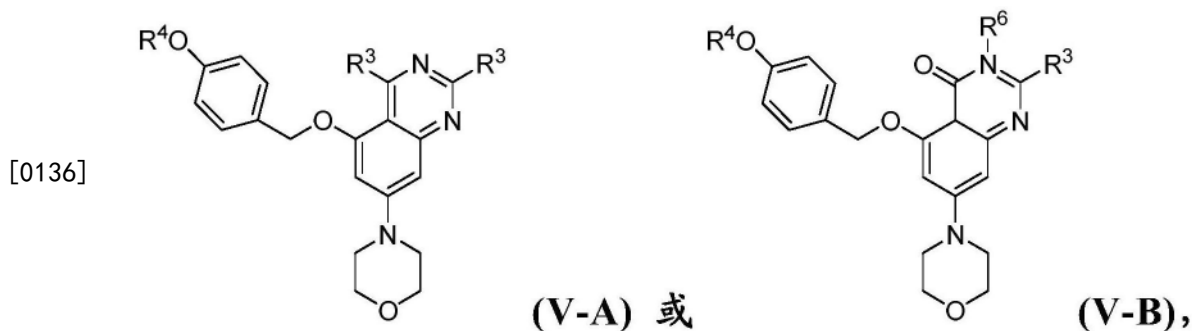
[0132] 在式(IV)的第一组变量中,每个变量独立地如在式(I)的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0133] 在式(IV)的第二组变量中, R^1 是氢、 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ;且式(IV)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0134] 在式(IV)的第三组变量中,环B是任选取代的  且式(IV)的其余变量每个且

独立地如在式(IV)的第一组或第二组变量中所述。

[0135] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式(V-A)或(V-B)表示或其药学上可接受的盐:



[0137] 其中式 (V-A) 或 (V-B) 的变量中的每一个独立地如下所述。

[0138] 在式 (V-A) 或 (V-B) 的第一组变量中,每个变量独立地如在式 (I) 的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0139] 在式 (V-A) 或 (V-B) 的第二组变量中, R^3 是氢、甲基、环丙基、-F、-Cl、-OC₁₋₂烷基、-NRR' 或 -CN,其中所述 R^3 烷基中的每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 -F、-OH和 -O(C₁₋₂烷基);每个 R^4 独立地是任选取代的C₁₋₄烷基,其任选地被一个或多个选自 -F、-OH和 -O(C₁₋₂烷基)的取代基取代;且R和R' 每个且独立地是氢或C₁₋₂烷基。式 (V-A) 或 (V-B) 的其余变量每个且独立地如在式 (I) 的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0140] 在式 (V-A) 或 (V-B) 的第三组变量中,每个 R^3 独立地是氢、甲基、-Cl、-OCH₃、-CN、环丙基、-NHCH₃或 -N(CH₃)₂;且 R^6 是氢或甲基。式 (V-A) 或 (V-B) 的其余变量每个且独立地如在式 (V-A) 或 (V-B) 的第一组或第二组变量中所述。

[0141] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式 (I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A) 和 (V-B) 中的任一个表示或其药学上可接受的盐,其中这些式的变量中的每一个独立地如在表1和2的结构式中所述。

[0142] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是如在表1和2中所述,或其药学上可接受的盐。在一个具体实施方案中,本发明表征了选自在表1中列出的化合物的集合的化合物或其药学上可接受的盐。在另一个具体实施方案中,本发明表征了选自在表2中列出的化合物的集合的化合物或其药学上可接受的盐。

[0143] 如本文中使用的,以下定义适用,除非另外指出。为了本发明的目的,根据Periodic Table of the Elements,CAS版和Handbook of Chemistry and Physics,1994年第75版来鉴别化学元素。另外,有机化学的一般原理描述在“Organic Chemistry,” Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999,和“March's Advanced Organic Chemistry,”第5版,Smith,M.B.和March,J.,编.John Wiley&Sons,New York:2001,它们的整个内容特此通过引用并入。

[0144] 如本文所述,本发明的化合物可以任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基诸如上文一般性说明的取代基或如以本发明的具体类别、亚类和种类所示例的取代基。应当理解,短语“任选取代的”与短语“被取代的或未被取代的”互换使用。通常,术语“取代的”无论前面是否有术语“任选”,均是指给定结构中的一个或多个氢基团被指定取代基的基团所替代。除非另外指明,否则任选取代的基团可在该基团的每个可取代位置有取代基。当给定结构中超过一个位置可被超过一个选自指定组的取代基取代时,取代基在每个位置可相同或不同。

[0145] 如本文中所述,当术语“任选取代的”处于一清单之前时,所述术语是指该清单中

所有后续可取代的基团。例如,如果X是卤素;任选取代的 C_{1-3} 烷基或苯基,则X可以是任选取代的烷基或任选取代的苯基。同样,如果术语“任选取代的”在一个清单之后,则除非另外指明,否则所述术语也指前面列表中的全部可取代基团。例如:如果X是卤素(halogen)、 C_{1-3} 烷基或苯基,其中X任选被 J^X 取代,则 C_{1-3} 烷基和苯基二者均可任选被 J^X 取代。如对本领域普通技术人员显而易见的,诸如H、卤素、 NO_2 、CN、 NH_2 、OH或 OCF_3 这类的基团将不包括在内,因为它们不是可取代的基团。同样对技术人员显而易见的是,含有NH基团的杂芳基或杂环基环可任选通过用所述取代基替代氢原子而被取代。如果取代基基团或结构未确定或未定义为“任选取代的”,则该取代基基团或结构是未被取代的。

[0146] 本发明所预想的取代基组合优选是能够形成稳定的或化学上可行的化合物的那些取代基组合。本文中使用的术语“稳定的”是指化合物在经受为了一种或多种本申请公开的目的而允许其产生、检测以及优选其回收、纯化和使用的条件时,不会实质上被改变。在某些实施方案中,稳定的化合物或化学上可行的化合物是在不存在水分或其它化学反应性条件的情况下,在40℃或更低温度下保持至少一周时不会实质上发生改变的化合物。

[0147] 本文中使用的术语“烷基”或“烷基基团”意指直链(即无支链)或支链的、被取代的或未被取代的完全饱和的烃链。除非另外指明,否则烷基含有1-8个碳原子。在某些实施方案中,烷基含有1-6个碳原子,并且在其它实施方案中,烷基含有1-4个碳原子(表示为“ C_{1-4} 烷基”)。在其它实施方案中,烷基表征为“ C_{0-4} 烷基”,其代表共价键或 C_{1-4} 烷基链。烷基的例子包括甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、异丁基、仲丁基和叔丁基。本文中使用的术语“亚烷基(alkylene)”代表饱和的二价直链或支链烃基并且以亚甲基、亚乙基、亚异丙基等为示例。本文中使用的术语“亚烷基(alkylidene)”代表二价直链烷基连接基团。本文中使用的术语“烯基”代表含有一个或多个碳-碳双键的单价直链或支链烃基。本文中使用的术语“炔基”代表含有一个或多个碳-碳三键的单价直链或支链烃基。

[0148] 术语“环烷基”(或“碳环”)是指单环 C_3-C_8 烃或双环 C_8-C_{12} 烃,该烃是完全饱和的并且具有与分子的其余部分的单个连接点,并且其中所述双环环系中的任何单独的环具有3-7个成员。合适的环境烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。

[0149] 本文中使用的术语“杂环”、“杂环基”、“杂环烷基”或“杂环的”是指这样的单环、双环或三环环系:其中环系中的至少一个环含有一个或多个相同或不同的杂原子,并且是完全饱和的或含有一个或多个不饱和单元,但是其不是芳族的,并且具有与分子的其余部分的单个连接点。在某些实施方案中,“杂环”、“杂环基”、“杂环烷基”或“杂环的”基团具有三至十四个环成员,其中一个或多个环成员是独立选自氧、硫、氮或磷的杂原子,并且环系中的每个环含有3至8个环成员。

[0150] 杂环的例子包括但不限于如下单环:2-四氢呋喃基、3-四氢呋喃基、2-四氢噻吩基、3-四氢噻吩基、2-吗啉代(morpholino)、3-吗啉代、4-吗啉代、2-硫代吗啉代(thiomorpholino)、3-硫代吗啉代、4-硫代吗啉代、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、1-四氢哌嗪基、2-四氢哌嗪基、3-四氢哌嗪基、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、1-吡唑啉基、3-吡唑啉基、4-吡唑啉基、5-吡唑啉基、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-哌啶基、2-噻唑烷基、3-噻唑烷基、4-噻唑烷基、1-咪唑烷基、2-咪唑烷基、4-咪唑烷基、5-咪唑烷基;以及如下双环:3-1H-苯并咪唑-2-酮、3-(1-烷基)-苯并咪唑-2-酮、吲哚啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、苯并硫杂环戊烷(benzothiolane)、苯并二噻烷(benzodithiane)和1,3-二氢-咪唑-

2-酮。

[0151] 术语“杂原子”意指氧、硫、氮或磷中的一个或多个,包括氮、硫或磷的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式;或者杂环的可取代氮,例如N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或NR⁺(如在N-取代的吡咯烷基中)。

[0152] 本文中使用的术语“不饱和的”意指一个部分具有一个或多个不饱和单元。

[0153] 本文中使用的术语“烷氧基”或“硫基烷基”是指通过氧(“烷氧基”)或硫(“硫基烷基”)原子连接至主碳链的如先前所定义的烷基。

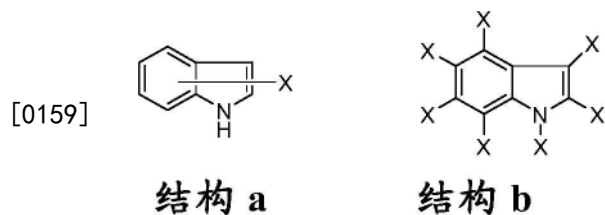
[0154] 术语“卤代烷基”、“卤代烯基”和“卤代烷氧基”意指视情况而被一个或多个卤素原子取代的烷基、烯基或烷氧基。术语“卤素”意指F、Cl、Br或I。

[0155] 单独使用的或作为较大部分(如在“芳烷基”、“芳烷氧基”或“芳氧基烷基”中)的一部分使用的术语“芳基”是指总共具有六至十四个环成员的单环、双环或三环碳环体系,其中所述环系具有与分子的其余部分的单个连接点,该环系中的至少一个环是芳族的并且其中该环系中的每个环含有4至7个环成员。术语“芳基”可与术语“芳基环”互换使用。芳基环的例子包括苯基、萘基和蒽。

[0156] 单独使用的或作为较大部分(如在“杂芳烷基”或“杂芳基烷氧基”中)的一部分使用的术语“杂芳基”是指总共具有五至十四个环成员的单环、双环和三环体系,其中所述环系具有与分子的其余部分的单个连接点,该环系中的至少一个环是芳族的,该环系中的至少一个环含有独立选自氮、氧、硫或磷的一个或多个杂原子,并且其中该环系中的每个环含有4至7个环成员。术语“杂芳基”可以与术语“杂芳基环”或术语“杂芳族”互换使用。

[0157] 杂芳基环的另外例子包括如下单环:2-呋喃基、3-呋喃基、N-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、5-咪唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、N-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、哒嗪基(例如,3-哒嗪基)、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、四唑基(例如,5-四唑基)、三唑基(例如,2-三唑基和5-三唑基)、2-噻吩基、3-噻吩基、吡唑基(例如,2-吡唑基)、异噻唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,3-三唑基、1,2,3-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、吡嗪基、1,3,5-三嗪基,以及如下双环:苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基(benzothiophenyl)、吲哚基(例如,2-吲哚基)、嘌呤基、喹啉基(例如,2-喹啉基、3-喹啉基、4-喹啉基)和异喹啉基(例如,1-异喹啉基、3-异喹啉基或4-异喹啉基)。

[0158] 如本文所述,从取代基画向多环体系内的一个环的中心的键(如下面所示)代表该取代基在该多环体系内的任一个环中的任何可取代位置处取代。例如,结构a代表结构b中所示任一位置中的可能取代。

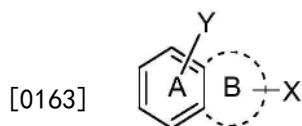


[0160] 这也适用于稠合至任选环系(其将由虚线表示)的多环体系。例如,在结构c中,X是环A和环B二者的任选取代基。



结构 c

[0162] 然而,如果多环环系中的两个环各具有从各环的中心画出的不同取代基,则除非另外指明,否则每个取代基仅代表其所连接的环上的取代。例如,在结构d中,Y仅是环A的任选取代基,X仅是环B的任选取代基。



结构 d

[0164] 本文中使用的术语“保护基”代表旨在在合成程序过程中保护官能团(例如醇、胺、羧基、羰基等)免于不期望的的那些基团。通常使用的保护基在如下文献中公开:Greene和Wuts,Protective Groups In Organic Synthesis,第3版(John Wiley&Sons,New York,1999),其通过引用并入本文。氮保护基的例子包括:酰基、芳酰基或氨基甲酰基诸如甲酰基、乙酰基、丙酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、2-氯乙酰基、2-溴乙酰基、三氟乙酰基、三氯乙酰基、邻苯二甲酰基、邻硝基苯氧基乙酰基、 α -氯丁酰基、苯甲酰基、4-氯苯甲酰基、4-溴苯甲酰基、4-硝基苯甲酰基以及手性辅助剂如受保护的或不受保护的D,L或D,L-氨基酸诸如丙氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等;磺酰基诸如苯磺酰基、对甲苯磺酰基等;氨基甲酸酯基诸如苄氧基羰基、对氯苄氧基羰基、对甲氧基苄氧基羰基、对硝基苄氧基羰基、2-硝基苄氧基羰基、对溴苄氧基羰基、3,4-二甲氧基苄氧基羰基、3,5-二甲氧基苄氧基羰基、2,4-二甲氧基苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、2-硝基-4,5-二甲氧基苄氧基羰基、3,4,5-三甲氧基苄氧基羰基、1-(对联苯基)-1-甲基乙氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、二苯甲氧基羰基、叔丁基氧基羰基、二异丙基甲氧基羰基、异丙氧基羰基、乙氧基羰基、甲氧基羰基、烯丙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、苯氧基羰基、4-硝基苯氧基羰基、苄基-9-甲氧基羰基、环戊氧基羰基、金刚烷氧基羰基、环己氧基羰基、苯基硫基羰基等、芳基烷基诸如苄基、三苯基甲基、苄氧基甲基等和甲硅烷基诸如三甲基甲硅烷基等。优选的N-保护基是甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、新戊酰基、叔丁基乙酰基、丙氨酰基、苯磺酰基、苄基、叔丁基氧基羰基(Boc)和苄氧基羰基(Cbz)。羟基保护基的例子包括醚,诸如四氢吡喃基、叔丁基、苄基、烯丙基等;甲硅烷基醚诸如三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基等;酯诸如乙酰基、三氟乙酰基等;和碳酸酯。羟基保护基基团还包括适合于保护酚类的那些基团。

[0165] 除非另外描绘或者说明,否则本文列举的结构意在包括该结构的所有异构(如对映异构的、非对映异构的和几何的(或构象的))形式;例如,每个不对称中心的R和S构型、(Z)和(E)双键异构体以及(Z)和(E)构象异构体。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构的、非对映异构的和几何的(或构象的)混合物均在本发明范围之内。已画有立体化学中心(通常通过使用阴影键(.....)或加粗键(——)定义)的化合物是立体化学纯的,但绝对立体化学仍未限定。这样的化合物可具有R或S构型。在已确定绝对构型的那些情形中,在绘图中手性中心标记有(R)或(S)。

[0166] 除非另外说明,否则本发明化合物的所有互变异构形式均在本发明范围之内。另外,除非另外说明,否则本文描绘的结构也旨在包括差别仅在于一个或多个同位素富集的原子的存在的化合物。例如,具有本发明结构、差别在于用氘或氚替换氢或用¹³C-或¹⁴C-富集的碳替换碳的化合物是在本发明的范围内。这样的化合物可例如用作分析工具、生物测定中的探针或用作具有改善的治疗特性的DNA-PK抑制剂。

[0167] 本发明的化合物的组合物、制剂和施用

[0168] 在另一个实施方案中,本发明提供了药物组合物,其包含本文所述任一式的化合物和药学上可接受的赋形剂。在另一个实施方案中,本发明提供了包含表1的化合物的药物组合物。在另一个实施方案中,本发明提供了包含表2的化合物的药物组合物。在另一个实施方案中,该组合物另外包含另外的治疗剂。

[0169] 根据另一个实施方案,本发明提供了包含本发明的化合物或其药学上可接受的衍生物以及药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物的组合物。在一个实施方案中,本发明组合物中的化合物的量是使得能有效以可测量的程度抑制生物样品中或患者中的DNA-PK的量。在另一个实施方案中,本发明组合物中的化合物的量是使得能有效以可测量的程度抑制DNA-PK的量。在一个实施方案中,将本发明的组合物配制以供施用给需要这种组合物的患者。在另一个实施方案中,将本发明的组合物配制以供经口施用给患者。

[0170] 本文中使用的术语“患者”意指动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0171] 术语“试剂”在本文中用于表示化学化合物、小分子、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。

[0172] 本文中使用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“减轻”或“改善”互换使用。这些术语表示用于获得有益或期望结果(包括但不限于治疗益处和/或预防益处)的方案。治疗益处是指对治疗中的一种或多种疾病、病症或症状的任何治疗相关的改善或作用。对于预防益处,可将组合物施用给有发展特定疾病、病症或症状的风险的受试者,或施用给报告疾病的一种或多种生理症状的受试者,即使所述疾病、病症或症状尚未表现出来。这些术语还意指对哺乳动物(例如人)的疾病的治疗,包括(a)抑制疾病,即阻止或防止其发展; (b)缓解疾病,即引起疾病状态的消退;或(c)治愈疾病。

[0173] 术语“有效量”或“治疗有效量”表示足以产生有益结果或期望结果的试剂的量。治疗有效量可根据以下中的一个或多个而变化:所治疗的受试者和疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等,其可由本领域的普通技术人员容易地确定。该术语还适用于将提供图像以便通过本文所述的任一种成像方法进行检测的剂量。具体剂量可根据以下中的一个或多个而变化:所选择的特定试剂、要遵循的给药方案、是否与其它化合物联合施用、施用时机、待成像组织以及携带它的物理递送系统。

[0174] 本文中使用的“施用”是指将DNA-PK抑制剂接触、注射、分配、递送或应用于受试者,将基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂接触、注射、分配、递送或应用于细胞或受试者。在某些实施方案中,施用是使基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂与细胞接触。在某些实施方案中,施用是将基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂递送至细胞。在某些实施方案中,施用是将基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂应用于细胞。在某些实施方案中,施用是将基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂注入细胞中。施用可在体内、离体或在体外发生。向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂可以同时地或依序地进行。

[0175] 如本文结合病症或疾病所用的术语“获得性的”意指在出生后产生的障碍或医学病症；与在出生时存在的先天性障碍形成对比。先天性障碍可能是获得性障碍的先兆 (antecedent)。

[0176] 术语“先天性的”或“遗传的”病症或疾病是在受试者的基因组中发现的遗传性障碍，其在出生时存在于受试者中。如本文所用的“基因组”包括细胞核和细胞质中的所有遗传物质，并且还包括线粒体基因组和核糖体基因组。先天性或遗传性可在受试者生命期间的任何时间表达，例如在出生时或在成年期。

[0177] 术语“遗传性障碍”或“遗传性疾病”包括受试者基因组中引起或可能引起疾病的遗传性或获得性突变。

[0178] 术语“多态性”或“遗传变异”意指在遗传基因座处的基因的不同形式。

[0179] 还应当理解，本发明的某些化合物可以以游离形式存在以供治疗，或者在适当的情况下，作为其药学上可接受的衍生物存在。根据本发明，药学上可接受的衍生物包括、但不限于药学上可接受的前药、盐、酯、这类酯的盐或任意其它加成化合物或衍生物，其在施用给有需要的患者后，能够直接地或间接地提供本文别处描述的化合物或其代谢物或残余物。本文中使用的术语“其抑制性的活性代谢物或残余物”意指其代谢物或残余物也是DNA-PK的抑制剂。

[0180] 本文中使用的术语“药学上可接受的盐”表示这样的盐：其在合理的医学判断范围内，适合用于接触人类和低等动物的组织，没有不适当的毒性、刺激、变应性应答等。

[0181] 药学上可接受的盐是本领域众所周知的。例如，S.M. Berge等人在J. Pharmaceutical Sciences, 66:1-19, 1977 (其通过引用并入本文) 中详细描述了药学上可接受的盐。本发明的化合物的药学上可接受的盐包括衍生自合适的无机和有机酸和碱的那些盐。药学上可接受的无毒的酸加成盐的例子是氨基与以下酸形成的盐：无机酸诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸，或有机酸诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸，或通过使用本领域所用的其它方法 (诸如离子交换)。其它药学上可接受的盐包括：己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。衍生自适当碱的盐包括碱金属、碱土金属、铵和 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。本发明也预见到本文中公开的化合物的任意碱性含氮基团的季铵化。通过这种季铵化可以获得水或油可溶性的或可分散的产物。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。其它药学上可接受的盐包括，在适当时，使用抗衡离子如卤根 (halide)、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、 C_{1-8} 磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒性铵、季铵和胺阳离子。

[0182] 如上所述，本发明的药学上可接受的组合物还包括药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物，本文使用的药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物包括适合于特定预期剂型的任何或全部溶剂、稀释剂或其它液体媒介物、分散或混悬助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂

或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,2005,D.B.Troy,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia著以及Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,J.Swarbrick和J.C.Boylan著,1988-1999,Marcel Dekker,New York(它们中的每一篇的内容通过引用并入本文)中公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种载体及其制备的已知技术。除非任何常规的载体媒介物与本发明化合物不相容(例如由于产生任何不希望的生物学效应或在其它方面与药学上可接受的组合物的任意其它组分以有害的方式相互作用),否则在本发明范围内预见到它的应用。

[0183] 可以充当药学上可接受的载体的物质的一些例子包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质,如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯(polyacrylate)、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、羊毛脂;糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉末状黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,如可可脂和栓剂用蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,如丙二醇或聚乙二醇;酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇,和磷酸盐缓冲溶液,以及其它无毒的相容性润滑剂,如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,而且根据配制人员的判断,着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂以及芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。

[0184] 可以口服地、胃肠外地、通过吸入喷雾、局部地、直肠地、经鼻地、含服地、经阴道或经由植入的贮库(reservoir)施用本发明的组合物。本文中使用的术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、眼内、肝内、病灶内、硬膜外、椎管内和颅内注射或输注技术。优选地,口服地、腹膜内地或静脉内地施用所述组合物。本发明组合物的无菌可注射形式可为水性或油性混悬剂。这些混悬剂可以按照本领域已知的技术,使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂制备。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混悬剂,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可用的可接受的载体和溶剂是水、林格氏液溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油通常被用作溶剂或混悬介质。

[0185] 为此目的,可采用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单脂或甘油二酯。脂肪酸(诸如油酸和它的甘油酯衍生物)可用于制备注射剂,天然的药学上可接受的油(诸如橄榄油或蓖麻油)也是如此,特别是其聚氧乙基化形式。这些油溶液或混悬剂还可以含有长链醇稀释剂或分散剂,诸如羧甲基纤维素或通常用于配制药学上可接受的剂型(包括乳剂和混悬剂)中的类似分散剂。通常用于制备药学上可接受的固体、液体或其它剂型的其它常用表面活性剂(诸如吐温类、司盘类和其它乳化剂或生物利用度促进剂)也可以用于实现制剂的目的。

[0186] 可以以任何口服可接受的剂型(包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液)来经口施用本发明的药学上可接受的组合物。在用于口服应用的片剂的情形下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也加入润滑剂,诸如硬脂酸镁。对于以胶囊剂形式口服施用,

可用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服使用需要水性混悬剂时,将活性成分与乳化剂和助悬剂组合。如果需要的话,还可以加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0187] 可替换地,可以以供直肠施用的栓剂形式施用本发明的药学上可接受的组合物。这些可以通过将所述试剂与合适的非刺激性赋形剂混合来制备,所述赋型剂在室温为固体、但是在直肠温度为液体,且因此将在直肠中熔化以释放出药物。这样的材料包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0188] 还可局部施用本发明的药学上可接受的组合物,特别是当治疗靶标包括通过局部(topically)施用可容易地达到的区域或器官时,包括眼部、皮肤或下肠道的疾病。针对这些区域或器官中的每一种,容易地制备合适的局部制剂。

[0189] 用于下肠道的局部应用可以在直肠栓剂制剂(参见上面)中或在合适的灌肠剂制剂中实现。也可使用局部透皮贴剂。

[0190] 对于局部应用,可将药学上可接受的组合物配制为含有悬浮或溶解于一种或多种载体中的活性组分的合适软膏剂。用于本发明化合物的表面施用的载体包括、但不限于矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替换地,可将药学上可接受的组合物配制为含有悬浮或溶解于一种或多种药学上可接受的载体中的活性组分的合适洗剂或乳膏剂。合适的载体包括、但不限于矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇(cetearyl alcohol)、2-辛基十二醇、苯甲醇和水。

[0191] 对于眼科使用,可将药学上可接受的组合物配制为例如在等渗的、调过pH的无菌盐水或其它水溶液中的微粉化混悬剂,或优选配制为在等渗的、调过pH的无菌盐水或其它水溶液中的溶液,使用或不使用防腐剂诸如苯扎氯铵。可替换地,对于眼科使用,可将药学上可接受的组合物配制于软膏如凡士林中。本发明的药学上可接受的组合物还可以通过鼻用气雾剂或吸入施用。这样的组合物根据药物制剂领域众所周知的技术来制备,并且可采用苯甲醇或其它合适的防腐剂、吸收促进剂(以增强生物利用度)、碳氟化合物和/或其它常规增溶剂或分散剂制备成在盐水中的溶液。

[0192] 最优选地,将本发明的药学上可接受的组合物配制成供口服施用。

[0193] 用于口服施用的液体剂型包括、但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性化合物以外,液体剂型可以含有本领域中通常使用的惰性稀释剂,例如,水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(具体地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯、及其混合物。除惰性稀释剂以外,口服组合物还可以包含辅助剂,诸如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0194] 根据已知技术,使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂,可以配制可注射制剂,例如无菌的可注射的水性或油性的混悬剂。所述无菌的可注射制剂也可以是在无毒的胃肠外地可接受的稀释剂或溶剂中的无菌的可注射的溶液、混悬剂或乳剂,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的媒介物和溶剂是水、美国药典(U.S.P.)林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油通常被用作溶剂或混悬介质。为此目的,可以采用任意温和的不挥发性油(bland fixed oil),包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸诸

如油酸被用在可注射制剂的制备中。

[0195] 可以将可注射制剂灭菌,例如通过穿过细菌截留滤器进行过滤,或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,所述灭菌剂可以在使用前溶解或分散在无菌水或其它无菌的可注射的介质中。

[0196] 为了延长本发明化合物的效果,常常需要减慢化合物从皮下或肌肉内注射的吸收。这可以通过使用具有差水溶性的结晶或无定形物的液体混悬剂实现。化合物的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率又可取决于晶体大小和晶体形式。可替换地,将化合物溶解或悬浮于油媒介物来实现胃肠外施用的化合物形式的延迟吸收。通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成化合物的微胶囊基质,制成可注射的贮库(depot)形式。根据化合物与聚合物之比以及所采用的特定聚合物的性质,可控制化合物释放速率。其它可生物降解聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过将化合物包埋(entrapping)在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备贮库型注射制剂。

[0197] 用于直肠或阴道施用的组合物优选地为栓剂,其可以如下制备:混合本发明的化合物与合适的非刺激性的赋形剂或载体诸如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡,它们在环境温度下为固体而在体温下为液体,并因此在直肠或阴道腔内熔化和释放活性化合物。

[0198] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒。在这样的固体剂型中,将活性化合物与至少一种惰性的、药学上可接受的赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体是例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或a)填充剂或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,b)粘合剂诸如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,c)保湿剂诸如甘油,d)崩解剂诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e)溶液阻滞剂诸如石蜡,f)吸收促进剂诸如季铵化合物,g)润湿剂诸如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h)吸收剂诸如高岭土和皂粘土粘土,和i)润滑剂诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠,及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,所述剂型也可包含缓冲剂。

[0199] 使用赋形剂诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等,也可以将类似类型的固体组合物用作在软或硬填充的明胶胶囊中的填充剂。用包衣剂和壳诸如肠溶包衣和药物配制领域众所周知的其它包衣剂,可以制备片剂、糖衣丸(dragees)、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型。它们可以任选地含有遮光剂,且也可以是这样的组合物:其仅仅或优先在肠道的特定部分中任选地以延迟方式释放活性成分。可使用的包埋(embedding)组合物的例子包括聚合物物质(polymeric substances)和蜡。使用赋形剂诸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等,也可以将类似类型的固体组合物用作在软或硬填充的明胶胶囊中的填充剂。

[0200] 所述活性化合物还可以与一种或多种如上所述的赋形剂一起形成微胶囊化形式。用包衣剂和壳诸如肠溶包衣剂、控释包衣剂和药物配制领域众所周知的其它包衣剂,可以制备片剂、糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂的固体剂型。在这种固体剂型中,活性化合物可与至少一种惰性稀释剂如蔗糖、乳糖或淀粉混合。如一般的做法,这种剂型还可包含除惰性稀释剂以外的另外物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,所述剂型也可以包含缓冲剂。它们可以任选地含有遮光剂,且也可以是这样的组合物:其仅仅或优先在肠道的特定部分中任选地以延迟方式释放活性成分。可使用的包埋组合物的例子包括聚合物物质和蜡。

[0201] 本发明化合物的局部或透皮施用剂型包括软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶、散剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。将活性组分在无菌条件下与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂相混合。也预见到眼用制剂、滴耳剂和滴眼剂在本发明的范围内。另外,本发明预见到使用透皮贴剂,其具有向身体提供化合物的受控递送的附加优点。可通过将化合物溶解或分配于恰当的介质中来制备这种剂型。还可以使用吸收增强剂增加所述化合物穿过皮肤的通量。通过提供控制速率的膜或通过聚合物基质或凝胶中分散所述化合物,可以控制该速率。

[0202] 优选地以施用容易和剂量均匀的剂量单位形式(dosage unit form)配制本发明的化合物。本文中使用的表述“剂量单位形式”表示适合于待治疗的患者的药剂的物理离散单元。然而,应当理解,本发明的化合物和组合物的总日用量由主治医师在合理的医学判断范围内确定。用于任何特定患者或生物体的具体有效剂量水平将取决于多种因素,所述因素包括:所治疗的病症和该病症的严重程度;使用的具体化合物的活性;所用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;所用具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物和医学领域中众所周知的类似因素。

[0203] 可与载体材料组合以产生单一剂型的组合物的本发明化合物的量将根据所治疗的宿主、具体的施用模式而变化。优选地,应当配制组合物以使得可以给接受这些组合物的患者施用0.01-100mg/kg体重/天的抑制剂剂量。

[0204] 根据要治疗的具体增殖性病症或癌症,通常施用来治疗或预防该病症的另外的治疗剂也可存在于本发明的组合物中。如本文中所述,通常施用来治疗或预防具体增殖性病症或癌症的另外的治疗剂被认为“适合于待治疗的疾病或病症”。下文提供了另外的治疗剂的例子。

[0205] 存在于本发明组合物中的另外的治疗剂的量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中通常施用的量。优选地,在本文公开的组合物中的另外的治疗剂的量将在包含该药剂作为唯一治疗活性剂的组合物中通常存在的量的约50%至100%的范围内。

[0206] 本发明的化合物和组合物的用途

[0207] 在一个实施方案中,本发明提供了一种使细胞对诱导DNA损伤的治疗剂或疾病状态敏感的方法,该方法包括下述步骤:使所述细胞与一种或多种式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A)和(V-B)的DNA-PK抑制剂或其药学上可接受的盐接触。在一个具体实施方案中,本发明的方法采用一种或多种式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)和(III-B-2)的DNA-PK抑制剂或其药学上可接受的盐。

[0208] 本发明进一步提供了增强用于治疗癌症的治疗方案的方法,该方法包括下述步骤:给有此需要的个体施用有效量的(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A)和(V-B)的DNA-PK抑制剂或其药学上可接受的盐。在一个具体实施方案中,本发明的方法采用一种或多种式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)和(III-B-2)的DNA-PK抑制剂或其药学上可接受的盐。在一个方面,用于治疗癌症的治疗方案包括放射疗法。

[0209] 本发明的化合物可用于其中放射疗法被指明提高这种治疗的治疗益处的情況中。另外,在癌症治疗中放射疗法常常被指明为外科手术的辅助治疗(adjunct)。在辅助剂的

背景中,放射疗法的目标是在原发性肿瘤已被控制时减少复发的风险以及增加无疾病存活。辅助性放射疗法被指明用于几种疾病,包括如下文所述的结肠癌、直肠癌、肺癌、胃食道癌和乳腺癌。

[0210] 通过在用于治疗癌症的治疗方案中包括另一种抗癌化学治疗剂和本发明的化合物,使用或不用放射疗法,也可以实践本发明。本发明的DNA-PK抑制剂化合物与这样的其它药剂的组合可以增强化疗方案。例如,本发明的抑制剂化合物可以与依托泊苷或博来霉素(已知会引起DNA链断裂的药剂)一起施用。

[0211] 本发明进一步涉及利用本发明的化合物,诸如式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)和(III-B-2)的DNA-PK抑制剂或其药学上可接受的盐,使肿瘤细胞放射致敏。优选的化合物是关于本发明的药物组合物描述的那些。如本文中使用的,可使细胞“放射致敏”的化合物被定义为以治疗有效量施用给动物来增加细胞对电磁辐射的敏感性和/或促进可用电磁辐射(如X-射线)治疗的疾病的治疗的分子,优选低分子量分子。可用电磁辐射治疗的疾病包括肿瘤疾病(neoplastic diseases)、良性和恶性肿瘤以及癌细胞。

[0212] 本发明也提供了治疗动物中的癌症的方法,所述方法包括给所述动物施用有效量的DNA-PK抑制剂,例如,本发明的化合物。本发明进一步涉及抑制生物系统中的癌细胞生长(包括细胞增殖、侵袭力和转移的过程)的方法。方法包括将本发明的化合物用作癌细胞生长的抑制剂。优选地,采用该方法来抑制或减少活动物如哺乳动物中的癌细胞生长、侵袭力、转移或肿瘤发病率。本发明的化合物可以单独使用,或与IR或一种或多种化学治疗剂的应用联合用于治疗癌症或抑制癌细胞生长。本发明的方法还可适用于测定系统,如测定癌细胞生长及其性质以及鉴定影响癌细胞生长的化合物。

[0213] 肿瘤或赘生物(neoplasm)包括其中细胞的倍增是不受控制和进行性的组织细胞的生长。一些这样的生长是良性的,但其它被称为“恶性的”并且可导致生物体死亡。恶性赘生物或“癌症”与良性瘤(benign growth)的区别在于,除了展现出侵袭性的细胞增殖外,它们还可侵入周围的组织并转移。此外,恶性赘生物的特征在于,它们显示出更大程度的分化丧失(更大的“去分化”)及其相对于彼此和它们周围组织的组构(organization)。这种性质也称为“间变”。

[0214] 可通过本发明治疗的赘生物还包括实体瘤,即癌和肉瘤。癌包括侵袭(侵入)周围组织并产生转移的源自上皮细胞的那些恶性赘生物。腺癌是源自腺组织或源自形成可识别的腺结构的组织的癌。另一广泛类别的癌症包括肉瘤,其为使细胞包埋在纤维状或均质物质如胚性结缔组织中的肿瘤。本发明还使得能治疗骨髓或淋巴系统的癌症,包括白血病、淋巴瘤和通常不作为肿瘤块存在而是分布在血管或淋巴网状系统中的其它癌症。

[0215] DNA-PK活性可与例如成人和小儿肿瘤学中的各种癌症形式以及如下癌症/肿瘤的生长相关:实体瘤/恶性肿瘤、粘液样和圆形细胞癌、局部晚期肿瘤、转移性癌症、人软组织肉瘤(包括尤因氏肉瘤)、癌转移物(包括淋巴转移物)、鳞状上皮细胞癌(尤其是头颈鳞状上皮细胞癌、食管鳞状上皮细胞癌)、口腔癌、血细胞恶性肿瘤(包括多发性骨髓瘤)、白血病(包括急性淋巴细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病和毛细胞白血病)、渗出性淋巴瘤(基于体腔的淋巴瘤)、胸腺淋巴瘤、肺癌(包括小细胞癌)、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、肾上腺皮质的癌症、产生ACTH的肿瘤、非小细胞癌症、乳腺癌(包括小细胞癌和导管癌)、胃肠癌(包括胃癌、结肠

癌、结肠直肠癌)、与结肠直肠癌形成相关的息肉、胰腺癌、肝癌、泌尿系统癌症(包括膀胱癌,包括原发性浅表膀胱肿瘤、膀胱的侵袭性移行细胞癌和肌肉侵袭性膀胱癌)、前列腺癌、女性生殖道的恶性肿瘤(包括卵巢癌、原发性腹膜上皮细胞肿瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、子宫癌和卵泡实体癌)、男性生殖道的恶性肿瘤(包括睾丸癌和阴茎癌)、肾癌(包括肾细胞癌)、脑癌(包括内源性脑肿瘤、成神经细胞瘤、星形细胞脑肿瘤、神经胶质瘤、中枢神经系统中的转移肿瘤细胞侵袭)、骨癌(包括骨瘤和骨肉瘤)、皮肤癌(包括恶性黑色素瘤、人皮肤角质细胞的进行性肿瘤、鳞状细胞癌)、甲状腺癌、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤、腹膜渗漏、恶性胸腔积液、间皮瘤、维尔姆斯肿瘤、胆囊癌、滋养层瘤、血管外皮细胞瘤和卡波西肉瘤。本发明包括增强癌症的这些及其它形式的治疗的方法。

[0216] 本发明提供了抑制生物样品中的DNA-PK活性的方法,该方法包括使所述生物样品与本发明的化合物或组合物接触。本文中使用的术语“生物样品”意指在活生物体外的样品,并且包括但不限于:细胞培养物或其提取物;从哺乳动物获得的活组织检查材料或其提取物;以及血液、唾液、尿、粪便、精液、泪液或其它体液或它们的提取物。对生物样品中的激酶活性、尤其是DNA-PK活性的抑制可用于本领域技术人员已知的多种目的。这样的目的的例子包括但不限于生物样本储存和生物测定。在一个实施方案中,抑制生物样品中的DNA-PK活性的方法局限于非治疗性方法。

[0217] 在某些实施方案中,本公开内容提供了用于编辑靶基因组的方法、组合物和试剂盒,例如通过修正突变。此类方法、组合物和试剂盒可通过使用DNA-PK抑制剂来提高基因组编辑效率。

[0218] 基因组编辑系统可以刺激或诱导DNA断裂,例如在基因组(或靶基因组区域)中的所需基因座处的DSB。DNA裂解的形成通过易错NHEJ途径或通过无错HDR途径促使细胞酶修复断裂的位点。在NHEJ中,通过在涉及Ku70/80异源二聚体和DNA依赖性蛋白激酶(DNA-PK)酶的一系列酶促过程中融合DNA断裂的两端来修复DNA损伤。修复机制涉及两个DNA末端的系链和比对、切除、延伸和连接(Rouet等人.;Dexheimer T. DNA repair pathways and mechanisms. 见:Mathews L, Cabarcas S, Hurt E, 编. DNA repair of cancer stem cells. Dordrecht: Springer; 2013. 第19-32页),导致在断裂位点处形成小插入或缺失突变(插入/缺失)。引入基因的编码序列中的插入/缺失可引起过早终止密码子或移码突变,导致产生无功能的截短蛋白质。对HDR途径的机制的理解较少,其涉及一组不同的修复蛋白质,例如Rad51,其通过供体修复模板刺激链侵入以进行碱基插入或基因置换。因此,HDR允许引入外源DNA模板以在基因组内获得所需的DNA编辑结果,并且可以是用于转化疾病建模和治疗性基因组编辑以恢复基因功能的有力策略。

[0219] 在这两种DNA修复途径中,NHEJ以高得多的频率发生,并且即使在神经元中也可以实现超过70%的报告效率(Swiech等人,“In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9,”*Nat Biotechnol.* 2015年1月;33(1):102-62014)。但是,HDR基因修正在S期和G2期期间在DNA复制完成时以非常低的频率发生,并且姊妹染色单体可用作修复模板(Heyer等人,Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 44:113-139, 2010)。由于NHEJ在整个细胞周期中竞争发生,并且在S期和G2期期间优于HDR,因此经由HDR途径的靶向插入仍存在挑战并且是继续研究的焦点。

[0220] DNA蛋白激酶 (DNA-PK) 在各种DNA修复过程中起作用。DNA-PK通过激活非同源末端连接 (NHEJ) 途径参与DNA双链断裂修复。NHEJ被认为通过三个步骤进行: 识别DSB, 用于去除不可连接末端或末端的其它形式的损伤的DNA处理, 最后是连接DNA末端。通过将Ku异源二聚体结合到不完全的DNA末端, 然后将两分子的DNA依赖性蛋白激酶催化亚基 (DNA-PKcs) 募集到DSB的相邻侧来进行DSB的识别; 这用于保护断裂的末端, 直到募集额外的加工酶。最近的数据支持这样的假设: DNA-PKcs使加工酶Artemis以及其自身磷酸化, 以准备DNA末端进行额外的处理。在某些情况下, 可能需要DNA聚合酶在连接步骤之前合成新的末端。DNA-PKcs的自磷酸化被认为诱导构象变化, 该构象变化打开中心DNA结合腔, 从DNA释放DNA-PKcs, 并促进DNA末端的最终重新连接。

[0221] 在某些实施方案中, 本公开内容提供了增强基因编辑的方法、组合物和试剂盒, 具体地讲提高经由HDR途径进行DNA断裂修复的效率, 或者在基因组编辑系统中抑制或遏制经由NHEJ途径进行的DNA断裂修复 (包括细胞中基于CRISPR的HDR修复) 的效率。虽然不受特定理论的束缚, 但据信施用给细胞的基因组编辑系统与靶基因的核酸相互作用, 从而导致或引起DNA断裂; 这种DNA断裂通过若干种修复途径 (例如, HDR) 修复, 并且施用给细胞的DNA-PK抑制剂抑制、阻断或遏制NHEJ修复途径, 并且可以提高或提升HDR DNA修复途径的频率或效率。

[0222] 基因组编辑系统与靶基因的核酸之间的相互作用可以是至少部分基因组编辑系统与靶基因的核酸的杂交, 或者基因组编辑系统对靶基因的核酸的任何其它识别。在某些实施方案中, 此类相互作用是碱基对之间的蛋白质-DNA相互作用或杂交。

[0223] 在某些实施方案中, 本公开内容提供了通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来编辑细胞中的一个或多个靶基因组区域的方法。编辑可以同时或依序进行。一个或多个靶基因组区域的编辑包括细胞基因组的任何种类的遗传操纵或工程改造 (engineered)。在某些实施方案中, 一个或多个靶基因组区域的编辑可以包括细胞中基因组区域的插入、缺失或置换。基因组区域包含细胞中的遗传物质, 例如DNA、RNA、多核苷酸和寡核苷酸。细胞中的基因组区域还包含细胞中包含的线粒体或叶绿体的基因组。

[0224] 在某些实施方案中, 插入、缺失或置换可以在编码或非编码基因组区域中、内含子或外显子区域中、或它们的包括其重叠或非重叠区段的任何组合中。本文中使用的“非编码区”是指不编码氨基酸序列的基因组区域。例如, 非编码区包括内含子。编码区是指编码氨基酸序列的基因组区域。例如, 编码区包括外显子。

[0225] 在某些实施方案中, 一个或多个靶基因组区域的编辑可以在细胞基因组中的任何一个或多个靶区域中发生。在某些实施方案中, 一个或多个靶基因组区域的编辑可以发生在例如外显子、内含子、转录起始位点中, 在启动子区域、增强子区域、沉默子区域、绝缘子区域、抗阻抑因子、翻译后调节元件、多腺苷酸化信号 (例如, 最小poly A)、保守区域、转录因子结合位点或它们的任何组合。

[0226] 在某些实施方案中, 与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比, 向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统导致靶向基因组编辑效率提高。在某些实施方案中, 与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比, 或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的条件相比, 提高的编辑效率为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍或100倍。基因组编辑的效率可通过本

领域已知的任何方法,例如通过确定靶向多核苷酸整合的频率的任何方法或通过测量靶向诱变的频率进行测量。靶向多核苷酸整合还可导致细胞染色质中基因组、染色体或感兴趣区域中的序列的改变或置换。靶向多核苷酸整合可导致靶向突变,包括、但不限于点突变(即,单个碱基对转化为不同碱基对)、置换(即,多个碱基对转化为不同的具有相同长度的序列)、一个或多个碱基对的插入、一个或多个碱基对的缺失以及前述序列改变的任何组合。

[0227] 在某些实施方案中,编辑细胞中的一个或多个靶基因组区域的方法包括向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂。在某些实施方案中,细胞在S或G2细胞周期阶段同步化。S或G2细胞周期阶段的细胞同步化可通过本领域已知的任何方法实现。作为非限制性实例,可用于使细胞在S或G2细胞周期阶段同步化的试剂包括阿非迪霉素、羟基脲、洛伐他汀、含羞草碱(mimosine)、诺考达唑、胸苷或它们的任何组合。(参见,Lin等人,“Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery,”*Elife*.2014年12月15日;3)。在某些实施方案中,可以在基因编辑过程中的任何时间施用用于细胞同步化的试剂。在某些实施方案中,可以在向细胞施用基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂之前、期间或之后使细胞在细胞周期的S期或G2期同步化。

[0228] 在某些实施方案中,通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来编辑细胞中的一个或多个靶基因组区域的方法导致与不向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂的条件相比或与仅将基因编辑系统与细胞接触或施用给细胞而不施用DNA-PK抑制剂的条件相比,细胞存活率增加。

[0229] 在某些实施方案中,本文提供了经由HDR途径修复一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的方法。向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂导致基因组的靶向区域的DNA断裂,随后至少部分地经由HDR途径修复DNA断裂。这些方法导致一个或多个靶基因组区域中HDR介导的修复(例如,HDR途径)的量增加,从而导致与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,HDR介导的修复的效率更高。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的条件相比,HDR途径介导的DNA断裂修复的效率为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍或100倍。HDR途径介导的修复的效率可通过本领域已知的任何方法,例如通过确定靶向多核苷酸整合的频率或通过测量靶向诱变的频率进行测量。

[0230] 在某些实施方案中,本文的方法提供了通过提高HDR途径的效率来修复DNA断裂。

[0231] HDR途径可以是“典型的”或“替代的”。“HDR”(同源定向修复)是指例如在细胞中双链断裂或DNA切口的修复期间发生的特定形式的DNA修复。双链断裂的HDR通常基于核苷酸序列同源性,使用“供体”分子进行“靶”分子(例如,经历双链断裂的分子)的模板修复,并且可以导致遗传信息从供体转移到靶标。双链断裂的典型HDR通常基于BRCA2和RAD51,并且通常采用dsDNA供体分子。非典型或“替代”的HDR是由BRCA2、RAD51和/或功能相关基因抑制的HDR机制。替代HDR可以使用ssDNA或带切口的dsDNA供体分子。参见例如WO 2014172458。

[0232] 在某些实施方案中,通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来经由HDR途径修复一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的方法导致与不向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂的条件相比或与仅向细胞施用基因编辑系统而不施用DNA-PK抑制剂的

条件相比,细胞存活率增加。

[0233] 在某些实施方案中,本文提供了抑制或遏制细胞的一个或多个靶基因组区域中NHEJ介导的DNA断裂修复的方法。在某些实施方案中,通过抑制或遏制NHEJ途径来进行NHEJ介导的DNA断裂修复的抑制或遏制。NHEJ途径可以是经典的(“典型的”)或替代的NHEJ途径(alt-NHEJ,或微同源介导的末端连接(MMEJ))。通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂,阻抑细胞中的NHEJ途径或alt-NHEJ途径。

[0234] 经典的NHEJ修复途径是DNA双链断裂修复途径,其中双链断裂的末端在不具有广泛同源性的情况下连接。经典的NHEJ修复使用若干种因子,包括KU70/80异源二聚体(KU)、XRCC4、连接酶IV和DNA蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)。Alt-NHEJ是另一种用于修复双链断裂的途径。在接合断裂末端之前,Alt-NHEJ在断裂末端的比对期间使用5-25个碱基对的微同源序列。Alt-NHEJ很大程度上独立于KU70/80异源二聚体(KU)、XRCC4、连接酶IV、DNA蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)、RAD52和ERCC1。参见,Bennardo等人,“Alternative-NHEJ is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair,”*PLOS Genetics*,2008年6月27日。

[0235] 在某些实施方案中,通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来抑制或遏制NHEJ途径,从而在细胞的一个或多个靶基因组区域中抑制或遏制经由NHEJ途径进行的NHEJ介导的DNA断裂修复的方法导致与未接受基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂的细胞相比,或与细胞接受基因组编辑系统但未接收DNA-PK抑制剂的细胞相比,抑制或遏制NHEJ介导的DNA断裂修复的效率提高。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的细胞相比,通过使细胞与DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统接触来抑制或遏制经由NHEJ途径进行的DNA断裂修复的效率的提高为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍或100倍。抑制或遏制经由NHEJ途径进行的DNA断裂修复的效率可通过本领域已知的任何方法,例如通过确定靶向多核苷酸整合的频率或通过测量靶向诱变的频率进行测量。

[0236] 在某些实施方案中,通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来抑制或遏制NHEJ途径,从而在细胞的一个或多个靶基因组区域中抑制或遏制NHEJ介导的DNA断裂修复的方法导致与基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂不与细胞接触或施用给细胞的细胞相比,或与仅基因组编辑系统与细胞接触或施用给细胞而不使用DNA-PK抑制剂的细胞相比,细胞存活率增加。

[0237] DNA断裂可以是双链断裂(DSB)或两个单链断裂(例如,两个DNA切口)。DSB可以是平端的或者具有5'或3'突出端,如果每个链都被切割开过远,则突出部将继续彼此退火并且以两个切口而不是一个DSB的形式存在。

[0238] 在某些实施方案中,本文提供了通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来修饰一种或多种基因(靶基因)和/或对应的或下游的蛋白质的表达的方法。在某些实施方案中,基因组编辑系统可以例如在细胞的靶基因的靶基因组区域中产生插入、缺失、置换、修饰或破坏,导致靶基因的经修饰的表达。在某些实施方案中,插入、缺失、置换、修饰或破坏可导致特定蛋白质或蛋白质组或下游蛋白质的靶向表达。在某些实施方案中,基因组编辑系统可以在非编码区或编码区中产生插入、缺失或置换。在某些实施方案中,基因组编

辑系统可以在启动子区、增强子区和/或任何其它基因调节元件(包括外显子、内含子、转录起始位点、沉默子区、绝缘子区、抗阻抑因子、翻译后调节元件、多腺苷酸化信号(例如最小 poly A)、保守区、转录因子结合位点或它们的任何组合)中产生插入、缺失、置换、修饰或破坏。在某些实施方案中,基因组编辑系统可以同时或依序地在多于一个靶区域中产生插入、缺失、置换、修饰或破坏。在某些实施方案中,向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂可以允许细胞中经靶向修饰的基因表达。这种靶向修饰的基因表达可导致特定蛋白质及其下游蛋白质的表达。

[0239] 在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的条件相比,下游基因和/或蛋白质的表达增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍或10倍。

[0240] 在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的条件相比,下游基因和/或蛋白质的基因表达降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0241] 本文方法的细胞可以是任何细胞。在某些实施方案中,细胞是脊椎动物细胞。在某些实施方案中,脊椎动物细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,脊椎动物细胞是人细胞。

[0242] 细胞可以是任何发育阶段的任何类型的细胞。在某些实施方案中,细胞可以是分化细胞、全能干细胞、多能干细胞、胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、成体干细胞、前体细胞、诱导多能干细胞或它们的任何组合。分化细胞是在组织中发挥特定功能的特化细胞。全能干细胞是来自胚胎、胎儿或成人的未分化细胞,其可以分裂较长时间并且具有分化成生物体的三个胚层中任一个的任何细胞类型的能力。多能干细胞是来自胚胎、胎儿或成人的未分化细胞,其可以分裂较长时间并且具有分化成生物体的除胚胎外组织或胎盘之外的任何细胞类型的能力。胚胎干细胞是未分化的干细胞,其存在于胚胎的内细胞群中,并且具有分化成三个胚层中任一个的任何类型细胞的能力。胚胎生殖细胞是一种胚胎细胞,其可以产生生殖细胞,如精子细胞或卵细胞。成体干细胞是存在于分化组织中的未分化细胞,能够自我更新并且可以分化成其所在组织的任何细胞。前体或祖细胞是部分分化的细胞,其通常只能分化成一种细胞(例如单能细胞)。诱导的多能干细胞是一种多能干细胞,其由成体分化或部分分化的细胞生成。参见例如WO/2010/017562。

[0243] 本文中使用的单数形式的“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另有明确说明。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。例如,“一个或多个细胞”和“细胞”在本文中可互换使用。类似地,“一个或多个靶基因组区域”和“靶基因组区域”在本文中可互换使用。

[0244] 术语“大约”和“约”在本文中可互换使用。应用于一个或多个感兴趣的值的术语“大约”或“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中,除非另有说明或者说从上下文中显而易见(除非此数字将超过可能值的100%),否则术语“大约”或“约”是指在任一方向(大于或小于)上落在规定参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的一系列

值。

[0245] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸(DNA)或核糖核苷酸(RNA))或其类似物的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码区或非编码区、由连锁分析定义的一个或多个基因座、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微型RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括一种或多种经修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在对核苷酸结构的修饰,则这些修饰可以在聚合物组装之前或之后实施。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可在聚合后进一步修饰,诸如与标记组分缀合。术语“ssDNA”意指单链DNA分子。术语“ssODN”意指单链寡脱氧核苷酸。

[0246] 本文涉及的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文涉及的术语“修饰的核苷酸”包括具有经修饰的或置换的糖基等等的核苷酸。本文涉及的术语“寡核苷酸键”包括寡核苷酸键,诸如硫代磷酸酯(Phosphorothioate)、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等等。如果需要,寡核苷酸可包含用于检测的标签。

[0247] 术语“合成RNA”是指经工程改造的或非天然存在的RNA。

[0248] 本文中使用的术语“野生型”是本领域技术人员理解的术语,意指生物体、菌株、基因或特征的典型形式,因为它存在于自然界中,区别于突变体或变体形式。

[0249] 术语“非天然存在的”或“经工程改造的”可互换使用,指示人插手参与。当提及核酸分子或多肽时,术语意指核酸分子或多肽至少基本上不含在自然界中与它们天然相关的和天然存在的至少一种其它组分。

[0250] “互补性”是指核酸通过传统的Watson-Crick或其它非传统类型与另一种核酸形成氢键的能力。互补性百分比表示核酸分子中可与第二核酸序列形成氢键(例如Watson-Crick碱基配对)的残基的百分比(例如,10个中有5、6、7、8、9、10个为50%、60%、70%、80%、90%和100%互补)。“完全互补”意指核酸序列的所有连续残基将与第二核酸序列中相同数量的连续残基氢键结合。本文中使用的“基本上互补”是指在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50个或更多个核苷酸的区域上互补程度为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%,或者是指两个核酸在严格条件下杂交。

[0251] 本文中使用的“表达”是指多核苷酸从DNA模板转录(例如转录成mRNA或其它RNA转录物)的过程和/或转录的mRNA随后翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。转录物和编码的多肽可统称为“基因产物”。如果多核苷酸源自基因组DNA,则表达可以包括在真核细胞中接合mRNA。

[0252] 在本文可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是直链的或支链的,它可包含经修饰的氨基酸,并且该氨基酸可被非氨基酸中断。该术语还包括经过修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操纵,例如与标记组分的缀合。本文中使用的术语“氨基酸”包括天然和/

或非天然或合成的氨基酸,包括甘氨酸和D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和模拟肽。

[0253] “病毒载体”被定义为重组产生的病毒或病毒颗粒,其包含待在体内、离体或体外递送至宿主细胞中的多核苷酸。病毒载体的例子包括逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体和嵌合病毒载体等。在其中基因转移由逆转录病毒载体介导的某些实施方案中,载体构建体是指包含逆转录病毒基因组或其部分的多核苷酸。

[0254] 本公开内容的某些实施方案涉及包含一种或多种载体的载体系统或载体本身。载体可设计用于在原核细胞或真核细胞中表达CRISPR转录物(例如核酸转录物、蛋白质或酶)。例如,CRISPR转录物可以在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。

[0255] 细胞可以是原代细胞、诱导多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞(hESC)、成体干细胞、祖细胞或细胞系。“原代细胞”是直接取自活组织并置于体外进行生长的细胞。原代细胞的群体倍增很少,并且在体外群体倍增具有有限的寿命。“干细胞”、“胚胎干细胞”和“诱导多能干细胞”是非特化且未分化的细胞,能够自我更新并且具有分化成具有特殊功能的不同类型细胞的潜力。“细胞系”包括衍生自一种细胞类型的细胞培养物或者可以无限增殖的一组相同类型的细胞。哺乳动物细胞系的非限制性实例可以包括CD34细胞、293细胞、HEK细胞、CHO细胞、BHK细胞、CV-1细胞、Jurkat细胞、HeLa细胞或它们的任何变体。

[0256] 在某些实施方案中,载体能够使用哺乳动物表达载体驱动哺乳动物细胞中一个或多个序列的表达。哺乳动物表达载体的例子包括pCDM8和pMT2PC。当用于哺乳动物细胞中时,表达载体的控制功能通常由一种或多种调节元件提供。例如,常用的启动子衍生自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒、猿猴病毒40以及本文所公开的和本领域已知的其它启动子。其它启动子可以包括例如EF1启动子或EF1 α 启动子。其它适用于原核细胞和真核细胞的表达系统参见例如Sambrook等人,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989的第16章和第17章。

[0257] 本文中使用的术语“标签”或“标记的”是指掺入可检测的标记物,例如通过掺入放射性标记的氨基酸,或连接至通过标记的抗生物素蛋白(例如,含有可通过光学或量热方法检测的荧光标记物或酶活性的链亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下,标签或标记物也可以是治疗性的。许多标记多肽和糖蛋白的方法是本领域已知的并且可以使用。用于多肽的标签的例子包括、但不限于:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标签(例如,FITC、罗丹明、镧系磷光体)、酶学标签(例如,辣根过氧化物酶、 β (p)-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光剂、生物素基团、由第二报告基因识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二抗的结合位点、金属结合域、表位标签)。在某些实施方案中,标签通过多个长度的间隔臂连接,以减少潜在的空间位阻。本文中使用的术语“药剂或药物”是指当适当施用给患者时能够诱导所需的治疗效果的化学化合物或组合物。

[0258] 本文中使用的“基本上纯的”意指对象物种(species)是存在的主要物种(即,以摩尔计丰度大于组合物中的任何其它单个物种)。在某些实施方案中,基本上纯化的级分是其中对象物种包含所有存在的大分子物种的至少约50%(以摩尔计)的组合物。

[0259] 通常,基本上纯的组合物将包含超过约80%的组合物中所有存在的大分子物种。在某些实施方案中,基本上纯的组合物将包含大于约85%、90%、95%和99%的组合物中所有存在的大分子物种。在某些实施方案中,将目标物种纯化至基本上同质的(不能通过常规检测方法检测组合物中的杂质物种),其中该组合物基本上由单个大分子物种组成。

[0260] 基因组编辑系统

[0261] 可使用各种类型的基因组工程系统。术语“基因组编辑系统”、“基因编辑系统”等在本文中可互换使用,并且是指编辑靶基因或其功能或表达的系统或技术。基因组编辑系统包括:至少一种内切核酸酶组分,其能够切割靶基因组区域(或靶序列);以及至少一种基因组靶向元件,其将内切核酸酶组分带向或靶向靶基因组区域。基因组靶向元件的例子包括DNA结合结构域(例如,锌指DNA结合蛋白或TALE DNA结合结构域)、指导RNA元件(例如,CRISPR指导RNA)和指导DNA元件(例如,NgAgo指导DNA)。可编程基因组靶向元件和内切核酸酶元件通过在特定基因组位点处引入DNA断裂(例如双链断裂(DSB))来实现精确的基因组编辑。DSB随后募集内源性修复机制,以对DSB位点进行非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR),从而介导基因组编辑。“内切核酸酶组分”包括内切核酸酶或包含编码这种内切核酸酶的核苷酸序列的核酸。

[0262] 术语“内切核酸酶”是指能够催化DNA或RNA分子内的核酸之间的键的水解(切割)的任何野生型酶、突变型酶、变体酶或工程酶。内切核酸酶可以识别并切割其靶基因组区域处的DNA或RNA分子。内切核酸酶的例子包括归巢内切核酸酶;限制酶,诸如FokI;嵌合锌指核酸酶(ZFN),由工程化锌指结构域与限制酶如FokI的催化结构域融合产生;Cas酶和Cpf酶。化学内切核酸酶包括在术语“内切核酸酶”中,其中化学或肽裂解剂与核酸聚合物或识别特定靶序列的另一DNA缀合,从而将裂解活性靶向特定序列。化学内切核酸酶的例子包括合成核酸酶如邻菲咯啉的缀合物、DNA裂解分子和形成三链体的寡核苷酸(TFO)。

[0263] 所谓“变体”是指通过用不同的氨基酸置换亲本蛋白质的氨基酸序列中的至少一个残基而获得的重组蛋白质。

[0264] 在某些实施方案中,内切核酸酶如ZFN、TALEN和/或大范围核酸酶(meganuclease)包含裂解结构域和/或裂解半结构域。裂解结构域可以与DNA结合结构域同源或异源。例如,可使用来自一种核酸酶的锌指DNA结合结构域和裂解结构域或者来自另一种核酸酶的大范围核酸酶DNA结合结构域和裂解结构域。异源裂解结构域可以从任何内切核酸酶或核酸外切酶获得。可由其衍生裂解结构域的示例性内切核酸酶包括、但不限于限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。参见例如W02013/130824。已知裂解DNA的其它酶(例如,S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNase I;微球菌核酸酶;酵母HO内切核酸酶;还可参见Linn等人(编辑)Nucleases,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993)。这些酶(或其功能片段)中的一种或多种可用作裂解结构域和裂解半结构域的来源。

[0265] 裂解半结构域可以衍生自如上所述的任何核酸酶或其部分,其需要二聚化以实现裂解活性。在某些实施方案中,如果融合蛋白包含裂解半结构域,则需要裂解两个融合蛋白。在某些实施方案中,可使用包含两个裂解半结构域的单一蛋白质。在某些实施方案中,两个裂解半结构域可以衍生自相同的内切核酸酶(或其功能片段)。在某些实施方案中,每个裂解半结构域可以衍生自不同的内切核酸酶(或其功能片段)。此外,优选地将两个融合蛋白的靶位点相对于彼此设置,使得这两个融合蛋白与它们各自的靶位点的结合将裂解半

结构域相对于彼此以空间取向放置,这允许裂解半结构域例如通过二聚化形成功能性裂解结构域。因此,在某些实施方案中,靶位点的近边缘被5-50个核苷酸、5-8个核苷酸或15-18个核苷酸分开。应注意,任何整数个核苷酸或核苷酸对可介于两个靶位点之间(例如,2至50个核苷酸对或更多)。在某些实施方案中,裂解位点位于靶位点之间。

[0266] 限制性内切核酸酶(限制酶)存在于许多物种中,并且能够与DNA(在识别位点处)进行序列特异性结合,并在结合位点处或附近裂解DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在从识别位点移除的位点处裂解DNA,并且具有可分离的结合结构域和裂解结构域。例如,IIS型酶Fok I催化DNA的双链裂解。参见例如美国专利5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279;Li等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768;Kim等人(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887;Kim等人(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。

[0267] 在某些实施方案中,内切核酸酶组分包含融合蛋白,所述融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的裂解结构域(或裂解半结构域)以及可以或可以不经过工程改造的一个或多个锌指结合结构域。其裂解结构域可与结合结构域分开的示例性IIS型限制酶是Fok I。该特定酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:10,570-10,575。Fok I酶中用于这种融合蛋白的部分被认为是裂解半结构域。因此,对于使用锌指或TALE-Fok I融合进行的细胞序列的靶向双链裂解和/或靶向置换,可使用两个融合蛋白(均包含Fok I裂解半结构域)重构催化活性裂解结构域。另选地,也可使用含有锌指结合结构域和两个Fok I裂解半结构域的单个多肽分子。

[0268] 示例性IIS型限制酶在国际公布WO 07/014275中有所描述,该公布全文并入本文。另外的限制酶还含有可分离的结合结构域和裂解结构域,本公开内容设想了这些。参见例如Roberts等人(2003)Nucleic Acids Res.31:418-420。

[0269] 在某些实施方案中,裂解结构域包含最小化或防止同源二聚化的一个或多个工程化裂解半结构域(也称为二聚化结构域突变体),如例如美国专利公开号20050064474和20060188987和WO 2013/130824所述。形成专性异源二聚体的Fok I的示例性工程化裂解半结构域包括其中第一裂解半结构域包含Fok I的490位和538位氨基酸残基处的突变且第二裂解半结构域包含氨基酸残基486和499处的突变的一对。参见例如美国专利公开号2008/0131962和2011/0201055。本文所述的工程化裂解半结构域可使用任何合适的方法制备,例如如美国专利公开号20050064474和20080131962所述,通过野生型裂解半结构域(Fok I)的定点诱变来制备。

[0270] 术语“编辑”等是指任何类型的工程改造、改变、修饰或调节(在每种情况下,包括、但不限于通过基因敲除、基因标记、基因破坏、基因突变、基因插入、基因缺失、基因活化、基因沉默或基因敲入)。

[0271] 本文中使用的“遗传修饰”、“基因组编辑”、“基因组修饰”、“基因修饰”和“基因编辑”是指对细胞的核苷酸的任何基因添加、缺失、敲除、敲入、标记、突变、活化、沉默、修饰和/或破坏。该上下文中的细胞可以是体外的、体内的或离体的。

[0272] “靶基因组区域”、“靶基因”、“DNA靶标”、“DNA靶序列”、“靶序列”、“靶核苷酸序列”、“靶位点”、“靶标”、“感兴趣的位点”、“识别位点”、“多核苷酸识别位点”、“识别序列”、“裂解位点”是指由基因组编辑系统识别和裂解的多核苷酸序列。这些术语是指不同的DNA

位置,优选基因组位置,在该位置处DNA断裂(裂解)将由基因组编辑系统诱导。

[0273] 上述编辑(包括工程改造、改变、修改和调节)可以同时地或依序地进行。可使用本领域已知的任何基因组编辑系统。在某些实施方案中,基因组编辑系统是基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。

[0274] 基于大范围核酸酶、基于ZFN和基于TALEN均包含至少一个DNA结合结构域或含有编码DNA结合结构域的核酸序列的核酸,并且经由蛋白质-DNA相互作用实现靶基因组区域的特异性靶向或识别。基于CRISPR的系统包含至少一种指导RNA元件或含有编码指导RNA元件的核酸序列的核酸,并且经由与靶基因组区域的DNA的碱基配对实现靶基因组区域的特异性靶向或识别。基于NgAgo的系统包含至少一种指导DNA元件或含有编码指导DNA元件的核酸序列的核酸,并且经由与靶基因组区域的DNA的碱基配对实现靶基因组区域的特异性靶向或识别。

[0275] 在某些实施方案中,基因组编辑系统是基于大范围核酸酶的系统。基于大范围核酸酶的系统采用大范围核酸酶,其是具有大(>14bp)识别位点的内切核酸酶,并且其DNA结合结构域还负责靶序列的裂解。大范围核酸酶的DNA结合结构域可具有12至45bp的双链DNA靶序列。在某些实施方案中,大范围核酸酶是二聚体酶,其中每个大范围核酸酶结构域位于单体上,或者单体酶包含位于单个多肽上的两个结构域。通过蛋白质工程不仅产生了野生型大范围核酸酶,还产生了各种大范围核酸酶变体,以覆盖大量独特的序列组合。在某些实施方案中,还可以使用具有由大范围核酸酶A的半位点和蛋白质B的半位点组成的识别位点的嵌合大范围核酸酶。这种嵌合大范围核酸酶的具体实例包括I-DmoI和I-CreI的蛋白质结构域。大范围核酸酶的例子包括来自LAGLIDADG家族的归巢内切核酸酶。

[0276] LAGLIDADG大范围核酸酶可以是I-SceI、I-ChuI、I-CreI、I-CsmI、PI-SceI、PI-TliI、PI-MtuI、I-CeuI、I-SceII、I-SceIII、HO、PI-CivI、PI-CtrI、PI-AaeI、PI-BsuI、PI-DhaI、PI-DraI、PI-MavI、PI-MchI、PI-MfuI、PI-MflI、PI-MgaI、PI-MgoI、PI-MinI、PI-MkaI、PI-MleI、PI-MmaI、PI-MshI、PI-MsmI、PI-MthI、PI-MtuI、PI-MxeI、PI-NpuI、PI-PfuI、PI-RmaI、PI-SpbI、PI-SspI、PI-FacI、PI-MjaI、PI-PhoI、PI-TagI、PI-ThyI、PI-TkoI、PI-TspI或I-MsoI;或者可以是其功能性突变体或变体,无论是同源二聚体、异源二聚体还是单体。在某些实施方案中,LAGLIDADG大范围核酸酶是I-CreI衍生物。在某些实施方案中,LAGLIDADG大范围核酸酶与天然I-CreI LAGLIDADG大范围核酸酶具有至少80%的相似性。在某些实施方案中,LAGLIDADG大范围核酸酶与天然I-CreI LAGLIDADG大范围核酸酶的残基1-152具有至少80%的相似性。在某些实施方案中,LAGLIDADG大范围核酸酶可以由在有或没有接头肽的情况下连接在一起的两种单体组成,所述两种单体与天然I-CreI LAGLIDADG大范围核酸酶的残基1-152具有至少80%的相似性。

[0277] “LAGLIDADG大范围核酸酶”是指来自LAGLIDADG家族的归巢内切核酸酶,如Stoddard等人(Stoddard,2005)所定义,或者包含与所述天然归巢内切核酸酶具有至少80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更高的同一性或相似性的多肽的工程化变体。此类工程化LAGLIDADG大范围核酸酶可以衍生自单体或二聚体大范围核酸酶。当衍生自二聚体大范围核酸酶时,此类工程化LAGLIDADG大范围核酸酶可以是单链或二聚体内切核酸酶。

[0278] 所谓“I-CreI”是指具有pdb登录号1g9y的序列的天然野生型I-CreI大范围核酸

酶。

[0279] 大范围核酸酶的DNA识别和裂解功能通常在单个结构域中错综复杂。与大范围核酸酶不同,基于ZFN的系统和基于TALEN的系统的DNA结合结构域与用于裂解功能的内切核酸酶不同。基于ZFN的系统包含:至少一种锌指蛋白或其变体,或者含有编码锌指蛋白或其变体的核苷酸序列作为其DNA结合结构域的核酸;以及内切核酸酶元件,例如锌指核酸酶(ZFN)或FokI裂解结构域。锌指蛋白(ZFP)是非天然存在的,因为它被工程改造成与选择的靶位点结合。参见例如Beerli等人(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo等人(2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan等人(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal等人(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo等人(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; 美国专利号6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; 和美国专利公开号2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061。

[0280] 与天然存在的锌指蛋白相比,工程化锌指结合结构域可具有新的结合特异性。工程化方法包括、但不限于合理设计和各种类型的选择。合理设计包括例如使用包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单个锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的锌指的一个或多个氨基酸序列相关联。参见例如共同拥有的美国专利6,453,242和6,534,261,通过引用整体并入本文。

[0281] 各种选择方法可以与本文的方法一起使用。包括噬菌体展示和双杂交系统在内的示例性选择方法公开于美国专利5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 和6,242,568; 以及WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197和GB 2,338,237。此外,对锌指结合结构域的结合特异性的增强例如在WO 02/077227中已进行了描述。此外,如在这些和其它参考文献中所公开的那样,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列连接在一起,所述接头序列包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,还可参见美国专利号6,479,626; 6,903,185; 和7,153,949。本文描述的蛋白质可以包括蛋白质的各个锌指之间的合适接头的任何组合。靶位点的选择; ZFP和用于设计和构建融合蛋白(和编码其的多核苷酸)的方法是本领域技术人员已知的,并且在美国专利号6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536和WO 03/016496中进行了详细描述。

[0282] 此外,如在这些和其它参考文献中所公开的那样,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列连接在一起,所述接头序列包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。对于长度为6个或更多个氨基酸的示例性接头序列,还可参见美国专利号6,479,626; 6,903,185; 和7,153,949。本文描述的蛋白质可以包括蛋白质的各个锌指之间的合适接头的任何组合。

[0283] 基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统是指采用一个或多个类转录激活因子效应物(TALE)-DNA结合结构域和内切核酸酶元件如FokI裂解结构域的基因组编辑系统。TALE-DNA结合结构域包含一个或多个TALE重复单元,每个TALE重复单元的长度为30-

38(例如,31、32、33、34、35或36)个氨基酸。TALE-DNA结合结构域可采用全长TALE蛋白或其片段,或其变体。TALE-DNA结合结构域可通过接头与内切核酸酶结构域融合或连接。

[0284] 术语“基于CRISPR的系统”、“基于CRISPR的基因编辑系统”、“CRISPR-基因组编辑”、“CRISPR-基因编辑”、“基于CRISPR-内切核酸酶的基因组编辑”等在本文中可互换使用,并且统称为基因组编辑系统,其包含一种或多种指导RNA元件;以及一种或多种RNA指导的内切核酸酶元件。指导RNA元件包含含有与一个或多个靶基因组区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列的靶向因子RNA(targeter RNA),或者含有编码靶向因子RNA的核苷酸序列的核酸。RNA指导的内切核酸酶元件包含通过指导RNA元件被导向或带到靶基因组区域的内切核酸酶;或者包含编码这种内切核酸酶的核苷酸序列的核酸。这种基于CRISPR的基因编辑系统的例子包括基于CRISPR的系统,即CRISPR-Cas系统或CRISPR-Cpf系统。

[0285] 本文中使用的术语“指导RNA元件”、“指导RNA”、“gRNA”、“gRNA分子”和“合成指导RNA”可互换使用,并且是指包含与靶核酸序列杂交的靶向因子RNA或者含有编码靶向因子RNA的核苷酸序列的核酸的多核苷酸序列。gRNA的靶向因子RNA包含靶向结构域,该靶向结构域包含与靶基因组区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列。短语“基本上互补”意指在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50个或更多个核苷酸的区域上互补程度为至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%,或者是指两个核酸在严格条件下杂交。

[0286] 指导RNA元件还可包含能够与靶向因子RNA杂交的激活因子RNA(activator RNA)或含有编码激活因子RNA的核苷酸序列的核酸。激活因子RNA和靶向因子RNA可经由接头环序列分离或融合为单个核酸,以形成单个gRNA分子。gRNA分子可包含许多结构域。例如,此类gRNA例如从5'至3'包含:靶向结构域(其与靶核酸互补)、第一互补结构域、连接结构域、第二互补结构域(与第一互补结构域互补)、近端结构域和任选的尾部结构域。参见W02015048557。

[0287] “第一互补结构域”与第二互补结构域具有基本互补性,并且可以在至少一些生理条件下形成双链区域。

[0288] “连接结构域”用于将单分子gRNA的第一互补结构域与第二互补结构域连接。连接结构域可以共价或非共价地连接第一互补结构域和第二互补结构域。

[0289] “近端结构域”的长度可为3-25个核苷酸,或者长度可为5-20个核苷酸。近端结构域可与天然存在的近端结构域共享同源性或由其衍生。

[0290] “尾部结构域”可以不存在,或者是长度为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸。尾部结构域可包含彼此互补并且在至少一些生理条件下形成双链区域的序列。

[0291] 指导RNA元件可以与RNA指导的内切核酸酶元件的内切核酸酶诸如Cas内切核酸酶形成复合物(“gRNA/核酸酶复合物”)。gRNA/核酸酶复合物的例子是下文关于基于CRISPR的系统所述的CRISPR复合物。在某些实施方案中,CRISPR复合物包含与靶向因子RNA复合的RNA指导的内切核酸酶系统的内切核酸酶。在某些实施方案中,CRISPR复合物包含与靶向因子RNA和激活因子RNA复合的RNA指导的内切核酸酶系统的内切核酸酶。

[0292] 靶向因子RNA的靶向结构域促进gRNA/核酸酶复合物特异性靶向或归巢至靶核苷酸序列。在某些实施方案中,靶向结构域可为10-30bp,诸如15-25bp、18-22bp或20bp。

[0293] 用于设计gRNA的方法是本领域已知的,包括用于选择、设计和验证靶结构域的方

法。参见例如W02015048577, Mali等人, 2013SCIENCE 339 (6121):823-826; Hsu等人, 2013NATBIOTECHNOL, 31 (9):827-32; Fu等人, 2014NATBTOTECHNOL, doi:10.1038/nbt.2808. PubMed PMID:24463574; Heigwer等人, 2014NAT方法11 (2):122-3. doi:10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID:24481216; Bae等人, 2014BIOTNFORMATICS PubMed PMID:24463181; Xiao A等人, 2014BIOINFORMATICS Pub Med PMID:24389662。

[0294] 在某些实施方案中, 可使用RNA指导的内切核酸酶, 诸如Cas酶或蛋白 (例如, II型Cas9蛋白) 或者Cpf酶或蛋白 (例如, Cpf1蛋白)。在某些实施方案中, 也可使用这种Cas或Cpf酶或蛋白的修饰形式。

[0295] 在某些实施方案中, 基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas系统。CRISPR-Cas系统包含: (a) 至少一种指导RNA元件或含有编码指导RNA元件的核苷酸序列的核酸, 该指导RNA元件包含靶向因子RNA和激活因子RNA, 所述靶向因子RNA含有与一个或多个靶基因组区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列, 所述激活因子RNA含有能够与靶向因子RNA杂交的核苷酸序列; 以及 (b) 包含Cas蛋白的Cas蛋白元件或包含编码Cas蛋白的核苷酸序列的核酸。靶向因子RNA和激活因子RNA可以分开或融合在一起以形成单个RNA。

[0296] 在某些实施方案中, 基于CRISPR的系统包括1类CRISPR和/或2类CRISPR系统。1类系统采用若干种Cas蛋白以及作为靶向因子RNA的CRISPR RNA (crRNA), 以构建功能性内切核酸酶。2类CRISPR系统采用单个Cas蛋白和作为靶向因子RNA的crRNA。2类CRISPR系统 (包括基于II型Cas9的系统) 包含单个Cas蛋白而不是1类系统采用的多亚基复合物来介导裂解。基于CRISPR的系统还包括II类V型CRISPR系统, 该系统使用Cpf1蛋白和作为靶向因子RNA的crRNA。

[0297] Cas蛋白是CRISPR相关 (Cas) 双链核酸酶。在某些实施方案中, CRISPR-Cas系统包含Cas9蛋白。在某些实施方案中, Cas9蛋白是SaCas9、SpCas9、SpCas9n、Cas9-HF、Cas9-H840A、FokI-dCas9或D10A切口酶。术语“Cas蛋白”诸如Cas9蛋白包括野生型Cas蛋白或其功能衍生物 (例如具有核酸酶活性的野生型Cas蛋白的截短形式或变体)。

[0298] 在某些实施方案中, 可使用来自除酿脓链球菌 (*S. pyogenes*) 和嗜热链球菌 (*S. thermophiles*) 之外的菌种 (species) 的Cas9蛋白。可获得并在本文中使用的另外的Cas9蛋白菌种包括: 燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、猪放线杆菌 (*Actinobacillus suis*)、放线菌属的种 (*Actinomyces* sp.)、*cycliphilus denitrificans*、少食氨基单胞菌 (*Aminomonas paucivorans*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、史氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、拟杆菌属的种 (*Bacteroides* sp.)、*Blastopirellula marina*、慢生根瘤菌属的种 (*Bradyrhizobium* sp.)、侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*)、结肠弯曲菌 (*Campylobacter coli*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、海鸥弯曲菌 (*Campylobacter lari*)、*Candidatus Puniceispirillum*、解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、拥挤棒状杆菌 (*Corynebacterium accolens*)、细长棒状杆菌 (*Corynebacterium dolichum*)、马氏棒状杆菌 (*Corynebacterium matruchotii*)、恒雄芝氏沟鞭藻玫瑰杆菌 (*Dinoroseobacter shibae*)、细长真杆菌 (*Eubacterium dolichum*)、 γ 变形菌 (*gamma proteobacterium*)、重氮

营养葡萄糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、*Haemophilus parainfluenzae*、生痰嗜血杆菌 (*Haemophilus sputorum*)、加拿大螺杆菌 (*Helicobacter canadensis*)、同性恋螺杆菌 (*Helicobacter cinaedi*)、鼬鼠螺杆菌 (*Helicobacter mustelae*)、营养泥杆菌 (*Illyobacter polytropus*)、金格氏杆菌 (*Kingella kingae*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、伊氏李斯特菌 (*Listeria ivanovii*)、单核细胞增多性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、李斯特氏菌科菌 (*Listeriaceae bacterium*)、甲基孢囊菌属的种 (*Methylocystis* sp.)、发孢甲基弯曲菌 (*Methylosinus trichosporium*)、羞怯动弯杆菌 (*Mobiluncus mulieris*)、杆状奈瑟氏菌 (*Neisseria bacilliformis*)、灰色奈瑟氏菌 (*Neisseria cinerea*)、浅黄奈瑟氏菌 (*Neisseria flavescens*)、乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、奈瑟氏菌属的种 (*Neisseria* sp.)、沃氏奈瑟氏菌 (*Neisseria wadsworthii*)、亚硝化单胞菌属的种 (*Nitrosomonas* sp.)、食清洁剂细小棒菌 (*Parvibaculum lavamentivorans*)、多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*)、*Phascolarctobacterium succinatutellii*、蒲桃雷尔氏菌 (*Ralstonia syzygii*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)、小红卵菌属的种 (*Rhodovulum* sp.)、米氏西蒙斯氏菌 (*Simonsiella muelleri*)、鞘氨醇单胞菌属的种 (*Sphingomonas* sp.)、*Sporolactobacillus vineae*、路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*)、链球菌属的种 (*Streptococcus* sp.)、罕见小球菌属的种 (*Subdoligranulum* sp.)、运动替斯崔纳菌 (*Tistrella mobilis*)、密螺旋体属的种 (*Treponema* sp.) 或艾森虹蛔肾杆菌 (*Verminephrobacter eiseniae*)。

[0299] 在某些实施方案中,基于CRISPR的系统的一种或多种元件衍生自I型、II型或III型CRISPR系统。

[0300] 在某些实施方案中,基于CRISPR的系统的一种或多种元件衍生自包含内源CRISPR系统的特定生物体,诸如酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、普雷沃菌属的种 (*Prevotella* sp.)、氨基酸球菌属的种 (*Acidaminococcus* sp.) 和毛螺菌属的种 (*Lachnospiraceae* sp.)。通常,基于CRISPR的系统通过促进在靶基因组区域或靶序列 (在内源CRISPR系统的上下文中也称为原型间隔序列 (protospacer)) 的位点处形成CRISPR复合物的元件来表征。在形成CRISPR复合物的上下文中,“靶序列”是指指导序列被设计成与其具有基本互补性的序列,其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。不一定需要完全互补,只要有足够的互补性引起杂交并促进CRISPR复合物的形成即可。靶序列可包含任何多核苷酸,诸如DNA或RNA多核苷酸。在某些实施方案中,靶序列位于细胞的细胞核或细胞质中。在某些实施方案中,靶序列可以在真核细胞的细胞器诸如线粒体或叶绿体内。

[0301] 可用于重组到包含靶序列的靶向基因座中的序列或模板被称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。外源模板多核苷酸可被称为编辑模板或供体模板。在某些实施方案中,可以使用来自合成或生物学起源的单链DNA和双链DNA。作为非限制性例子,合适的编辑模板包括ssODN、dsODN、PCR产物、质粒和病毒,包括AAV、腺病毒、逆转录病毒、慢病毒等。另外的编辑模板也是可行的。在某些实施方案中,重组是同源重组。

[0302] 在某些实施方案中,基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas9系统。CRISPR-Cas9系统的靶向因子RNA包含CRISPR靶向因子RNA (crRNA),并且CRISPR-Cas 9系统的激活因子RNA包含

反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)。CRISPR-Cas9系统的Cas蛋白元件采用Cas9蛋白。crRNA和tracrRNA可以分开或经由接头环序列组合成单个RNA构建体。这种组合的RNA构建体被称为单指导RNA(sgRNA;或指导RNA)。

[0303] 关于CRISPR-Cas系统的一般信息、其组分和这些组分的递送(包括方法、材料、递送媒介物、载体、颗粒、AAV及其制备和使用,包括关于量和配制),可见于:美国专利号8,999,641,8,993,233,8,945,839,8,932,814,8,906,616,8,895,308,8,889,418,8,889,356,8,871,445,8,865,406,8,795,965,8,771,945和8,697,359;美国专利公开US 2014-0310830,US 2014-0287938 A1,US 2014-0273234 A1,US2014-0273232 A1,US 2014-0273231,US 2014-0256046 A1,US 2014-0248702 A1,US 2014-0242700 A1,US 2014-0242699 A1,US 2014-0242664 A1,US 2014-0234972 A1,US 2014-0227787 A1,US 2014-0189896 A1,US 2014-0186958,US 2014-0186919 A1,US 2014-0186843 A1,US 2014-0179770 A1和US 2014-0179006 A1,US 2014-0170753;欧洲专利EP 2 784 162 B1和EP 2 771 468 B1;欧洲专利申请EP 2 771 468(EP13818570.7),EP 2 764 103(EP13824232.6),和EP 2 784 162(EP14170383.5);和PCT专利公开WO 2014/093661,WO 2014/093694,WO 2014/093595,WO 2014/093718,WO 2014/093709,WO 2014/093622,WO 2014/093635,WO 2014/093655,WO 2014/093712,WO2014/093701,WO2014/018423,WO 2014/204723,WO 2014/204724,WO 2014/204725,WO 2014/204726,WO 2014/204727,WO 2014/204728,WO 2014/204729,和WO2016/028682。

[0304] 在某些实施方案中,基于CRISPR的系统是CRISPR-Cpf系统。“CRISPR-Cpf系统”包含:(a)至少一种指导RNA元件或含有编码指导RNA元件的核苷酸序列的核酸,该指导RNA包含靶向因子RNA,所述靶向因子RNA具有与靶核酸的基因座处的核苷酸序列互补的核苷酸序列;以及(b)Cpf蛋白元件或含有编码Cpf蛋白元件的核苷酸序列的核酸。

[0305] Cpf蛋白元件的例子包括Cpf1核酸酶,诸如弗朗西斯氏菌属(*Francisella*) Cpf1(FnCpf1)及其任何变体。参见例如Zetsche等人,“Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2CRISPR-Cas system,”*Cell*,163(3):第759-71页;以及Fonfara等人,“The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA,”*Nature* 532(7600):第517-21页。Cpf1的优选PAM是5'-TTN,在基因组位置和GC含量方面不同于Cas9(3'-NGG)。CRISPR-Cpf系统可能不采用激活因子RNA(tracrRNA)。Cpf1及其指导RNA通常小于它们的SpCas9对应物。Cpf1基因座包含混合的 α/β 结构域、后接螺旋区的RuvC-I、RuvC-II和锌指状结构域。Cpf1蛋白具有RuvC样内切核酸酶结构域,类似于Cas9的RuvC结构域。此外,Cpf1不具有HNH内切核酸酶结构域,并且Cpf1的N末端不具有Cas9的 α -螺旋识别叶。Cpf1基因座编码更类似于I型和III型而非II型系统的Cas1、Cas2和Cas4蛋白。Cpf1家族蛋白可见于许多细菌菌种中。

[0306] 不受特定理论的束缚,CRISPR-Cpf系统采用Cpf1-crRNA复合物,与Cas9靶向的富含G的PAM相比,其通过识别原型间隔序列相邻基序5'-YTN-3'(其中“Y”为嘧啶,“N”为任何核碱基)或5'-TTN-3来裂解靶DNA或RNA。识别PAM后,Cpf1引入了具有4或5个核苷酸突出端的粘性末端样DNA双链断裂。

[0307] 在某些实施方案中,基因组编辑系统是基于NgAgo的系统。基于NgAgo的系统包含至少一种指导DNA元件或含有编码指导DNA元件的核苷酸序列的核酸;以及DNA指导的内切核

酸酶。基于NgAgo的系统采用DNA作为指导元件。其作用原理类似于CRISPR-Cas9技术,但其指导元件是CRISPR-Cas9技术中的一段指导DNA(dDNA)而非gRNA。DNA指导的内切核酸酶的例子是来自格氏嗜盐碱杆菌(*Natronobacterium gregoryi*)的Argonaute内切核酸酶(NgAgo)。参见例如Feng Gao等人,“DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute,”*Nature Biotechnology*, (2016):doi:10.1038/nbt.3547。

[0308] 所谓“接头”、“肽接头”或“肽间隔物”旨在表示允许融合蛋白中不同单体连接并且采用所述融合蛋白活性的正确构象的肽序列,它不会改变任一种单体的活性。肽接头可具有作为非限制性指示范围的1、2、3、4、5、10、15、20、30、40至50个氨基酸或该范围内的任何中间值的各种大小。

[0309] 用于提高基因组编辑效率的DNA-PK抑制剂

[0310] 通过向细胞施用本文所述的一种或多种化合物(例如,DNA-PK抑制剂)和基因组编辑系统,可以提高靶向基因组编辑效率。适合使用的基因组编辑系统包括例如基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。本公开内容的方法、组合物和试剂盒提供了用于提高基因组编辑效率的DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统。在某些实施方案中,在向细胞施用DNA-PK抑制剂之后,HDR基因组编辑效率得到提高。

[0311] 在某些实施方案中,基因组编辑系统是基于CRISPR的基因组编辑系统。基于CRISPR的基因组编辑系统可以是CRISPR-Cas系统或其变体。CRISPR-Cas系统可以使用任何Cas内切核酸酶,诸如Cas9内切核酸酶及其变体。Cas9内切核酸酶的例子包括Cas9内切核酸酶或其变体,诸如SaCas9、SpCas9、SpCas9n、Cas9-HF、Cas9-H840A、FokI-dCas9或CasD10A切口酶。Cas内切核酸酶可以是野生型、工程化的或切口酶突变体,或其任何变体。

[0312] 在某些实施方案中,基于CRISPR的基因组编辑系统包括CRISPR序列、反式激活cr(tracr)序列、指导序列和Cas内切核酸酶或者它们的任何组合。

[0313] 在某些实施方案中,基于CRISPR的基因组编辑系统包括含有CRISPR序列的RNA(crRNA)、含有反式激活cr(tracr)序列的RNA(tracrRNA)和Cas内切核酸酶或者它们的任何组合。

[0314] 在某些实施方案中,基于CRISPR的基因组编辑系统包括CRISPR序列、指导序列和Cas内切核酸酶或Cpf内切核酸酶或者它们的任何组合。

[0315] 在某些实施方案中,基于CRISPR的基因组编辑系统是CRISPR-Cpf系统。Cpf核酸酶是2类CRISPR-Cas系统内切核酸酶。Cpf是单个RNA指导的内切核酸酶。Cpf核酸酶可以是野生型、工程化的或切口酶突变体,或其任何变体。参见例如Zetsche等人,“CPF1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System,”*Cell*, 163(3):759-71。在某些实施方案中,Cpf核酸酶是Cpf 1内切核酸酶。

[0316] 在某些实施方案中,基因组编辑系统是基于大范围核酸酶的系统。基于大范围核酸酶的基因组编辑使用识别大DNA靶位点(例如,通常约>12bp)的序列特异性内切核酸酶。参见例如U.S. 9,365,964。大范围核酸酶可以裂解独特的染色体序列,而不影响总体基因组完整性。在某些实施方案中,大范围核酸酶可以是归巢内切核酸酶。在某些实施方案中,大范围核酸酶可以是内含子内切核酸酶或内含肽内切核酸酶。归巢内切核酸酶可以属于

LAGLIDADG家族。大范围核酸酶可以是野生型、工程化的或切口酶突变体。

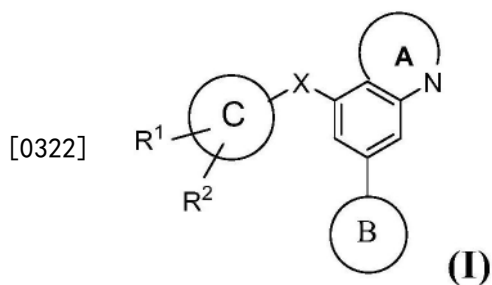
[0317] 在某些实施方案中,基因编辑系统是基于锌指核酸酶(ZFN)的系统。ZFN是基于锌指DNA结合结构域与DNA裂解结构域之间的融合而工程化的人工限制酶。参见例如U.S.9,145,565。

[0318] 在某些实施方案中,基因编辑系统是基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)。TALEN是工程化限制酶,其通过TAL效应物DNA结合结构域与DNA裂解结构域的融合而制备。参见例如U.S.9,181,535。

[0319] 在某些实施方案中,基因编辑系统是基于Argonaute的系统。基于Argonaute的基因编辑系统包括Argonaute衍生的内切核酸酶和5'磷酸化ssDNA。在某些实施方案中,磷酸化ssDNA的长度可为10-40个核苷酸、15-30个核苷酸或18-30个核苷酸(例如,约24个核苷酸)。在某些实施方案中,Argonaute内切核酸酶可以是任何内切核酸酶。在某些实施方案中,Argonaute内切核酸酶衍生自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) (TtAgo)、焦酚火球菌(*Pyrococcus furiosus*) (PfAgo)或格氏嗜盐碱杆菌(NgAgo)。在某些实施方案中,格氏嗜盐碱杆菌(NgAgo)是菌株2(即格氏嗜盐碱杆菌SP2)。在某些实施方案中,Argonaute内切核酸酶是NgAgo。参见例如Gao等人,“DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute,”*Nature Biotechnology*,2016年5月。

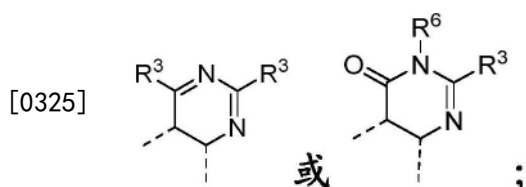
[0320] DNA-PK抑制剂可以是任何DNA-PK抑制剂。DNA-PK抑制剂可以是引起DNA-PK抑制的任何化合物或物质。DNA-PK抑制剂可以是化合物、小分子、抗体或核苷酸序列。在某些实施方案中,DNA-PK抑制剂是由式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A)和(V-B)表示的化合物。

[0321] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种编辑一个或多个靶基因组区域的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:

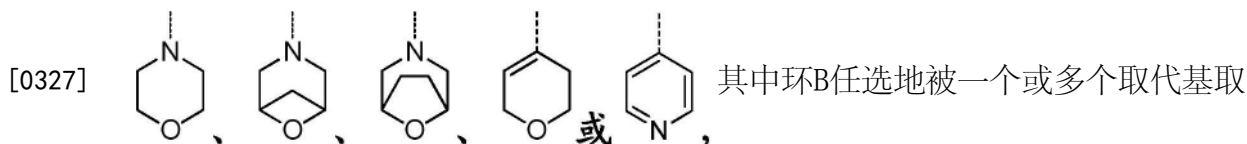


[0323] 其中R¹、R²、X、环A、环B和环C中的每一个独立地如本文别处所定义。

[0324] 环A是选自以下的芳族环系



[0326] 环B是选自以下的环系



代,所述取代基选自-F、-OH和 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基的取代基取代;

[0328] 环C是 C_{4-6} 环烷基、5-6元杂芳基或苯基,其中环C任选地被一个或多个取代基进一步取代,所述取代基选自卤素、 C_{1-2} 烷基、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0329] X是-NH-、-O-、- OC_{1-4} 烷基-、-S-或- CH_2 -;

[0330] R^1 和 R^2 中的每一个独立地是氢、-C(O)NHR⁴、-C(O)OR⁴、-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴、- C_{1-4} 烷基-NHR⁴、-OR⁴或R⁷,其中 R^1 和 R^2 不可同时是氢;

[0331] 每个 R^3 独立地是氢、- C_{1-4} 烷基、卤素、- OC_{1-2} 烷基、-C(O)OH、-C(O) OC_{1-2} 烷基、-CN、-C(O)NHC₁₋₂烷基、-C(O)NH₂、 C_{3-4} 环烷基或-NRR',其中所述 R^3 烷基和环烷基中的每一个独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、-OH和- OC_{1-2} 烷基;

[0332] 每个 R^4 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-10元杂环基,其中所述 R^4 基团中的每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-Br、-Cl、-F、 C_{1-4} 烷基、CN、NO₂、 C_{2-4} 烯基、 C_{2-4} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基-O- C_{1-4} 烷基、 C_{0-4} 烷基-O- C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、C(O) OC_{1-4} 烷基、C(O) OC_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基、 C_{0-4} 烷基-C(O)NH₂、C(O)NHC₁₋₄烷基、C(O)N(C_{1-4} 烷基)₂、C(O)NH(C_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基)、CH₂OR⁵、 C_{0-4} 烷基-C(O)R⁵、 C_{0-4} 烷基-C(O)N(R⁵)₂、 C_{0-4} 烷基-C(O)OR⁵、 C_{0-4} 烷基-NHC(O)R⁵、 C_{0-4} 烷基-N(R⁵)₂、5-6元杂环基、-O(C_{1-4} 烷基)OR⁵、-OR⁵和氧代,且其中所述任选的 R^4 取代基中的每一个任选地且独立地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-4} 烷基、-OH、- OC_{1-4} 烷基、-SC₁₋₄烷基、-C(O) C_{1-4} 烷基、-C(O) OC_{1-4} 烷基和-C(O) OC_{0-4} 烷基- C_{3-5} 环烷基;和

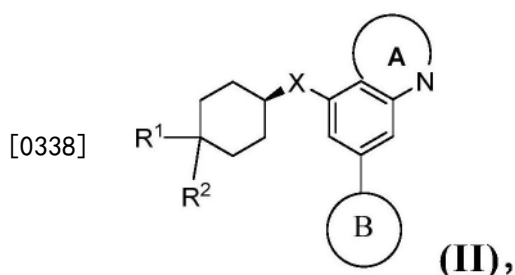
[0333] 每个 R^5 独立地是氢、 C_{1-4} 烷基、苯基、5-6元杂芳基或4-7元杂环基,其中每个 R^5 独立地任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN、-OH、- OC_{1-2} 烷基、5-6元杂芳基和4-7元杂环基,或2个 R^5 基团与插入氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环;和

[0334] R^6 是氢或 C_{1-4} 烷基,所述 C_{1-4} 烷基任选地被一个或多个选自-F、-Cl、-CH₂OH、-CN、-OH和- OC_{1-2} 烷基的取代基取代;

[0335] R^7 是6-10元芳基、5-10元杂芳基或4-7元杂环基,其中每一个任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自-F、-Cl、 C_{1-2} 烷基、-CH₂OH、-CN和-OR;和

[0336] R和R'中的每一个独立地是氢或 C_{1-4} 烷基,或者R和R'与它们所连接的氮原子一起任选地形成吗啉环、氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或哌嗪环。

[0337] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种编辑一个或多个靶基因组区域的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(II)表示的化合物或其药学上可接受的盐:

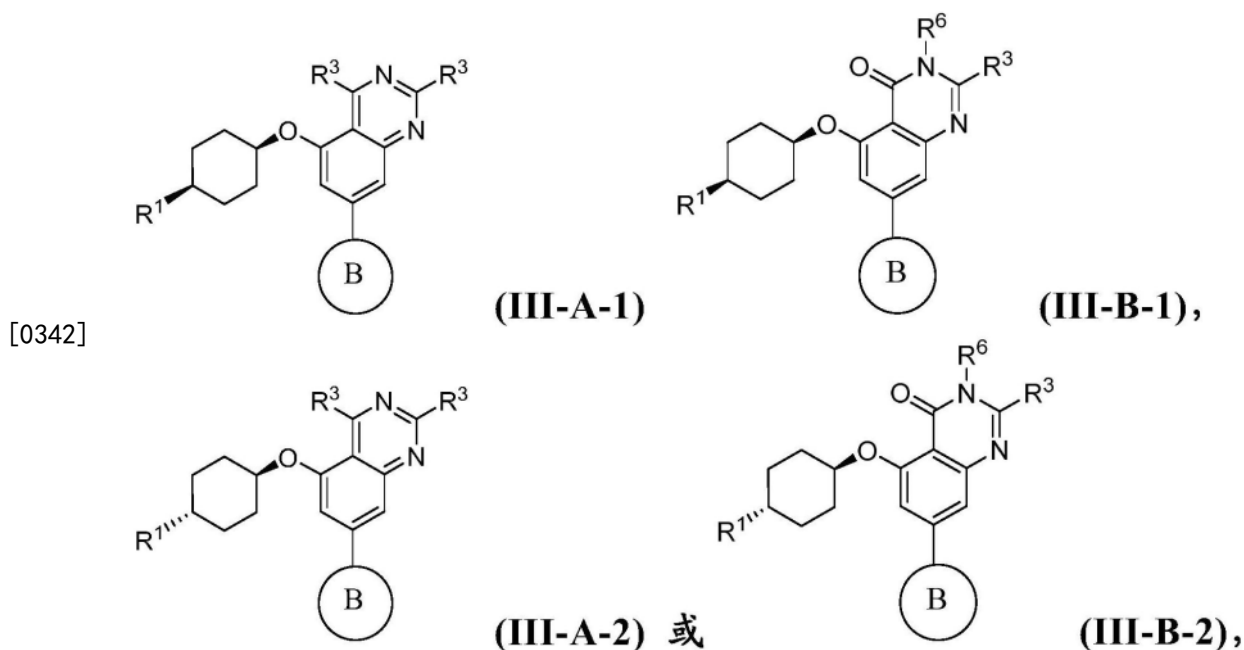


其中式 (II) 的变量每个独立地如下所述。

[0339] 在式 (II) 的第一组变量中, 式 (II) 的每个变量独立地如上面在式 (I) 的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0340] 在式 (II) 的第二组变量中, R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ; 且 R^2 是氢。式 (I) 的其余变量每个且独立地如在式 (I) 的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0341] 在某些实施方案中, 本公开内容提供了一种编辑一个或多个靶基因组区域的方法, 该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式 (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 表示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0343] 其中式 (II) 的变量每个独立地如下所述。

[0344] 在式 (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 的第一组变量中, (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 的每个变量独立地如上面在式 (I) 的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

[0345] 在式 (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 的第二组变量中, R^1 是 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ; 且式 (I) 的其余变量每个且独立地如在式 (I) 的第一组至第二十七组变量中的任一组中所述。

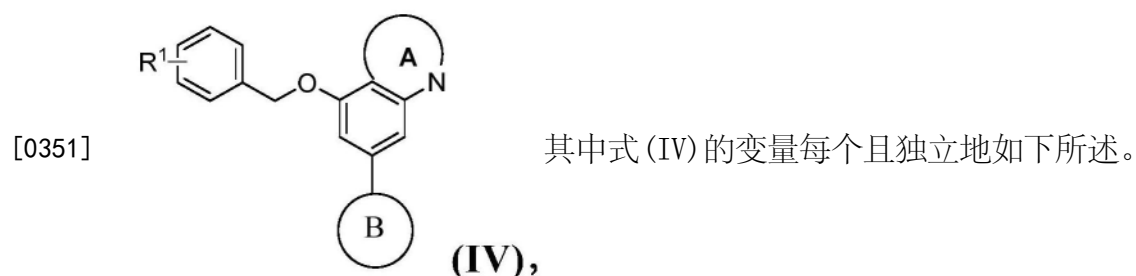
[0346] 在式 (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 的第三组变量中, R^1 是 $-C_{1-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-NHR^4$ 或 $-OR^4$; 且式 (I) 的其余变量每个且独立地如在 (III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1) 或 (III-B-2) 的第一组或第二组变量中的任一组中所述。

[0347] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第四组变量中, R^1 是 $-NHR^4$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第三组变量中的任一组中所述。

[0348] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第五组变量中, R^1 是 $-OR^4$;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第四组变量中的任一组中所述。

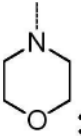
[0349] 在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第六组变量中, R^3 独立地是氢、甲基、 $-Cl$ 、 $-OCH_3$ 、 $-CN$ 、环丙基、 $-NHCH_3$ 或 $-N(CH_3)_2$; R^6 是氢或甲基;且式(I)的其余变量每个且独立地如在式(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)或(III-B-2)的第一组至第五组变量中的任一组中所述。

[0350] 在另一个实施方案中,本发明的化合物是由式(IV)表示或其药学上可接受的盐:



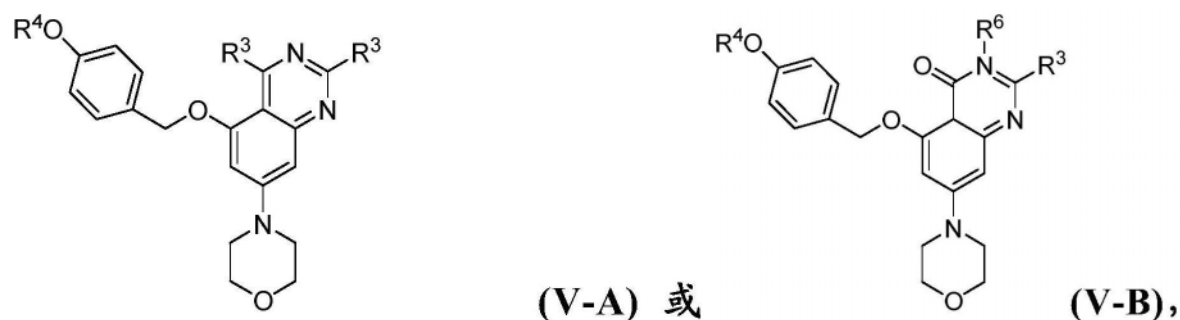
[0352] 在式(IV)的第一组变量中,每个变量独立地如在式(I)的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0353] 在式(IV)的第二组变量中, R^1 是氢、 $-C(O)NHR^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)R^4$ 、 $-NHC(O)OR^4$ 、 $-NHC(O)NHR^4$ 、 $-NHS(O)_2R^4$ 、 $-C_{0-4}$ 烷基- NHR^4 、 $-OR^4$ 或 R^7 ;且式(IV)的其余变量每个且独立地如在式(I)的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0354] 在式(IV)的第三组变量中,环B是任选取代的 ; 且式(IV)的其余变量每个且

独立地如在式(IV)的第一组或第二组变量中所述。

[0355] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种编辑一个或多个靶基因组区域的方法,该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式(V-A)或(V-B)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0356] 其中式(V-A)或(V-B)的变量中的每一个独立地如下所述。

[0357] 在式(V-A)或(V-B)的第一组变量中,每个变量独立地如在式(I)的第一组至第三

十组变量中的任一组中所述。

[0358] 在式 (V-A) 或 (V-B) 的第二组变量中, R^3 是氢、甲基、环丙基、-F、-Cl、-OC₁₋₂烷基、-NRR' 或 -CN, 其中所述 R^3 烷基中的每一个任选地被一个或多个取代基取代, 所述取代基选自 -F、-OH 和 -O (C₁₋₂烷基); 每个 R^4 独立地是任选取代的 C₁₋₄烷基, 其任选地被一个或多个选自 -F、-OH 和 -O (C₁₋₂烷基) 的取代基取代; 且 R 和 R' 每个且独立地是氢或 C₁₋₂烷基。式 (V-A) 或 (V-B) 的其余变量每个且独立地如在式 (I) 的第一组至第三十组变量中的任一组中所述。

[0359] 在式 (V-A) 或 (V-B) 的第三组变量中, 每个 R^3 独立地是氢、甲基、-Cl、-OCH₃、-CN、环丙基、-NHCH₃ 或 -N(CH₃)₂; 和 R^6 是氢或甲基。式 (V-A) 或 (V-B) 的其余变量每个且独立地如在式 (V-A) 或 (V-B) 的第一组或第二组变量中所述。

[0360] 在另一个实施方案中, 本发明的化合物是由式 (I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A) 和 (V-B) 中的任一个表示, 或其药学上可接受的盐, 其中这些式的变量中的每一个独立地如在表1和2的结构式中所述。

[0361] 在某些实施方案中, 本公开内容也提供了一种经由同源性定向修复 (HDR) 途径修复一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的方法, 该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式 (I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A) 和 (V-B) 表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0362] 所述基因组编辑系统与靶基因组区域的核酸相互作用, 导致DNA断裂, 且其中所述DNA断裂至少部分地经由HDR途径修复。

[0363] 在某些实施方案中, 本公开内容也提供了一种抑制或遏制经由NHEJ途径对一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的修复的方法, 该方法包括向具有一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统由式 (I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A) 和 (V-B) 表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0364] 所述基因组编辑系统与一个或多个靶基因组区域的核酸相互作用, 导致DNA断裂, 并且其中经由NHEJ途径的DNA断裂的修复被抑制或遏制。

[0365] 在某些实施方案中, 本公开内容也提供了一种修饰一个或多个基因或蛋白的表达的方法, 该方法包括向包含一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用基因组编辑系统和由式 (I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A) 和 (V-B) 表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0366] 所述基因组编辑系统与靶基因的一个或多个靶基因组区域的核酸相互作用, 导致编辑所述一个或多个靶基因组区域, 并且其中所述编辑修饰与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达。

[0367] 在某些实施方案中, 所述DNA断裂包括DNA双链断裂 (DSB)。

[0368] 在某些实施方案中, 所述化合物是共晶, 其包括具有式 (I) 的结构化合物和选自己二酸、柠檬酸、富马酸、马来酸、琥珀酸或苯甲酸的共晶形成剂。

[0369] 在某些实施方案中, 与在其它方面相同但没有所述化合物的情况下的一个或多个细胞相比, 在一个或多个细胞中编辑靶基因组区域的效率增加。

[0370] 在某些实施方案中, 与在其它方面相同但没有所述化合物的情况下的一个或多个细胞相比, 经由HDR途径对一个或多个细胞中的靶基因组区域处的DNA断裂的修复的效率增加。

[0371] 在某些实施方案中,与在其它方面相同但没有所述化合物的情况下的一个或多个细胞相比,抑制或遏制经由NHEJ途径对一个或多个细胞中的靶基因组区域处的DNA断裂的修复的效率增加。

[0372] 在某些实施方案中,与在其它方面相同但没有所述化合物的情况下的一个或多个细胞相比,所述效率增加了至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍或100倍。

[0373] 在某些实施方案中,通过靶向多核苷酸整合的频率测量效率。在某些实施方案中,通过靶向诱变的频率测量效率。在某些实施方案中,靶向诱变包括点突变、缺失和/或插入。

[0374] 在某些实施方案中,与施用前一个或多个细胞中的基线表达水平相比,与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达增加。例如,与施用前一个或多个细胞中的基线表达水平相比,所述表达增加了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍或10倍。

[0375] 在某些实施方案中,与施用前一个或多个细胞中的基线表达水平相比,与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达减少。例如,与施用前一个或多个细胞中的基线表达水平相比,所述基因表达减少了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0376] 在某些实施方案中,在一个或多个细胞中基本上消除了与靶基因有关的下游基因和/或蛋白的表达。

[0377] 在某些实施方案中,细胞在S或G2细胞周期阶段同步化。

[0378] 在某些实施方案中,与未施用或未接触所述化合物的一个或多个细胞相比,施用或接触所述化合物的一个或多个细胞具有增加的存活率。

[0379] 在某些实施方案中,将基因组编辑系统和化合物同时施用进一个或多个细胞中。在某些实施方案中,将基因组编辑系统和化合物依序施用进一个或多个细胞中。在某些实施方案中,将基因组编辑系统在化合物之前施用进一个或多个细胞中。在某些实施方案中,将化合物在基因组编辑系统之前施用进一个或多个细胞中。

[0380] 在某些实施方案中,一个或多个细胞是培养的细胞。在某些实施方案中,一个或多个细胞是生物体内的体内细胞。在某些实施方案中,一个或多个细胞是来自生物体的离体细胞。

[0381] 在某些实施方案中,生物体是哺乳动物。在某些实施方案中,生物体是人。

[0382] 在某些实施方案中,基因组编辑系统和化合物经由相同途径施用。在某些实施方案中,基因组编辑系统和化合物经由不同途径施用。在某些实施方案中,静脉内施用基因组编辑系统,并且口服施用化合物。

[0383] 在某些实施方案中,基因组编辑系统选自基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。

[0384] 在某些实施方案中,所述基因组编辑系统是基于CRISPR的系统。在某些实施方案中,所述基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas系统或CRISPR-Cpf系统。

[0385] 在某些实施方案中,所述基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas系统且其中所述CRISPR-Cas系统包括:(a)至少一种指导RNA元件,其包含:(i)含有与一个或多个靶基因组

区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列的靶向因子RNA,或含有编码靶向因子RNA的核苷酸序列的核酸;(ii)以及含有能够与靶向因子RNA杂交的核苷酸序列的激活因子RNA,或含有编码激活因子RNA的核苷酸序列的核酸;以及(b)包含Cas蛋白的Cas蛋白元件或包含编码Cas蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0386] 在某些实施方案中,所述靶向因子RNA和激活因子RNA融合为单个分子。

[0387] 在某些实施方案中,所述Cas蛋白是II型Cas9蛋白。在某些实施方案中,所述Cas9蛋白是SaCas9、SpCas9、SpCas9n、Cas9-HF、Cas9-H840A、FokI-dCas9或D10A切口酶或它们的任意组合。

[0388] 在某些实施方案中,所述基于CRISPR的系统是CRISPR-Cpf系统且所述CRISPR-Cpf系统包括:(a)至少一种指导RNA元件或包含编码所述指导RNA元件的核苷酸序列的核酸,所述指导RNA包含靶向因子RNA,所述靶向因子RNA含有与一个或多个靶基因组区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列;以及(b)Cpf蛋白元件,其包含Cpf蛋白或含有编码Cpf蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0389] 在某些实施方案中,所述基因组编辑系统由一种或多种载体递送。

[0390] 在某些实施方案中,所述一种或多种载体选自病毒载体、质粒或ssDNA。

[0391] 在某些实施方案中,所述病毒载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒载体。

[0392] 在某些实施方案中,所述基因组编辑系统通过合成RNA递送。

[0393] 在某些实施方案中,所述基因组编辑系统通过纳米制剂递送。

[0394] 在某些实施方案中,提供了用于编辑一个或多个靶基因组区域的试剂盒或组合物。在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物包括基因组编辑系统;和由式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A)和(V-B)表示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0395] 在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基因组编辑系统是基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基因组编辑系统是基于CRISPR的系统。在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas系统或CRISPR-Cpf系统。

[0396] 在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基于CRISPR的系统是CRISPR-Cas系统且其中所述CRISPR-Cas系统包括:(a)至少一种指导RNA元件,其包含:(i)含有与一个或多个靶基因组区域处的核苷酸序列基本上互补的核苷酸序列的靶向因子RNA,或含有编码靶向因子RNA的核苷酸序列的核酸;(ii)以及含有能够与靶向因子RNA杂交的核苷酸序列的激活因子RNA,或含有编码激活因子RNA的核苷酸序列的核酸;以及(b)包含Cas蛋白的Cas蛋白元件或包含编码Cas蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0397] 在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的Cas蛋白是II型Cas9蛋白。在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的Cas9蛋白是SaCas9、SpCas9、SpCas9n、Cas9-HF、Cas9-H840A、FokI-dCas9或D10A切口酶或它们的任意组合。

[0398] 在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基于CRISPR的系统是CRISPR-Cpf系统,且其中所述CRISPR-Cpf系统包括:(a)含有与一个或多个靶基因组区域处的核苷酸序列

基本上互补的核苷酸序列的靶向因子RNA,或含有编码靶向因子RNA的核苷酸序列的核酸;以及(b)Cpf蛋白元件,其包含Cpf蛋白或含有编码Cpf蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0399] 在某些实施方案中,所述试剂盒或组合物的基因组编辑系统被包含或包装在一种或多种载体中。在某些实施方案中,所述一种或多种载体选自病毒载体、质粒或ssDNA。在某些实施方案中,所述病毒载体选自逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒载体。

[0400] 在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的条件相比,或与向细胞仅施用基因组编辑系统并且不施用DNA-PK抑制剂的条件相比,提高的基因组编辑效率为约1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍或100倍。

[0401] DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统、其试剂盒及组合物的应用

[0402] 其中特定基因组区域被精确改变的基因组编辑具有很大的治疗潜力。

[0403] 在某些实施方案中,本文提供了用于编辑一个或多个靶基因组区域的方法,用于经由HDR途径修复一个或多个靶基因组区域中的DNA断裂的方法,用于抑制或遏制一个或多个靶基因组中NHEJ介导的DNA断裂修复的方法,以及通过向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂来修饰一种或多种基因或蛋白质的表达的方法。

[0404] 在某些实施方案中,本文提供了修饰一种或多种基因或蛋白质的表达的方法,该方法包括向包含一个或多个靶基因组区域的一个或多个细胞施用本文描述的基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂,其中所述基因组编辑系统与靶基因的一个或多个靶基因组区域的核酸相互作用,导致编辑所述一个或多个靶基因组区域,并且其中所述编辑修饰与靶基因有关的下游基因和/或蛋白质的表达。

[0405] 基因组编辑系统可以是可编辑细胞中的靶基因组区域的任何基因组编辑系统。示例性基因组编辑系统在上文进行了详细描述且可以包括例如基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。

[0406] 一个或多个靶基因组区域的编辑的编辑包括细胞基因组的任何种类的遗传操纵或工程改造。一个或多个靶基因组区域的编辑可以包括由一种或多种内切核酸酶进行的细胞中基因组区域的插入、缺失或替换。基因组区域包含细胞中的遗传物质,例如DNA、RNA、多核苷酸和寡核苷酸。细胞中的基因组区域还包含细胞中包含的线粒体或叶绿体的基因组。

[0407] 在某些实施方案中,本文提供了治疗患有需要编辑受试者细胞中的一个或多个靶基因组区域的疾病或病症的受试者的方法,所述方法包括向一个或多个细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂。

[0408] 在某些实施方案中,本文提供的方法用于修饰途径中的基因、RNA分子、蛋白质、蛋白质组或下游蛋白质的表达。这种修饰可用于治疗获得性的或遗传性的或由于衰老过程引起的疾病、功能障碍、异常的生理稳态。本文中使用的术语“修饰”包括调节、增强、减少、增加、插入、缺失、敲除、敲入等。

[0409] 本领域的技术人员应当理解,获得性的或遗传性的或以其它方式获得的疾病涉及包括参与基因或蛋白质功能在内的稳态机制的失调。为此,技术人员可以使用本文提供的方法来调节、修饰、增强、减少或提供受试者中的其它方面的基因功能。

[0410] 修饰细胞中基因的表达和随后的蛋白质表达可通过本文提供的方法来实现,例如

通过在外显子、内含子、转录起始位点、启动子区域、增强子区域、沉默子区域、绝缘子区域、抗阻抑因子、翻译后调节元件、多腺苷酸化信号(例如最小poly A)、保守区域、转录因子结合位点或它们的任何组合的任一种中特异性编辑(例如,置换、插入或缺失,它们的任何组合)核酸序列来实现。

[0411] 在某些实施方案中,本文提供的方法、试剂盒和组合物用于治疗患有癌症的受试者。治疗患有癌症或癌症相关病症的受试者的方法包括向受试者的细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统。DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的施用可以是体内的或离体的。

[0412] 癌症可以是任何类型的癌症。癌症包括实体瘤,诸如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌、脑癌、黑素瘤和其它组织器官肿瘤,以及血细胞癌,诸如淋巴瘤和白血病,包括急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、T细胞淋巴瘤白血病和B细胞淋巴瘤。癌症可以包括黑素瘤、白血病、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、淋巴瘤、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病,以及胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、卵巢癌、子宫癌、睾丸癌、垂体癌、肾癌、胃癌、食道癌和直肠癌。

[0413] 在某些实施方案中,本文提供的方法、试剂盒和组合物用于治疗患有以下癌症中的任一种或多种的受试者:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、附件癌、星形细胞瘤、儿童小脑或大脑基底细胞瘤、胆管癌、肝外(见胆管癌)、膀胱癌、骨肿瘤、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干胶质瘤、脑癌、小脑星形细胞瘤脑肿瘤、大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤脑肿瘤、室管膜瘤脑肿瘤、成神经管细胞瘤脑肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤脑肿瘤、视觉传导通路和下丘脑神经胶质瘤脑肿瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特氏淋巴瘤、类癌肿瘤、儿童类癌肿瘤、胃肠道原发灶不明癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、宫颈癌、儿童期癌症、软骨肉瘤、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性骨髓增生性病症、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮样血管内皮瘤(EHE)、食道癌、尤文氏肿瘤家族的尤文氏肉瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼内黑色素瘤(眼癌)、成视网膜细胞瘤(眼癌)、胆囊癌、胃(胃的)癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、颅外、性腺外或卵巢生殖细胞瘤、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干的胶质瘤、胶质瘤、儿童大脑星形细胞瘤胶质瘤、儿童视觉传导通路和下丘脑神经胶质瘤、胃类癌、毛细胞白血病、头颈癌、心癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、儿童下丘脑和视觉传导通路胶质瘤、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、白血病、急性淋巴细胞白血病(又称急性淋巴细胞性白血病)、急性髓性白血病(又称急性骨髓性白血病)、慢性淋巴细胞白血病(又称慢性淋巴细胞性白血病)、慢性髓细胞性白血病(又称慢性骨髓白血病)、多毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、脂肪肉瘤、肝癌(原发性)、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金(除霍奇金之外的所有淋巴瘤的旧分类)淋巴瘤、原发性中枢神经系统巨球蛋白血症(瓦尔登斯特伦)、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤、成神经管细胞瘤、儿童黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、Merkel细胞癌、间皮瘤、成人恶性间皮瘤、儿童原发灶隐匿转移性鳞状颈癌、口腔癌、多发性内分泌肿瘤综合征多发性骨髓瘤/浆细胞瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、骨髓性白血病、慢性粒细胞白血病、成人急性髓性白血病、儿童多发性急性骨髓瘤

(骨髓瘤)、骨髓增生性病症、慢性粘液瘤、鼻腔癌和鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、少突神经胶质瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮-间质瘤)、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低度恶性潜在肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦癌和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体腺瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统性淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文肿瘤家族肉瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、Sézary综合征、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、Merkel细胞皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌-见皮肤癌(非黑色素瘤)、原发灶隐匿转移性鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(蕁样肉芽肿和Sézary综合征)、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、成人未知原发部位癌、儿童未知原发部位癌、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉传导通路和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(**Waldenström**macroglobulinemia)或肾母细胞瘤(肾癌)。

[0414] 在某些实施方案中,与癌症相关的示例性靶基因包括ABL1、ABL2、ACSL3、AF15Q14、AF1Q、AF3p21、AF5q31、AKAP9、AT1、AKT2、ALDH2、AL、AL017、APC、ARHGEF12、ARHH、ARID1A、ARID2、ARNT、ASPCR1、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、CEP1、CHCHD7、CHEK2、CHIC2、CHN1、CIC、Cin A、CLTC、CLTCL1、CMKOR1、CNOT3、COL1 A1、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、EVI1、EWSR1、EXT1、EXT2、EZH2、EZR、FACL6、FAM22A、FAM22B、FAM46C、1ANCA、EANCC、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、FBX01 1、FBXW7、FCGR2B、FEV、FGFR1、FGFR1OP、FGFR2、FGFR3、FTI、FIIIT、FIP1L1、FLU、FLJ27352、FLT3、FNBP1、FOX L2、FOX OIA、FOX O3A、FOXP1、FSTL3、FUBP1、FUS、FVT1、GAS7、GATA1、GATA2、GATA3、GMPS、GNA11、GNAQ、GNAS、GOLGA5、GOPC、GPC3、GPHN、GRAF、H3F3A、IICMOGT-1、IIEAB、HERPUD1、IIEY1、IIIP1、HIST1IT3B、IIIIST1II4I、IILF、HLXB9、HMGA1、HMGA2、HNRNPA2BI、HOOK3、HOXA11、HOXA13、HOXA9、HOXC11、HOXC13、HOXD11、HOXD13、HRAS、IIRPT2、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、Mλ P 2K4、MAX、MDM2、MDM4、MDS1、MDS2、MECT1、MED12、MEN1、MET、MITF、MKL1、MLF1、MLII1、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、NOTCH 1、NOTCH2、NPM1、NR4A3、NRAS、NSD1、NT5C2、NTRK1、NTRK3、NUMA1、NUP214、NUP98、OLIG2、OMD、P2RY8、PAFAH1B2、PALB 2、PAX3、PAX5、PAX7、PAX8、PBRM1、PBX1、PCM1、PCSK7、PDE4DIP、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、PERI、PIIF6、PHOX2B、PICALM、PIK3CA、PIK3R1、PIM1、PLAG 1、PML、PMS1、PMS2、PMX1、PNUTL1、POT1、POU2AF1、POU5F1、PPARG、PPP2R1A、PRCC、PRDM1、PRDM16、PRF1、PRKAR1 A、PRO1073、PSIP2、PTCH、PTEN、PTPN11、RAB5EP、RAC1、RAD51L1、RAF1、RALGDS、RANBP17、RAP1GDSI、RARA、RBI、RBM15、RECQL4、REL、RET、RNF43、ROS1、RPL10、RPL22、RPL5、RPN1、RUNDC2A、RUNX1、RUNXBP2、SBDS、SDC4、SDH5、SDHB、SDHC、SDHD、SEPT6、SET、SETBP1、SETD2、SF3B1、SFPQ、SFRS3、SH2B3、SH3GL1、SIL、SLC34A2、SLC45A3、SMARCA4、SMARCB1、SMARCE1、SMO、SOCS1、SOX2、SRGAP3、SRSF2、SSI8、SS18L1、SSH3BP1、SSX1、SSX2、SSX4、STAT3、STK11、STL、SUFU、SIJZ12、SYK、TAF15、TALI、TAL2、TCEA1、TCF1、TCF12、TCF3、TCF7L2、TCL1A、TCL6、TERT、TET2、TFE3、TFEB、TFG、TFPT、TFRC、THRAP3、TIF1、TLX1、TLX 3、TMPRSS2、TNFAIP3、TNFRSF14、TNFRSF17、TNFRSF6、TOPI、TP53、TPM3、TPM4、TPR、TRA、TRAF7、TRB、TRD、TRIM27、TRIM33、TRIP11、TSC1、TSC2、TSHR、TTL、U2AF1、USP6、VHL、VTUA、WAS、WHSC1、WHSC1L1、WIF1、WRN、WT1、WTX、WWTR1、XPA、XPC、XP01、YWHAE、ZNF145、ZNF198、ZNF278、ZNF331、ZNF384、ZNF521、ZNF9、ZRSR2或它们的任意组合。

[0415] 在某些实施方案中,本文提供的方法用于治疗患有遗传性病症的受试者。治疗患有遗传性疾病或病症或遗传性病症的受试者的方法包括向受试者的细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统。DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的施用可以是体内的或离体的。

[0416] 遗传性病症可以由染色体区域中的突变或复制(例如,由点突变、缺失、插入、移码、染色体复制或缺失)引起。遗传性病症可以是任何遗传性病症。

[0417] 在某些实施方案中,遗传性病症是22q11.2缺失综合征、Angelman综合征、卡纳万病、Charcot-Marie-Tooth病、色盲、猫叫综合征(Cri du chat)、唐氏综合征、杜氏肌营养不良症、血色病、血友病、Klinefelter综合征、多发性神经纤维瘤、苯丙酮尿症、多囊性肾病、Prader-Willi综合征、镰状细胞病、脊髓性肌萎缩症、脊髓性肌萎缩症、Tay-Sachs病、特纳综合征、血红蛋白病或它们的任何组合。

[0418] 在某些实施方案中,遗传性疾病是1p36缺失综合征、18p缺失综合征、21-羟化酶缺乏症、47XXX(三重X综合征)、47XXY(Klinefelter综合征)、5-ALA脱水酶缺乏卟啉病、ALA脱水酶缺乏症、5-氨基乙酰丙酸脱水酶缺乏卟啉病、5p缺失综合征、猫叫综合征(AKA5p综合征)、共济失调毛细血管扩张症(AKA AT)、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症(AAT)、血浆铜蓝蛋白缺乏症、II型软骨成长不全(ACG2)、软骨发育不全(ACH)、酸性 β -葡萄糖苷酶缺乏症、戈谢病(任何类型,例如1型、2型、3型)、尖头并指畸形(Apert)、Apert综合征、尖头并指畸形(任何类型,例如1型、2型、3型、5型)、Pfeiffer综合征、塔头畸形、急性脑性戈谢病、急性间歇性卟啉病(AIP)、ACY2缺乏症、阿尔茨海默病(AD)、Adelaide型颅缝早闭症、Muenke综合征、腺瘤性结肠息肉病、家族性腺瘤性息肉病、结肠腺瘤性息肉病、家族性腺瘤性息肉病(ADP)、腺苷酸琥珀酸裂解酶缺乏症、肾上腺疾病、肾上腺性征综合征、肾上腺脑白质营养不良、雄激素不敏感综合征(AIS)、黑尿症(AKU)、ALA脱水酶卟啉病、ALA-D卟啉病、ALA脱水酶缺乏症、Alagille综合征、白化病、尿黑酸尿症(黑尿症)、亚历山大病(黑尿症)、黑尿性褐黄病、 α -1

蛋白酶抑制剂疾病、 α -1相关肺气肿、 α -半乳糖苷酶A缺乏症、法布里病、综合征、亚历山大病(ALX)、釉质发育不全、氨基乙酰丙酸脱水酶缺乏症、氨基酰化酶2缺乏症、卡纳万病、Anderson-Fabry病、雄激素不敏感综合征、遗传性铁粒幼细胞贫血、X连锁铁粒幼细胞性贫血和/或家族性贫血、弥漫性体血管角质瘤、弥漫性血管角质瘤、视网膜血管瘤、von Hippel-Lindau病、APC抵抗症、Leiden型、因子V Leiden血栓形成倾向、Apert综合征、AR缺乏症、雄激素不敏感综合征、Charcot-Marie-Tooth病(任何类型,例如CMT1、CMTX、CMT2、CMT4、严重早发性CMT)、蜘蛛脚样指、Marfan综合征、ARNSHL、非综合征型耳聋(常染色体隐性遗传、常染色体显性、x连锁或线粒体)、遗传进行性关节眼病、Stickler综合征(例如COL2A1、COL11A1、COL11A2、COL9A1)、先天性多发性关节松弛、Ehlers-Danlos综合征(例如运动过度型、关节松弛型、经典型、血管型、脊柱侧凸型、皮肤病型)、Asp缺乏症、Aspa缺乏症、天冬氨酸酰酶缺乏症、共济失调毛细血管扩张症、自闭-痴呆-共济失调-手运动失调综合征、Rett综合征、常染色体显性遗传青少年ALS、常染色体显性遗传opitz G/BBB综合征、常染色体隐性遗传形式的青少年ALS 3型、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(任何类型;例如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)、常染色体隐性遗传非综合征性听力损失、常染色体隐性遗传感音神经性听力损伤和甲状腺肿、Pendred综合征、亚历山大病(AxD)、Ayerza综合征、家族性肺动脉高压、己糖胺酶GM2神经节苷脂沉积症的B变体、Sandhoff疾病、BANF相关疾病、多发性神经纤维瘤(任何类型,例如NF1、NF2、神经鞘瘤病)、Beare-Stevenson皮肤旋纹综合征、良性阵发性腹膜炎、Benjamin综合征、 β -地中海贫血、BH4缺乏症、四氢生物蝶呤缺乏症、双侧听神经纤维瘤、生物素酶缺乏症、膀胱癌、出血性疾病、因子V Leiden血栓形成倾向、Bloch-Sulzberger综合征、色素失调症、Bloom综合征、骨病、Bourneville病、结节性硬化症、脑部疾病、朊病毒病、乳腺癌、Birt-Hogg-Dubé综合征、脆骨病、成骨不全症、宽拇指-巨趾综合征、Rubinstein-Taybi综合征、青铜色糖尿病、血色素沉着病、青铜色肝硬化、脊髓延髓性肌肉萎缩症、X连锁脊髓延髓肌肉萎缩症、Burger-Grutz综合征、脂蛋白脂酶缺乏症、家族性CADASIL综合征、CGD慢性肉芽肿性疾病、短指发育不良、癌症家族综合征、遗传性非息肉病性结直肠癌、乳腺癌、膀胱癌、羧化酶缺乏症、多种晚发性生物素酶缺乏症、猫叫综合征、Caylor心-面综合征、神经酰胺三己糖苷酶缺乏症、小脑视网膜血管瘤、家族性von Hippel-Lindau病、脑动脉病、CADASIL综合征、常染色体显性遗传性脑动脉病、CADASIL综合征、大脑萎缩性高氨血症、Rett综合征、脑苷脂沉积综合征、Charcot病、CHARGE综合征、软骨营养不良、软骨营养不良综合征、软骨营养不良伴感音神经性耳聋、耳脊椎骨骺发育不良、软骨发育不全、舞蹈徐动症-自残-高尿酸血症综合征、Lesch-Nyhan综合征、经典半乳糖血症、半乳糖血症、唇腭裂、Stickler综合征、三叶草颅伴致死性侏儒症、致死性发育不全(例如1型或2型)、Coffin-Lowry综合征(CLS)、Cockayne综合征、Coffin-Lowry综合征、II型和XI型胶原病、家族性非息肉病、遗传性非息肉病性结直肠癌、家族性结肠癌、家族性腺瘤性息肉病、结直肠癌、完全HPRT缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、完全次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症、压迫性神经病变、遗传性神经病伴压迫性麻痹、结缔组织病、异常面容综合征、地中海贫血、 β -地中海贫血、铜贮积病、威尔逊氏病、铜转运疾病、Menkes病、粪卟啉症、遗传性粪卟啉症、粪卟啉原氧化酶缺乏症、Cowden综合征、CPX缺乏症、颅面关节变形、Crouzon综合

征、颅面骨发育不全、Crouzon综合征、克罗恩病、纤维性狭窄病、Crouzon综合征、Crouzon综合征伴黑棘皮病、Crouzonodermoskeletal综合征、Crouzonodermoskeletal综合征、Cockayne综合征 (CS)、Cowden综合征、Curschmann-Batten-Steinert综合征、Beare-Stevenson的皮肤旋纹综合征、Beare-Stevenson皮肤旋纹综合征、D-甘油酸脱氢酶缺乏症、原发性高草酸尿症、斑点干骺端综合征、Strudwick型脊椎干骺端发育不良、阿尔茨海默病型痴呆 (DAT)、遗传性高钙尿症、Dent病、肌肉萎缩症 (例如Duchenne型和Becker型)、耳聋伴甲状腺肿、Pendred综合征、耳聋-视网膜色素变性综合征、Usher综合征、苯丙氨酸羟化酶缺乏症、退行性神经疾病、de Grouchy综合征1、De Grouchy综合征、Dejerine-Sottas综合征、 δ -氨基乙酰丙酸脱水酶缺乏卟啉病、痴呆、CADASIL综合征、脱髓鞘发生性脑白质营养不良、亚历山大病、皮肤痉挛型Ehlers-Danlos综合征、皮肤脆裂症、遗传性发育障碍、远端遗传性运动神经病 (dHMN)、远端遗传性运动神经病 (例如DHMN-V)、DHTR缺乏症、雄激素不敏感综合征、弥漫性球样体硬化、Krabbe病、Di George综合征、二氢睾酮受体缺乏症、雄激素不敏感综合征、远端遗传性运动神经病、肌强直性营养不良 (1型或2型)、远端脊髓性肌萎缩症 (任何类型, 包括例如1型、2型、3型、4型、5型、6型)、Duchenne/Becker肌营养不良、侏儒症 (任何类型, 例如软骨发育不全、致死性发育不良)、侏儒症-视网膜萎缩-耳聋综合征、Cockayne综合征、脱髓鞘发生性脑白质营养不良、亚历山大病、肌强直性营养不良、营养不良性视网膜色素变性-骨发育不全综合征、Usher综合征、早发性家族性阿尔茨海默病 (EOFAD)、阿尔茨海默病 (包括例如1型、2型、3型或4型)、Ekman-Lobstein病、成骨不全症、神经嵌压症、遗传性神经病伴压迫性麻痹、红细胞生成性原卟啉病 (EPP)、成红细胞性贫血、 β -地中海贫血、红细胞生成性原卟啉病、红细胞5-氨基乙酰丙酸合成酶缺乏症、X连锁铁粒幼细胞贫血、眼癌、成视网膜细胞瘤FA-Friedreich共济失调、Friedreich共济失调、FA、范科尼贫血、面部损伤和疾病、因子V Leiden血栓形成倾向、FALS、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、家族性听神经瘤、家族性腺瘤性息肉病、家族性阿尔茨海默病 (FAD)、家族性肌萎缩性脊髓侧索硬化症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、家族性自主神经异常、家族性脂致性高三酸甘油血症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症、家族性血色素沉着病、血色素沉着病、家族性LPL缺乏症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症、家族性非息肉病性结肠癌、遗传性非息肉病性结直肠癌、家族性阵发性多浆膜炎、家族性PCT (迟发性皮肤卟啉病)、家族性压迫敏感性神经病、遗传性神经病伴压迫性麻痹、家族性原发性肺动脉高压 (FPPH)、家族性血管性白质脑病、CADASIL综合征、FAP (家族性腺瘤性息肉病)、FD (家族性自主神经异常)、亚铁螯合酶缺乏症、铁转运蛋白病、血色病 (任何类型, 例如1型、2A型、2B型、3型、4型、新生儿血色病、血浆铜蓝蛋白缺乏症 (acaeruloplasminaemia)、先天性无转铁蛋白血症、gracile综合征) 周期性发热综合征、家族性地中海热 (FMF)、FG综合征、FGFR3相关性冠状缝早闭综合征、星形胶质细胞纤维蛋白样变性、亚历山大病、胰腺纤维化囊性病、Folling病、fra (X) 综合征、脆性X染色体综合征、脆骨症、成骨不全症、FRAXA综合征、弗里德希氏共济失调 (FRDA)、G6PD缺乏症、半乳糖激酶缺乏症 (半乳糖血症)、半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏症 (半乳糖血症)、半乳糖神经酰胺酶缺乏症 (克拉伯病)、半乳糖神经酰胺脂沉积症 (克拉伯病)、半乳糖脑苷脂酶缺乏症、半乳糖苷鞘氨醇脂沉积症、GALC缺乏症、GALT缺乏症、半乳糖血症、类戈谢病、假戈谢病、GBA缺乏症、遗传脑失调、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着病、血色素沉着病、新生儿巨细胞肝炎、新生儿血色素沉着病、GLA缺乏症、视网膜胶质母细胞瘤 (视网膜母细胞瘤)、视网膜胶质瘤

(视网膜母细胞瘤)、球形细胞脑白质营养不良 (GCL/GLD)、克拉伯病、球形细胞脑白质病、葡萄糖脑苷脂酶缺乏症、葡萄糖脑苷脂沉积病、葡萄糖脑苷脂沉积症、葡萄糖神经酰胺酶缺乏症、葡萄糖神经酰胺 β -葡萄糖苷酶缺乏症、葡萄糖神经酰胺脂沉积症、甘氨酸尿症、原发性高草酸尿症、甘氨酸脑病、非酮性高甘氨酸血症、乙醇酸尿症、原发性高草酸尿症、GM2神经节苷脂沉积症、Tay-Sachs病、甲状腺-耳聋综合征、Pendred综合征、Graefe-Usher综合征、Usher综合征、Gronblad-Strandberg综合征、弹性假黄瘤、血色病、血色素沉着病、Hallgren综合征、Usher综合征、Harlequin型鱼鳞癣、Hb S病、软骨发育不全 (HCH)、遗传性粪卟啉病 (HCP)、头部和脑畸形、听力障碍和耳聋、儿童听力问题、HEF2A、HEF2B、血卟啉病、卟啉症、血红素合成酶缺乏症、血色素沉着病、血红蛋白M病、高铁血红蛋白症 β 球蛋白型、血红蛋白S病、血友病、肝红细胞生成性卟啉病 (HEP)、肝AGT缺乏症、原发性高草酸尿症、肝豆状核变性综合征、Wilson病、遗传性关节眼病、Stickler综合征、遗传性异位脂沉积症、遗传性血色素沉着病 (HHC)、血色素沉着病、遗传性出血性毛细血管扩张症 (HHT)、遗传性包涵体肌病、骨骼肌再生、遗传铁负荷性贫血、X连锁铁粒幼细胞贫血、遗传性运动感觉性神经病、遗传性运动神经病V型、远端遗传性运动神经病、遗传性多发性骨软骨瘤、遗传性非息肉病性结直肠癌、遗传性周期性发热综合征、遗传性结肠息肉病、家族性腺瘤性息肉病、遗传性肺气肿、遗传性活化蛋白C抵抗症、因子V Leiden血栓形成倾向、遗传性感觉和自主性神经病III型、家族性自主神经异常、遗传性痉挛性截瘫、婴儿起病型上行遗传性痉挛性瘫痪、遗传性脊柱共济失调、弗里德希氏共济失调、遗传性脊髓硬化症、弗里德希氏共济失调、Herrick氏贫血、杂合OSMED、Weissenbacher-Zweymüller综合征、杂合性耳脊椎骨骺发育不良、Weissenbacher-Zweymüller综合征、HexA缺乏症、Tay-Sachs病、己糖胺酶A缺乏症、Tay-Sachs病、己糖胺酶 α 亚基缺乏症(任何变体,例如变体A、变体B)、Tay-Sachs病、HFE相关血色素沉着病、血色素沉着病、HGPS、早衰、Hippel-Lindau病、von Hippel-Lindau病、血色素沉着病 (HLAH)、远端遗传性运动神经病 (HMN V)、遗传性非息肉病性结直肠癌 (HNPCC)、遗传性神经病伴压迫性麻痹 (HNPP)、高胱氨酸尿症、尿黑酸氧化酶缺乏症、黑尿症、尿黑酸尿 (黑尿症)、纯合型迟发性皮肤卟啉病、肝红细胞生成性卟啉病、原发性高草酸尿症 (HP1)、高草酸尿症 (HP2)、高苯丙氨酸血症 (HPA)、HPRT-次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、HSAN III型、家族性自主神经异常、家族性自主神经异常 (HSAN3)、遗传性感觉神经病(任何类型,例如HSN-1、HSN-II、HSN-III)、家族性自主神经异常、人皮肤脆裂、亨廷顿病、Hutchinson-Gilford早衰综合征、早衰、雄激素过多症、非经典21-羟化酶缺乏症、高乳糜微粒血症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症、高甘氨酸血症伴酮酸中毒和白血球减少症、丙酸血症、I型高脂蛋白血症、脂蛋白脂酶缺乏症、家族性高草酸尿症、原发性高苯丙氨酸血症、高苯丙氨酸血症、高苯丙氨酸血症、季肋发育不全、软骨发育不良、软骨形成不足、软骨发育不良、低色指数性贫血、X-连锁铁粒幼细胞贫血、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、婴儿起病型上行遗传性痉挛性瘫痪 (IAHSP)、ICF综合征、免疫缺陷、着丝粒不稳定和面部异常综合征、特发性血色素沉着病、血色素沉着病3型、特发性新生儿血色素沉着症、新生儿血色素沉着症、特发性肺动脉高压、免疫系统疾病、X连锁重度联合免疫缺陷病、色素失调症、婴儿脑型戈谢病、婴儿戈谢病、婴儿起病型上行遗传性痉挛性瘫痪、不孕症、遗传性肺气肿、遗传性压迫性麻痹倾向、遗传性神经病伴压迫性麻痹、Insley-Astley综合征、耳脊椎骨骺发育不良、间歇性急性卟啉病综合征、急性间歇性卟啉病、肠息肉病-皮肤色素沉着综合征、

Peutz-Jeghers综合征、色素失调症(IP)、铁贮积紊乱、血色素沉着病、Isodicentric 15、isodicentric 15、孤立性耳聋、非综合征性耳聋、Jackson-Weiss综合征、Joubert综合征、青少年原发性侧索硬化症(JPLS)、青少年肌萎缩性脊髓侧索硬化症、青少年痛风、舞蹈手足徐动症、智力低下综合征、Lesch-Nyhan综合征、青少年高尿酸血症综合征、Lesch-Nyhan综合征、Jackson-Weiss综合征(JWS)、脊髓延髓肌肉萎缩症、肯尼迪病、脊髓延髓肌肉萎缩症、肯尼迪脊髓延髓肌肉萎缩症、脊髓延髓肌肉萎缩症、角苷脂组织细胞增多症、角苷脂沉积症、角苷脂贮积病、酮症性甘氨酸血症(丙酸血症)、酮症性高甘氨酸血症(丙酸血症)、肾病、原发性高草酸尿症、Kniest发育不良、克拉伯病、Kugelberg-Welander病、脊髓性肌肉萎缩症、腔隙性痴呆、CADASIL综合征、Langer-Saldino软骨成长不全、Langer-Saldino发育不良、迟发性阿尔茨海默病、迟发性克拉伯病(LOKD)、克拉伯病、学习障碍、学习失能、口周着色斑病、Peutz-Jeghers综合征、Lesch-Nyhan综合征、脑白质营养不良、脑白质营养不良伴罗森塔尔纤维、亚历山大病、海绵状脑白质营养不良、Li-Fraumeni综合征(LFS)、Li-Fraumeni综合征、脂肪酶D缺乏症、脂蛋白脂酶缺乏症、家族性LIPD缺乏症、脂蛋白脂肪酶缺乏症、家族性脑苷脂沉积症、婴儿神经节苷脂沉积症、Tay-Sachs病、类脂性组织细胞增生症(keratin型)、脂蛋白脂酶缺乏症、家族性肝脏疾病、半乳糖血症、Lou Gehrig病、Louis-Bar综合征、共济失调毛细血管扩张症、Lynch综合征、遗传性非息肉病性结直肠癌、赖氨酰羟化酶缺乏症、Machado-Joseph病、脊髓小脑性共济失调(任何类型,例如SCA1、SCA2、SCA3、SCA18、SCA20、SCA21、SCA23、SCA26、SCA28、SCA29)、男性乳腺癌、乳腺癌、男性生殖疾病、恶性乳腺肿瘤、乳腺癌、乳腺恶性肿瘤、乳腺癌、恶性膀胱肿瘤、膀胱癌、乳腺肿瘤、乳腺癌、马凡综合征、Marker X综合征、脆性X染色体综合征、Martin-Bell综合征、脆性X染色体综合征、McCune-Albright综合征、McLeod综合征、MEDNIK综合征、地中海贫血、 β -地中海贫血、大骨骺侏儒症、耳脊椎骨骺发育不良、Menke综合征、Menkes病、Menkes病、智力迟钝伴骨软骨异常、Coffin-Lowry综合征、代谢紊乱、II型间向性侏儒症、Kniest发育不良、变形性骨发育不良II型、Kniest发育不良、高铁血红蛋白症(任何类型,例如先天性、 β -球蛋白型、先天性高铁血红蛋白症II型)、甲基丙二酸血症、马凡氏综合征(MFS)、MHAM、Cowden综合征、微综合征、头小畸形、MMA、甲基丙二酸血症、Menkes病(又称AKA MK或MNK)、单体性1p36综合征、运动神经元病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、运动障碍、Mowat-Wilson综合征、粘多糖贮积症(MPS I)、粘稠物阻塞症、多发梗塞性痴呆、CADASIL综合征、多种羧化酶缺乏症(迟发性)、生物素酶缺乏症、多发性错构瘤综合征、Cowden综合征、多发性神经纤维瘤、肌肉萎缩症(任何类型,包括Duchenne型和Becker型)、萎缩性肌强直、肌强直性营养不良、营养不良性肌强直症、Nance-Insley综合征、耳脊椎骨骺发育不良、Nance-Sweeney软骨发育不良、耳脊椎骨骺发育不良、NBIA1、泛酸激酶相关神经变性、Neill-Dingwall综合征、Cockayne综合征、成神经细胞瘤(视网膜)、成视网膜细胞瘤、神经变性伴脑内铁积累1型、泛酸激酶相关神经变性、神经系统疾病、神经肌肉障碍、远端遗传性运动神经元病、Niemann-Pick、Niemann-Pick病、Noack综合征、非酮性高苷胺酸血症、甘氨酸脑病、非神经元性高胆红素血症、非苯丙酮尿症高苯丙氨酸血症、四氢生物蝶呤缺乏症、非综合征性耳聋、Noonan综合征、Norrbottnian戈谢病、褐黄病(黑尿症)、褐黄病性关节炎(黑尿症)、Ogden综合征、成骨不全症(OI)、Osler-Weber-Rendu病、遗传性出血性毛细血管扩张症、OSMED、耳脊椎骨骺发育不良、成骨不全症、骨脆症(成骨不全症)、先天性骨硬化、耳脊椎骨

骺发育不良、耳脊椎骨骺发育不良、耳脊椎骨骺发育不良、草酸过多症、原发性高草酸尿症、原发性草酸尿、原发性高草酸尿症、泛酸激酶相关神经变性、Patau综合征(13三体综合征)、PBGD缺乏症、急性间歇性卟啉病、PCC缺乏症、丙酸血症、迟发性皮肤卟啉病(PCT)、PDM病、Pendred综合征、周期性病、地中海热、家族性周期性腹膜炎、口周着色斑病综合征、Peutz-Jeghers综合征、周围神经病变、家族性自主神经异常、周围神经纤维瘤、腓骨肌萎缩症、过氧化物酶体丙氨酸:乙醛酸氨基转移酶缺乏症、高草酸尿症、原发性Peutz-Jeghers综合征、苯丙氨酸羟化酶缺乏症、嗜铬细胞瘤、von Hippel-Lindau病、Pierre Robin综合征伴胎儿软骨发育不良、Weissenbacher-Zweymüller综合征、色素性肝硬变、血色素沉着病、Peutz-Jeghers综合征(PJS)、泛酸激酶相关神经变性(PKAN)、PKU、苯丙酮尿症、铅性紫质病、ALA缺乏性卟啉病、PMA、多囊性肾病、多骨性纤维性结构不良、McCune-Albright综合征、家族性腺瘤性息肉病、错构瘤性肠息肉病、息肉黑斑综合征、Peutz-Jeghers综合征、胆色素原合成酶缺乏症、ALA缺乏性卟啉病、卟啉症、PPOX缺乏症、多样性卟啉病、Prader-Labhart-Willi综合征、Prader-Willi综合征、早老性和老年性痴呆、原发性纤毛运动障碍(PCD)、原发性血色素沉着症、血色素沉着症、原发性高尿酸血症综合征、Lesch-Nyhan综合征、原发性老年退行性痴呆、前胶原EDS VII型、突变体、早衰、Hutchinson Gilford早衰综合征、早衰样综合征、Cockayne综合征、早衰样侏儒症、Cockayne综合征、进行性舞蹈症、慢性遗传性(亨廷顿)、亨廷顿病、正常巩膜进行性畸形成骨不全症、成骨不全症(任何类型,例如I型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型)、近端肌强直性营养不良(PROMM)、丙酸血症、丙酰辅酶A羧化酶缺乏症、蛋白C缺乏症、蛋白S缺乏症、原卟啉病、原卟啉原氧化酶缺乏症、多样性卟啉病、近端肌强直性营养不良、肌强直性营养不良2型、近端强直性肌病、假戈谢病、弹性假黄瘤、鞘氨醇半乳糖苷脂沉积症、克拉伯病、肺动脉高压、肺动脉高血压、弹性假黄瘤(PXE)、弹性假黄瘤、成视网膜细胞瘤(Rb)、Recklinghausen病、复发性多浆膜炎、视网膜疾病、视网膜色素变性-耳聋综合征、Usher综合征、成视网膜细胞瘤、Rett综合征、RFALS 3型、Ricker综合征、Riley-Day综合征、家族性自主神经异常、Roussy-Levy综合征、Rubinstein-Taybi综合征(RSTS)、Rett综合征(RTS)、Rubinstein-Taybi综合征、Rubinstein-Taybi综合征、Sack-Barabas综合征、SADDAN病、李氏和Fraumeni肉瘤家族综合征、Li-Fraumeni综合征、SBLA综合征(肉瘤、乳腺、白血病和肾上腺综合征)、Li-Fraumeni综合征、脊髓延髓肌肉萎缩症(SBMA)、双侧听神经鞘瘤、多发性神经纤维瘤II型、Schwartz-Jampel综合征、X连锁重度联合免疫缺陷(SCIDX1)、先天性SED、先天性脊椎骨骺发育不良、SED Strudwick、Strudwick型脊椎干骺端发育不良、先天性脊椎骨骺发育不良(SEDc)、脊椎干骺端发育不良(SEMD)、Strudwick型SEMD、老年性痴呆、严重软骨发育不全伴发育迟缓和黑棘皮病、SADDAN病、Shprintzen综合征、由PHF8基因突变引起的Siderius X连锁智力低下综合征、骨骼-皮肤-脑综合征、皮肤色素沉着症、脊髓性肌萎缩(SMA)、脊柱-骺-骨骺发育不良(SMED)(任何类型,例如Studwick型、I型)、Smith-Lemli-Opitz综合征、Smith Magenis综合征、南非遗传性卟啉病、婴儿起病型上行性痉挛性瘫痪、婴儿起病型上行遗传性痉挛性瘫痪、言语和交流障碍、神经脂质病、Tay-Sachs、Tay-Sachs病、脊髓延髓肌肉萎缩症、脊髓性肌萎缩、脊髓性肌萎缩(远端V型)、远端遗传性运动神经病、远端上肢脊髓性肌萎缩、远端遗传性运动神经病、脊髓小脑性共济失调、先天性椎体骨骺结构不良、脊椎骨骺发育不良、胶原病(任何类型,例如II型和XI型)、脊椎干骺端发育不良、脊椎干骺端发育不良(SMD)、脊椎干骺端发育不良、

中枢神经系统海绵状变性、脑海绵状变性、婴儿期白质海绵状变性、散发性原发性肺动脉高压、SSB综合征、钢发综合征、Menkes病、Steinert病、肌强直性营养不良、Steinert肌强直性营养不良综合征、肌强直性营养不良、Stickler综合征、中风、CADASIL综合征、Strudwick综合征、亚急性神经元病性戈谢病、瑞典遗传性卟啉病、急性间歇性卟啉病、急性间歇性卟啉症、瑞士奶酪软骨发育不良、Kniest发育不良、Tay-Sachs病、TD-致死性侏儒症、致死性发育不良、TD伴直股骨和三叶草颅、致死性发育不良2型、毛细血管扩张症(小脑-眼皮肤)、共济失调毛细血管扩张症、睾丸女性化综合征、雄激素不敏感综合征、四氢生物蝶呤缺乏症、睾丸女性化综合征(TFM)、雄激素不敏感综合征、中间型地中海贫血、 β -地中海贫血、重型地中海贫血、 β -地中海贫血、致死性发育不良、由活化蛋白C辅助因子缺乏引起的血栓形成、Leiden型、因子V Leiden血栓形成倾向、甲状腺疾病、腊肠样神经病、遗传性神经病伴压迫性麻痹、总HPRT缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、总黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、Treacher Collins综合征、三叠系脆骨症、三重X综合征、三X综合征、三体21、三体X、Troisier-Hanot-Chauffard综合征、血色素沉着症、Tay-Sachs病(TSD)、结节性硬化症复合物(TSC)、结节性硬化症、Turner样综合征、Noonan综合征、UDP-半乳糖-4-差向异构酶缺乏症、半乳糖血症、UDP葡萄糖4-差向异构酶缺乏症、半乳糖血症、UDP葡萄糖己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏症、半乳糖血症、未分化性耳聋、非综合征性耳聋、UPS缺乏症、急性间歇性卟啉病、膀胱癌、膀胱癌、UROD缺乏症、尿卟啉原脱羧酶缺乏症、尿卟啉原合成酶缺乏症、急性间歇性卟啉病、Usher综合征、UTP己糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏症、半乳糖血症、Van Bogaert-Bertrand综合征、Van der Hoeve综合征、Velocardiofacial综合征、VHL综合征、von Hippel-Lindau病、视力障碍和失明、综合征、Von Bogaert-Bertrand病、von Hippel-Lindau病、Von Recklenhausen-Applebaum病、血色素沉着病、von Recklinghausen病、多发性神经纤维瘤I型、Vrolik病、成骨不全症、Waardenburg综合征、Warburg Sjo Fledelius综合征、Micro综合征、Wilson病(WD)、Weissenbacher-Zweymüller综合征、Werdnig-Hoffmann病、脊髓性肌萎缩、Williams综合征、Wilson病、Wilson氏病、Wilson病、Wolf-Hirschhorn综合征、Wolff周期性疾病、Weissenbacher-Zweymüller综合征(WZS)、着色性干皮病、X连锁智力障碍-大睾丸、脆性X染色体综合征、X连锁原发性高尿酸血症、Lesch-Nyhan综合征、X连锁重度联合免疫缺陷、X连锁铁粒幼细胞贫血、X连锁脊髓延髓肌肉萎缩症、脊髓延髓肌肉萎缩症、X连锁尿酸尿酶缺乏症、Lesch-Nyhan综合征、X-SCID、X连锁重度联合免疫缺陷、X连锁铁粒幼细胞贫血(XLSA)、X-SCID、X连锁重度联合免疫缺陷、X连锁铁粒幼细胞贫血(XLSA)、XSCID、X连锁重度联合免疫缺陷、XXX综合征、三X综合征、XXXX综合征、XXXXX综合征、XXXXX、XXY综合征、XXY三体、Klinefelter综合征、XYY综合征、三联体重复疾病或它们的任何组合。

[0419] 在实施方案中,通过施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统来靶向特定的转录后控制调节子以调节、修饰、增强或降低活性。举例来说,转录后控制调节子可以包括PARN、PAN、CPSF、CstF、PAP、PABP、PAB2、CFI、CFII、RNA三磷酸酶、RNA葡萄糖基鸟苷转移酶、RNA甲基转移酶、SAM合酶、泛素缀合酶E2R、SR蛋白SFRS1至SFR11、hnRNP蛋白(例如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-box解旋酶e1F4A、

e1F4B、e1F4E、e1F4G、GEF、GCN2、PKR、HRI、PERK、eEF1、eEF2、GCN、eRF3；ARE特异性结合蛋白、EXRN1、DCP1、DCP2、RCK/p54、CPEB、eIF4E、微RNAs和siRNA、DICER、Ago蛋白、无义介导的mRNA衰变蛋白、UPF3A、UPF3B、eIF4A3、MLN51、Y14/MAGOH、MG-1、SMG-5、SMG-6、SMG-7或它们的任何组合。

[0420] 在某些实施方案中,通过施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统来调节、增强或降低与细胞周期相关的遗传途径的活性。与细胞周期相关的示例性途径和基因包括ATM、PMS2、FAS-L、MRE11、MLH1、FasR、NBS1、MSH6、Trail-L、RAD50、MSH2、Trail-R、53BP1、RFC、TNF-Ct、P53、PCNA、TNF-R1、CHKE、MSH3、FADD、E2F1、MutS同源物、TRADD、PML、MutL同源物、R1P1、FANCD2、核酸外切酶、MyD88、SMC1、DNA聚合酶 δ 、IRAK、BLM1、(POLD1、POLD2、POLD3、NIL、BRCA1和POLD4基因、IKK、H2AX编码亚基)、NFK β 、ATR、拓扑异构酶1、I κ B α 、RPA、拓扑异构酶2、IAP、ATRIP、RNAseH1、半胱天冬酶3、RAD9、连接酶1、半胱天冬酶6、RAD1、DNA聚合酶1、半胱天冬酶7、HUS、DNA聚合酶3、半胱天冬酶8、RAD17、引发酶、半胱天冬酶10、RFC、螺旋酶、HDAC1、CHK1、单链结合、HDAC2、TLK1蛋白、细胞色素C、CDC25、Bx1-xL、STAT3、STAT5、DFF45、Vc1-2、ENDO-G、PI3K、Akt、钙蛋白酶、Bad、Bax、泛素介导的蛋白质水解、缺氧、细胞增殖、HIF-1 α 、MAPK、E1、HERC1、TRAF6、HIF-1 β 、MAPKK、E2、UBE2Q、MEKK1、Ref1、MAPKKK、E3、UBE2R、COP1、HSP90、c-Met、UBLE1A、UBE2S、PIF2、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、桩蛋白、UBE2C、UBE1、AIRE、EPF、FAK、UBE2A、E6AP、MGRN1、VDU2、内收蛋白、UBE2E、UBE3B、BRCA1、SUMORESUME、PYK1、UBE2F、Smurf、FANCL、SENP1、RB、UBE2G1、Itch、MIDI、钙调磷酸酶A、RBI、UBE2G2、HERC2、Cdc20、RACK1、Raf-1、UBE2I、HERC3、Cdh1、PTB、A-Raf、UBE2J1、HERC4、Apc1、Hur、B-raf、UBE2J2、UBE4A、Apc2、PHD2、MEK1/2、UBE2L3、UBE4B、Apc3、SSAT2、ERK1/2、UBE2L6、CHIP、Apc4、SSAT1、Ets、UBE2M、CYC4、Apc5、GSK3、E1k1、UBE2N、PPR19、Apc6、CBP、SAP1、UBE20、UIP5、Apc7、FOXO4、cPLA2、WWP1、Mdm2、Apc8、F1H-1、WWP2、Parkin、Apc9、TRIP12、Trim32、Ape10、NEED4、Trim37、Ape11、ARF-BP1、SIAH-1、Ape12、EDD1、PML、细胞存活基因、细胞周期阻滞基因、SMAD1、P21、SMAD5、BAX、SAMD8、MDR、LEF1、DRAIL、IGFBP3、TCF3、GADD45、TCF4、P300、HAT1、PI3、Akt、GF1或它们的任何组合。

[0421] 在某些实施方案中,通过向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统,调节、增强或降低与血管生成相关的基因的活性。与血管生成和血管生成相关病症相关的示例性基因和遗传途径包括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或它们的任何组合。

[0422] 在某些实施方案中,通过向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统,调节、增强或降低与线粒体功能相关的遗传途径和/或基因的活性。与线粒体功能相关的示例性基因和遗传途径包括苹果酸脱氢酶、氨基转移酶、水合酶、脱酰酶、脱氢酶、羧化酶、变位酶、脂肪酸氧化、亮氨酸氧化、异亮氨酸紊(酶途径氧化途径缺陷)氨基转移酶、OCTN2支链支链、FATP1-6氨基转移酶2、氨基转移酶2、CPT-1线粒体、CACT异丁基-CoA 2-甲基丁基-CoA、CPT-II脱氢酶脱氢酶、SCAD(支链(支链、MCAD酮酸酮酸、VLCAD脱氢酶、ETF-DH复合物)复合物)、 α -ETF水合酶水合酶、 β -ETF HMG-CoA裂解酶2-甲基-3-OH-SHAD丁酰基-辅酶A、LCHAD脱氢酶、MTP 3-氧代硫解酶、LKAT、DECR 1、HMGCS2、HMGCL或它们的任何组合。

[0423] 在某些实施方案中,与DNA损伤或基因组不稳定性相关的遗传途径和/或基因的活性被调节、增强或降低。与DNA损伤和基因组不稳定性相关的途径和/或基因相关的示例性基因和遗传途径包括53BP1、BLM、MBD2、DNA连接酶4、MDC1、H2AX、XLF、SMC1、53BP1、Rad50、P53、P53、Artemis、Rad27、TdT、APE1、PMS2、APE2、UvrA、RecA、MLH1、NEIL1、UvrB、SSB、MSH6、NEIL2、UvrC、Mre11、MSH2、NEIL3、XPC、Rad50、RFC、XRCC1、Rad23B、Nbs1、PCNA、PNKP、CEN2、CtIP、MSH3、Tdp1、DDB1、RPA、MutS、APTX、XPE、Rad51、MutL、DNA聚合酶 β CSA、Rad52、DNA聚合酶 δ 、CSB、Rad54、拓扑异构酶1、DNA、TFT1H、BRCA1、拓扑异构酶2、PCNA、XPB、BRCA2、RNAseH1、FEN1、XPD、Exo1、连接酶1、RFC、XPA、BLM、DNA聚合酶1、PAR 1、RPA、Top111a、DNA、Lig1、XPG、GEN1、引发酶、Lig3、ERCC1 Yen1螺旋酶、UNG、XPF、S1x1、SSBs、MUTY DNA聚合酶 δ 、S1x4、SMUG DNA聚合酶 ϵ 、Mus8、MBD4、Eme1、Dss1、ASH1L、SETD4、DQT1L、SETD5、EHMT1、SETD6、EHMT2、SETD7、EZH1、SETD8、EZH2、SETD9、MLL、SETDB1、MLL2、SETDB2、MLL3、SETMAR、MLL4、SMYD 1、MLL5、SMYD2、NSD 1、SMYD3、PRDM2、SMYD4、SET、SMYD5、SETBP1、SUV39H1、SETD 1A、SUV39H2、SETD 1B、SUV420H1、SETD2、SUV420H2、SETD3或它们的任何组合。

[0424] 在某些实施方案中,编码哺乳动物转录因子的基因被调节、增强、减少或提供给细胞。示例性人转录因子包括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、CBFB、CAMTA2、CAMTA1、EBF4、EBF3、EBF1、EBF2、NR2F6、NR2F1、NR2F2、GRHL2、TFCP2L1、GRHL1、TFCP2、UBP1、GRHL3、YBX2、CSDE1、CSDA、YBX1、LIN28A、CARHSP1、CSDC2、LIN28B、NFIX、NFIC、NFIB、NFIA、CUX2、ONECUT2、CUX1、ONECUT1、SATB1、ONECUT3、SATB2、DMRT3、DMRT1、DMRTC2、DMRTA2、DMRTB1、DMRT2、DMRTA1、E2F2、E2F1、E2F3、TFDP2、E2F8、E2F5、E2F7、E2F6、TFDP3、TFDP1、E2F4、NR1H3、NR1H2、ETV1、ETV7、SPI1、ELF4、ETV2、ERF、ELF2、ELK3、ETV3、ELF1、SPDEF、ELK1、ETS1、EHF、ELF5、ETV6、SPIB、FLI1、GABPA、ERG、ETS2、ELK4、ELF3、FEV、SPIC、ETV4、ETV5、FOXN3、FOXC1、FOXJ2、FOXF1、FOXN1、FOXMI、FOXP1、FOXO3、FOXA2、FOXP2、FOXJ1、FOXP4、FOXF2、FOXN4、FOXK2、FOXO1、FOXH1、FOXQ1、FOXK1、FOXI1、FOXO4、FOXA3、FOXN2、FOXBI、FOXG1、FOXR1、FOXLI、FOXC2、FOXEL1、FOXSI、FOXLI2、FOXO4、FOXO4L1、FOXO4L4、FOXO2、FOXI2、FOXEL3、FOXO3、FOXO4L3、FOXO2、FOXJ3、FOXO6、FOXO2、FOXO4L5、FOXO4L6、FOXO4L2、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、ZFHX4、SIX4、VSX1、ADNP、RHOXF1、MEIS3、PBX4、DLX5、HOXA1、HOXA2、HOXA3、HOXA5、HOXA6、HOXA13、EVX1、NOBOX、MEOX2、LHX2、LHX6、LHX3、TLX1、PITX3、HOXB6、HNF1B、DLX4、SEBOX、VTN、PHOX2B、NKX3-2、DBX1、NANOG、IRX4、CDX1、TLX2、DLX2、VAX2、PRRX1、TGIF2、VSX2、NKX2-3、HOXB8、HOXB5、HOXB7、HOXB3、HOXB1、MSX2、LHX4、HOXA7、HOXC13、HOXC11、HOXC12、ESX1、BARHL1、NKX2-4、NKX2-2、SIX1、HOXD1、HOXD3、HOXD9、HOXD10、HOXD11、HOXD13、MNX1、CDX4、BARX1、RHOXF2、LHX1、GSC、MEIS2、RAX、EMX1、NKX2-8、NKX2-1、HLX、LMX1B、SIX3、LBX1、PDX1、LASS5、ZFHX3、BARHL2、LHX9、LASS2、MEIS1、DLX1、HMBX1、ZEB1、VAX1、NKX6-2、VENTX、HHEX、TGIF2LX、LASS3、ALX3、HOXB13、IRX6、ISL2、PKNX1、LHX8、LMX1A、EN1、MSX1、NKX6-1、HESX1、PITX2、TLX3、EN2、UNCX、GBX1、NKX6-3、ZHX1、HDX、PHOX2A、PKNX2、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、HSFX1、HSFX2、HSFY1、HSF1、LCORL、LCOR、IRF6、IRF1、IRF3、IRF5、IRF4、IRF8、IRF2、IRF7、IRF9、MBD3、BAZ2B、MBD4、SETDB2、MBD1、MECP2、SETDB1、MBD2、BAZ2A、SMAD7、SMAD5、SMAD9、SMAD6、SMAD4、SMAD3、SMAD1、SMAD2、ZZZ3、RCOR1、CDC5L、MYBL2、DNAJC2、TADA2A、RCOR3、MYB、TERF2、DMTF1、DNAJC1、NCOR1、TERF1、MIER3、MYSM1、SNAPC4、RCOR2、TADA2B、MYBL1、TERF1P2、NCOR2、CCDC79、SMARCC1、SMARCC2、TTF1、C11orf9、NFYA、NFYC、NFYB、NRF1、NR4A3、NR4A1、NR4A2、ESR1、NR0B2、NR0B1、PREB、EAF2、SPZ1、TP63、TP73、TP53、PAX6、PAX7、PAX2、PAX4、PAX8、PAX1、PAX3、PAX5、PAX9、SUB1、POU2F2、POU1F1、POU4F3、POU6F2、POU2F3、POU2F1、POU4F2、POU4F1、POU6F1、POU3F2、POU3F1、POU3F4、POU3F3、POU5F1、POU5F1B、PPARD、PPARG、PPARA、PGR、PROX1、PROX2、NR2E1、NR5A2、NR2C1、NR5A1、NR6A1、ESRRA、NR2C2、RFX3、RFX2、RFX4、RFX1、RFX5、RFX7、RFX6、RFX8、NFATC3、NFKB2、NFATC4、NFATC2、NFAT5、RELB、NFKB1、NFATC1、REL、RELA、RORA、RORC、NR1D2、RORB、RUNX3、RUNX1、SP100、SP140、GMEB2、SP110、AIRE、GMEB1、DEAF1、SP140L、LOC729991、MEF2B、MEF2A、SRF、MEF2D、MEF2B、STAT1、STAT5A、STAT4、STAT6、STAT3、STAT2、STAT5B、TBX21、TBX5、TBX15、TBX18、TBX2、TBX4、TBX22、TBX3、TBR1、TBX19、TBX6、EOMES、T、TBX20、TBX10、MGA、TBX1、TEAD3、TEAD2、TEAD1、TEAD4、CREBL2、NFE2L3、CREB3L3、FOSL2、NFE2L1、CREM、DBP、CREB3、HLF、BACH2、ATF2、NFE2L2、ATF6、CREB1、ATF1、NFE2、FOSB、ATF4、NRL、JUND、JDP2、CREB3L4、BATF、BACH1、CREB3L1、NFIL3、TEF、BATF2、ATF5、FOS、JUNB、DDIT3、FOSL1、JUN、MAF、CREB3L2、MAFA、MAFF、MAFG、MAFK、MAFB、ATF6B、CRX、OTX1、OTX2、THAP3、THAP10、THAP1、PRKRIR、THAP8、THAP9、THAP11、THAP2、THAP6、THAP4、THAP5、THAP7、NR1H4、NR2E3、RAR、HNF4A、VDR、ESRRB、THRA、NR1D1、RARA、ESR2、NR1I3、NR1I2、THRB、NR3C2、HNF4G、RARG、RXRA、ESRRG、RXRB、TSC22D1、TSC22D3、TSC22D4、TSC22D2、TULP3、TULP2、TULP1、TULP4、TUB、ZBTB33、ZBTB32、ZBTB11、MYNN、ZBTB25、PATZ1、ZBTB16、ZBTB24、BCL6、ZBTB47、ZBTB17、ZBTB45、GZF1、ZBTB1、ZBTB46、ZBTB8A、ZBTB7B、BCL6B、ZBTB49、ZBTB43、HIC2、ZBTB26、

ZNF131、ZNF295、ZBTB4、ZBTB34、ZBTB38、HIC1、ZBTB41、ZBTB7A、ZNF238、ZBTB42、ZBTB2、ZBTB20、ZBTB40、ZBTB7C、ZBTB37、ZBTB3、ZBTB6、ZBTB44、ZFP161、ZBTB12、ZBTB48、ZBTB10、ZBED4、ZBED3、ZBED2、C11orf95、ZBED1、IKZF5、ZNF821、ZNF451、ZNF195、ZFX、ZNF263、ZNF200、HIVEP2、WIZ、ZNF582、SNAI2、ZFP64、IKZF2、ZIC2、ZNF800、PRDM1、PRDM6、ZFP112、ZNF275、ZNF76、ZFAT、KLF6、ZFY、ZXDC、GLI2、ZNF532、ZNF37A、ZNF510、ZNF506、ZNF324、ZNF671、ZNF416、ZNF586、ZNF446、ZNF8、ZNF264、REST、MECOM、ZNF213、ZNF343、ZNF302、ZNF268、ZNF10、HIVEP1、ZNF184、MZF1、SALL4、ZNF516、KLF8、KLF5、ZNF629、ZNF423、CTCF、ZNF500、ZNF174、SALL1、MAZ、ZNF419、OVOL3、ZNF175、ZNF14、ZNF574、ZNF85、SP4、ZKSCAN1、GLI3、GLIS3、KLF3、PRDM4、GLI1、PRDM13、ZNF142、PRDM2、ZNF684、ZNF541、KLF7、PLAGL1、ZNF430、KLF12、KLF9、ZNF410、BCL11A、EGR1、ZFP30、TSHZ3、ZNF549、ZSCAN18、ZNF211、ZNF639、ZSCAN20、GTF3A、ZNF205、ZNF644、EGR2、IKZF4、CTCFL、ZNF831、SNAI1、ZNF576、ZNF45、TRERF1、ZNF391、RREB1、ZNF133、OVOL2、ZNF436、PLAGL2、GLIS2、ZNF384、ZNF484、HIVEP3、BCL11B、KLF2、ZNF780B、FEZF1、KLF16、ZSCAN10、ZNF557、ZNF337、PRDM12、ZNF317、ZNF426、ZNF331、ZNF236、ZNF341、ZNF227、ZNF141、ZNF304、ZSCAN5A、ZNF132、ZNF20、EGR4、ZNF670、VEZF1、KLF4、ZFP37、ZNF189、ZNF193、ZNF280D、PRDM5、ZNF740、ZIC5、ZSCAN29、ZNF710、ZNF434、ZNF287、ZIM3、PRDM15、ZFP14、ZNF787、ZNF473、ZNF614、PRDM16、ZNF697、ZNF687、OSR1、ZNF514、ZNF660、ZNF300、RBAK、ZNF92、ZNF157、ZNF182、ZNF41、ZNF711、PRDM14、ZNF7、ZNF214、ZNF215、SALL3、ZNF827、ZNF547、ZNF773、ZNF776、ZNF256、ZSCAN1、ZNF837、PRDM8、ZNF117、ZIC1、FEZF2、ZNF599、ZNF18、KLF10、ZKSCAN2、ZNF689、ZIC3、ZNF19、ZSCAN12、ZNF276、ZNF283、ZNF221、ZNF225、ZNF230、ZNF222、ZNF234、ZNF233、ZNF235、ZNF362、ZNF208、ZNF714、ZNF394、ZNF333、ZNF382、IKZF3、ZNF577、ZNF653、ZNF75A、GFI1、ZNF281、ZNF496、ZNF2、ZNF513、ZNF148、KLF15、ZNF691、ZNF589、PRDM9、ZNF12、SP8、OSR2、ZNF367、ZNF22、GFI1B、ZNF219、SALL2、ZNF319、ZNF202、ZNF143、ZNF3、ZSCAN21、ZNF606、SP2、ZNF91、ZNF23、ZNF226、ZNF229、ZNF180、ZNF668、ZNF646、ZNF641、ZNF610、ZNF528、ZNF701、ZNF526、ZNF146、ZNF444、ZNF83、ZNF558、ZNF232、E4F1、ZNF597、INSM2、ZNF30、ZNF507、ZNF354A、ZEB2、ZNF32、KLF13、ZFPM2、ZNF764、ZNF768、ZNF35、ZNF778、ZNF212、ZNF282、PRDM10、SP7、SCRT1、ZNF16、ZNF296、ZNF160、ZNF415、ZNF672、ZNF692、ZNF439、ZNF440、ZNF581、ZNF524、ZNF562、ZNF561、ZNF584、ZNF274、ZIK1、ZNF540、ZNF570、KLF17、ZNF217、ZNF57、ZNF556、ZNF554、KLF11、HINFP、ZNF24、ZNF596、OVOL1、SP3、ZNF621、ZNF680、BNC2、ZNF483、ZNF449、INSM1、ZNF417、ZNF791、ZNF80、GLIS1、ZNF497、KLF14、ZNF266、ZIC4、ZNF408、ZNF519、ZNF25、ZNF77、ZNF169、ZNF613、ZNF683、ZNF135、ZSCAN2、ZNF575、ZNF491、ZNF620、ZNF619、ZNF354C、ZNF114、ZNF366、ZNF454、ZNF543、ZNF354B、ZNF223、ZNF713、ZNF852、ZNF552、ZFP42、ZNF664、EGR3、ZFPM1、ZNF784、ZNF648、FIZ1、ZNF771、TSHZ1、ZNF48、ZNF816、ZNF571、ZSCAN4、ZNF594、ZFP3、ZNF443、ZNF792、ZNF572、ZNF707、ZNF746、ZNF322A、ZNF467、ZNF678、ZFP41、HKR1、PLAG1、ZNF329、ZNF101、ZNF716、ZNF708、ZSCAN22、ZNF662、ZNF320、ZNF623、ZNF530、ZNF285、ZFP1、WT1、ZFP90、ZNF479、ZNF445、ZNF74、SP1、SNAI3、ZNF696、IKZF1、ZNF267、ZNF566、ZNF224、ZNF529、ZNF284、ZNF749、ZNF17、ZNF555、ZNF75D、ZNF501、ZNF197、ZNF396、ZFP91、ZNF732、ZNF397、ZSCAN30、ZNF546、ZNF286A、ZKSCAN4、ZNF70、ZNF643、ZNF642、ZSCAN23、ZNF490、ZNF626、ZNF793、ZNF383、ZNF669、ZNF559、ZNF177、

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

[0425] 在某些实施方案中,将细胞从一种细胞类型操纵(例如,转化或分化)到另一种细胞类型。在某些实施方案中,将胰细胞操纵成 β 胰岛细胞。在某些实施方案中,将成纤维细胞操纵成iPS细胞。在某些实施方案中,将前脂肪细胞操纵成棕色脂肪细胞。其它示例性细胞包括例如肌细胞、神经细胞、白细胞和淋巴细胞。

[0426] 在某些实施方案中,细胞是患病的或携带突变体的细胞。可操纵这些细胞以治疗疾病,例如纠正突变或改变细胞的表型,例如抑制癌细胞的生长。例如,细胞与本文描述的一种或多种疾病或病症相关。

[0427] 在某些实施方案中,操纵的细胞是正常细胞。

[0428] 在某些实施方案中,操纵的细胞是干细胞或祖细胞(例如,iPS、胚胎细胞、造血细胞、脂肪细胞、生殖细胞、肺细胞、神经干细胞或祖细胞)。在某些实施方案中,操纵的细胞可以是来自三个胚层中任一个的细胞(即,中胚层、内胚层或外胚层)。在某些实施方案中,操纵的细胞可以来自胚外组织,例如来自胎盘。

[0429] 在某些实施方案中,被操纵的细胞选自成纤维细胞、单核细胞前体、B细胞、外分泌细胞、胰腺祖细胞、内分泌祖细胞、成肝细胞、成肌细胞或前脂肪细胞。在某些实施方案中,将细胞操纵(例如,转化或分化)成肌细胞、红细胞-巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛 β 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 α 细胞、 β 细胞、 δ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞、成血管细胞、中成血管细胞或棕色脂肪细胞。

[0430] 在某些实施方案中,细胞是肌细胞、红细胞-巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛 β 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 α 细胞、 β 细胞、 δ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或者白色或棕色脂肪细胞。

[0431] 在某些实施方案中,细胞是前体细胞、多能细胞、全能细胞、成体干细胞、内细胞团细胞、胚胎干细胞或iPS细胞。

[0432] 在某些实施方案中,操纵的细胞是癌细胞。在某些实施方案中,癌细胞可以是肺癌细胞、乳腺癌细胞、皮肤癌细胞、脑癌细胞、胰腺癌细胞、造血癌细胞、肝癌细胞、肾癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、皮肤癌细胞。

[0433] 在某些实施方案中,细胞是肌细胞、红细胞-巨核细胞、嗜酸性粒细胞、iPS细胞、巨噬细胞、T细胞、胰岛 β 细胞、神经元、心肌细胞、血细胞、内分泌祖细胞、外分泌祖细胞、导管细胞、腺泡细胞、 α 细胞、 β 细胞、 δ 细胞、PP细胞、肝细胞、胆管细胞或者白色或棕色脂肪细胞。

[0434] 向细胞施用DNA-PK抑制剂和基因编辑系统

[0435] 可通过本领域已知的任何方法对细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂。施用可以是体外的、离体的或体内的。向细胞施用基因组编辑系统和DNA-PK抑制剂可以同时地或依序地进行。在某些实施方案中,施用导致DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统组分进入细胞膜。在某些实施方案中,施用导致DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统组分进入细胞核中。在某些实施方案中,施用包括在存在DNA-PK抑制剂和基因组编辑系统的情况下温育细胞。

[0436] 基因编辑系统可通过本领域已知的任何方法施用给细胞。例如,可使用本领域已知的任何核酸或蛋白质递送方法。通过编码基因编辑系统组分的核酸将基因编辑系统施用(例如,递送)至细胞。基因编辑系统可通过病毒载体或非病毒载体施用给细胞。在某些实施方案中,使用病毒载体。病毒载体可以是逆转录病毒(例如鼠白血病病毒、HIV病毒或慢病毒)或DNA病毒(例如腺病毒、单纯疱疹病毒和腺相关病毒)。在某些实施方案中,使用转染方法(例如非病毒递送方法)将基因组编辑系统引入细胞中。转染方法包括使细胞与DEAE-葡聚糖、磷酸钙、脂质体接触或将质粒电穿孔到细胞中。另外的非病毒递送方法包括电穿孔、脂质转染、微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸偶联物、裸DNA、裸RNA、人工病毒粒子以及试剂增强的DNA摄取。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声致穿孔也可用于递送核酸。在某些实施方案中,一种或多种核酸作为mRNA递送。在某些实施方案中,加帽的mRNA用于提高翻译效率和/或mRNA稳定性。在某些实施方案中,使用ARCA(抗反向帽类似物)帽或其变体。参见美国专利US7074596和US8153773。

[0437] 在实施方案中,内切核酸酶(例如Cas、Cpf1等)和gRNA从DNA转录。

[0438] 在实施方案中,内切核酸酶(例如Cas、Cpf1等)从DNA转录,并且gRNA作为RNA提供。

[0439] 在实施方案中,内切核酸酶(例如Cas、Cpf1等)和gRNA作为RNA提供。

[0440] 在实施方案中,内切核酸酶(例如Cas、Cpf1等)作为蛋白质提供,并且gRNA作为DNA提供。

[0441] 在实施方案中,内切核酸酶(例如Cas、Cpf1等)作为蛋白质提供,并且gRNA作为RNA提供。

[0442] 另外的核酸递送系统包括由Amixa Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) 和 Copernicus Therapeutics Inc提供的那些(参见例如US6008336)。脂质转染在例如美国专

利号5,049,386、4,946,787和4,897,355中有所描述,并且脂质转染试剂可商购获得(例如,TransfectamTM和LipofectinTM和LipofectamineTM RNAiMAX)。适用于多核苷酸的高效受体识别脂质转染的阳离子脂质和中性脂质包括Feigner、WO 91/17424、WO 91/16024的那些脂质。递送可以是向细胞(离体施用)或靶组织(体内施用)进行的。

[0443] 脂质:核酸复合物(包括靶向脂质体,诸如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员所熟知的(参见例如Crystal, Science 270:404-410(1995);Blaese等人, Cancer Gene Ther. 2:291-297(1995);Behr等人, Bioconjugate Chem. 5:382-389(1994);Remy等人, Bioconjugate Chem. 5:647-654(1994);Gao等人, Gene Therapy 2:710-722(1995);

[0444] 额外的递送方法包括使用将待递送的核酸包装于EnGeneIC递送媒介物(EDV)中。使用双特异性抗体(其中该抗体的一条臂具有针对靶组织的特异性,而另一条臂具有针对EDV的特异性)将这些EDV特异性地递送到靶组织。该抗体将EDV带至靶细胞表面,随后EDV通过胞吞作用被带入细胞中。一旦进入细胞,就释放内容物(参见MacDiarmid等人(2009) Nature Biotechnology 27(7):643)Ahmad等人, Cancer Res. 52:4817-4820(1992);美国专利号4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028, 和4,946,787)。

[0445] 在某些实施方案中,转染可以是瞬时的,其中含有质粒的转染的基因组编辑系统进入细胞核,但在复制期间不会结合到细胞的基因组中。转染可以是稳定的,其中转染的质粒将整合到细胞的基因组区域中。

[0446] 在使用瞬时表达的某些实施方案中,可以使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体在许多细胞类型中能够具有非常高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用这样的载体已经获得了高滴度和高水平的表达。该载体可以在相对简单的系统中大量产生。腺相关病毒(“AAV”)载体也用于用靶核酸转导细胞,例如,在体外产生核酸和肽,以及用于体内和离体基因治疗程序(参见例如West等人, Virology 160:38-47(1987);美国专利号4,797,368;WO 93/24641;Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801(1994);Muzyczka, J.. Clin. Invest. 94:1351(1994)。重组AAV载体的构建在许多出版物中有所描述,包括美国专利号5,173,414;Tratschin等人, Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260(1985);Tratschin, 等人, Mol Cell. Biol. 4:2072-2081(1984);Hermonat&Muzyczka, PNAS 81:6466-6470(1984);和Samulski等人, J. Virol 63:03822-3828(1989)。

[0447] 在某些实施方案中,通过在存在DNA-PK抑制剂和允许DNA-PK抑制剂进入细胞膜和/或细胞核的任何合适培养基的情况下培养分离的细胞来进行DNA-PK抑制剂向细胞的施用。

[0448] 在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂体外、体内或离体施用给细胞。在某些实施方案中,使DNA-PK抑制剂与细胞接触约5小时、10小时、15小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、25小时、30小时、35小时、40小时、45小时、50小时、55小时、60小时、65小时、70小时、85小时、90小时、100小时、125小时、150小时、200小时或其间的任何时间段。在某些实施方案中,使DNA-PK抑制剂与细胞接触约1.5周、2.0周、2.5周、3.0周、3.5周、4周或其间的任何时间段。可在细胞培养基变化的情况下重新施用DNA-PK抑制剂。可在引入基因组编辑系统组分之前、期间或之后使DNA-PK抑制剂与细胞接触。

[0449] 在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂以约0.1 μ M、0.25 μ M、0.5 μ M、0.75 μ M、1.0 μ M、

1.25 μ M、1.50 μ M、1.75 μ M、2.0 μ M、2.5 μ M、3.0 μ M、3.5 μ M、4.0 μ M、4.5 μ M、5.0 μ M、5.5 μ M、6.0 μ M、6.5 μ M、7.0 μ M、7.5 μ M、8.0 μ M、8.5 μ M、9.0 μ M、9.5 μ M、10 μ M、10.5 μ M、11.0 μ M、11.5 μ M、12 μ M或其任何浓度的浓度施用给细胞。在施用过程中可修改DNA-PK抑制剂浓度。

[0450] 在某些实施方案中,基因编辑组分通过一种或多种载体或以RNA、mRNA的形式或在内切核酸酶组分作为纯化的蛋白质或mRNA(例如Cas9蛋白)的情况下递送到细胞中。一种或多种载体可以包括病毒载体、质粒或ssDNA。病毒载体可以包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体和单纯疱疹病毒载体,或它们的任何组合。在某些实施方案中,基因编辑组分经由RNA或合成RNA递送。

[0451] 在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂的基线条件相比,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致增加量的同源定向修复基因编辑结果。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致在靶标上或靶标外阻抑插入/缺失(来自NHEJ)。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致感兴趣基因的表达增加或减少。将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞可导致非细胞内源的基因表达。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致从细胞完全或部分去除基因或修饰基因。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致完全或部分去除或者修饰细胞中的内含子和/或外显子。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致完全或部分去除或者修饰细胞中的非编码区。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致同时或依序、完全或部分去除或者修饰细胞中的编码遗传区和/或非编码遗传区。在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因编辑系统一起施用给细胞会导致同时或依序、完全或部分去除或者修饰细胞中的编码遗传区和/或非编码遗传区,包括染色体外DNA或RNA。染色体外DNA可以是线粒体DNA、叶绿体DNA、染色体外环状DNA或病毒染色体外DNA。

[0452] 在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因组编辑系统一起施用给细胞会导致感兴趣基因的表达增加或表达减少。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂的基线条件相比,感兴趣基因的表达增加或减少可以为约下列或介于下列之间:2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂的基线表达水平相比,感兴趣基因的增加或减少可以为约下列或介于下列之间:0.5倍、1.0倍、1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍或10倍。

[0453] 在某些实施方案中,将DNA-PK抑制剂与基因组编辑系统一起施用给细胞导致基因组编辑的增加。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂的基线条件相比,基因组编辑的增加可以为约下列或介于下列之间:2.5%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%。在某些实施方案中,与不向细胞施用DNA-PK抑制剂的基线表达水平相比,基因组编辑的增加可以为约下列或介于下列之间:0.5倍、1.0倍、1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍或10倍。

[0454] 在某些实施方案中,与向细胞群仅施用基因编辑系统且未施用DNA-PK抑制剂的基线条件相比,向细胞群施用DNA-PK抑制剂和基因编辑系统会导致更大的细胞存活率。在某些实施方案中,导致更大细胞存活率的DNA-PK抑制剂是式(I)、(II)、(III-A-1)、(III-A-2)、(III-B-1)、(III-B-2)、(IV)、(V-A)和(V-B)的化合物。

[0455] 在某些实施方案中,在S或G2细胞周期阶段,在施用DNA-PK抑制剂之前、之后或期间同步化细胞。在某些实施方案中,在S或G2细胞周期阶段,在引入基因编辑组分之前、之后或期间同步化细胞。S或G2细胞周期阶段的细胞同步化可通过本领域已知的任何方法实现。作为非限制性实例,可用于使细胞在S或G2细胞周期阶段同步化的试剂包括阿非迪霉素、羟基脲、洛伐他汀、含羞草碱、诺考达唑、胸苷或它们的任何组合。(参见Lin等人,Elife.2014年12月15日;32014)。在某些实施方案中,可以在基因编辑过程中的任何时间施用用于细胞同步化的试剂。

[0456] 在某些实施方案中,DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统可以连同使用说明书包含在容器、包装或分配器中。在某些实施方案中,包含在容器、包装或分配器中的DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统连同使用说明书组成试剂盒。

[0457] 在某些实施方案中,DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统与使用说明书一起包含在试剂盒中。该试剂盒可含有任何基因组编辑系统和/或DNA-PK抑制剂和使用说明书。在某些实施方案中,DNA-PK抑制剂是由结构式(I)表示的化合物中的任一种。在某些实施方案中,基因组编辑系统选自基于大范围核酸酶的系统、基于锌指核酸酶(ZFN)的系统、基于类转录激活因子效应物的核酸酶(TALEN)系统、基于CRISPR的系统或基于NgAgo的系统。基因组编辑系统可以任何形式在试剂盒中提供,例如作为质粒、载体、DNA或RNA构建体。

[0458] 在某些实施方案中,在体内施用DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统。DNA-PK抑制剂和基因编辑系统被配制成与其预期施用途径相容。上面描述了施用途径的例子。

[0459] 在某些实施方案中,制剂还可包含多于一种所治疗的特定适应症所必需的活性化合物,例如具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。另选地/除此之外,组合物可包含增强其功能的试剂,诸如细胞毒剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。此类分子以对于预期目的有效的量适当地联合存在。

[0460] 在某些实施方案中,DNA-PK抑制剂和/或基因组编辑系统以组合疗法施用,即,与可用于治疗病理状况或病症(例如各种形式的癌症和炎症性疾病)的其它试剂例如治疗剂组合。在该上下文中,术语“组合”意指试剂基本上同时(同时地或依序地)施用。如果依序地施用,在开始施用第二种化合物时,两种化合物中的第一种优选地在治疗部位仍可检测到有效浓度。

[0461] 基因组编辑筛选方法

[0462] 本领域已知的任何方法可用于筛选细胞的基因组编辑效率,包括NHEJ和/或HDR的效率。例如,筛选方法可以包括基于PCR的靶向区域扩增,然后对扩增区域进行测序或深度测序以确认基因组编辑。PCR基因分型能够在刺激HDR时对化合物进行量化和排序。其它筛选方法可以包括新一代测序。参见例如Bell等人,“A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing,”BMC Genomics,15:1002(2014)。

[0463] 可对PCR引物进行工程改造以选择性扩增未修饰和经修饰的遗传区,从而产生取决于遗传修饰状态的不同长度的扩增子。然后可以在凝胶上分离扩增子,并使用Bio-Imager通过密度测定法估计HDR效率。另选地,新的PCR技术快速微滴数字PCR(DDPCR)可用于同时测量基因组编辑样品中的HDR和NHEJ事件。参见例如Miyaoka等人,“Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus,nuclease,and cell

type on genome-editing,” *Scientific Reports*, 6, 2016。可用于筛选细胞进行基因组修饰的其它方法包括Sanger测序、深度测序和RT-PCR。

[0464] 在某些实施方案中,交通指挥灯报道因子(TLR)构建体用于筛选细胞。TLR筛选包括报道因子细胞,该细胞被工程改造成在靶向的基因组编辑后表达荧光标志物。适当的靶向以后,所述细胞表达荧光标志物。通过本领域已知的任意方法,例如流式细胞计数分析,可以进行适当靶向的细胞的定量。参见,例如,Certo等人.2011,“Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints,” *Nature Methods*, 8, 第671-676页(2011)。

[0465] 本发明的化合物的制备

[0466] 本文中使用的所有缩写、符号和惯例与当代科学文献中使用那些一致。参见,例如,Janet S.Dodd,编,The ACS Style Guide:A Manual for Authors and Editors,第2版,Washington,D.C.:American Chemical Society,1997。如下定义描述了本文中使用的术语和缩写:

[0467] BPin频哪醇硼酸酯

[0468] 盐水饱和的NaCl水溶液

[0469] DCM 二氯甲烷

[0470] DIAD 二异丙基偶氮二甲酸酯

[0471] DIEA 二异丙基乙胺

[0472] DMA 二甲基乙酰胺

[0473] DMF 二甲基甲酰胺

[0474] DMSO 二甲基亚砷

[0475] DTT 二硫苏糖醇

[0476] ESMS 电喷射质谱法

[0477] Et₂O 乙醚

[0478] EtOAc 乙酸乙酯

[0479] EtOH 乙醇

[0480] HEPES 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸

[0481] HPLC 高效液相色谱法

[0482] IPA 异丙醇

[0483] LAH 氢化铝锂

[0484] LC-MS 液相色谱法-质谱法

[0485] LDA 二异丙基乙基氨基锂

[0486] Me 甲基

[0487] MeOH 甲醇

[0488] MsCl 甲磺酰氯

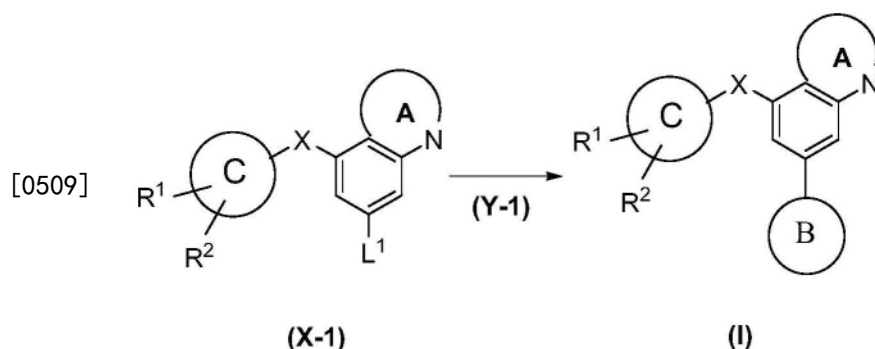
[0489] MTBE 甲基叔丁基醚

[0490] NMP N-甲基吡咯烷

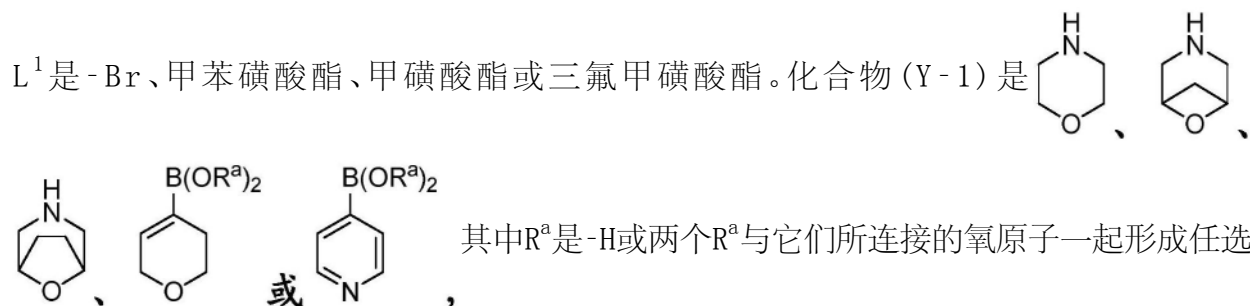
[0491] Pd₂(dba)₃ 三(二亚苺基丙酮)二钯(0)

[0492] Pd(dppf)Cl₂ 1,1'-双(二苺基膦基)-二茂铁二氯-钯

- [0493] PG 保护基
- [0494] Ph 苯基
- [0495] (rac)-BINAP 外消旋的2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘
- [0496] RockPhos 二叔丁基(2',4',6'-三异丙基-3,6-二甲氧基-[1,1'-联苯]-2-基)膦
- [0497] RT或rt 室温
- [0498] SFC 超临界流体色谱法
- [0499] SPhos 2-二环己基膦基-2',6'-二甲氧基联苯
- [0500] TBAI 四丁基碘化铵
- [0501] tBu 叔丁基
- [0502] THF 四氢呋喃
- [0503] TEA 三乙胺
- [0504] TMEDA 四甲基乙二胺
- [0505] VPhos [3-(2-二环己基膦基苯基)-2,4-二甲氧基-苯基]磺酰氧基钠
- [0506] 通用合成方法
- [0507] 一般而言,通过本文描述的方法或通过本领域技术人员已知的其它方法,例如,2014年3月12日提交的US2013/0281431和PCT/US2014/024767,可以制备本发明的化合物。在下面的例证部分中描述了本发明的化合物的具体示例性制备。
- [0508] 在一个实施方案中,制备由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐的方法采用以下步骤:在合适的条件下使化合物(X-1)与化合物(Y-1)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐



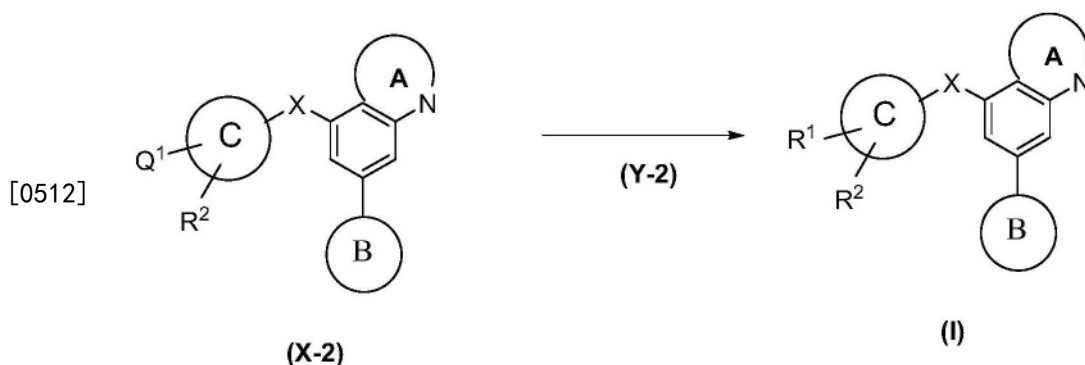
[0510] 式(I)的变量每个且独立地如上面关于本发明的化合物所描述。化合物(X-1)的 L^1 是离去基团诸如卤素(例如,-F、-Cl、-Br或-I)、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯,且化合物(X-1)的其它变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述。在一个具体实施方案中,



地被一个或多个 C_{1-2} 烷基取代的二氧杂环戊烷环。在一个具体实施方案中,两个 R^a 与它们所

连接的氧原子一起和与硼原子一起形成4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(dioxaborolane)。可以使用本领域已知的用于实现交联(诸如Csp₂-Csp₂偶联)的任意合适的条件。在下面在例证中描述了具体示例性条件。

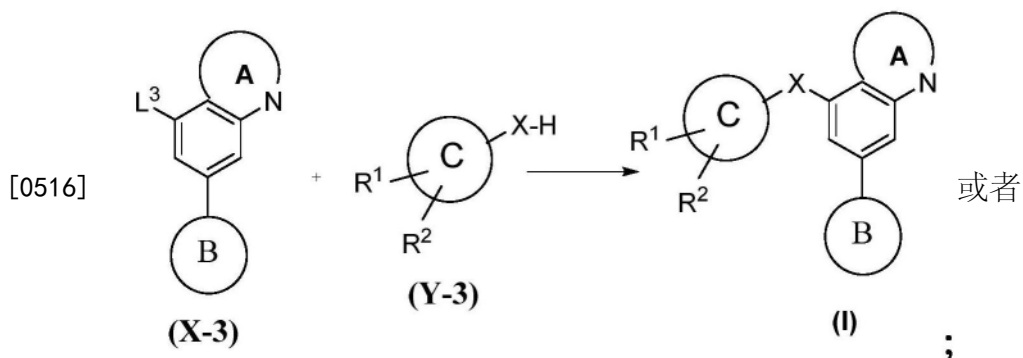
[0511] 在另一个实施方案中,通过采用在合适的条件下使化合物(X-2)与化合物(Y-2)反应的步骤,制备式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R¹是-NHC(O)R⁴、-NHC(O)OR⁴、-NHC(O)NHR⁴、-NHS(O)₂R⁴、-NHR⁴或-OR⁴,且式(I)的其它变量每个且独立地如上所述



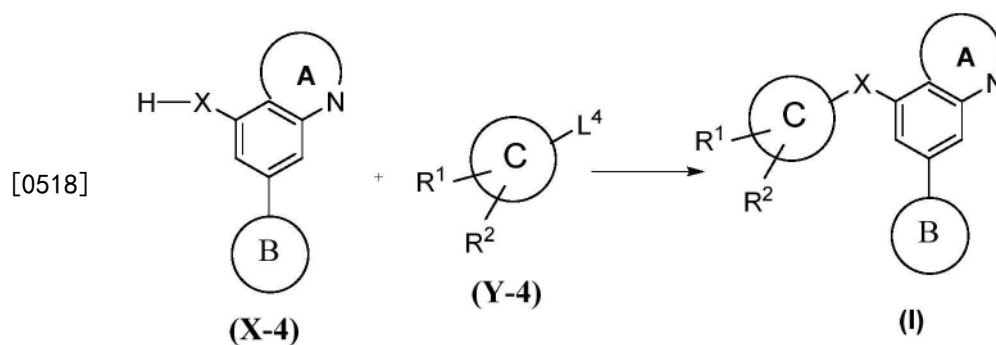
[0513] 化合物(X-2)的Q¹是-NH₂或-OH,且化合物(X-2)的其它变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述。化合物(Y-2)是R⁴-C(O)-L²、R⁴-O-C(O)-L²、NHR⁴-C(O)-L²、R⁴S(O)₂-L²、R⁴-L²、R⁴C(O)OR^b或R⁴-N=C=O,其中每个R⁴独立地如关于式(I)所描述;L²是卤素(例如,-F、-Cl、-Br或-I)、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯;和R^b是C₁₋₄烷基,诸如甲基或乙基。在一个具体实施方案中,L²是-Br、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯。可以使用本领域已知的实现反应的任意合适的条件。在下面在例证中描述了具体示例性条件。

[0514] 在另一个实施方案中,通过采用以下步骤的方法,制备式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中X是-NH-或-O-,且式(I)的其它变量每个且独立地如上所述:

[0515] (i) 使化合物(X-3)与化合物(Y-3)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:

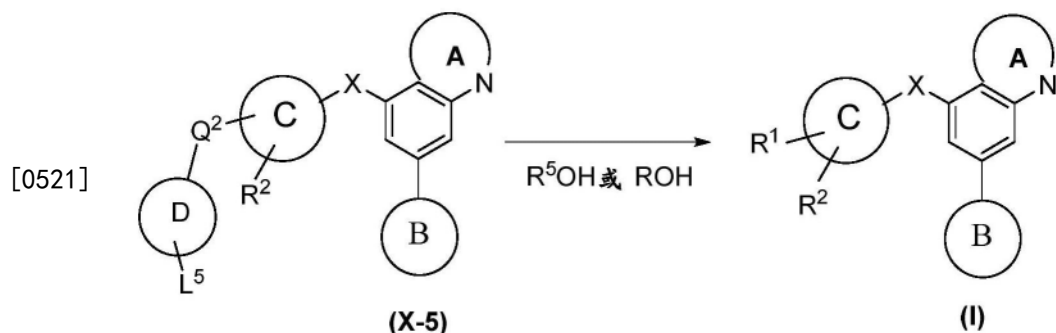


[0517] (ii) 使化合物(X-4)与化合物(Y-4)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0519] 化合物(X-3)的 L^3 是卤素(例如,-Br、-Cl或-I)。化合物(Y-4)的 L^4 是卤素(例如,-Br、-Cl或-I)、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯。化合物(Y-3)和(X-4)的每个X独立地是-NH-或-O-。化合物(X-3)、(X-4)、(Y-3)和(Y-4)中的每一个的其余变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述。在一个具体实施方案中,化合物(X-3)的 L^3 是-Br。在另一个具体实施方案中,化合物(Y-4)的 L^4 是-Br、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯。可以使用本领域已知的亲核取代的任意合适的条件。在下面在例证中描述了具体示例性条件。

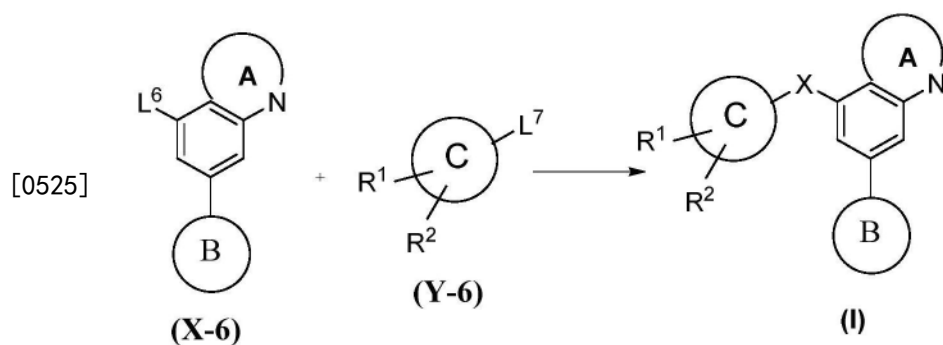
[0520] 在另一个实施方案中,本发明的方法采用以下步骤:使化合物(X-5)与 R^5OH 或 ROH 反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐,其中 R^1 是-C(O)NHR ^{4} 、-C(O)OR ^{4} 、-NHC(O)R ^{4} 、-NHC(O)OR ^{4} 、-NHC(O)NHR ^{4} 、-NHS(O) $_2$ R ^{4} 、-NHR ^{4} 、-C $_{1-4}$ 烷基-NHR ^{4} 或-OR ^{4} 或 R^7 ;R ^{4} 是被至少一个-OR ^{5} 取代的5-10元杂芳基;R ^{7} 是被至少一个-OR取代的5-10元杂芳基;且R、R ^{5} 和式(I)的其它变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述,前提条件是,R和R ^{5} 不是氢:



[0522] 化合物(A-5)的 Q^2 是键、-C(O)NH-、-C(O)O-、-NHC(O)-、-NHC(O)O-、-NHC(O)NH-、-NHS(O) $_2$ -、-NH-、-C $_{1-4}$ 烷基-NH-或-O-。化合物(A-5)的环D是5-10元杂芳基。 L^5 是卤素(例如,-Br、-Cl、-F或-I)。 ROH 的R、 R^5OH 的 R^5 和化合物(X-5)的其余变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述。在一个具体实施方案中, L^5 是-Br。可以使用本领域已知的亲核芳族取代的任意合适的条件。在下面在例证中描述了具体示例性条件。

[0523] 在另一个实施方案中,通过采用以下步骤的方法制备式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中X是-O-,且式(I)的其它变量每个且独立地如上所述:

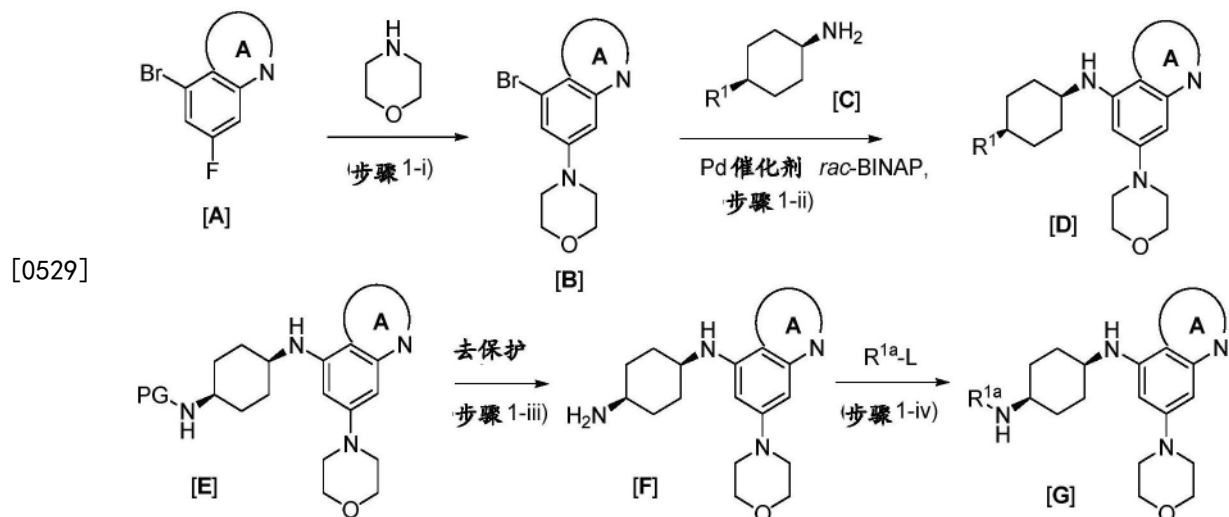
[0524] 使化合物(X-6)与化合物(Y-6)反应以形成由式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0526] 化合物(X-6)的 L^6 是-OH。化合物(Y-6)的 L^7 是-OH。化合物(X-6)和(Y-6)中的每一个的其余变量每个且独立地如上面关于式(I)所描述。可以使用本领域已知的亲核取代的任意合适的条件,诸如Mitsunobu反应。在下面在例证中描述了具体示例性条件。

[0527] 在一个具体实施例中,可以如下面在方案1中所述制备式(I)的化合物,其中X是-NH-。因此,如方案1的步骤1-i中所示,通过在极性非质子溶剂中加热混合物,可以使式A的杂芳基化合物与吗啉或吗啉类似物反应,得到式B的化合物。使用钯催化的(例如, $Pd_2(dba)_3$)、膦配体辅助的Buchwald/Hartwig-型偶联,如方案1的步骤1-ii中所示,可以使式B的化合物与式C的氨基环己烷反应,得到式D的化合物,其中 R^1 和 R^2 如本文别处所述。在一个实例中,当制备式E的单被保护的內消旋环己烷-1,4-二胺类时,保护基的除去形成式F的化合物,如方案1的步骤1-iii中所示。然后可以使得到的游离胺与具有针对胺类反应的基团的不同部分(例如, R^{1a} -L,其中L是离去基团,例如氯、溴、碘、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯;或其中L是反应性含羰基部分,例如活性酯或异氰酸根合基团)反应,得到式G的化合物,如方案1的步骤1-iv中所示。在合适的条件下采用化合物(C)的巯基对应物,可以以与方案1中所述类似的方式制备式(I)的化合物,其中X是-S-。

[0528] 实施例1. 式G的化合物的一般制备

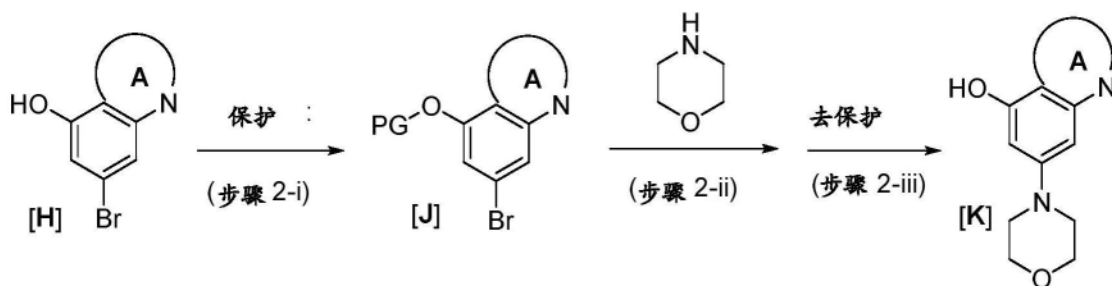


[0530] 方案1

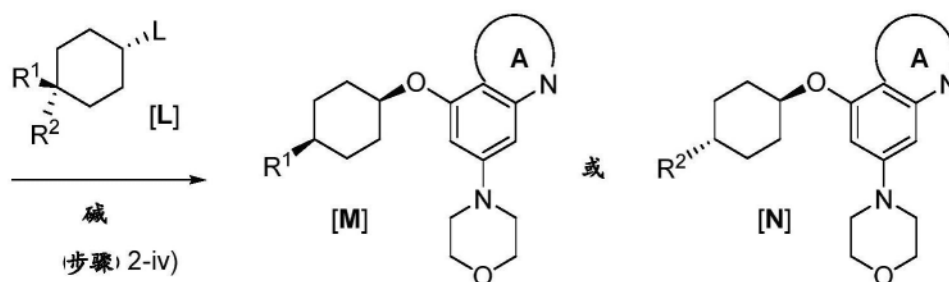
[0531] 在另一个实施例中,可以如下文方案2a和2b中概括的制备式(I)的化合物,其中X是-O-。因此,如方案2a的步骤2-i中所示,可以保护式H的杂芳基化合物的羟基,得到式J的化合物,然后可以通过在极性非质子溶剂中加热混合物使其与吗啉或吗啉类似物反应,除去保护基后得到式K的化合物,如方案2a的步骤2-ii和2-iii中所示。随后,如方案2a的步骤

2-iv中所示,可以使式K的化合物与式L的化合物(例如其中L是离去基团,例如氯、溴、碘、甲苯磺酸酯、甲磺酸酯或三氟甲磺酸酯)在足以影响其离去基团的 S_N2 置换的条件下反应,得到式M或式N的化合物,视 R^1 或 R^2 是否为氢而定。在那些情况中,当 R^1 或 R^2 是被保护的氮或氧部分时,可以通过除去保护基且随后合成操作得到的游离胺/醇生产本发明的化合物。

[0532] 实施例2. 式M、N、R和S的化合物的一般制备

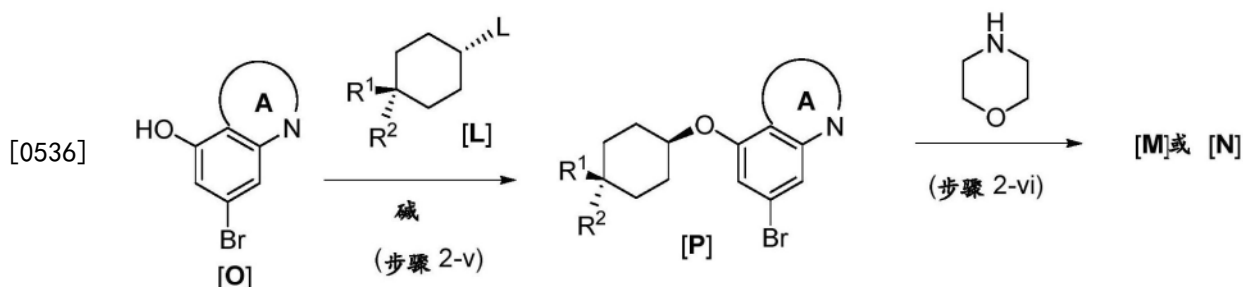


[0533]



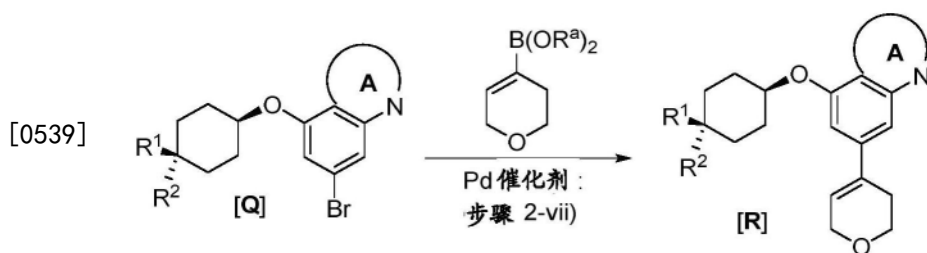
[0534] 方案2a

[0535] 可替换地,如方案2b中所示,可以使式O的化合物的羟基与式L的化合物反应,得到式P的稠合的双环杂芳基溴,随后可以使所述双环杂芳基溴与吗啉或吗啉类似物反应,得到式M或式N的化合物。



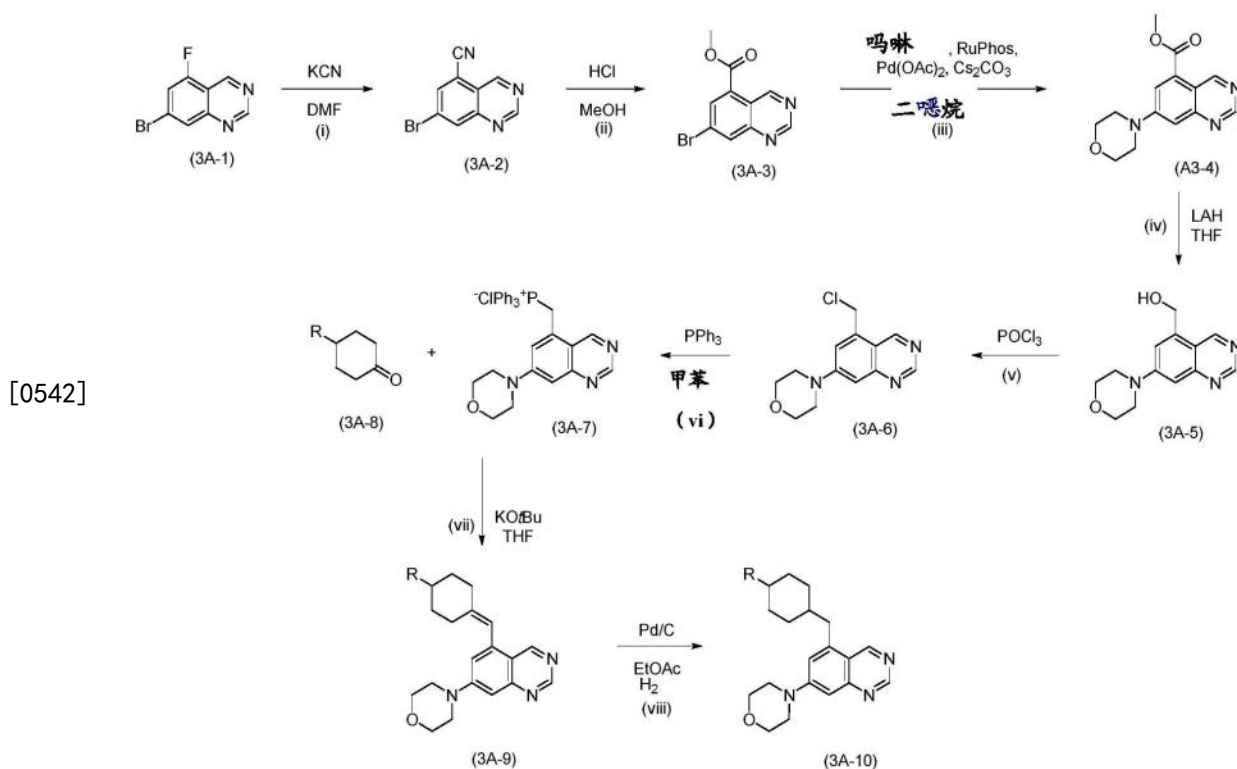
[0537] 方案2b

[0538] 可替换地,如方案2c中所示,可以通过使式Q的化合物与(3,6-二氢-2H-吡喃-4-基)硼酸二烷基酯反应制备本发明的化合物,其中环B是二氢吡喃环,得到式R的化合物。所述反应可以在碱性条件(例如,金属碳酸盐,诸如 Na_2CO_3)下在Pd催化剂诸如Pd(dppf)下进行。方案2c中的 R^a 是-H或两个 R^a 与它们所连接的氧原子一起形成任选地被一个或多个 C_{1-2} 烷基取代的二氧杂环戊烷环。在一个具体实施方案中,两个 R^a 与它们所连接的氧原子一起和与硼原子一起形成4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷。



[0540] 方案2c

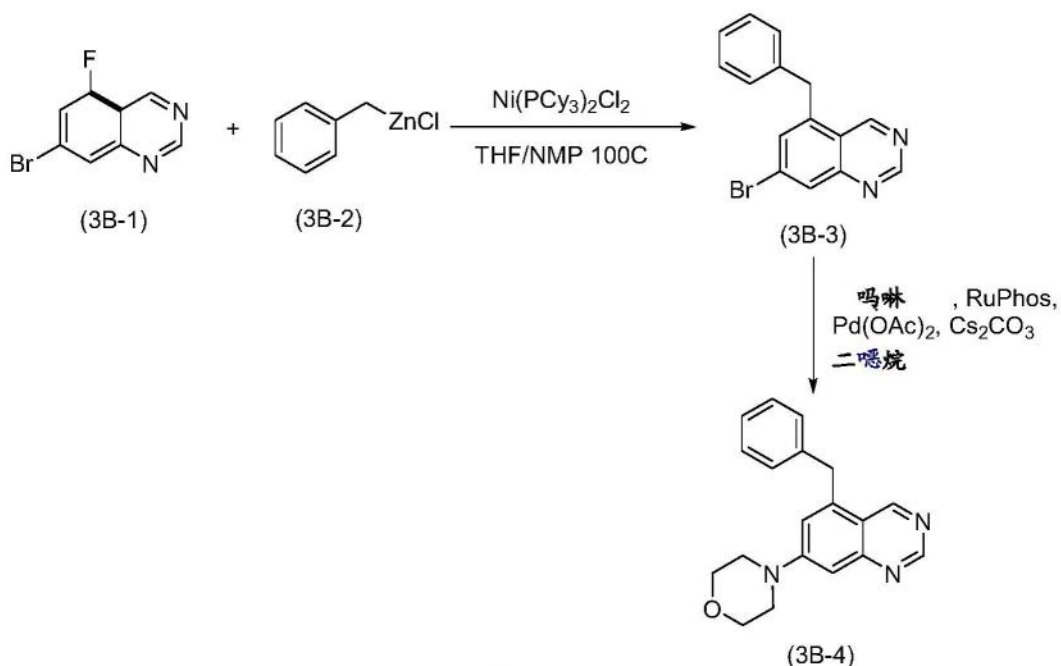
[0541] 在另一个实施例中,可以如下面在方案3A和3B中所概括制备式(I)的化合物,其中X是 $-\text{CH}_2-$ 。例如,可以如方案3A中所示制备化合物(3A-10),其中环C是 C_{4-6} 环烷基且X是 $-\text{CH}_2-$ 。在步骤(i)中,化合物(3A-2)的氰化物基团对化合物(3A-1)的F基团的亲核芳族取代产生化合物(3A-2)。用HCl的甲醇溶液处理化合物(3A-2),形成酯化合物(3A-3),其在Buchwald条件下在步骤(iii)中与吗啉反应以形成化合物(3A-4)。合适的还原剂诸如氢化铝锂对酯化合物(3A-4)的还原产生伯醇化合物(3A-5)。用合适的氯化剂诸如 POCl_3 将醇化合物(3A-5)氯化,随后与三苯基膦反应,形成Wittig盐,化合物(3A-7)。用碱诸如 KO^tBu 将化合物(3A-7)去质子化,产生化合物(3A-8)。化合物(3A-8)与适当地取代的环己酮反应,产生烯烃化合物(3A-9)。然后在合适的氢化条件诸如Pd/C下用 H_2 气体还原烯烃化合物(3A-9)。



[0543] 方案3A

[0544] 在另一个实施例中,可以如方案3B中所示制备化合物(3B-4),其中环C是芳族环系(苯基或杂芳基)且X是 $-\text{CH}_2-$ 。方案3B的具体条件可以在现有技术中找到,例如, J.Org.Chem.2014,79,4285-4292。

[0545]



[0546] 方案3B

[0547] 可替换地,表2的化合物还可以用于制备式(I)的其它化合物,如下面在例证中举例说明的。

[0548] 例证

[0549] 分析表征

[0550] 本文中使用的术语“ R_t (min)”表示与化合物有关的HPLC保留时间,以分钟为单位。除非另有说明,否则用于获得报告的保留时间的HPLC方法如下所述:

[0551] HPLC方法A

[0552] 仪器:Waters Acquity UPLC,Waters 3100Mass Spec

[0553] 柱:Waters CSH C18 1.7 μm 2.1x50mm

[0554] 温度:25°C

[0555] 溶剂A:水+0.1% TFA

[0556] 溶剂B:乙腈+0.1% TFA

[0557] 检测:DAD 220-400nm

[0558] 梯度:

[0559] 0min 95%A,5%B

[0560] 0.6min 5%A,95%B

[0561] 0.7min 5%A,95%B

[0562] 1.4min 95%A,5%B

[0563] 流速:0.600mL/min

[0564] HPLC方法B

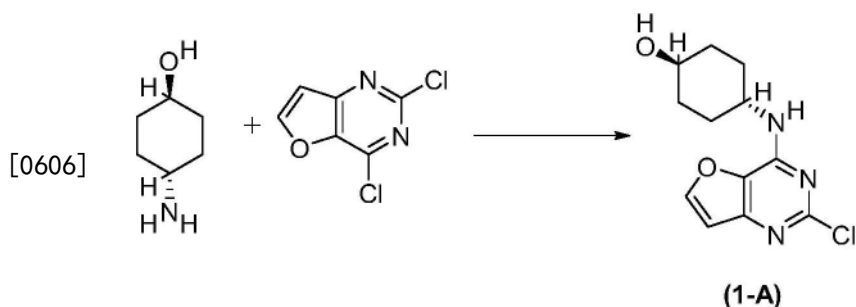
[0565] 仪器:Waters Autopure

[0566] 柱:Waters Sunfire C18 5 μm ,4.6x100mm

[0567] 温度:环境温度

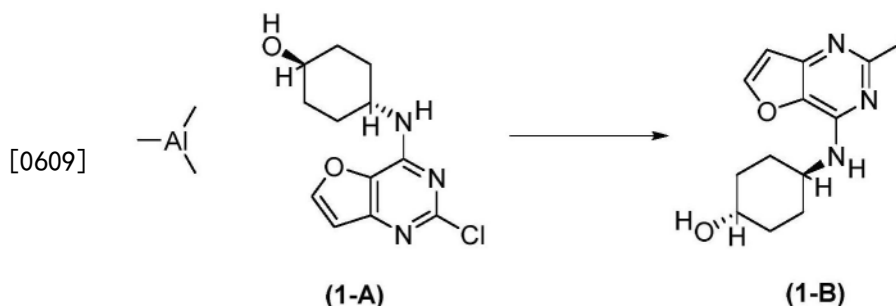
[0568] 溶剂A:水+0.1% TFA

- [0569] 溶剂B:乙腈+0.1%TFA
- [0570] 检测:质谱仪-Waters 3100,DAD(220-400nm)
- [0571] 梯度:
- [0572] 0min-98%A,2%B
- [0573] 3.8min-2%A,98%B
- [0574] 4.9min-2%A,98%B
- [0575] 5.0min-98%A,2%B
- [0576] 流速:1.50mL/min
- [0577] HPLC方法C
- [0578] 仪器:Waters Acquity UPLC,Waters 3100Mass Spec
- [0579] 柱:Waters CSH C18 1.7um 2.1x50mm
- [0580] 温度:25℃
- [0581] 溶剂A:水+0.1%TFA
- [0582] 溶剂B:乙腈+0.1%TFA
- [0583] 检测:DAD 220-400nm
- [0584] 梯度:
- [0585] 0min 90%A,10%B
- [0586] 0.6min 40%A,60%B
- [0587] 0.7min 90%A,10%B
- [0588] 1.4min 90%A,10%B
- [0589] 流速:0.600mL/min
- [0590] HPLC方法D
- [0591] 仪器:Waters Acquity UPLC,Waters 3100Mass Spec
- [0592] 柱:Waters UPLC BEH C8 1.7um 2.1x50mm
- [0593] 温度:25C
- [0594] 溶剂A:95/5水(50mM甲酸铵,pH9)/乙腈
- [0595] 溶剂B:乙腈
- [0596] 检测:DAD 220-400nm
- [0597] 梯度:
- [0598] 0min 95%A,5%B
- [0599] 0.6min 5%A,95%B
- [0600] 0.7min 5%A,95%B
- [0601] 1.4min 95%A,5%B
- [0602] 流速:0.600mL/min。
- [0603] 实施例1:化合物的制备
- [0604] 化合物1:2-甲基-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺的制备
- [0605] 4-[(2-氯呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇(1-A)



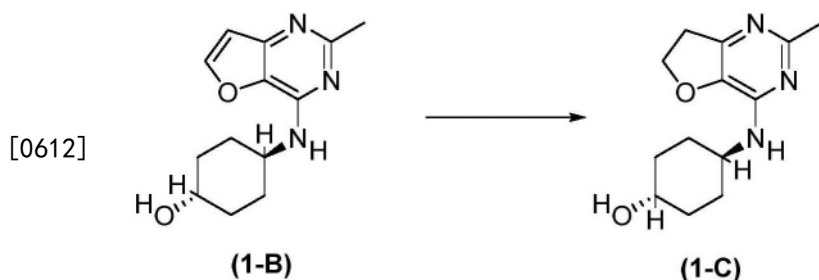
[0607] 在配有冷凝器的圆底烧瓶中,将4-氨基环己烷-1-醇(1.219g,10.58mmol)、2,4-二氯呋喃并[3,2-d]嘧啶(2.000g,10.58mmol)、Hunig氏碱(2.735g,3.686mL,21.16mmol)和*i*PrOH(26.38mL)的混合物加热至100℃保持16h。将溶剂除去,并将粗残余物在EtOAc和饱和NH₄Cl水溶液之间分配。分离各层,并将水层用EtOAc(2×)进一步萃取。将合并的有机层干燥(Na₂SO₄)、过滤并浓缩,得到橙色固体。¹H NMR(CDCl₃)显示干净的期望的4-[(2-氯呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇(2.659g,9.932mmol,93.89%)以及残余的EtOAc。在真空下干燥过夜并原样原样下一步。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.73(d,J=1.7Hz,1H),6.78(d,J=2.1Hz,1H),5.09(s,1H),4.20-4.08(m,1H),3.78-3.61(m,1H),2.19(d,J=11.5Hz,2H),2.05(d,J=10.8Hz,2H),1.66-1.45(m,4H),1.45-1.30(m,2H)。ESI-MS *m/z*计算值267.07745,实测268.15(M+1)⁺;保留时间:0.56分钟。

[0608] 4-[(2-甲基呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇(1-B)



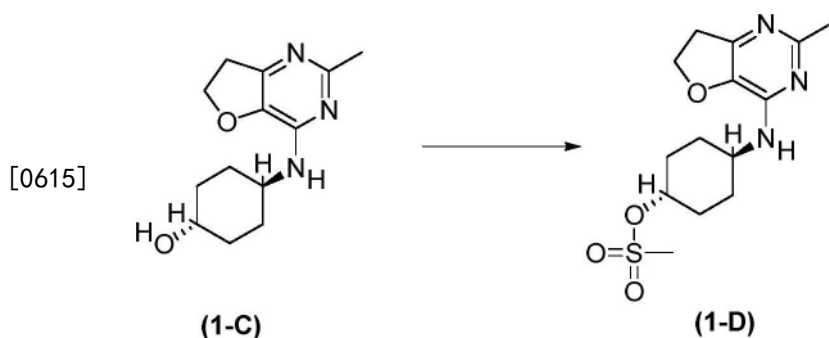
[0610] 在N₂下在烘干的微波管中,将化合物(1-A)溶解在无水THF(8.0mL)中。通过用N₂在溶液中鼓泡5分钟,将反应物脱气。加入Pd(PPh₃)₄(215.9mg,0.1868mmol)并脱气另外2分钟。小心地加入三甲基铝(2.107g,2.802mL 2M,5.603mmol),并将反应混合物在125℃的铝珠子浴中加热16h。将反应混合物小心地倒入饱和NH₄Cl水溶液中。分离各层,并将水层用EtOAc(2×)和CH₂Cl₂(2×)进一步萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩成橙色半固体。将粗残余物通过硅胶色谱法(12g Isco金柱,线性梯度0→30%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到期望的产物(180.75mg,0.7309mmol,78.27%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ7.67(d,J=2.1Hz,1H),6.75(d,J=2.2Hz,1H),4.91(d,J=7.8Hz,1H),4.15(tdt,J=12.2,8.1,4.0Hz,1H),3.70(ddd,J=14.7,10.3,4.1Hz,1H),2.57(s,3H),2.19(d,J=12.7Hz,2H),2.11-1.98(m,2H),1.67(s,1H),1.52(ddd,J=23.4,13.0,3.4Hz,2H),1.35(ddd,J=24.1,12.9,3.3Hz,2H)。ESI-MS *m/z*计算值247.13208,实测248.25(M+1)⁺;保留时间:0.46分钟。

[0611] 4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇(1-C)



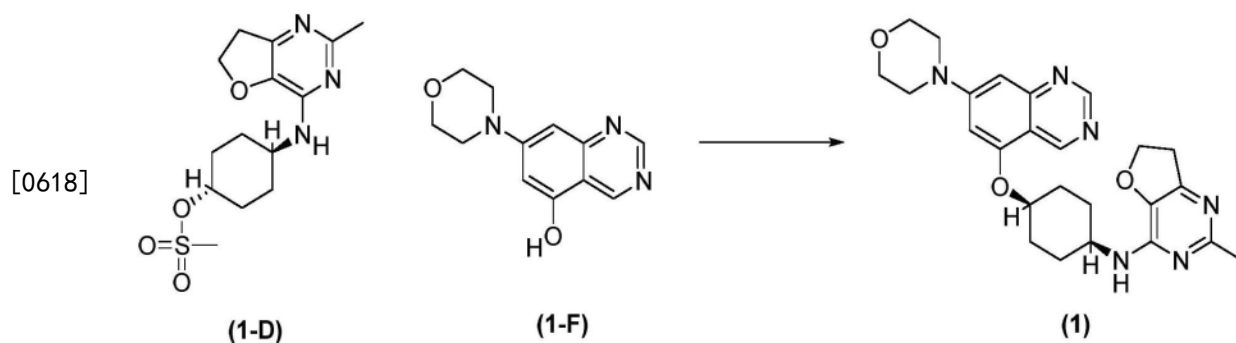
[0613] 向含有 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (3.424g, 4.877mmol) 的烧瓶中加入在EtOH (270.9mL) 和HCl (11mL 2M, 22.00mmol) 中的化合物 (1-B) (2.68g, 9.754mmol)。将得到的反应混合物在50psi H_2 下在Parr振荡器上振荡2h 10min。将反应混合物穿过硅藻土过滤并浓缩。将物质干燥加载到硅藻土上并通过硅胶色谱法 (80g Isco金柱, 线性梯度0% 己烷类 $\rightarrow$ 30% MeOH/ CH_2Cl_2) 纯化。将有关级分合并和浓缩以得到4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇 (2.15g, 8.624mmol, 88.40%)。 ^1H NMR (400MHz, MeOH- D_4) δ 4.85-4.79 (t, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 4.24-4.12 (m, 1H), 3.63-3.51 (m, 1H), 3.42 (t, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.11-1.85 (m, 4H), 1.44 (dq, $J=22.9, 10.4\text{Hz}$, 4H)。ESI-MS m/z 计算值249.14772, 实测250.19 ($\text{M}+1$) $^+$; 保留时间: 0.46分钟。

[0614] 甲磺酸[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯 (1-D)



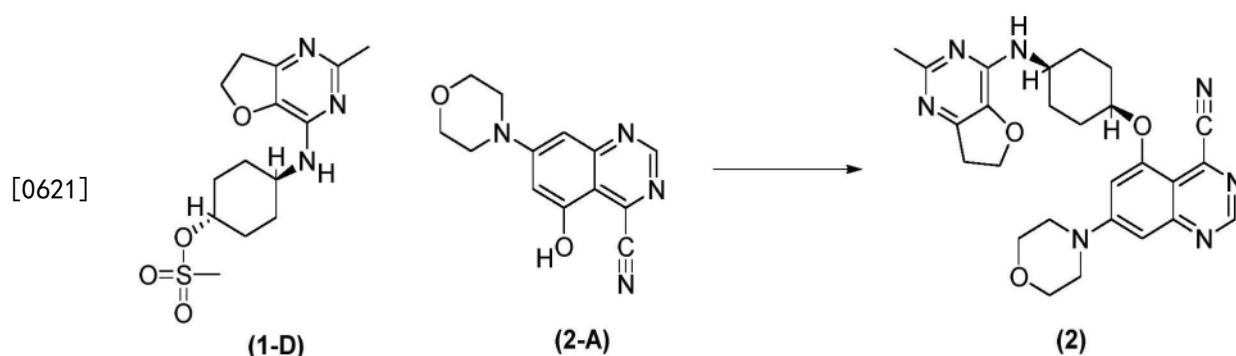
[0616] 向4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己醇 (2.15g, 8.624mmol) 和 Et_3N (2.793g, 3.847mL, 27.60mmol) 在 CH_2Cl_2 (223.6mL) 中的室温悬浮液中加入MsCl (1.087g, 734.5 μL , 9.486mmol)。继续在室温搅拌30min。将反应物倒入饱和的 NaHCO_3 。分离各层, 并将水相用 CH_2Cl_2 (2 $\times$ 150mL) 进一步萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法 (120g Isco金柱, 线性梯度0% $\rightarrow$ 10% MeOH/ CH_2Cl_2) 纯化。得到甲磺酸[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯 (2.3269g, 7.107mmol, 82.43%)。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 4.74-4.62 (m, 1H), 4.57 (t, $J=9.1\text{Hz}$, 2H), 4.34 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 4.11-3.95 (m, 1H), 3.18 (t, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.20 (d, $J=10.4\text{Hz}$, 4H), 1.78 (dd, $J=22.4, 10.3\text{Hz}$, 2H), 1.34 (dd, $J=22.4, 10.8\text{Hz}$, 2H)。ESI-MS m/z 计算值327.12527, 实测328.16 ($\text{M}+1$) $^+$; 保留时间: 0.52分钟。

[0617] 2-甲基-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺



[0619] 将7-吗啉代喹唑啉-5-醇(17.4mg, 0.07524mmol, 化合物(1-F):请参见下面关于化合物7的制备)、甲磺酸[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(49.3mg, 0.1506mmol)和 Cs_2CO_3 (73.6mg, 0.2259mmol)在无水二噁烷(1.0mL)中的悬浮液加热至110℃保持72h。将反应混合物倒入 H_2O 中,并用 CH_2Cl_2 萃取。将合并的有机层干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(12g Isco金柱,线性梯度0→10%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到期望的产物,尽管它含有残余的杂质。将该物质通过反相Isco[50g C18 Aq柱;0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA调节剂)]进一步纯化。将有关级分合并和浓缩。将残余物溶解在 CH_2Cl_2 中并穿过Stratospheres SPE柱(cartridge)以得到2-甲基-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺(12.2mg, 0.02374mmol, 31.55%)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 9.43(s, 1H), 9.09(s, 1H), 6.78(s, 1H), 6.58(d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 4.75(s, 1H), 4.59(t, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 4.52(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 4.24-4.11(m, 1H), 3.94-3.83(m, 4H), 3.42-3.31(m, 4H), 3.19(t, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 2.48(s, 3H), 2.21(d, $J=13.1\text{Hz}$, 2H), 1.99(dd, $J=12.6, 3.6\text{Hz}$, 2H), 1.90-1.72(m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值462.23795, 实测463.26($M+1$)+;保留时间:0.5分钟。

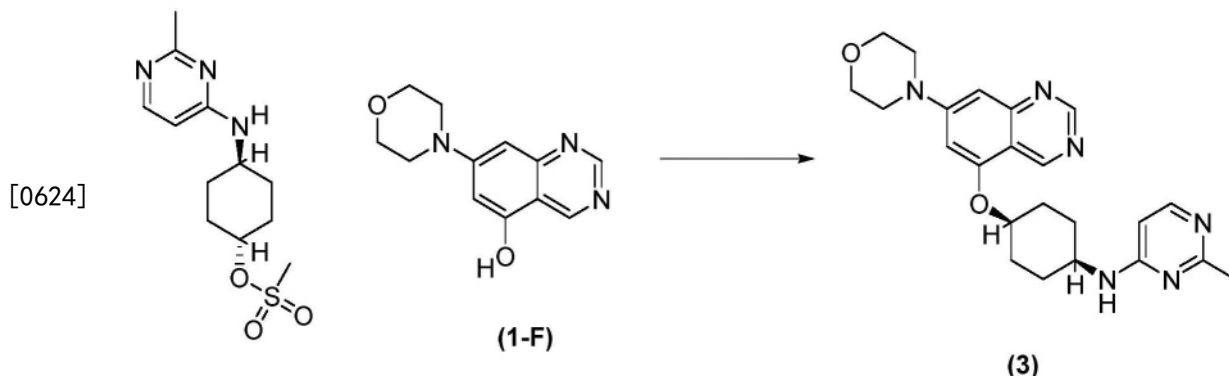
[0620] 化合物2:5-[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈的制备



[0622] 将5-羟基-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(31mg, 0.1210mmol, 化合物(2-A):参见下面化合物11的制备)、甲磺酸[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(80mg, 0.2444mmol)和 Cs_2CO_3 (160mg, 0.4911mmol)在无水二噁烷(1.5mL)中的悬浮液加热至115℃保持72h。将反应混合物穿过硅藻土过滤,并浓缩滤液。将粗残余物溶解在最小量DMSO中并通过反相Isco[150g C18 Aq柱;0→50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并和浓缩。将残余物溶解在 CH_2Cl_2 中并穿过Stratospheres SPE柱以得到产物,尽管纯度仅为~75%。通过正相Isco(40g Isco金柱,线性梯度0%→10%MeOH/ CH_2Cl_2)重新纯化以得

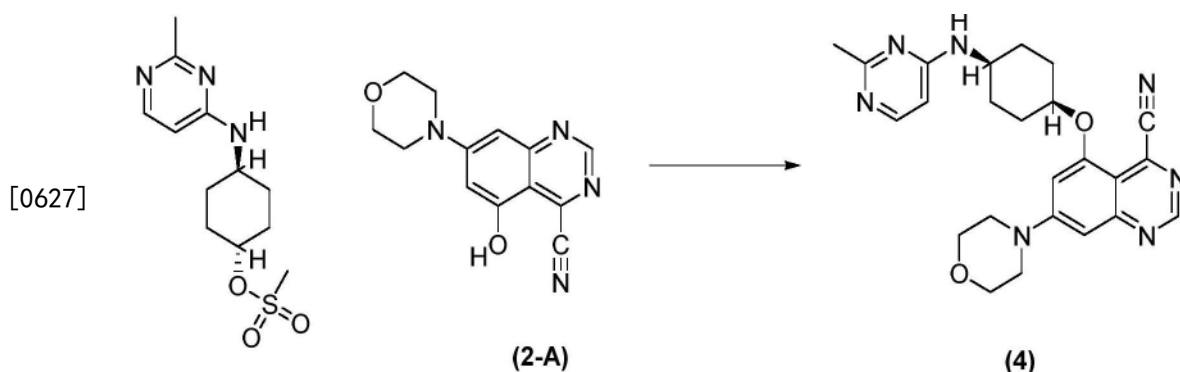
到5-[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基) 氨基] 环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(3.1mg, 0.005881mmol, 4.861%), 具有92.5重量%纯度。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ9.08(s, 1H), 6.83(d, J=2.1Hz, 1H), 6.67(d, J=2.0Hz, 1H), 4.84(s, 1H), 4.64(dd, J=8.6, 4.2Hz, 1H), 4.62-4.52(m, 2H), 4.27-4.17(m, 1H), 3.94-3.85(m, 4H), 3.51-3.40(m, 4H), 3.18(t, J=9.1Hz, 2H), 2.49(s, 3H), 2.33-2.22(m, 2H), 2.07-1.86(m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值487.2332, 实测488.34(M+1)+; 保留时间: 0.63分钟。

[0623] 化合物3: 2-甲基-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基) 氧基环己基]嘧啶-4-胺的制备



[0625] 将7-吗啉代喹唑啉-5-醇(三氟乙酸(1)) (68.78mg, 0.1992mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基) 氨基] 环己基]酯(142.1mg, 0.4980mmol)和Cs₂CO₃ (324.5mg, 0.9960mmol)在无水二噁烷(3.3mL)中的悬浮液加热至110℃保持24h。将反应混合物倒入H₂O中, 并用CH₂Cl₂萃取。将合并的有机层干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱, 线性梯度0→100% CH₂Cl₂-20% MeOH/CH₂Cl₂) 纯化以得到产物(11.5mg, 0.02653mmol, 13.32%)。¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ9.45(s, 1H), 9.12(s, 1H), 8.12(d, J=5.9Hz, 1H), 6.86-6.77(m, 1H), 6.60(d, J=2.2Hz, 1H), 6.18(d, J=5.9Hz, 1H), 4.87(s, 1H), 4.79(d, J=3.5Hz, 1H), 4.02-3.80(m, 5H), 3.48-3.30(m, 4H), 2.52(s, 3H), 2.32-2.20(m, 2H), 2.07-1.95(m, 2H), 1.94-1.76(m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值420.2274, 实测421.42(M+1)+; 保留时间: 0.55分钟。

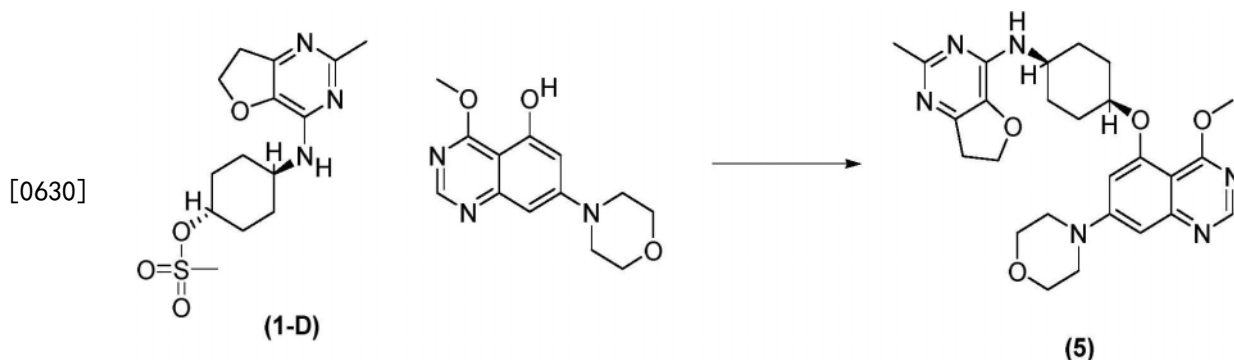
[0626] 化合物4: 5-[4-[(2-甲基嘧啶-4-基) 氨基] 环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈的制备



[0628] 将5-羟基-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(三氟乙酸盐) (95.42mg, 0.2577mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基) 氨基] 环己基]酯(220.6mg, 0.7731mmol)和Cs₂CO₃ (420mg, 1.289mmol)在无水DMF(2.6mL)中的悬浮液加热至80℃保持112h。将反应混合物穿过玻璃料(glass frit)过滤, 用CH₂Cl₂漂洗。将滤液蒸发, 并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金

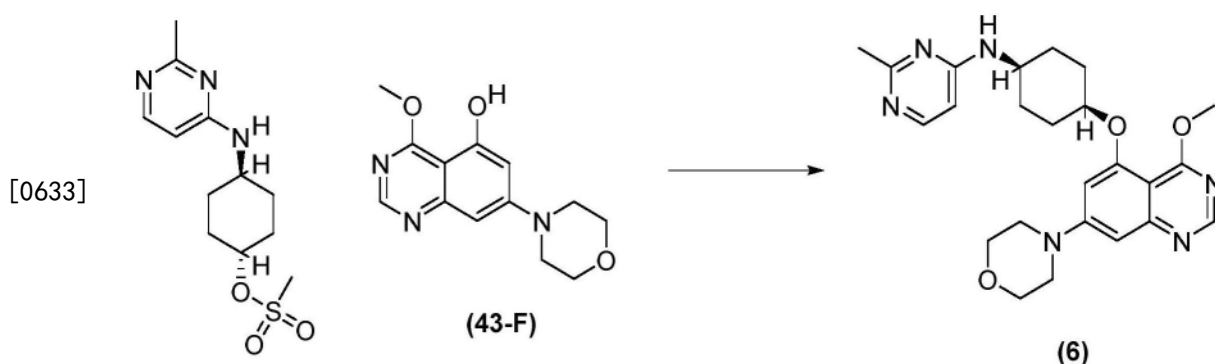
柱,线性梯度0→100%CH₂Cl₂-20%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到产物(41.8mg,0.09101mmol,35.32%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d)δ9.08(s,1H),8.06(d,J=5.9Hz,1H),6.83(d,J=2.3Hz,1H),6.71-6.63(m,1H),6.14(d,J=6.0Hz,1H),4.93(s,1H),4.85(s,1H),4.06-3.79(m,5H),3.49(s,3H),3.48-3.40(m,4H),2.49(s,3H),2.34-2.21(m,2H),2.13-1.85(m,6H)。ESI-MS m/z计算值445.22263,实测446.35(M+1)⁺;保留时间:0.61分钟。

[0629] 化合物5:N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-胺的制备



[0631] 将4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(三氟乙酸(1))(73.78mg,0.1966mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基-6,7-二氢呋喃并[3,2-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(161mg,0.4918mmol)和Cs₂CO₃(321mg,0.9852mmol)在无水DMF(1.3mL)中的悬浮液加热至90℃保持24h。将反应混合物穿过棉花塞过滤,用CH₂Cl₂漂洗。将滤液蒸发,并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0→100%CH₂Cl₂-20%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到产物(39.9mg,0.07938mmol,40.38%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d)δ8.58(s,1H),6.80(d,J=2.4Hz,1H),6.56(d,J=2.4Hz,1H),4.68(s,1H),4.58(t,J=9.1Hz,2H),4.46(d,J=8.3Hz,1H),4.13(s,3H),3.93-3.82(m,4H),3.38-3.27(m,4H),3.19(t,J=9.1Hz,2H),2.49(s,3H),2.25-2.13(m,2H),1.99-1.74(m,6H)。ESI-MS m/z计算值492.2485,实测493.34(M+1)⁺;保留时间:0.58分钟

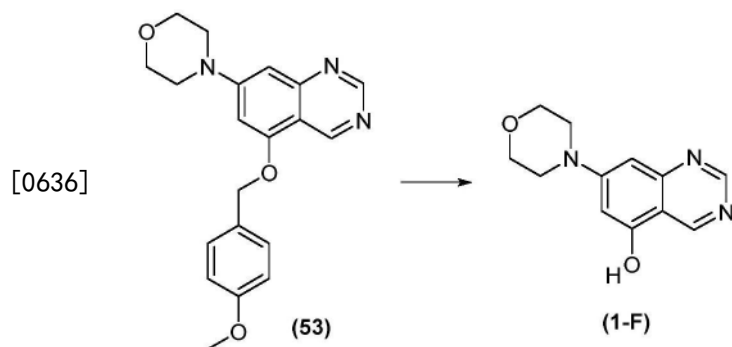
[0632] 化合物6:N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-嘧啶-4-胺的制备



[0634] 将4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(三氟乙酸(1))(73.78mg,0.1966mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(140mg,0.4906mmol)和Cs₂CO₃(330mg,1.013mmol)在无水DMF(1.3mL)中的悬浮液加热至90℃保持24h。将反应混合物穿过棉花塞过滤,用CH₂Cl₂漂洗。将滤液蒸发,并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0→100%CH₂Cl₂-20%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到产物(20.3mg,0.04416mmol,22.46%)。¹H

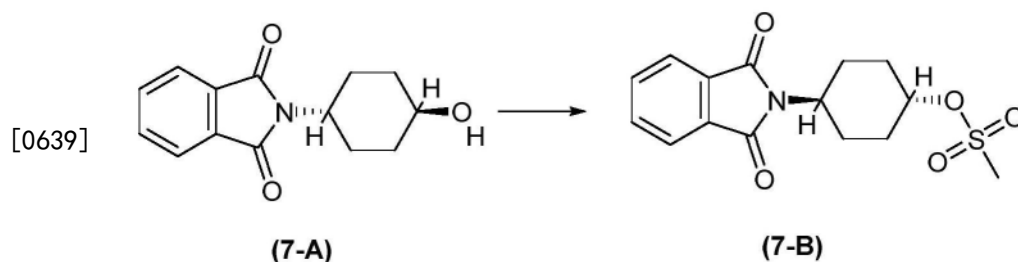
NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 8.58 (s, 1H), 8.12 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J=2.1$ Hz, 1H), 6.17 (d, $J=5.9$ Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.12 (s, 3H), 3.94-3.84 (m, 4H), 3.70 (d, $J=12.4$ Hz, 1H), 3.41-3.25 (m, 4H), 2.49 (s, 3H), 2.21 (d, $J=11.0$ Hz, 2H), 1.98-1.73 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值 450.23795, 实测 451.35 (M+1)⁺; 保留时间: 0.57 分钟。

[0635] 化合物 7: 4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备 化合物 (1-F): 7-吗啉代喹唑啉-5-醇的制备



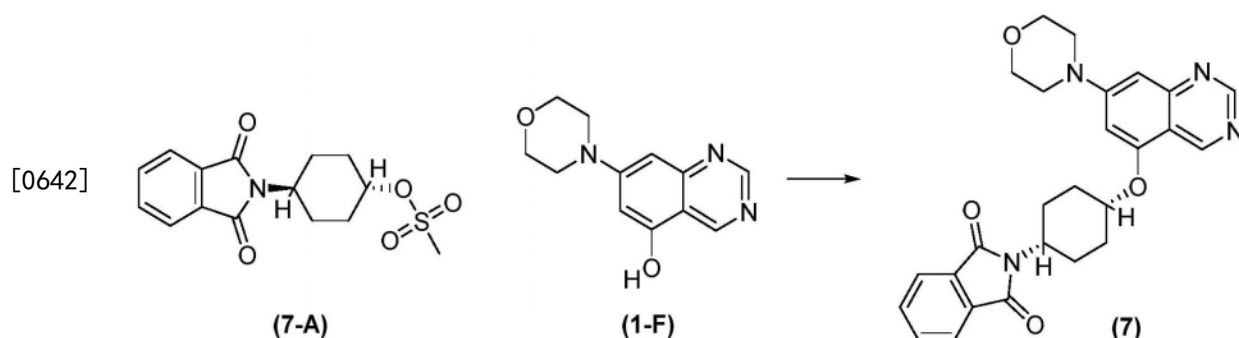
[0637] 向 4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉 (1.38g, 3.927mmol) 在 CH_2Cl_2 (40mL) 中的溶液中加入 TFA (12.36g, 8.351mL, 108.4mmol)。将得到的深红橙色混合物在 50℃ 搅拌 4h, 然后在室温搅拌过夜。在温和的加热/ N_2 流下蒸发溶剂。将粗残余物直接用于下一步。M+1: 232.32。保留时间: 0.5

[0638] 甲磺酸[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己基]酯的制备



[0640] 将 2-(4-羟基环己基)异吲哚啉-1,3-二酮 (1.0g, 4.077mmol) 在 Et_3N (1.238g, 1.705mL, 12.23mmol) 和 CH_2Cl_2 (6.683mL) 中的 0℃ 悬浮液用 MsCl (607.1mg, 410.2 μL , 5.300mmol) (放热, 反应物升温-放入室温水浴中) 处理。继续搅拌, 同时温热至室温过夜。将反应物用 EtOAc 稀释和倒入 H_2O 中。分离各层, 并将水相用 EtOAc (2 $\times$ 50mL) 进一步萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并浓缩为蓬松的白色固体。 ^1H NMR 显示干净的期望的产物, 不需要纯化; 产物重量 1.277g。

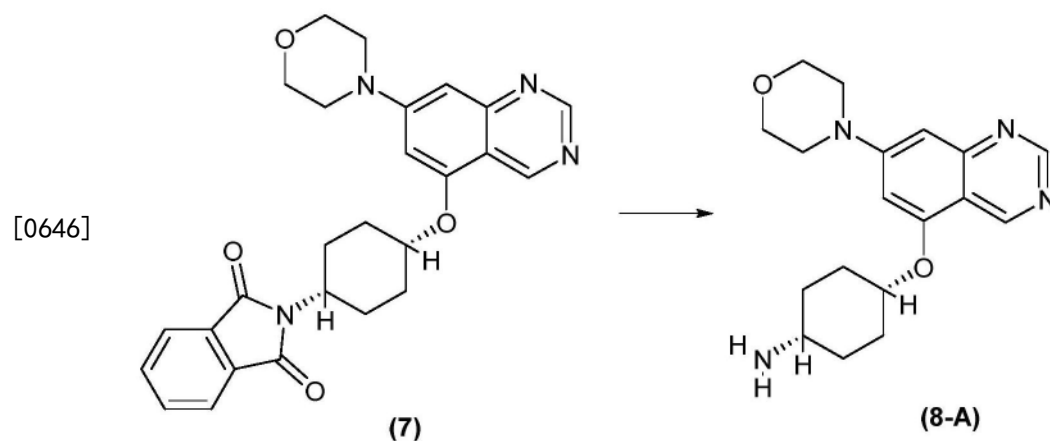
[0641] 化合物 7: 2-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮的制备



[0643] 将7-吗啉代喹唑啉-5-醇(三氟乙酸(1)) (324.7mg, 0.9405mmol)、甲磺酸[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己基]酯(760.2mg, 2.351mmol)和 Cs_2CO_3 (1.535g, 4.712mmol)在无水DMF (5.705mL)中的悬浮液加热至90℃保持24h。将反应混合物穿过硅藻土塞过滤,用 CH_2Cl_2 漂洗。将滤液蒸发,并将粗残余物干燥加载到硅藻土上并通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0→30% MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到作为褐色固体的产物(206.5mg, 0.4414mmol, 46.93%)。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 9.80 (d, $J=0.6\text{Hz}$, 1H), 9.15 (s, 1H), 7.89-7.78 (m, 2H), 7.78-7.65 (m, 2H), 6.80 (dd, $J=2.3, 0.6\text{Hz}$, 1H), 6.61 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.30 (tt, $J=12.5, 4.1\text{Hz}$, 1H), 3.96-3.82 (m, 4H), 3.47-3.30 (m, 4H), 2.83 (qd, $J=12.8, 3.4\text{Hz}$, 2H), 2.35 (d, $J=15.0\text{Hz}$, 2H), 1.84-1.62 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值 458.1954, 实测 459.31 (M+1)⁺; 保留时间: 0.66分钟。

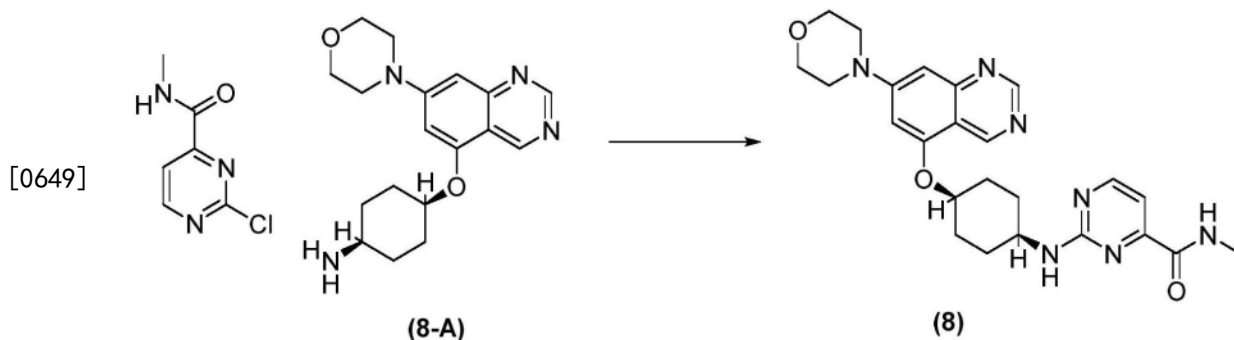
[0644] 化合物8:N-甲基-2-[[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺的制备

[0645] 4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺:化合物(8-A)的制备



[0647] 向2-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(1.477g, 3.221mmol)在MeOH(110mL)中的搅拌溶液中加入胍(2.0mL, 63.72mmol)。将得到的反应物密封并在室温搅拌20h。将反应混合物浓缩。向粗残余物中加入 CH_2Cl_2 并将悬浮液穿过中孔隙率玻璃料过滤(将固体用 CH_2Cl_2 漂洗几次并收集进同一个烧瓶中)。将滤液浓缩以得到4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(1.0133g, 3.085mmol, 95.78%)。将整批料在真空下在50℃干燥4天。得到4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(1.0133g, 3.085mmol, 95.78%)。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 9.47 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 6.86-6.72 (m, 1H), 6.58 (d, $J=1.7\text{Hz}$, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.02-3.83 (m, 4H), 3.47-3.29 (m, 4H), 2.95-2.79 (m, 1H), 2.21 (d, $J=14.0\text{Hz}$, 2H), 1.90-1.69 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值 328.1899, 实测 329.52 (M+1)⁺; 保留时间: 329.39分钟。

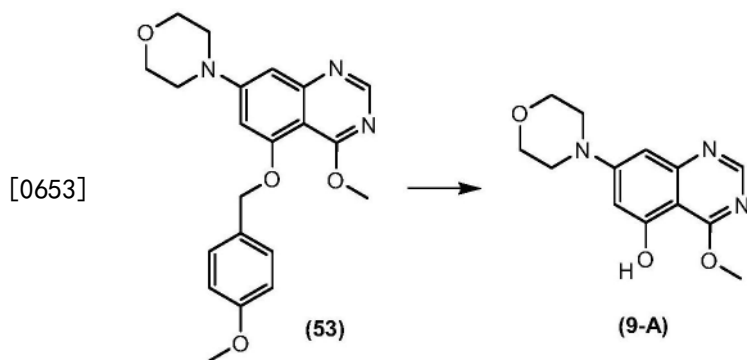
[0648] N-甲基-2-[[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(化合物8)的制备



[0650] 在密封微波管中将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(33.2mg, 0.09503mmol)、2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(18.8mg, 0.1096mmol)和 Na_2CO_3 (190 μL , 2M, 0.3800mmol)在水(156 μL)中的混合物加热至回流(100 $^\circ\text{C}$)。将得到的混合物搅拌过夜。将粗制的悬浮液冷却, 冷冻, 和在冷冻干燥器上干燥。将残余物干燥加载到硅藻土上并通过反相 Isco[150g C18 Aq柱; 0 $\rightarrow$ 50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并和浓缩。将样品溶解在最小量 CH_2Cl_2 中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩并在真空中干燥以得到N-甲基-2-[[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(32.4mg, 0.06920mmol, 72.82%)。 ^1H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ 9.45(s, 1H), 9.10(s, 1H), 8.49(d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 7.76(d, $J=4.5\text{Hz}$, 1H), 7.32(d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 6.79(d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 6.59(d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 5.18(d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 4.86-4.70(m, 1H), 4.15-3.96(m, 1H), 3.96-3.78(m, 4H), 3.49-3.33(m, 4H), 3.00(d, $J=5.2\text{Hz}$, 3H), 2.32-2.14(m, 2H), 2.10-1.96(m, 2H), 1.96-1.74(m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值463.2332, 实测464.35($\text{M}+1$) $^+$; 保留时间: 0.58分钟。

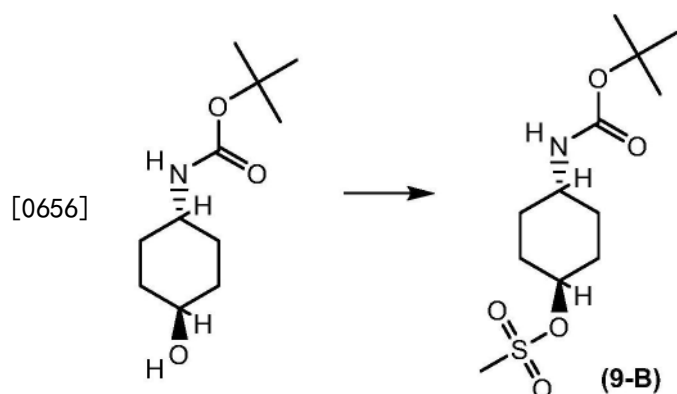
[0651] 化合物(9): 2-[[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺的制备

[0652] 4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇: 化合物(9-A)的制备



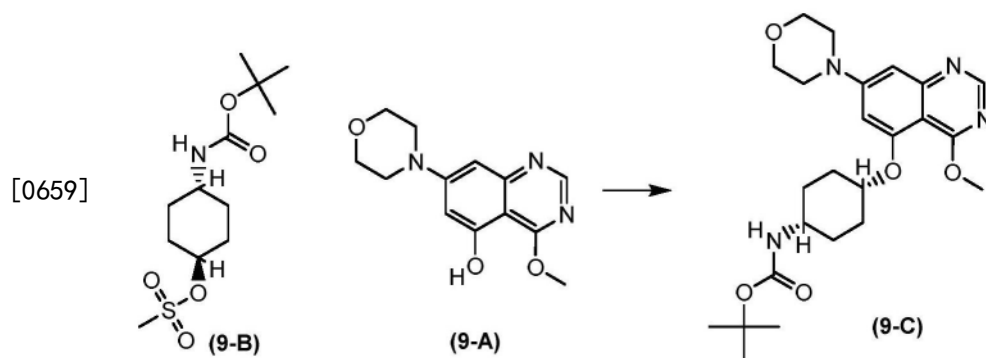
[0654] 向4-[4-甲氧基-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(100mg, 0.2622mmol)在 CH_2Cl_2 (2.667mL)中的溶液中加入TFA(1.794g, 1.212mL, 15.73mmol)。将反应物密封并用热(thermally)加热至50 $^\circ\text{C}$ 保持16h。在 N_2 流/温和的加热下除去溶剂。将粗残余物直接用于下一反应。质量+1: 262.34。保留时间: 0.55

[0655] 甲磺酸[4-(叔丁氧基羰基氨基)环己基]酯: 化合物(9-B)的制备



[0657] 向N-(4-羟基环己基)氨基甲酸叔丁酯(8.2g,38.09mmol)在DCM(100mL)中的溶液中加入DIEA(14mL,80.38mmol)和MsCl(3.2mL,41.34mmol)。将混合物搅拌0.5h并用DCM稀释,用H₂O洗涤,经Na₂SO₄干燥,穿过硅胶Pad层过滤,浓缩。回收灰白色固体。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ4.64(tt,J=10.8,4.1Hz,1H),4.40(s,1H),3.48(s,1H),3.02(s,3H),2.25-1.99(m,4H),1.80-1.59(m,2H),1.45(s,9H),1.36-1.13(m,2H)。

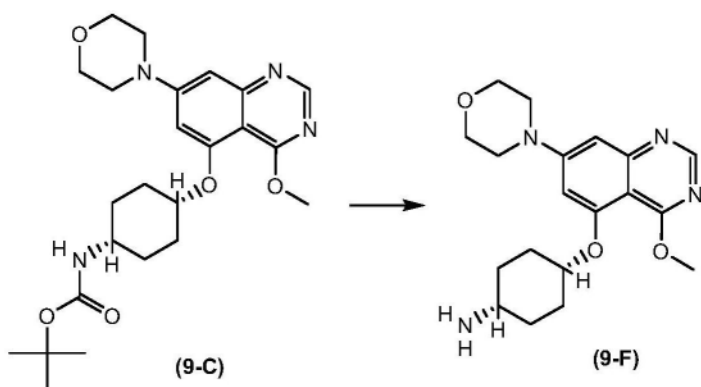
[0658] N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯:化合物(9-C)的制备



[0660] 将4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(三氟乙酸(1))(98.4mg,0.2622mmol)、甲磺酸[4-(叔丁氧基羰基氨基)环己基]酯(154mg,0.5249mmol)和Cs₂CO₃(427mg,1.311mmol)在无水DMF(1.75mL)中的悬浮液加热至90℃保持24h。将反应混合物穿过棉花塞过滤,用CH₂Cl₂漂洗。将滤液蒸发,并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0→20%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯。将粗制物质原样用于Boc去保护。ESI-MS m/z计算值458.25293,实测459.45(M+1)⁺;保留时间:0.67分钟。

[0661] 4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺:化合物(9-F)的制备

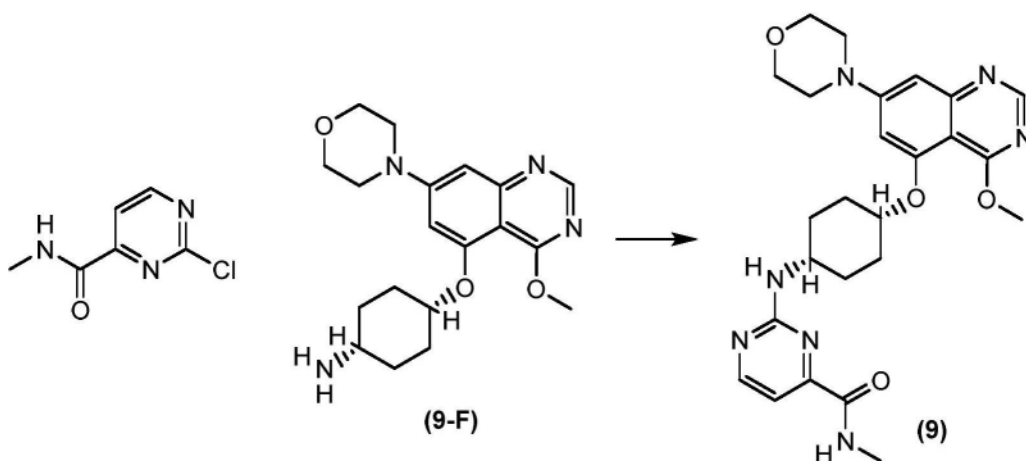
[0662]



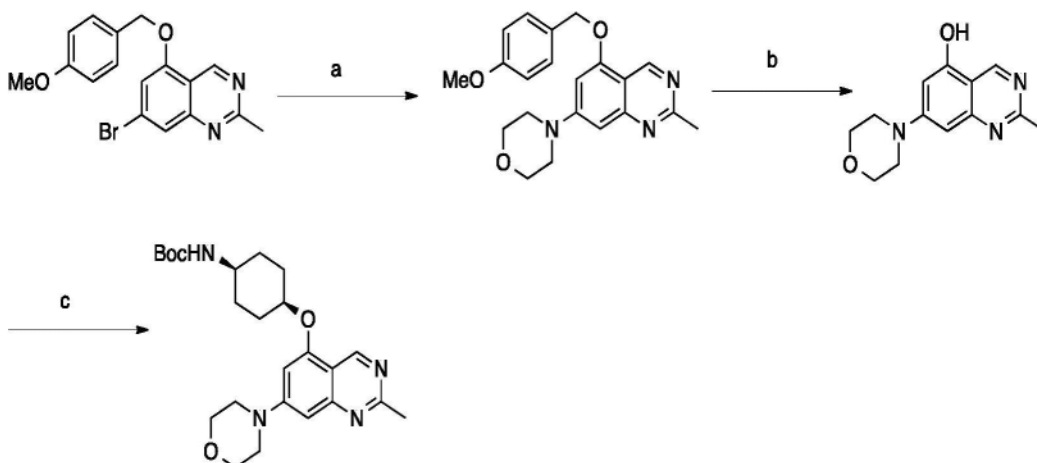
[0663] 向N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯(120.2mg, 0.2622mmol)在 CH_2Cl_2 (2.622mL)中的溶液中加入TFA (896.9mg, 606.0 μL , 7.866mmol)。将得到的溶液在室温搅拌过夜。将反应混合物浓缩,并将粗残余物通过反相Isco[50g C18 Aq柱;0 $\rightarrow$ 40% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并,浓缩,并通过甲苯共沸物(2 $\times$)和真空干燥以得到4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(三氟乙酸(1)) (50mg, 0.1058mmol, 40.36%) (3个步骤的收率)。ESI-MS m/z 计算值358.2005, 实测359.36($M+1$)+;保留时间:0.53分钟。

[0664] 2-[[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺:化合物(9)的制备

[0665]



[0666] 化合物(10):N-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯的制备



[0667]

[0668] 试剂和条件: (a) 吗啉, DIEA, iPrOH; (b) TFA, DCM; (c) 甲磺酸[4-(叔丁氧基羰基氨基)环己基]酯, CsCO₃, DMF

[0669] 步骤a

[0670] 将7-溴-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2-甲基-喹唑啉(80mg, 0.22mmol)、吗啉(23mg, 0.27mmol)、碳酸铯(145mg, 0.45mmol)、Pd(OAc)₂(5.0mg, 0.023mmol)和rac-BINAP(28mg, 0.045mmol)在1,4-二噁烷(2mL)中的混合物用N₂鼓泡和在90℃搅拌1h。将反应混合物用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 蒸发。将粗制物通过硅胶色谱法纯化, 用0-5% MeOH/DCM的梯度洗脱。这得到4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2-甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(50mg, 61%)。ESI-MS m/z计算值365.1, 实测366.14(M+1)⁺; 保留时间: 0.58分钟。

[0671] 步骤b

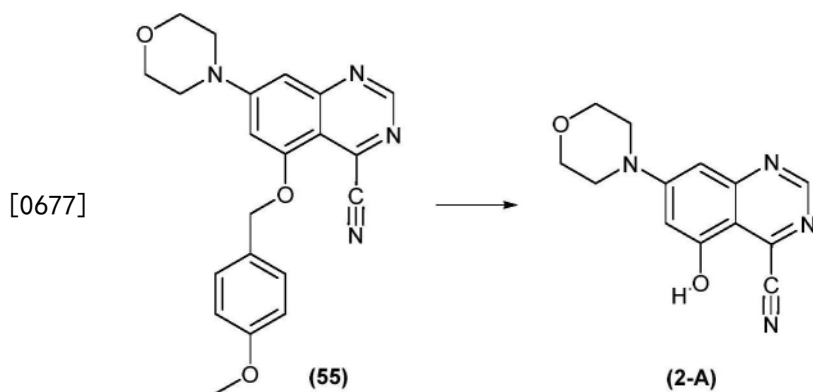
[0672] 向4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2-甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(180mg, 0.49mmol)在DCM(10mL)中的溶液中加入TFA(1mL, 12.9mmol), 并将得到的反应物在室温搅拌1h。将混合物在真空中浓缩。将粗制物通过12g硅胶柱纯化, 用0-4% MeOH/DCM的梯度洗脱, 得到2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(85mg, 70%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 9.37(s, 1H), 6.67(d, J=2.1Hz, 1H), 6.52(d, J=2.1Hz, 1H), 3.82(dd, J=5.8, 4.0Hz, 4H), 3.35-3.23(m, 4H), 2.80(s, 3H)。

[0673] 步骤c

[0674] 在70℃向2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(30mg, 0.12mmol)、碳酸铯(200mg, 0.62mmol)在DMF(1mL)中的混合物中加入甲磺酸[4-(叔丁氧基羰基氨基)环己基]酯(100mg, 0.34mmol)。将得到的反应混合物在70℃搅拌1h。向混合物中加入另一部分的甲磺酸[4-(叔丁氧基-羰基氨基)-环己基]酯(100mg, 0.34mmol)并继续在70℃搅拌18h。将混合物用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 在真空中浓缩。将粗制物通过硅胶色谱法纯化, 用0-10% MeOH/DCM的梯度洗脱, 回收N-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯(2.0mg, 3.6%)(化合物10)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 9.32(s, 1H), 6.80(s, 1H), 6.50(d, J=2.0Hz, 1H), 4.71(s, 1H), 4.56(s, 1H), 3.89(t, J=4.9Hz, 4H), 3.63(s, 1H), 3.42(t, J=4.9Hz, 4H), 2.84(s, 3H), 2.17(d, J=13.4Hz, 2H), 1.97-1.60(m, 6H), 1.47(s, 9H)。ESI-MS m/z计算值442.26, 实测443.2(M+1)⁺; 保留时间: 0.6分钟。

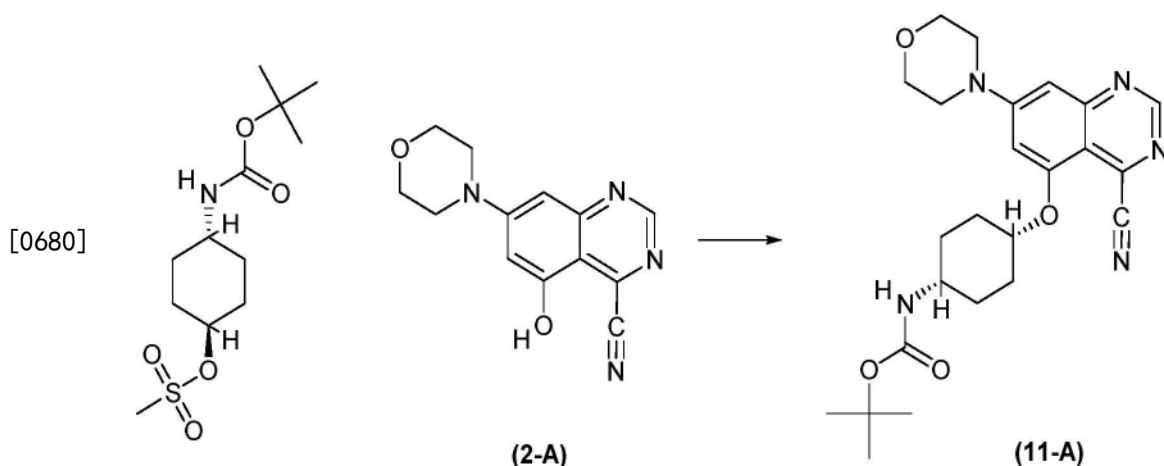
[0675] 化合物11:N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺的制备

[0676] 5-羟基-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(化合物(2-A))的制备



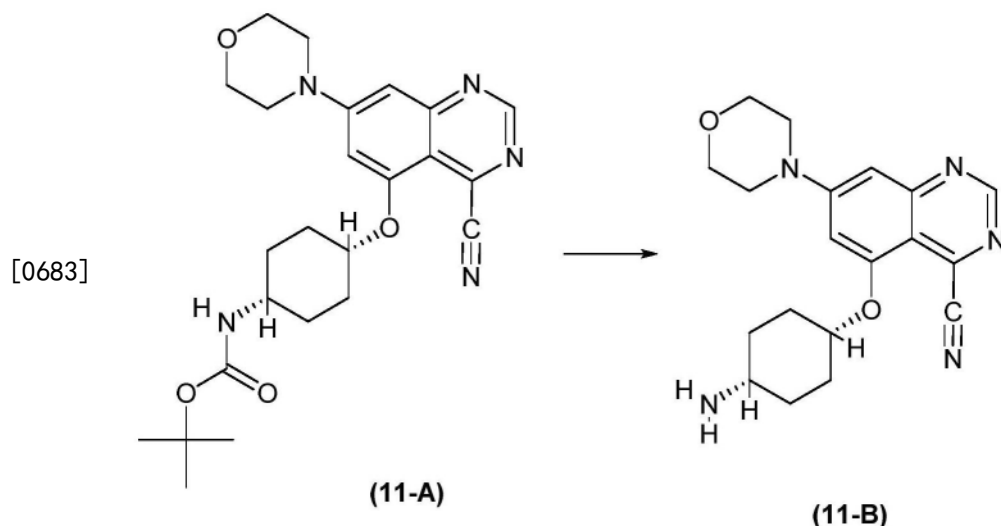
[0678] 向5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(160mg, 0.4251mmol)在 CH_2Cl_2 (4.25mL)中的溶液中加入TFA(1.800g, 1.216mL, 15.79mmol) (溶液从黄色变成红色)。将反应混合物在室温搅拌过夜, 此后LCMS仅显示与期望产物的[M+1]对应的主要峰。在温和的加热/ N_2 流下将溶剂除去, 并将粗残余物不经进一步操作直接用于下一步。ESI-MS m/z 计算值256.09604, 实测257.3 (M+1)⁺; 保留时间: 0.62分钟。

[0679] N-[4-(4-氰基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯(化合物(11-A))的制备



[0681] 将5-羟基-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(三氟乙酸(1)) (157.4mg, 0.4251mmol)、甲磺酸[4-(叔丁氧基羰基氨基)环己基]酯(312mg, 1.063mmol)和 Cs_2CO_3 (694mg, 2.130mmol)在无水DMF (2.75mL)中的悬浮液加热至90℃保持24h。将反应混合物穿过硅藻土塞真空过滤, 用 CH_2Cl_2 漂洗。将滤液蒸发, 并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱, 线性梯度0→100% CH_2Cl_2 -20% MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到C24H31N5O4 (192.8mg, 0.4251mmol, 100.0%)。将该粗制物质用于下一步。ESI-MS m/z 计算值453.2376, 实测454.41 (M+1)⁺; 保留时间: 0.83分钟。

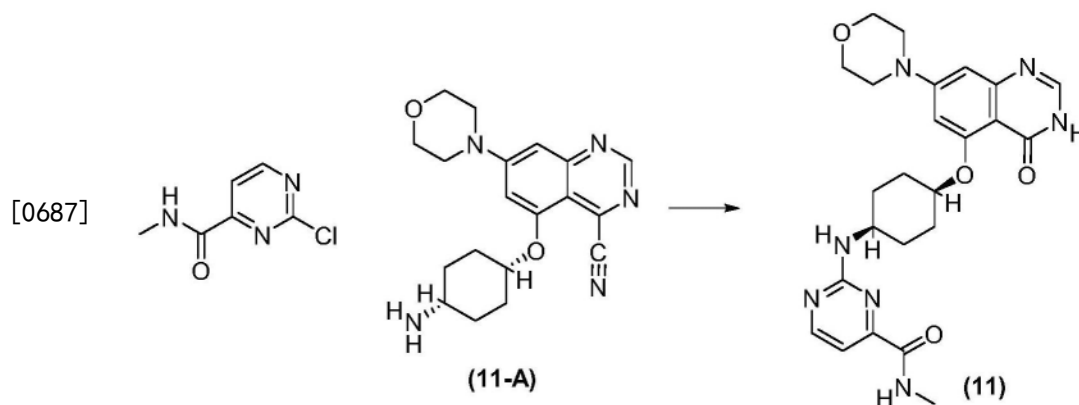
[0682] 5-(4-氨基环己氧基)-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(化合物(11-B))的制备



[0684] 向N-[4-(4-氰基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基甲酸叔丁酯(192.8mg, 0.4251mmol)在CH₂Cl₂(10mL)中的溶液中加入TFA(1.454g, 982.4μL, 12.75mmol)。将得到的溶液在室温搅拌4h。

[0685] 将反应混合物浓缩,并将粗残余物通过反相Isco[50g C18 Aq柱;0→40%CH₃CN/H₂O(TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并,浓缩,并通过甲苯共沸物(2×)和真空干燥以得到5-(4-氨基环己氧基)-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(三氟乙酸(1))(47.8mg, 0.1023mmol, 24.06%)(3个步骤的收率)。ESI-MS m/z计算值353.18518,实测354.41(M+1)⁺;保留时间:0.57分钟。

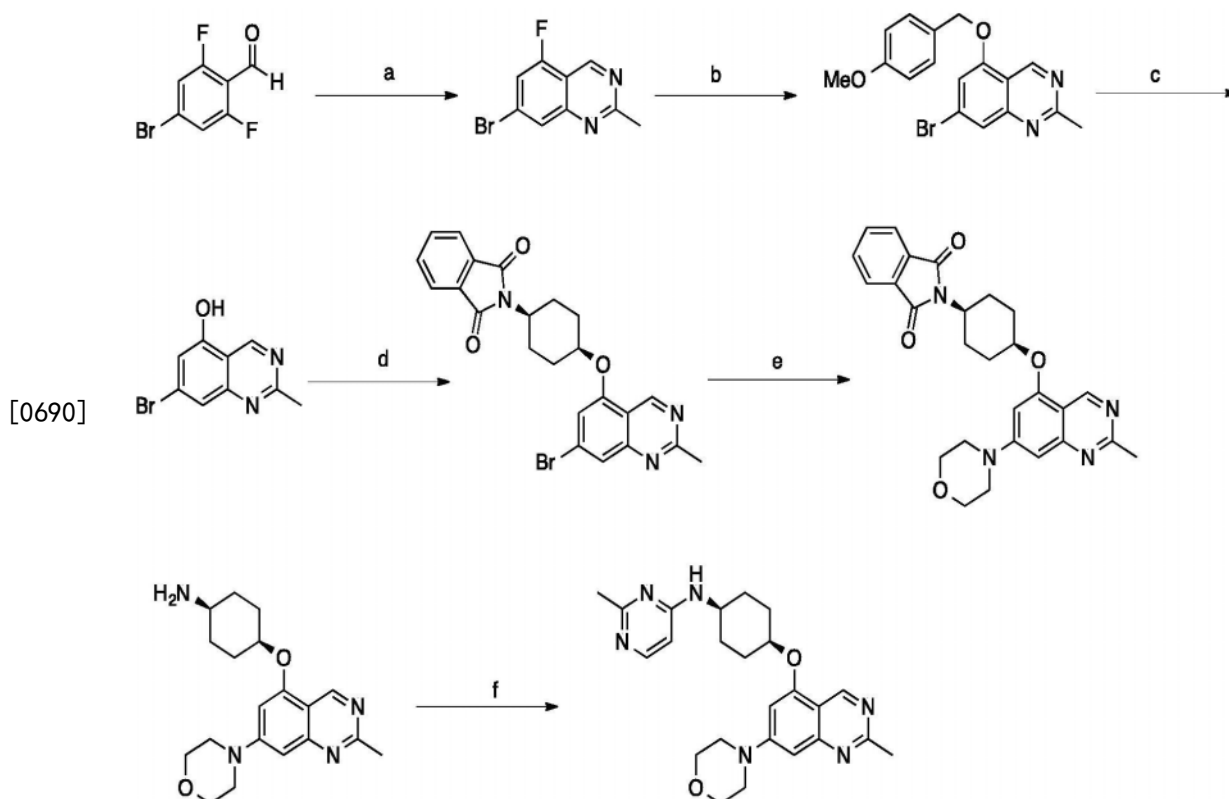
[0686] N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(化合物(11))的制备



[0688] 在密封微波管中将5-(4-氨基环己氧基)-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(三氟乙酸(1))(47.8mg, 0.1023mmol)、2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(23mg, 0.1340mmol)和Na₂CO₃(256.2μL 2M, 0.5124mmol)在水(506.7μL)中的混合物加热至110℃并搅拌16h。LCMS显示转化为主要峰,尽管它对应于[M+1]480.42。似乎在反应过程中形成了N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(或它的互变异构体)。将粗制的悬浮液冷却至室温。为了辅助溶解,加入1:1MeOH/H₂O(~1mL)和~6-8滴TFA。将得到的溶液直接加载到反相Isco[50g C18 Aq柱;0→50%CH₃CN/H₂O(TFA调节剂)]上。收集与[M+1]480.42产物对应的级分并在减压下浓缩。将样品溶解在最小量1:1CH₂Cl₂/MeOH中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩,剩下白色固体薄膜。所述物质的1H

NMR(CDC13)与N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(或它的互变异构体)一致。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 8.46(d, J=4.9Hz, 1H), 8.02(s, 1H), 7.87(dd, J=5.4, 4.5Hz, 1H), 7.29(d, J=4.8Hz, 1H), 6.70(d, J=2.4Hz, 1H), 6.48(d, J=2.5Hz, 1H), 5.76-5.31(m, 1H), 4.72(s, 1H), 3.99(dt, J=8.1, 4.0Hz, 1H), 3.92-3.74(m, 4H), 3.42-3.22(m, 4H), 2.98(d, J=5.1Hz, 3H), 2.32-2.12(m, 2H), 2.12-1.84(m, 4H), 1.77(td, J=13.2, 11.9, 3.2Hz, 2H)。ESI-MS m/z计算值479.2281, 实测480.33(M+1)⁺; 保留时间:0.57分钟。

[0689] 化合物12:2-甲基-N-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-嘧啶-4-胺的制备



[0691] 试剂和条件:(a)乙脒(HCl), K₂CO₃和MS 4A, 丁腈, 130℃, 22h, (b)NaH, PMB-OH, DMF; (c) TFA, DCM; (d) 2-(4-羟基环己基)异吲哚啉-1,3-二酮, PPh₃, DIAD, THF; (e) 吗啉, Pd(OAc)₂, rac-BINAP, CsCO₃, 二噁烷; (f) NH₂NH₂, MeOH; (g) 4-氯-2-甲基-嘧啶, t-butylxPhospalladcycle, NaOtBu, tBuOH。

[0692] 步骤a:

[0693] 将4-溴-2,6-二氟-苯甲醛(4g, 18.1mmol)、乙脒(盐酸(1)) (2.4g, 25.4mmol)、K₂CO₃ (3.5g, 25mmol)和MS 4A(2.8g, 粉末)在丁腈(20.00mL)中的混合物在130℃搅拌20h。冷却至室温以后,将混合物用EtOAc(20mL)稀释,穿过硅藻土层过滤,在真空中浓缩。将粗制物从120g硅胶柱纯化,用0-30%EtOAc/庚烷的梯度洗脱。这得到7-溴-5-氟-2-甲基-喹唑啉(1.35g, 31%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 9.47(s, 1H), 7.89(dt, J=1.9, 1.0Hz, 1H), 7.31(dd, J=8.7, 1.6Hz, 1H), 2.84(s, 3H)。

[0694] 步骤b:

[0695] 向(4-甲氧基苯基)甲醇(886mg, 0.8mL, 6.4mmol)在DMF(20.00mL)中的溶液中加入NaH(260mg, 6.4mmol), 并将得到的混合物搅拌30min。向混合物中加入7-溴-5-氟-2-甲基-喹唑啉(800mg, 3.3mmol)并继续搅拌1h。将反应混合物用EtOAc稀释, 用H₂O洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 浓缩。将粗制物从40g硅胶柱纯化, 用0-60% EtOAc/庚烷的梯度洗脱。这得到7-溴-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2-甲基-喹唑啉(900mg, 75.5%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 9.58(d, J=0.8Hz, 1H), 7.74-7.65(m, 1H), 7.43-7.37(m, 2H), 7.06(d, J=1.5Hz, 1H), 6.99-6.92(m, 2H), 5.17(s, 2H), 3.85(s, 3H), 2.86(s, 3H)。

[0696] 步骤c:

[0697] 向7-溴-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2-甲基-喹唑啉(1.2g, 3.3mmol)在DCM(10mL)中的溶液中加入TFA(2.0mL, 26mmol), 并将得到的反应混合物搅拌30min。将反应混合物浓缩并从40g硅胶柱纯化, 用0-100% EtOAc/庚烷的梯度洗脱, 以得到7-溴-2-甲基-喹唑啉-5-醇(450mg, 56%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 9.60(d, J=0.9Hz, 1H), 7.56(dt, J=1.8, 0.9Hz, 1H), 7.01(t, J=1.3Hz, 1H), 2.83(d, J=0.9Hz, 3H)。

[0698] 步骤d:

[0699] 向7-溴-2-甲基-喹唑啉-5-醇(200mg, 0.83mmol)、2-(4-羟基环己基)异吲哚啉-1,3-二酮(210mg, 0.85mmol)和PPh₃(330mg, 1.25mmol)在THF(10mL)中的溶液中缓慢地加入DIAD(253mg, 250 μ L, 1.25mmol)。将得到的反应混合物搅拌1h。将混合物在真空下浓缩, 从12g硅胶柱纯化, 用0-70% EtOAc/庚烷的梯度洗脱, 以得到2-[4-(7-溴-2-甲基-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(280mg, 71%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 10.01(t, J=1.1Hz, 1H), 7.91-7.80(m, 2H), 7.75-7.68(m, 2H), 7.03(d, J=1.6Hz, 1H), 6.36(s, 2H), 5.06-4.93(m, 2H), 4.33(tt, J=12.5, 4.2Hz, 1H), 2.94-2.84(m, 2H), 2.83-2.78(m, 2H), 2.37(s, 3H), 1.87-1.7(m, 4H)。

[0700] 步骤e:

[0701] 将2-[4-(7-溴-2-甲基-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(280mg, 0.60mmol)、吗啉(100 μ L, 1.1mmol)、碳酸铯(400mg, 1.2mmol)、rac-BINAP(40mg, 0.06mmol)和PdOAc₂(7mg, 0.03mmol)在二噁烷(5mL)中的混合物用N₂鼓泡5min。将反应混合物密封并在100℃搅拌过夜。冷却至室温以后, 将混合物用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 并浓缩。将粗制物用0-3% MeOH/DCM的梯度从硅胶色谱法纯化, 以得到2-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(125mg, 44%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 9.7(s, 1H), 7.88-7.75(m, 2H), 7.72-7.65(m, 2H), 6.8(d, J=1.6Hz, 1H), 6.55(s, 2H), 5.03-4.83(m, 1H), 4.35-4.25(m, 1H), 3.92-3.83(m, 4H), 3.42-3.31(m, 4H), 2.7-2.9(m, 2H), 2.45-2.3(m, 2H), 2.37(s, 3H), 1.80(m, 4H)。

[0702] 步骤f:

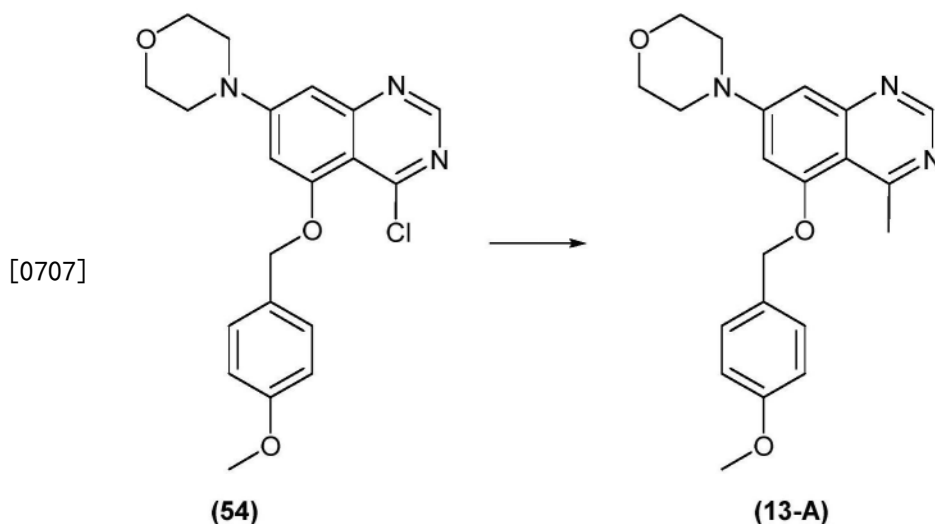
[0703] 向2-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(120mg, 0.25mmol)在MeOH(5mL)中的溶液中加入胍(Water(1)) (250mg, 280 μ L, 5mmol), 并将得到的反应混合物在70℃搅拌1h。将反应混合物冷却至室温, 在真空中浓缩, 并从硅胶色谱法(12g柱)纯化, 用0-10%的梯度(7M NH₃在MeOH/DCM中)洗脱。这得到4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(66mg, 76%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ 9.39(d, J=0.6Hz, 1H), 6.72(d, J=2.0Hz, 1H), 6.51(d, J=2.1, 1H), 4.72-4.60(m, 1H), 3.94-3.81(m, 4H), 3.43-

3.30 (m, 4H), 2.80 (s, 3H), 2.26-2.12 (m, 2H), 1.86-1.54 (m, 6H)。

[0704] 步骤g:

[0705] 向4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(66mg, 0.19mmol)、4-氯-2-甲基-嘧啶(42mg, 0.32mmol)、t-butyl xPhos palladacycle(13mg, 0.02mmol)在t-BuOH(2mL)中的混合物中加入叔丁醇钠(200μL 2M的在THF中的溶液, 0.4mmol)并在室温搅拌过夜。将反应混合物用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 浓缩。将粗制物从硅胶色谱法(4g柱)纯化, 用0-6% MeOH/DCM的梯度洗脱, 并得到2-甲基-N-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-嘧啶-4-胺(20.9mg, 23.7%)。¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ9.27 (d, J=1.7Hz, 1H), 8.01 (d, J=5.8Hz, 1H), 6.65 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.44 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.19-6.05 (m, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 3.80 (t, J=4.9Hz, 5H), 3.29 (dd, J=6.8, 3.1Hz, 4H), 2.71 (d, J=1.9Hz, 3H), 2.43 (d, J=1.8Hz, 4H), 2.14 (d, J=13.8Hz, 2H), 2.01-1.68 (m, 6H)。ESI-MS m/z计算值434.24, 实测435.28 (M+1)⁺; 保留时间: 0.50分钟。

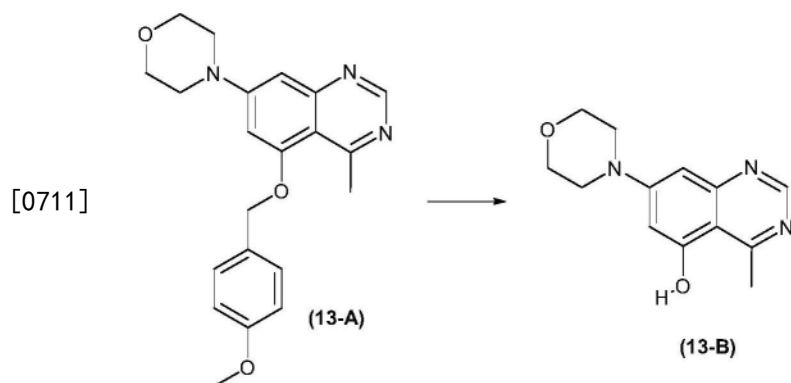
[0706] 化合物13:N-甲基-2-[[4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺的制备



[0708] 4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-4-甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(化合物(13-A))的制备

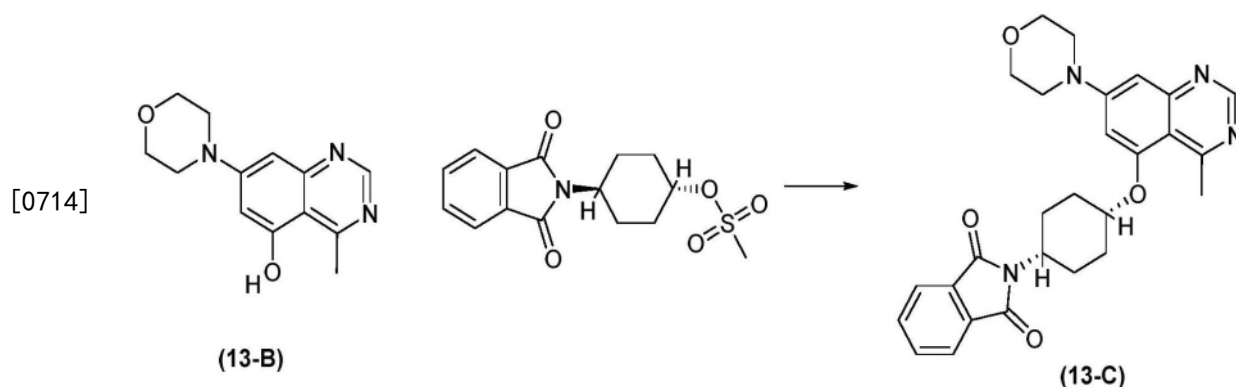
[0709] 在N₂下将4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(100mg, 0.2592mmol)溶解在THF(1.3mL)中并冷却至0℃。加入PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂(10.6mg, 0.01298mmol), 随后逐滴加入MeMgBr(110μL 3M的在乙醚中的溶液, 0.3300mmol)。除去冰浴, 并将得到的反应混合物在室温在N₂下搅拌过夜。在更大规模重复该步骤, 这次使用2-2.5当量的MeMgBr。将来自两批的产物合并和倒入H₂O中。分离各层, 并将水层用CH₂Cl₂(2×20mL)进一步萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩为明亮的橙黄色固体。将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱, 线性梯度0→10% MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-4-甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(245.0mg, 0.6705mmol, 43.12%)。¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ8.85 (s, 1H), 7.46-7.35 (m, 2H), 7.01-6.92 (m, 2H), 6.84 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.63 (d, J=2.4Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.93-3.86 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.44-3.32 (m, 4H), 2.90 (s, 3H)。ESI-MS m/z计算值365.17395, 实测366.39 (M+1)⁺; 保留时间: 0.64分钟。

[0710] 4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(化合物(13-B))的制备



[0712] 向4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-4-甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(245.0mg, 0.6705mmol)在 CH_2Cl_2 (6.534mL)中的溶液中加入TFA(2.0mL, 25.96mmol)。将反应物在室温搅拌16h。在 N_2 流/温和的加热下除去溶剂。将粗残余物直接用于下一反应。质量+1:246.41。保留时间:0.54

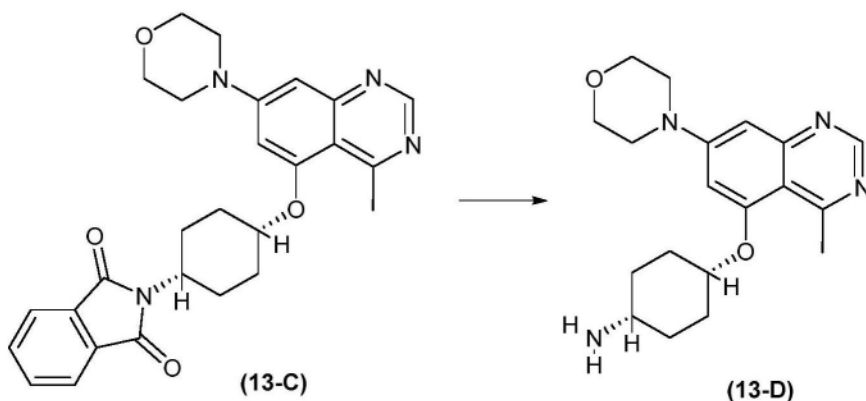
[0713] 2-[4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(化合物(13-C))的制备



[0715] 将4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(三氟乙酸盐)(240.9mg, 0.6705mmol)、甲磺酸[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己基]酯(542mg, 1.676mmol)和 Cs_2CO_3 (1.10g, 3.376mmol)在无水DMF(4.2mL)中的悬浮液加热至90℃保持5h。LCMS显示部分进展。加入另外1.5当量的甲磺酸酯和加热至110℃保持16h。将反应混合物穿过硅藻土塞过滤,用 CH_2Cl_2 漂洗。将滤液蒸发,并将粗残余物干燥加载到硅藻土上并通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0→20%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到2-[4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(127.9mg, 0.2707mmol, 40.37%)。 ^1H NMR(300MHz, 氯仿- d) δ 8.89(s, 1H), 7.91-7.77(m, 2H), 7.77-7.65(m, 2H), 6.82(d, J =2.3Hz, 1H), 6.61-6.49(m, 1H), 4.89-4.74(m, 1H), 4.29(tt, J =12.4, 3.9Hz, 1H), 4.00-3.79(m, 4H), 3.44-3.31(m, 4H), 3.27(s, 3H), 2.77(qd, J =13.2, 12.7, 3.0Hz, 2H), 2.51-2.30(m, 2H), 1.84-1.68(m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值472.21106, 实测473.4($M+1$) $^+$;保留时间:0.66分钟。

[0716] 4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(化合物(13-D))的制备

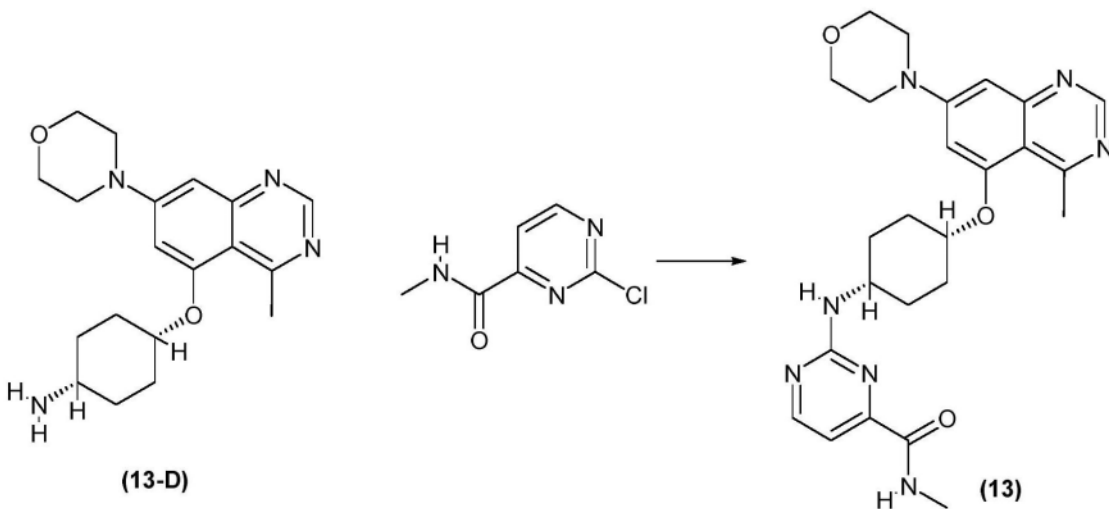
[0717]



[0718] 向2-[4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]异吲哚啉-1,3-二酮(127.9mg, 0.2707mmol)在MeOH(10mL)中的搅拌溶液中加入肼(172 μ L, 5.480mmol)。将得到的反应物密封并在室温搅拌20h(LCMS显示完全)。将反应混合物浓缩。向粗残余物中加入CH₂Cl₂。将悬浮液穿过中孔隙率玻璃料过滤(将固体用CH₂Cl₂漂洗几次并收集进同一个烧瓶中)。将滤液浓缩,并将粗残余物通过反相Isco[50g C18Aq柱;0 $\rightarrow$ 50%CH₃CN/H₂O(TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并并在减压下浓缩以得到产物(三氟乙酸(1))(21.9mg, 0.04798mmol, 17.72%)。将TFA盐直接用于下一反应。质量+1:343.39。保留时间:0.52

[0719] N-甲基-2-[[4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺(化合物(13))的制备

[0720]

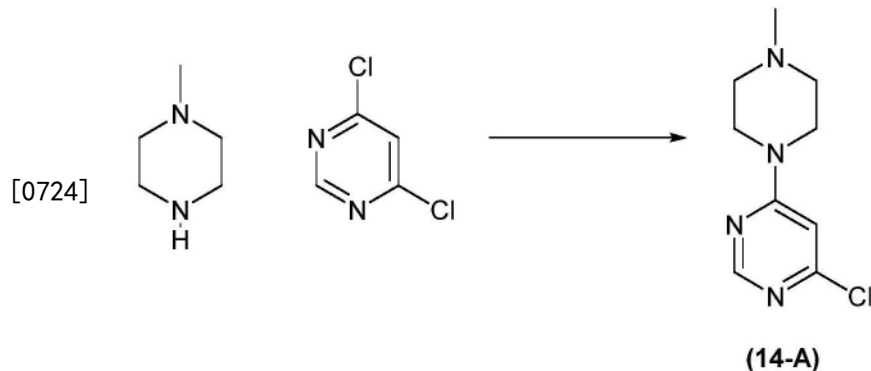


[0721] 在密封微波管中将4-(4-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(三氟乙酸(1))(21.9mg, 0.04798mmol)、2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(12.35mg, 0.07197mmol)和Na₂CO₃(120 μ L 2M, 0.2400mmol)在水(250 μ L)中的混合物加热至回流(100 $^{\circ}$ C)。将得到的混合物搅拌72h。将粗制的悬浮液用MeOH和几滴TFA处理,并将得到的溶液通过反相Isco[50g C18 Aq柱;0 $\rightarrow$ 50%CH₃CN/H₂O(TFA调节剂)]纯化。将有关级分合并和浓缩。将样品溶解在最小量1:1MeOH/CH₂Cl₂中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩以得到作为淡黄色固体的产物(5.8mg, 0.01154mmol, 24.05%)。1H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ 8.87(s, 1H), 8.49(d, J=4.8Hz, 1H), 7.75(d, J=4.9Hz, 1H), 7.34(d, J=4.8Hz, 1H), 6.82(d, J=2.4Hz, 1H), 6.56(d, J=2.4Hz, 1H), 5.18(d, J=7.4Hz, 1H), 4.79-4.69(m, 1H), 4.03(ddt, J=13.1, 7.8, 4.4Hz, 1H), 3.89(dd, J=5.7, 4.1Hz, 4H), 3.42-3.27(m, 4H), 3.05(s, 3H), 3.01

(d, $J=5.1\text{Hz}$, 3H), 2.31-2.16 (m, 2H), 2.13-2.00 (m, 2H), 2.00-1.75 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值477.24884, 实测478.44 ($M+1$)⁺; 保留时间: 0.59分钟。

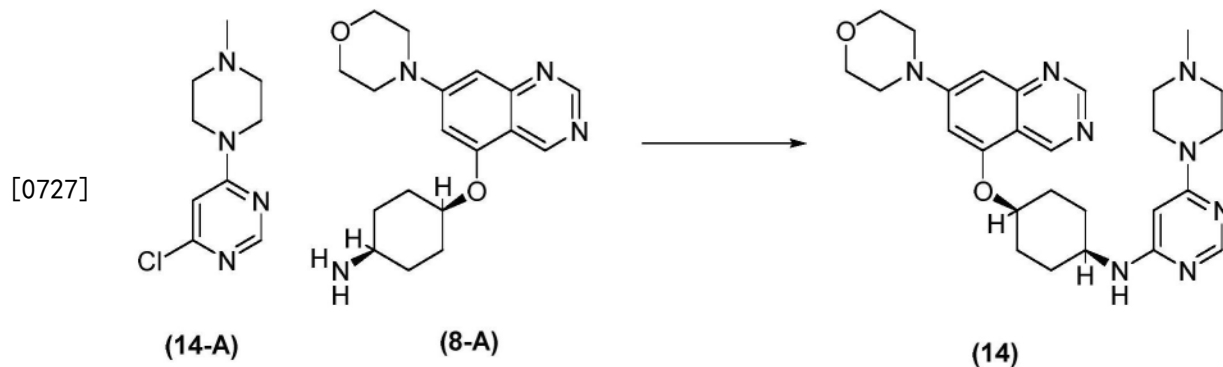
[0722] 化合物14: 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺的制备

[0723] 4-氯-6-(4-甲基哌嗪-1-基)嘧啶(化合物(14-A))的制备



[0725] 向4,6-二氯嘧啶(2.0g, 13.42mmol)和Et₃N(1.494g, 2.058mL, 14.76mmol)在EtOH(40mL)中的0℃溶液中加入1-甲基哌嗪(1.344g, 1.490mL, 13.42mmol)。将得到的溶液温热至室温, 然后搅拌5h。将反应物在真空中浓缩并在EtOAc和1N NaOH之间分配。分离各层, 并将水相用EtOAc(2×30mL)进一步萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。将粗残余物溶解在己烷类/EtOAc中并静置5天, 在此期间沉淀出灰白色物质(非产物)。滤出固体并浓缩滤液以得到产物。¹H NMR(CDCl₃)显示干净的期望的4-氯-6-(4-甲基哌嗪-1-基)嘧啶(2.126g, 9.896mmol, 73.75%) ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ8.37(d, $J=0.7\text{Hz}$, 1H), 6.49(d, $J=0.8\text{Hz}$, 1H), 3.67(s, 4H), 2.56-2.41(m, 4H), 2.34(s, 3H)。ESI-MS m/z 计算值212.08287, 实测213.14 ($M+1$)⁺; 保留时间: 0.39分钟。

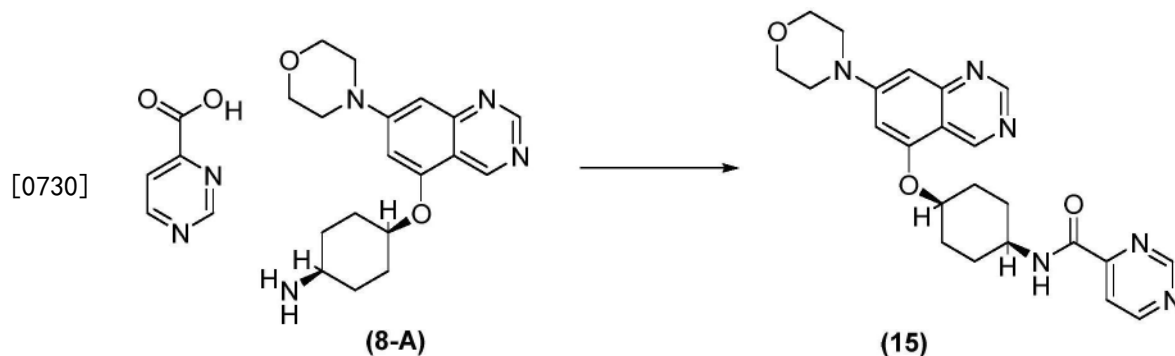
[0726] 6-(4-甲基哌嗪-1-基)-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺(化合物(14))的制备



[0728] 将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(40mg, 0.1218mmol)、4-氯-6-(4-甲基哌嗪-1-基)嘧啶(28.5mg, 0.1340mmol)、4-氯-6-(4-甲基哌嗪-1-基)嘧啶(28.5mg, 0.1340mmol)和NaOtBu(35mg, 0.3642mmol)在tBuOH(800μL)中的悬浮液用t-BuXPhos Palladacycle(8mg, 0.01165mmol)处理。将反应物密封和在铝珠子浴中加热至100℃保持2h。在N₂流下除去溶剂, 并将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱, 线性梯度0%→10% MeOH/CH₂Cl₂[+0.1% Et₃N])纯化。将有关级分合并和浓缩以得到产物(42.1mg, 0.07509mmol, 61.65%)。¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ9.42(s, 1H), 9.08(s, 1H), 8.18(d, $J=$

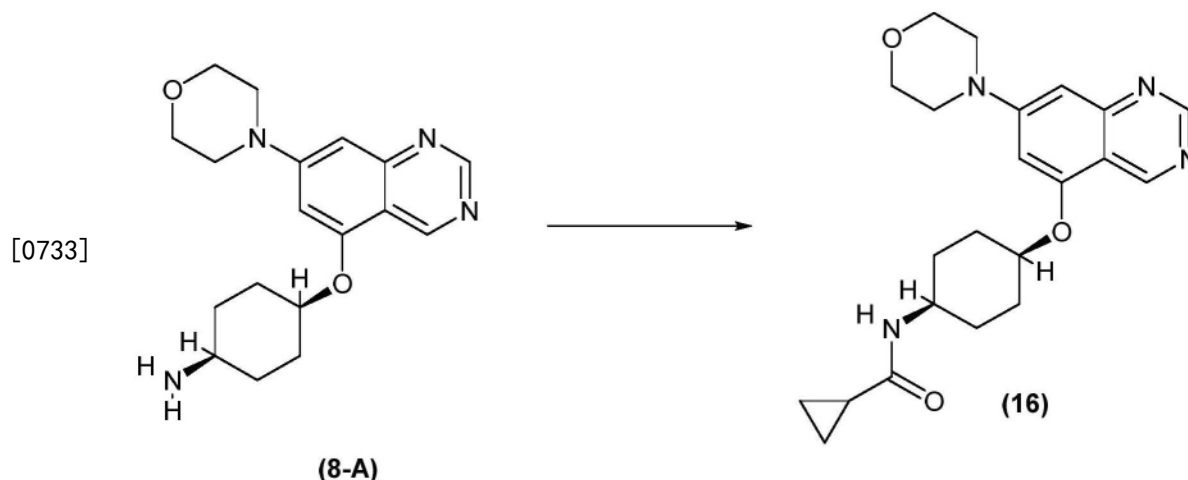
0.8Hz, 1H), 6.77 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.56 (d, J=2.2Hz, 1H), 5.44 (d, J=1.0Hz, 1H), 4.85-4.62 (m, 2H), 3.97-3.74 (m, 5H), 3.60-3.55 (m, 4H), 3.45-3.27 (m, 4H), 2.52-2.46 (m, 4H), 2.33 (d, J=2.5Hz, 3H), 2.26-2.15 (m, 2H), 2.05-1.91 (m, 2H), 1.91-1.64 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值504.2961, 实测505.44(M+1)⁺; 保留时间: 0.53分钟。

[0729] 化合物15: N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-甲酰胺的制备



[0731] 向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(40mg, 0.1218mmol)、嘧啶-4-甲酸(23mg, 0.1853mmol)和Et₃N(102μL, 0.7318mmol)在1,4-二噁烷(1.2mL)中的悬浮液中逐滴加入T3P(235μL 50% w/v在乙酸乙酯中的溶液, 0.3693mmol)。将得到的溶液加热至50℃保持20h。在N₂流下除去溶剂, 并将粗残余物通过硅胶色谱法[12g Isco金柱; 线性梯度0→10% MeOH/CH₂Cl₂ (+0.5% Et₃N)]纯化, 但是物质仍然含有杂质。将所述物质溶解/悬浮在2mL DMSO中并通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)纯化。将有关级分脱水(dried-down), 并将残余物溶解在1:1 MeOH/CH₂Cl₂中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩以得到N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-甲酰胺(20.9mg, 0.04714mmol, 38.70%)。¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ 9.47 (s, 1H), 9.26 (d, J=1.4Hz, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.97 (d, J=5.0Hz, 1H), 8.12 (dd, J=5.1, 1.5Hz, 1H), 8.02 (d, J=8.2Hz, 1H), 6.82-6.75 (m, 1H), 6.58 (d, J=2.2Hz, 1H), 4.83-4.73 (m, 1H), 4.20-4.07 (m, 1H), 3.95-3.82 (m, 4H), 3.43-3.31 (m, 4H), 2.33-2.17 (m, 2H), 2.06-1.82 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值434.20663, 实测435.35(M+1)⁺; 保留时间: 2.48分钟。

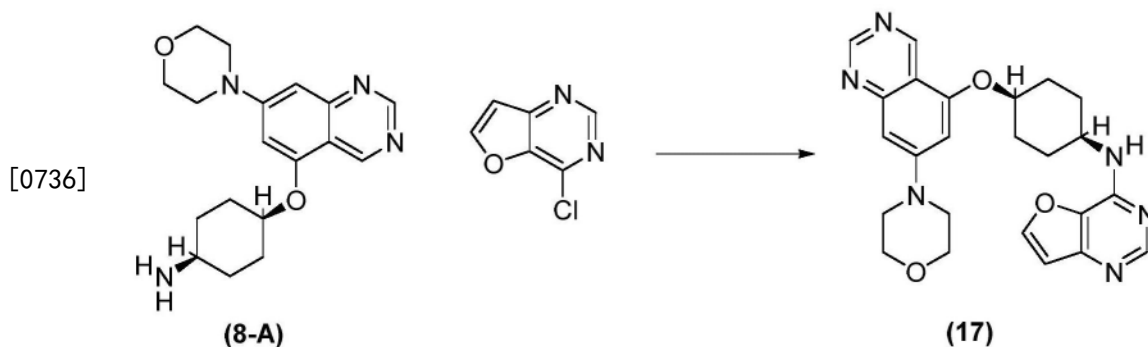
[0732] 化合物16: N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]环丙烷甲酰胺的制备



[0734] 向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(40mg, 0.1218mmol)在CH₃CN(1.0mL)中

的溶液中加入 K_2CO_3 (20.21mg, 0.1462mmol), 随后逐滴加入环丙烷甲酰氯 (cyclopropanecarbonyl chloride) (12.73mg, 11.05 μ L, 0.1218mmol)。将得到的红橙色反应混合物在室温搅拌1h。将反应混合物浓缩。将粗残余物溶解/悬浮在1:1MeOH/ H_2O 中, 穿过硅藻土过滤, 并进行C18制备型HPLC (含有TFA调节剂的水/乙腈)。将有关级分脱水, 并将残余物溶解在1:1MeOH/ CH_2Cl_2 中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩以得到N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]环丙烷甲酰胺 (7.2mg, 0.01780mmol, 14.61%)。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿- d) δ 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.78 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 5.73-5.54 (m, 1H), 4.74 (t, $J=3.9$ Hz, 1H), 3.97 (ddd, $J=14.9, 6.4, 4.1$ Hz, 1H), 3.92-3.81 (m, 4H), 3.45-3.30 (m, 4H), 2.19 (dd, $J=12.1, 2.7$ Hz, 2H), 1.95-1.59 (m, 6H), 1.34 (tt, $J=7.7, 4.6$ Hz, 1H), 1.03-0.91 (m, 2H), 0.79-0.68 (m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值396.21616, 实测397.44 ($M+1$) $^+$; 保留时间: 0.58分钟。

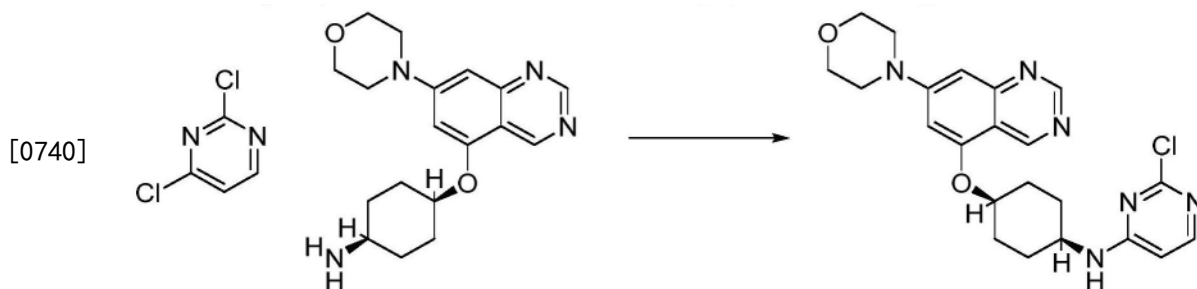
[0735] 化合物17: N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]呋喃并[3,2- d]嘧啶-4-胺的制备



[0737] 将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺 (40mg, 0.1218mmol)、4-氯呋喃并[3,2- d]嘧啶 (21mg, 0.1359mmol) 和叔丁醇钠 (35mg, 0.3642mmol) 的悬浮液通过用 N_2 在混合物中鼓泡10min进行脱气。加入 t -BuXPhos Palladacycle (8mg, 0.01165mmol), 并将反应物加热至100 $^{\circ}C$ 保持16h。将反应混合物浓缩, 溶解/悬浮在2mL DMSO中, 穿过硅藻土过滤, 并通过C18制备型HPLC (含有TFA调节剂的水/乙腈) 纯化。将有关级分脱水, 并将残余物溶解在1:1MeOH/ CH_2Cl_2 中并穿过Stratospheres PL-HC03 MP Resin柱。将滤液浓缩以得到N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]呋喃并[3,2- d]嘧啶-4-胺 (10.5mg, 0.02116mmol, 17.38%)。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿- d) δ 9.49 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.76 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J=2.2, 0.5$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.83 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 4.45-4.29 (m, 1H), 3.94-3.90 (m, 4H), 3.45-3.39 (m, 4H), 2.30 (d, $J=9.4$ Hz, 2H), 2.15-2.06 (m, 2H), 1.99-1.86 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值446.20663, 实测447.12 ($M+1$) $^+$; 保留时间: 0.55分钟。

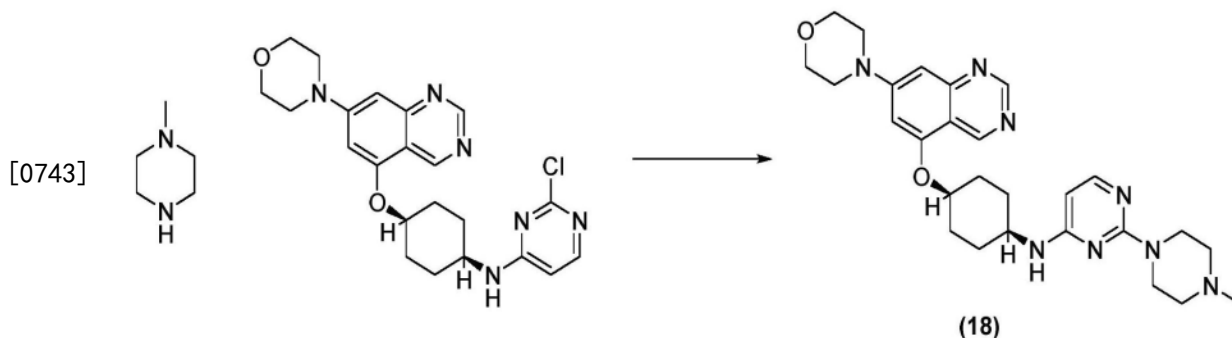
[0738] 化合物18: 2-(4-甲基哌嗪-1-基)-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺的制备

[0739] 2-氯-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺的制备



[0741] 在密封微波管中将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(110mg, 0.3349mmol)、2,4-二氯嘧啶(55mg, 0.3692mmol)和 Na_2CO_3 (670 μL 2M, 1.340mmol)在水(450 μL)中的混合物加热至回流保持16h,在此时物质已经簇集成大球(在冷却后固化)。经由移液器除去上清液,并将固体用刮勺打碎,并用几部分的水洗涤。将固体溶解在 CH_2Cl_2 中并将溶液干燥(Na_2SO_4),过滤,并浓缩成淡棕色-橙色泡沫。将粗残余物通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0% $\rightarrow$ 20%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到2-氯-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺(41.2mg, 0.09344mmol, 27.89%)。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 9.41 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.99 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 1H), 6.79 (d, ($J=2.1\text{Hz}$, 1H), 6.57 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 6.25 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 5.24 (d, $J=33.6\text{Hz}$, 1H), 4.76 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 4.15-3.77 (m, 5H), 3.45-3.29 (m, 4H), 2.34-2.15 (m, 2H), 2.07-1.93 (m, 2H), 1.93-1.70 (m, 6H)。

[0742] 2-(4-甲基哌嗪-1-基)-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺的制备

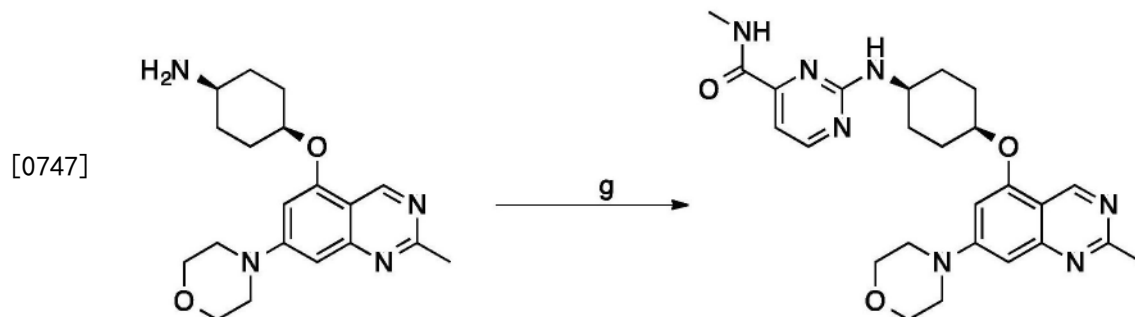


[0744] 将2-氯-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺(41.2mg, 0.09344mmol)、1-甲基哌嗪(25 μL , 0.2254mmol)和Hunig氏碱(40 μL , 0.2296mmol)在iPrOH (700 μL)中的混合物在微波中加热至170 $^{\circ}\text{C}$ 保持1h。在真空中除去i-PrOH。将粗残余物溶解在 CH_2Cl_2 中并倒入饱和 NH_4Cl 水溶液。分离各层,并将水层用 CH_2Cl_2 进一步萃取。将合并的有机层用1N NaOH和盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩。将粗残余物通过Isco(40g金柱;0 $\rightarrow$ 60%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到2-(4-甲基哌嗪-1-基)-N-[4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己基]嘧啶-4-胺(21.6mg, 0.04152mmol, 44.44%)。将得到的产物溶解在 CH_3CN 中,回流,并重新浓缩几次以除去残余的溶剂。 ^1H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.89 (d, $J=5.8\text{Hz}$, 1H), 6.85-6.72 (m, 1H), 6.57 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 5.68 (d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.60 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 3.95-3.70 (m, 9H), 3.44-3.32 (m, 4H), 2.49-2.39 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.27-2.14 (m, 2H), 2.05-1.92 (m, 2H), 1.92-1.76 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值 504.2961, 实测 505.49 ($M+1$) $^{+}$; 保留时间: 0.53分钟。

[0745] 化合物19:N-甲基-2-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-嘧啶-4-

甲酰胺(carboxylamides)的制备

[0746] 如上面关于化合物12的合成方案中所示制备化合物19,但是为步骤g采用下述操作:



[0748] g) 2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺,叔丁醇钠,t-BuXPhospalladacycle,t-BuOH

[0749] 向4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己胺(80mg,0.23mmol)、氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(68mg,0.4mmol)和t-butyl xPhos Palladacycle(20mg,0.03mmol)在t-BuOH(2mL)中的混合物中加入叔丁醇钠(250 μ L 2M,0.50mmol),并将得到的混合物在50 $^{\circ}$ C搅拌过夜。将反应混合物用DCM稀释,穿过硅藻土层过滤,并蒸发。将粗制物用0-10%MeOH/DCM的梯度通过硅胶色谱法纯化,以得到期望的产物。将产物通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)纯化。将有关级分脱水,并将残余物穿过PL-HC03 MP SPE以得到N-甲基-2-[4-(2-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-嘧啶-4-甲酰胺(13.3mg,11.3%)。 ^{1} H NMR(400MHz,CDC13) δ 9.17(s,1H),8.28(d,J=4.9Hz,1H),7.56(s,1H),7.12(dd,J=4.8,0.7Hz,1H),6.52(d,J=2.0Hz,1H),6.32(d,J=2.0Hz,1H),4.94(d,J=8.0Hz,1H),4.54(d,J=4.3Hz,1H),3.82(dp,J=13.9,4.2Hz,1H),3.67(dd,J=5.9,3.8Hz,4H),3.21-3.12(m,4H),2.80(d,J=5.0Hz,3H),2.59(s,3H),2.12-1.95(m,2H),1.88-1.75(m,2H),1.73-1.51(m,4H)。ESI-MS m/z计算值477.25,实测478.3(M+1) $^{+}$;保留时间:0.53分钟。

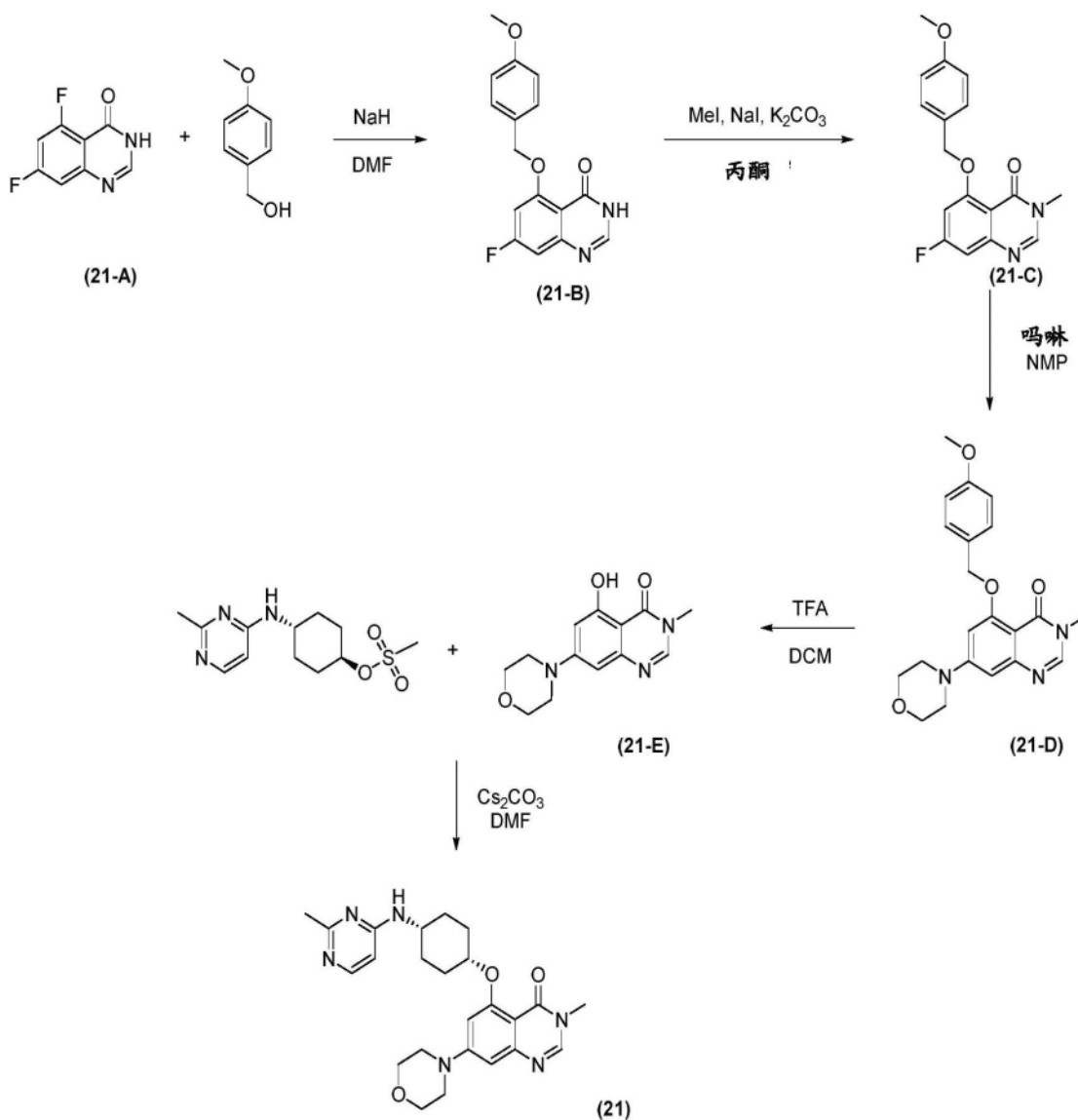
[0750] 化合物20:2-甲氧基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)乙酰胺的制备



[0752] 在氮气下在室温将1-羟基苯并三唑一水合物(16mg,0.118mmol)、3-(乙基亚氨基亚甲基氨基)-N,N-二甲基-丙烷-1-胺(盐酸(1))(35mg,0.183mmol)和2-甲氧基乙酸(8.8 μ L,0.115mmol)组合在DMF(0.2mL)中。将得到的混合物搅拌40分钟。加入4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(25mg,0.0761mmol)并继续搅拌30分钟。加入饱和碳酸氢钠,并将混合物用EtOAc(2 $\times$)萃取。将合并的有机层用水(2 $\times$)、盐水洗涤,经硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将得到的残余物通过使用0-10%甲醇/DCM梯度的在4g硅胶上的色谱法纯化。得到2-甲氧基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)乙酰胺(10mg)(33%收率)。 ^{1} H

NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.45 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.79 (d, J=2.0Hz, 1H), 6.57 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.52 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.75 (p, J=3.2Hz, 1H), 4.06-3.93 (m, 1H), 3.94-3.84 (m, 6H), 3.45 (s, 3H), 3.42-3.33 (m, 4H), 2.26-2.14 (m, 2H), 1.93-1.61 (m, 6H)。ESI-MS m/z = 401.32 (M+1)⁺。

[0753] 3-甲基-5-[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮:化合物21的制备



[0755] 7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮:化合物(21-B)的制备

[0756] 在0℃向(4-甲氧基苯基)甲醇(10.69g, 77.39mmol)在DMF(200mL)中的溶液中历时5分钟逐份加入NaH(6.89g, 172.3mmol),然后历时30分钟温热至室温。将反应物冷却至0℃,并历时5分钟分份加入5,7-二氟-3H-喹唑啉-4-酮(23.78g, 114.9mmol)。将反应物在该温度搅拌30分钟,然后温热至室温过夜。认为反应不完全,所以加入0.96mL醇和680mg NaH并将反应物在室温搅拌30分钟。仍然认为反应不完全,所以加入另外0.96mL醇和680mg NaH并将反应物在室温搅拌过夜。将反应物用水稀释并用乙酸将pH调至5。将得到的固体过滤,并用水和Et₂O洗涤,然后在真空下干燥以得到7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3H-喹唑啉-4-

酮(23.45g,100%收率)。¹H-NMR(400MHz,DMSO) δ8.00(s,1H),7.54-7.46(m,2H),7.00-6.83(m,4H),5.16(s,2H),3.76(s,3H)。

[0757] 7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-喹唑啉-4-酮:化合物(21-C)的制备

[0758] 给配备磁力搅拌棒的Biotage 10mL微波瓶装入在丙酮(10mL)中的7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮(406mg,1.352mmol)、MeI(193.9mg,85.04μL,1.366mmol)、NaI(20.00mg,0.1334mmol)和K₂CO₃(935.9mg,6.772mmol)。将瓶用特氟隆隔膜帽密封并在微波中加热至100℃保持15分钟。将反应物过滤并在真空中浓缩。使用10-50%CH₃CN(0.1%TFA)在H₂O(0.1%TFA)中的溶液,将残余物在反相C18-衍生化的硅胶柱上纯化。将产物级分合并,通过加入NaHCO₃(饱和)进行中和,并用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤,并浓缩以得到7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-喹唑啉-4-酮(227mg,53.4%收率)。ESI-MS m/z计算值314.10666,实测315.09(M+1)⁺。

[0759] 5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮:化合物(21-D)的制备

[0760] 将7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-喹唑啉-4-酮(80mg,0.25mmol)和吗啉(430μL,4.9mmol)在无水NMP(1mL)中的溶液在120℃加热18小时。将反应物冷却至室温,并用水稀释。将沉淀物过滤,并用水洗涤,然后在真空下干燥以得到5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮(60mg,64%收率)。ESI-MS m/z计算值381.16885,实测382.21(M+1)⁺。

[0761] 3-甲基-5-[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮:化合物(21-E)的制备

[0762] 将5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮(60mg,0.16mmol)和TFA(0.5mL,6.5mmol)在DCM(1mL)中的溶液在室温搅拌过夜。在真空中除去溶剂以得到5-羟基-3-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮。ESI-MS m/z计算值261.11133,实测262.07(M+1)⁺。

[0763] 3-甲基-5-[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮:化合物(21)的制备

[0764] 给配备磁力搅拌棒的微波瓶装入在DMF(3mL)中的5-羟基-3-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮(60.9mg,0.2331mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(200mg,0.7009mmol)和Cs₂CO₃(380mg,1.17mmol)。将瓶用一次性的特氟隆隔膜帽密封并在微波中在120℃加热10分钟。加入50mg甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯并在微波中在120℃加热10分钟。将反应物在微波中在120℃加热5分钟。将反应物过滤并使用10-50%CH₃CN(0.1%TFA)在H₂O(0.1%TFA)中的溶液在反相C18-衍生化的SiO₂柱上纯化。将产物级分合并,并用NaHCO₃(饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤,并浓缩以得到3-甲基-5-[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-酮(32.6mg,30.8%收率)。¹H-NMR(300MHz,CDC1₃) δ8.08(d,J=5.9Hz,1H),7.93(s,1H),6.65(d,J=2.3Hz,1H),6.48(d,J=2.2Hz,1H),6.18(d,J=6.1Hz,1H),5.22(s,1H),4.72(s,1H),3.97-3.81(m,4H),3.53(d,J=10.6Hz,3H),3.40-3.25(m,4H),2.52(s,3H),2.23(d,J=12.9Hz,2H),2.05-1.70(m,7H)。ESI-MS m/z计算值450.23795,实测451.33(M+1)⁺。

[0765] 化合物22:((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)氨基甲酸乙酯的

制备。

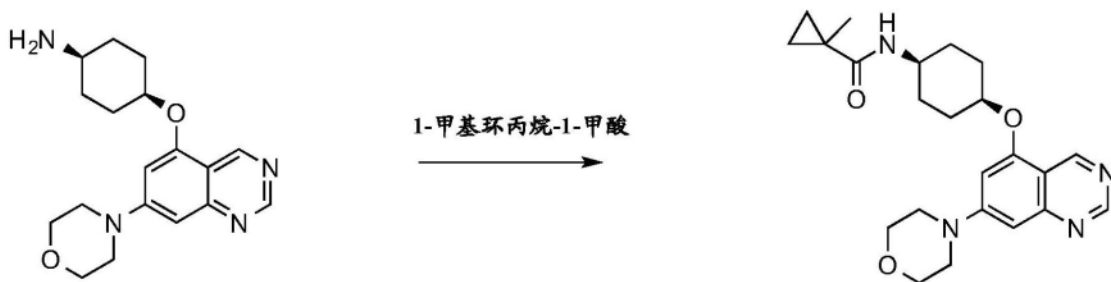
[0766]



[0767] 向冰冷的4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(25mg,0.076mmol)和TEA(32 μ L,0.230mmol)在DCM(800 μ L)中的溶液中加入氯甲酸乙酯(10.9 μ L,0.114mmol)。搅拌30min。将反应物用DCM稀释并加入饱和碳酸氢钠(水溶液)。使混合物穿过分相器并将有机物在减压下浓缩。在4g硅胶柱上色谱分离,使用0-10%MeOH/DCM作为洗脱液,并通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)进一步纯化。将有关级分脱水,并将残余物穿过PL-HC03 MP SPE以得到((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)氨基甲酸乙酯(2.3mg,7%收率)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 9.41(s,1H),9.09(s,1H),6.85-6.72(m,1H),6.56(d,J=2.0Hz,1H),4.78-4.56(m,2H),4.12(q,J=7.1Hz,2H),3.96-3.82(m,4H),3.66(d,J=9.7Hz,1H),3.46-3.31(m,4H),2.25-2.08(m,2H),1.90(dt,J=12.5,4.1Hz,2H),1.84-1.61(m,4H),1.25(t,J=7.1Hz,3H)。ESI-MS m/z =401.32(M+1)⁺。

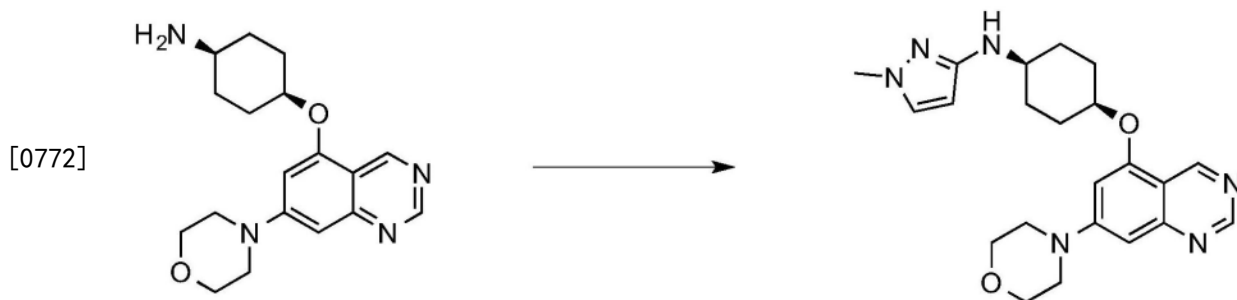
[0768] 化合物23:1-甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)环丙烷-1-甲酰胺的制备

[0769]



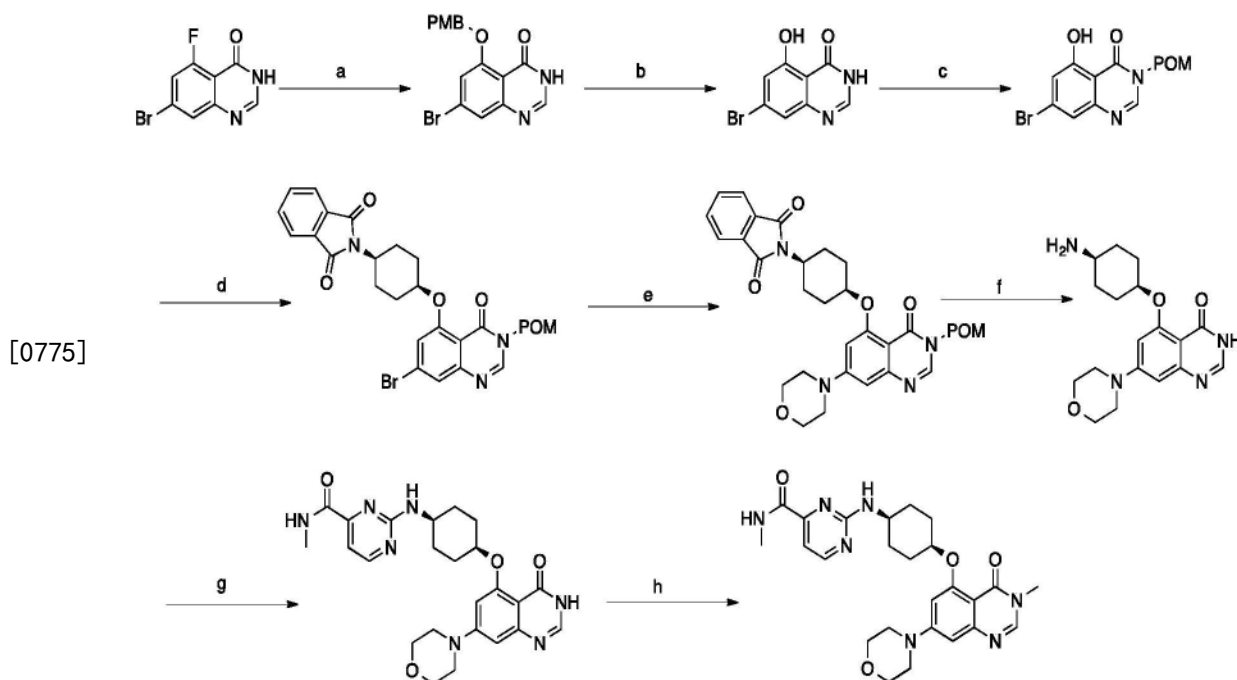
[0770] 在氮气下在室温将1-羟基苯并三唑一水合物(16mg,0.118mmol)、3-(乙基亚氨基亚甲基氨基)-N,N-二甲基-丙烷-1-胺(盐酸(1)) (35mg,0.183mmol)和1-甲基环丙烷-1-甲酸(12mg,0.1199mmol)组合在DMF(0.2mL)中并搅拌40min。加入4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(25mg,0.0761mmol)并继续搅拌另外30分钟。加入饱和碳酸氢钠,并将混合物用EtOAc(2 $\times$)萃取。将合并的有机层用水(2 $\times$)、盐水洗涤,经硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将得到的残余物通过使用0-10%甲醇/DCM梯度的在4g硅胶上的色谱法纯化。得到1-甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)环丙烷-1-甲酰胺(13mg,40%收率)。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ 9.46(s,1H),9.09(s,1H),6.85-6.74(m,1H),6.56(d,J=2.1Hz,1H),5.67(d,J=8.1Hz,1H),4.74(t,J=3.2Hz,1H),4.04-3.80(m,5H),3.47-3.32(m,4H),2.28-2.14(m,2H),1.96-1.83(m,2H),1.83-1.51(m,4H),1.35(s,3H),1.19(q,J=3.8Hz,2H),0.65-0.53(m,2H)。ESI-MS m/z =411.31(M+1)⁺。

[0771] 化合物24:1-甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)环丙烷-1-甲酰胺的制备



[0773] 在2mL微波管中,将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(27mg,0.082mmol)、3-溴-1-甲基-吡唑(9.5 μ L,0.0999mmol)、烯丙基(氯)钼(0.8mg,0.004mmol)、二叔丁基(2',4',6'-三异丙基-3,6-二甲氧基-[1,1'-联苯]-2-基)磷烷(4mg,0.008mmol)和2-甲基丙烷-2-醇化钠(83 μ L 2M在四氢呋喃中,0.166mmol)在tBuOH(400 μ L)中的混合物加热至90℃并搅拌过夜。将反应物用DCM稀释并穿过硅藻土过滤并将滤液在减压下浓缩。将残余物在12g硅胶上色谱分离,使用0-10%MeOH/DCM作为洗脱液,得到1-甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)-1H-吡唑-3-胺(12.5mg,36%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.43 (d, J=1.5Hz, 1H), 9.09 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.10 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.57 (d, J=1.9Hz, 1H), 5.53 (t, J=2.0Hz, 1H), 4.76-4.66 (m, 1H), 3.88 (dt, J=5.0, 3.0Hz, 4H), 3.72 (d, J=1.5Hz, 3H), 3.49-3.33 (m, 5H), 2.18 (dd, J=13.8, 4.1Hz, 3H), 1.99 (dt, J=11.7, 3.7Hz, 2H), 1.89-1.63 (m, 4H)。ESI-MS m/z=409.33 (M+1)⁺。

[0774] 化合物25:N-甲基-2-[[4-(3-甲基-7-吗啉代-4-氧代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺的制备



[0776] 步骤a

[0777] 向(4-甲氧基苯基)甲醇(5mL,40.1mmol)在DMF(50mL)中的溶液中加入NaH(3g,75.0mmol),并将得到的混合物在室温搅拌30min。向混合物中加入7-溴-5-氟-3H-喹唑啉-4-酮(5g,20.6mmol)并继续在室温搅拌2h。将混合物用H₂O(100mL)稀释并用乙酸中和至pH 5。将得到的沉淀物通过真空过滤进行收集,用H₂O、Et₂O洗涤,在真空下干燥过夜。这得到[7-

溴-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3-H-喹唑啉-4-酮(7g, 95%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 8.01 (s, 1H), 7.49 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.36 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.26 (d, J=1.9Hz, 1H), 7.02-6.89 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.76 (s, 3H)。

[0778] 步骤b

[0779] 向7-溴-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮(7g, 19.4mmol)在DCM(30mL)中的溶液中加入TFA(15mL, 194.7mmol), 并将得到的溶液搅拌30min。将混合物浓缩, 用H₂O稀释, 用NaHCO₃溶液中和, 过滤以收集固体。将固体在真空中干燥过夜以得到7-氟-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮(4.5g, 98%)。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H); 7.26 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.03 (d, J=1.8Hz, 1H), 3.6 (b, 1H)。

[0780] 步骤c

[0781] 在0℃向NaH(1.9g, 47.7mmol)在DMF(30mL)中的悬浮液中缓慢地加入7-溴-5-羟基-3H-喹唑啉-4-酮(5g, 20.7mmol), 并将得到的混合物在室温搅拌20min。将混合物冷却至0℃并然后加入POMCl(9.4g, 9mL, 62.2mmol)。将混合物搅拌30min。将反应混合物倒入乙酸(10mL)在H₂O(100mL)中的溶液中。将沉淀物过滤和溶解于DCM中, 经Na₂SO₄干燥和蒸发。将粗制物通过120g硅胶柱纯化, 用0-25%EtOAc/庚烷洗脱, 得到2,2-二甲基丙酸(7-溴-5-羟基-4-氧代-喹唑啉-3-基)甲酯(4.5g, 61%)¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 11.35 (d, J=1.1Hz, 1H), 8.21 (d, J=1.1Hz, 1H), 7.39 (t, J=1.4Hz, 1H), 7.15 (t, J=1.5Hz, 1H), 5.90 (d, J=1.1Hz, 2H), 1.23 (d, J=1.2Hz, 9H)。

[0782] 步骤d

[0783] 向2,2-二甲基丙酸(7-溴-5-羟基-4-氧代-喹唑啉-3-基)甲酯(3.5g, 9.85mmol)、PPh₃(4.1g, 15.8mmol)和2-(4-羟基环己基)异吲哚啉-1,3-二酮(2.8g, 11.4mmol)在THF(35mL)中的混合物中逐滴加入DIAD(3.2g, 3.1mL, 15.8mmol)。将混合物在室温搅拌1h。将混合物浓缩, 通过硅胶色谱柱纯化, 用EtOAc/庚烷洗脱。这得到2,2-二甲基丙酸[7-溴-5-[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己氧基]-4-氧代-喹唑啉-3-基]甲酯(4.2g, 73%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.22 (d, J=1.4Hz, 1H), 7.73 (tt, J=5.2, 3.7Hz, 2H), 7.65-7.57 (m, 2H), 7.40 (t, J=1.7Hz, 1H), 7.00 (d, J=1.7Hz, 1H), 5.90 (d, J=1.4Hz, 2H), 4.65 (s, 1H), 4.16 (tt, J=12.9, 3.9Hz, 1H), 2.80 (dt, J=15.5, 12.0Hz, 2H), 2.29 (d, J=14.5Hz, 2H), 1.74-1.52 (m, 5H), 1.16 (d, J=1.5Hz, 9H)。

[0784] 步骤e

[0785] 将2,2-二甲基丙酸[7-溴-5-[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己氧基]-4-氧代-喹唑啉-3-基]甲酯(500mg, 0.86mmol)、吗啉(83mg, 85 μ L, 1.0mmol)、碳酸铯(566mg, 1.7mmol)、rac-BINAP(107mg, 0.17mmol)在1,4-二噁烷(5.0mL)中的混合物用N₂鼓泡5min。将混合物在微波中在150℃加热15min。将混合物冷却至室温, 用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法纯化, 用0-20%DCM/EtOAc洗脱, 以得到2,2-二甲基丙酸[5-[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己氧基]-7-吗啉代-4-氧代-喹唑啉-3-基]甲酯(56mg, 11%)。ESI-MS m/z计算值588.26, 实测589.3(M+1)⁺; 保留时间: 0.78分钟。

[0786] 步骤f

[0787] 向2,2-二甲基丙酸[5-[4-(1,3-二氧代异吲哚啉-2-基)环己氧基]-7-吗啉代-4-氧代-喹唑啉-3-基]甲酯(56mg, 0.1mmol)在MeOH(5mL)中的溶液中加入NH₂NH₂(100 μ L,

3.2mmol), 并将得到的反应溶液在70℃搅拌90min。冷却至室温以后, 将混合物浓缩并通过4g硅胶柱纯化, 用0-10% (7N NH_3/MeOH)/DCM洗脱, 以得到期望的5-(4-氨基-环己氧基)-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮 (30mg, 91%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.93 (s, 1H), 6.64 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 6.41 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 3.86 (t, $J=4.9\text{Hz}$, 4H), 3.31 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 4H), 3.11 (td, $J=8.9, 7.1, 3.4\text{Hz}$, 1H), 2.12 (d, $J=13.6\text{Hz}$, 2H), 2.03-1.91 (m, 2H), 1.82 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 2H), 1.58 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 2H)。

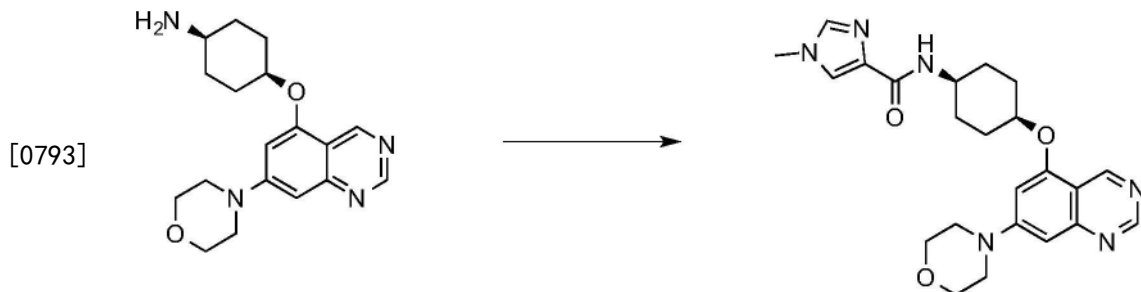
[0788] 步骤g

[0789] 将5-(4-氨基环己氧基)-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮 (30mg, 0.14mmol)、2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺 (30mg, 0.17mmol) 和 K_2CO_3 (100mg, 0.72mmol) 在 H_2O (2mL) 中的混合物在100℃搅拌18h。将混合物用DCM萃取, 经 Na_2SO_4 干燥, 浓缩并通过硅胶色谱法纯化, 用0-10% MeOH/DCM 洗脱。这得到N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺 (15mg, 35.9%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.48 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.97-7.78 (m, 2H), 7.31 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 6.73 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.49 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.93-3.81 (m, 4H), 3.50 (s, 1H), 3.43-3.29 (m, 4H), 3.00 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 3H), 2.29-2.17 (m, 2H), 2.11-1.97 (m, 2H), 1.92 (dq, $J=12.7, 4.2\text{Hz}$, 2H), 1.85-1.70 (m, 2H)。

[0790] 步骤h

[0791] 向N-甲基-2-[[4-[(7-吗啉代-4-氧代-3H-喹唑啉-5-基)氧基]环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺 (15mg, 0.031mmol)、 K_2CO_3 (80mg, 0.58mmol) 在DMF (1mL) 中的混合物中加入MeI (50 μL , 0.80mmol) 并在70℃搅拌30min。将溶剂蒸发, 并将粗制物通过4g硅胶柱纯化, 用0-10% MeOH/DCM 洗脱。回收的产物是不纯的。对产物进行SFC分离以得到N-甲基-2-[[4-(3-甲基-7-吗啉代-4-氧代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]嘧啶-4-甲酰胺 (2mg, 16.3%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.47 (d, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.28 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 6.63 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.47 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.99 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 3.92-3.80 (m, 4H), 3.50 (s, 3H), 3.37-3.23 (m, 4H), 3.01 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 3H), 2.27-2.15 (m, 2H), 2.07-1.95 (m, 2H), 1.90 (dd, $J=13.0, 4.2\text{Hz}$, 2H), 1.79 (t, $J=12.8\text{Hz}$, 2H)。ESI-MS m/z 计算值493.24374, 实测494.37 ($\text{M}+1$)+; 保留时间: 0.6分钟。

[0792] 化合物26: 1-甲基-N-((1s, 4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)-1H-咪唑-4-甲酰胺的制备

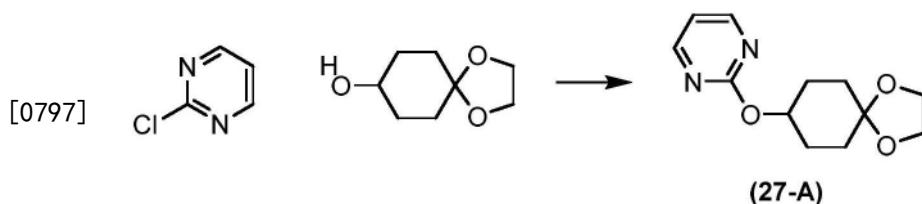


[0794] 在氮气下在室温将1-羟基苯并三唑一水合物 (16mg, 0.118mmol)、3-(乙基亚氨基亚甲基氨基)-N,N-二甲基-丙烷-1-胺 (盐酸(1)) (35mg, 0.183mmol) 和1-甲基-1H-咪唑-4-甲酸 (15mg, 0.119mmol) 组合在DMF (0.2mL) 中并搅拌40min。加入4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)

氧基环己胺 (25mg, 0.0761mmol), 并继续搅拌另外30min。加入饱和碳酸氢钠, 将混合物用 EtOAc (2×) 萃取。将合并的有机层用水 (2×)、盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 并在减压下浓缩。将得到的残余物通过使用0-10% 甲醇/DCM梯度的在4g硅胶上的色谱法纯化, 以得到1-甲基-N-((1s, 4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基) 氧基) 环己基)-1H-咪唑-4-甲酰胺 (6mg, 17%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.44 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 7.51 (d, J=1.3Hz, 1H), 7.40-7.34 (m, 1H), 7.09 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.78 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.57 (d, J=2.0Hz, 1H), 4.74 (d, J=3.9Hz, 1H), 4.11 (tq, J=9.9, 6.2, 5.3Hz, 1H), 3.89 (dd, J=5.9, 3.9Hz, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.43-3.33 (m, 4H), 2.29-2.17 (m, 2H), 2.04-1.73 (m, 6H)。ESI-MS m/z=433.05 (M+1)⁺。

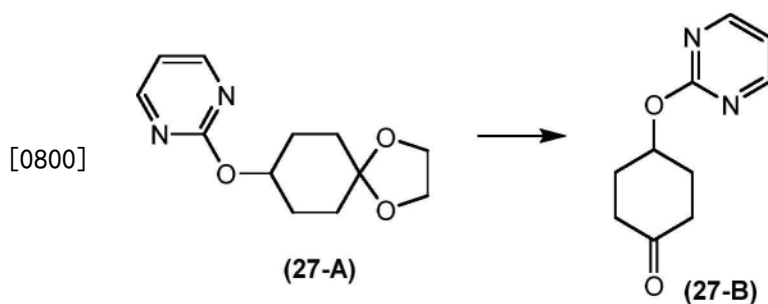
[0795] 化合物27的制备:

[0796] 2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基氧基) 嘧啶: 化合物 (27-A) 的制备



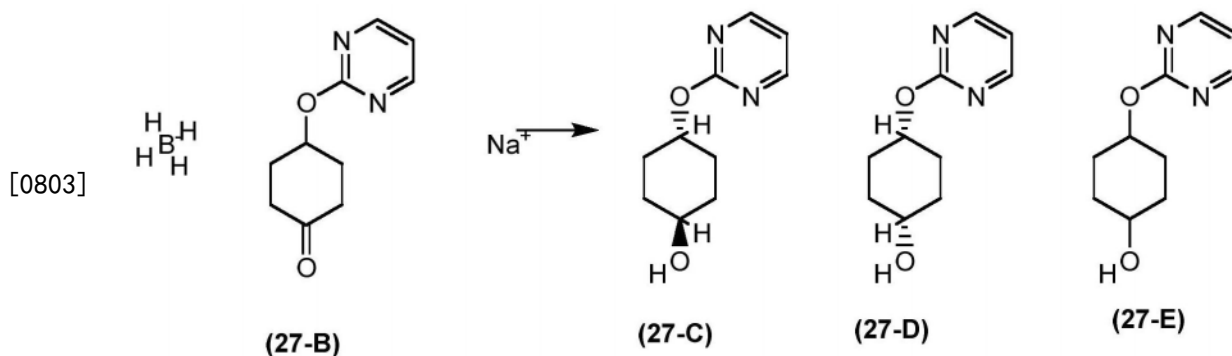
[0798] 向用冰浴冷却的NaH (370.1mg, 9.254mmol) (60%在矿物油中) 在DMA (2ml) 中的悬浮液中, 加入1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-醇 (1g, 6.321mmol) 在DMA (10mL) 和咪唑 (43mg) 中的溶液。在室温搅拌30min以后, 加入2-氯嘧啶 (868.7mg, 7.585mmol) 并将混合物搅拌30min, 在室温搅拌2h, 然后在60℃搅拌1h。然后将反应物用EtOAc稀释, 用H₂O洗涤, 经Na₂SO₄干燥并浓缩。通过硅胶色谱法 (40g硅胶, EtOAc/庚烷0-50%) 纯化以得到2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基氧基) 嘧啶 (3.20g, 6.230mmol, 98.59%), 将其原样用于下一反应。¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 8.43 (d, J=4.8Hz, 2H), 6.83 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.06 (tt, J=6.5, 4.2Hz, 1H), 4.06-3.75 (m, 4H), 1.98-1.77 (m, 6H), 1.64-1.55 (m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值 236.11609, 实测237.22 (M+1)⁺; 保留时间: 0.72分钟。

[0799] 4-嘧啶-2-基氧基环己酮: 化合物 (27-B) 的制备



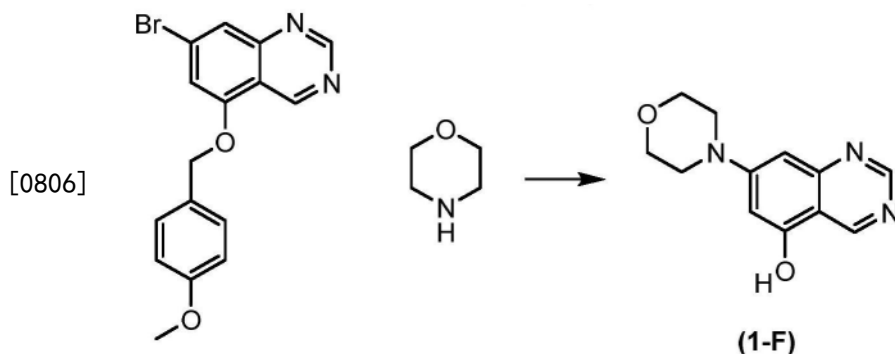
[0801] 向2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基氧基) 嘧啶 (1.10g, 4.656mmol) 在二噁烷 (6mL) 中的溶液中加入HCl (7.883mL 6M, 47.30mmol)。搅拌2天以后, 将反应混合物蒸发, 用饱和NaHCO₃水溶液中和, 用DCM (3x) 萃取, 经MgSO₄干燥, 过滤并通过硅胶色谱法 (12g硅胶, EtOAc/庚烷0-100%) 纯化, 以得到4-嘧啶-2-基氧基环己酮 (800mg, 4.162mmol, 89.39%)。¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 8.56 (d, J=4.8Hz, 2H), 6.98 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.47 (tt, J=6.4, 3.3Hz, 1H), 2.88-2.62 (m, 2H), 2.51-2.28 (m, 5H), 2.30-2.11 (m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值 192.08987, 实测193.07 (M+1)⁺; 保留时间: 0.6分钟。

[0802] 化合物 (27-C)、(27-D) 和 (27-E) 的制备



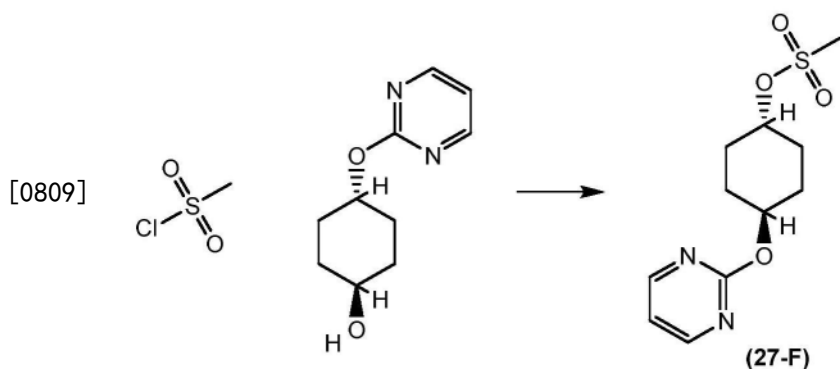
[0804] 向化合物 (27-B) (383mg, 1.993mmol) 在 MeOH (2mL) 中的溶液中加入硼氢化钠 (151mg, 3.991mmol)。观察到中等气体产生, 伴有温度小幅升高。将反应物搅拌 1 小时, 然后将它用 HCl (6N 0.70mL) 猝灭, 并搅拌直到气体产生停止。将混合物用 1N NaOH 碱化至 pH ~ 8, 并用 EtOAc (20mL) 萃取。将有机物经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。得到 248mg 4-嘧啶-2-基氧基环己醇。通过 HPLC 制备型色谱法 (10-90% CH₃CN/水梯度) 纯化 12mg 样品以分离顺/反异构体。反式-4-嘧啶-2-基氧基环己醇: ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 8.54 (d, J=4.8Hz, 2H), 6.95 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.05 (tt, J=9.4, 4.0Hz, 1H), 3.91-3.75 (m, 1H), 2.26-1.99 (m, 4H), 1.76-1.41 (m, 4H)。顺式-4-嘧啶-2-基氧基环己醇: ¹H NMR (300MHz, 氯仿-d) δ 8.62 (d, J=4.9Hz, 2H), 7.04 (t, J=4.9Hz, 1H), 5.21 (tt, J=5.3, 2.6Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 3.85 (p, J=5.9Hz, 1H), 2.17-2.02 (m, 2H), 1.88-1.67 (m, 6H)。

[0805] 7-吗啉代喹唑啉-5-醇: 化合物 (1-F) 的制备



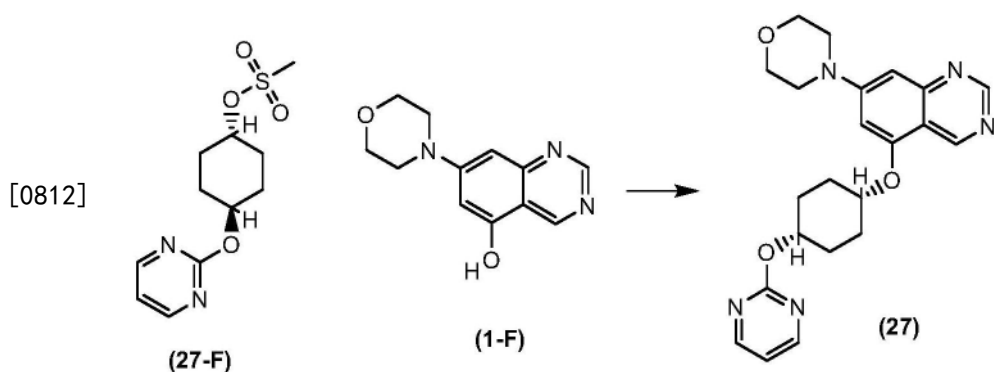
[0807] 在 20mL 微波瓶中将 7-溴-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉 (300mg, 0.8691mmol)、Pd(OAc)₂ (18mg, 0.08017mmol) 和 RuPhos (81.10mg, 0.1738mmol) 在 1,4-二噁烷 (5mL) 中的悬浮液用 N₂ 鼓泡。加入吗啉 (113.6mg, 113.7μL, 1.304mmol), 随后加入叔丁醇钠 (250.5mg, 2.607mmol)。将瓶密封并在 100℃ 加热 19h。加入 NH₄Cl 水溶液, 并将混合物用 EtOAc (6×) 萃取。将合并的有机相经 MgSO₄ 干燥, 过滤, 并浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法 (4g+12g 硅胶, MeOH/DCM 0-10%) 进一步纯化 2 次, 以得到 7-吗啉代喹唑啉-5-醇 (147mg, 0.6357mmol, 73.14%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 10.86 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 6.72 (d, J=2.1Hz, 1H), 6.66 (d, J=2.2Hz, 1H), 3.76 (t, J=4.9Hz, 4H), 3.33 (dd, J=6.2, 3.4Hz, 4H)。ESI-MS m/z 计算值 231.10078, 实测 232.22 (M+1)⁺; 保留时间: 0.49 分钟。

[0808] 反式-甲磺酸 (4-嘧啶-2-基氧基环己基) 酯 (trans-(4-pyrimidin-2-ylloxycyclohexyl)methanesulfonate): 化合物 (27-F) 的制备



[0810] 将反式-4-吡啶-2-基氧基环己醇(80mg,0.4119mmol)(来自FC1)、TEA(125.1mg,172.3 μ L,1.236mmol)在DCM(5mL)中的溶液用甲磺酰氯(70.77mg,47.82 μ L,0.6178mmol)处理1h。将反应混合物蒸发,并将残余物通过快速色谱法(4g硅胶,EtOAc/DCM 0-30%)纯化以得到反式-甲磺酸(4-吡啶-2-基氧基环己基)酯(74mg,0.2717mmol,65.95%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 8.43(d,J=4.8Hz,2H),6.86(t,J=4.8Hz,1H),5.05(tt,J=6.6,3.4Hz,1H),4.78(tt,J=7.0,3.2Hz,1H),2.17-1.93(m,5H),1.82(tdd,J=13.0,5.7,3.5Hz,4H)。ESI-MS m/z计算值272.08307,实测273.12(M+1)⁺;保留时间:0.76分钟。

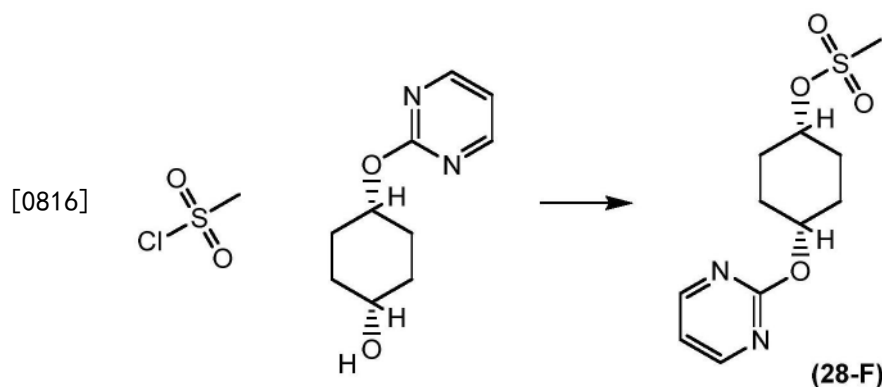
[0811] 4-[5-顺式-(4-吡啶-2-基氧基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉:化合物(27)的制备



[0813] 将反式-甲磺酸(4-吡啶-2-基氧基环己基)酯(58.7mg,0.2156mmol)、7-吗啉代喹唑啉-5-醇(40mg,0.1730mmol)和Cs₂CO₃(67.64mg,0.2076mmol)在二噁烷(1mL)和DMF(1mL)中的混合物密封在5mL微波管中并加热至110℃保持15h。将反应混合物在减压下浓缩。将残余物溶解在DCM/MeOH 9:1中并穿过硅藻土过滤。将滤液蒸发,并通过硅胶色谱法(2 $\times$ 4g硅胶,MeOH/DCM 0-5%)纯化以得到4-[5-顺式-(4-吡啶-2-基氧基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉(45mg,0.0994mmol,57.45%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 9.45(s,1H),9.10(s,1H),8.53(d,J=4.8Hz,2H),6.93(t,J=4.8Hz,1H),6.85-6.72(m,1H),6.60(d,J=2.1Hz,1H),5.20(dq,J=7.6,3.7Hz,1H),4.67(dt,J=6.3,3.1Hz,1H),3.99-3.79(m,4H),3.51-3.15(m,4H),2.38-2.06(m,4H),2.11-1.78(m,4H)。ESI-MS m/z计算值407.19574,实测408.35(M+1)⁺;保留时间:0.63分钟。

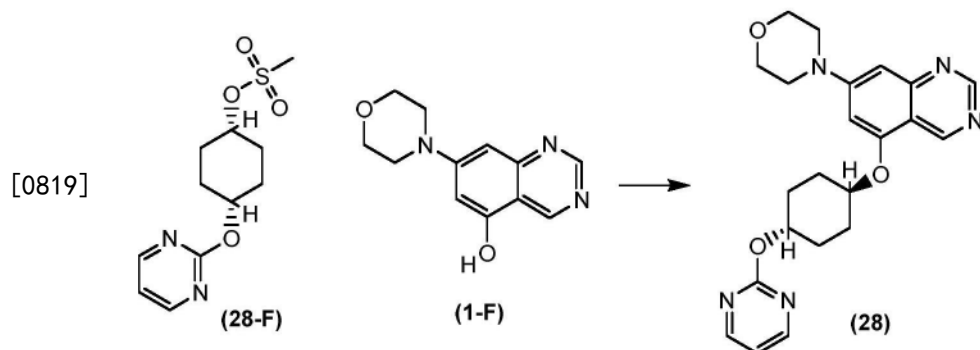
[0814] 化合物28:4-[5-反式-(4-吡啶-2-基氧基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉的制备

[0815] 顺式-甲磺酸(4-吡啶-2-基氧基环己基)酯:化合物(27-F)的制备



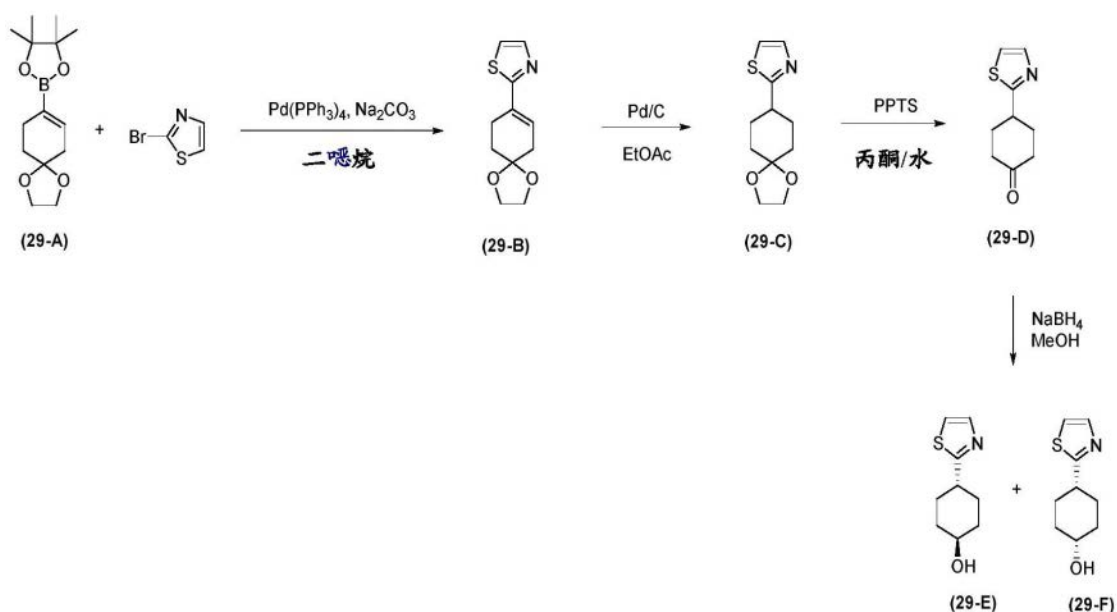
[0817] 向顺式-4-嘧啶-2-基氧基环己醇(160mg,0.8238mmol)(FC2)和TEA(250.0mg,344.4 μ L,2.471mmol)在DCM(1078mL)中的溶液中加入甲烷磺酰氯(140.7mg,95.07 μ L,1.228mmol)。将混合物在室温搅拌1h,浓缩,和在12g硅胶上色谱分离,使用0 $\rightarrow$ 70%EtOAc/庚烷作为洗脱剂,以得到顺式-甲磺酸(4-嘧啶-2-基氧基环己基)酯(142mg,0.5214mmol,63.31%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 8.51(d,J=4.8Hz,2H),6.93(t,J=4.8Hz,1H),5.15(tt,J=7.9,3.1Hz,1H),4.97-4.70(m,1H),3.04(s,3H),2.38-2.04(m,4H),1.95-1.68(m,4H)。ESI-MS m/z计算值272.08307,实测273.16(M+1)⁺;保留时间:0.74分钟。

[0818] 4-[5-(4-嘧啶-2-基氧基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉:化合物(27)的制备



[0820] 将顺式-甲磺酸(4-嘧啶-2-基氧基环己基)酯(43mg,0.1579mmol)、7-吗啉代喹唑啉-5-醇(40mg,0.1730mmol)和Cs₂CO₃(67.64mg,0.2076mmol)在二噁烷(1mL)和DMF(1mL)中的混合物密封在5mL微波管中并加热至110 $^{\circ}$ C保持15h。将反应混合物在减压下浓缩。将残余物溶解在DCM/MeOH 9:1中,穿过硅藻土过滤。将滤液蒸发,并通过硅胶色谱法(2 $\times$ 4g硅胶,MeOH/DCM 0-5%)纯化以得到4-[5-反式-(4-嘧啶-2-基氧基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉(14.5mg,0.03203mmol,18.51%)。¹H NMR(300MHz,氯仿-d) δ 9.43(s,1H),9.10(s,1H),8.54(d,J=4.8Hz,2H),6.95(t,J=4.8Hz,1H),6.80(dd,J=2.1,0.8Hz,1H),6.62(d,J=2.0Hz,1H),5.29-5.24(m,1H),4.80-4.59(m,1H),4.11-3.77(m,4H),3.58-3.30(m,4H),2.33-2.20(m,4H),2.04-1.70(m,4H)。ESI-MS m/z计算值407.19574,实测408.39(M+1)⁺;保留时间:0.62分钟。

[0821] 化合物29和35的制备



[0822]

[0823] 2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-7-烯-8-基)噻唑:化合物(29-B)的制备

[0824] 将2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-7-烯-8-基)-4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(2.0g, 7.5mmol)、2-溴噻唑(1.27g, 7.74mmol)、Pd(PPh₃)₄(436mg, 0.377mmol)和Na₂CO₃(7.60mL 2M溶液, 15.2mmol)在二噁烷(40mL)中的混合物抽真空并用氮气回填(重复2次), 然后加热至90℃保持6小时。将反应物冷却至室温, 并用水稀释, 然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩。将残余物通过使用EtOAc和庚烷的快速色谱法纯化, 以得到2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-7-烯-8-基)噻唑(889mg, 53.0%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.75(d, J=3.3Hz, 1H), 7.19(d, J=3.3Hz, 1H), 6.63-6.52(m, 1H), 4.04(s, 4H), 3.00-2.74(m, 2H), 2.69-2.38(m, 2H), 1.94(t, J=6.6Hz, 2H)。

[0825] 2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基)噻唑:化合物(29-C)的制备

[0826] 将2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸-7-烯-8-基)噻唑(889mg, 3.98mmol)和10%活性炭载钯(425mg, 0.399mmol)在EtOAc(15mL)中的混合物在1大气压的氢气下在室温搅拌过夜。将反应物穿过硅藻土过滤并在真空中浓缩以得到2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基)噻唑(860mg, 93.9%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.70(d, J=3.3Hz, 1H), 7.22(d, J=3.3Hz, 1H), 3.99(s, 4H), 3.11(tt, J=11.1, 3.8Hz, 1H), 2.28-2.12(m, 2H), 1.99-1.83(m, 4H), 1.72(td, J=13.3, 4.3Hz, 2H)。ESI-MS m/z计算值225.08235, 实测226.05(M+1)⁺。

[0827] 4-噻唑-2-基环己酮:化合物(29-D)的制备

[0828] 将2-(1,4-二氧杂螺[4.5]癸烷-8-基)噻唑(860mg, 3.82mmol)和吡啶鎓对甲苯磺酸盐(1.93g, 7.68mmol)在丙酮(19mL)和水(19mL)中的溶液加热至回流过夜。在真空中除去丙酮。将水层用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩, 以得到4-噻唑-2-基环己酮(641.5mg, 90%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ7.74(d, J=3.3Hz, 1H), 7.28(d, J=0.8Hz, 1H), 3.53(tt, J=10.4, 3.4Hz, 1H), 2.66-2.40(m, 6H), 2.27-2.05(m, 2H)。ESI-MS m/z计算值181.05614, 实测182.02(M+1)⁺。

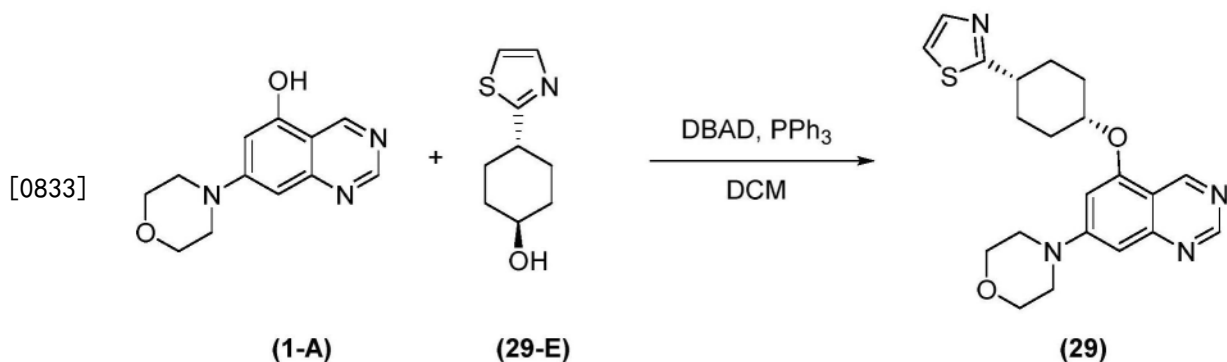
[0829] 化合物(29-E)和(29-F)的制备

[0830] 在0℃向4-噻唑-2-基环己酮(564mg, 3.11mmol)在MeOH(15mL)中的溶液中加入

NaBH_4 (244mg, 6.32mmol)。将反应物历时1小时温热至室温。在真空中除去溶剂。将反应物用水稀释并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩以得到4-噻唑-2-基环己醇(492mg, 82.4%收率)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.68 (t, $J=3.2\text{Hz}$, 1H), 7.20 (dd, $J=5.3, 3.3\text{Hz}$, 1H), 4.11-4.01 (m, 1H), 3.70 (tt, $J=10.6, 4.3\text{Hz}$, 1H), 3.16-2.90 (m, 1H), 2.29-2.16 (m, 2H), 2.16-2.05 (m, 2H), 1.73-1.56 (m, 2H), 1.54-1.35 (m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值183.07178, 实测184.0 ($\text{M}+1$) $^+$ 。

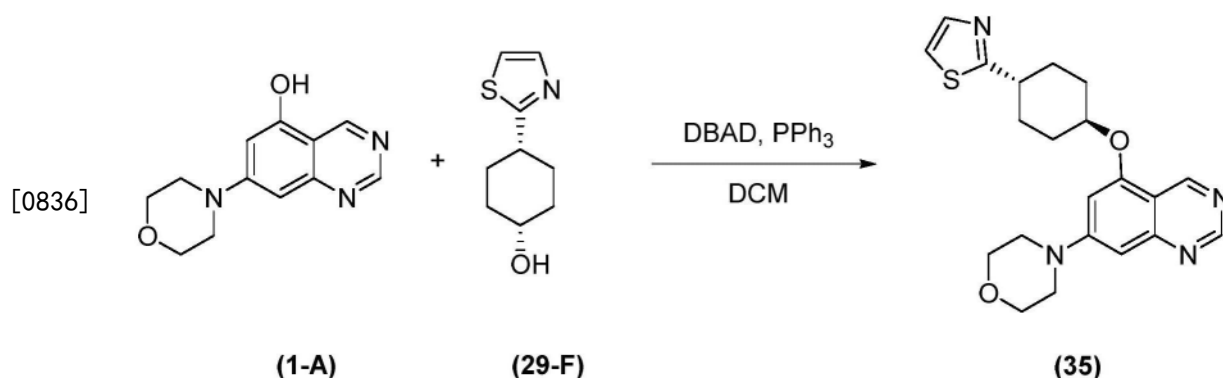
[0831] 使用 CO_2 和EtOH (0.2% Et_2NH) 通过SFC纯化反式-和顺式-4-噻唑-2-基环己醇的混合物(492mg, 2.68mmol), 以得到反式-4-噻唑-2-基环己醇(381mg, 2.08mmol) $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 7.21 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 3.72 (tt, $J=10.6, 4.3\text{Hz}$, 1H), 3.02 (tt, $J=11.9, 3.7\text{Hz}$, 1H), 2.33-2.19 (m, 2H), 2.19-2.05 (m, 2H), 1.77-1.37 (m, 4H) 和顺式-4-噻唑-2-基环己醇(65.7mg, 0.359mmol) $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 7.22 (dt, $J=7.2, 3.6\text{Hz}$, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.11 (tt, $J=10.2, 3.9\text{Hz}$, 1H), 2.19-2.01 (m, 2H), 2.01-1.92 (m, 2H), 1.92-1.81 (m, 2H), 1.81-1.70 (m, 2H)。

[0832] 化合物(29)的制备



[0834] 向7-吗啉代喹唑啉-5-醇(25mg, 0.11mmol)、顺式-4-噻唑-2-基环己醇(30mg, 0.16mmol)和 PPh_3 (52mg, 0.20mmol)在DCM (1mL)中的溶液中加入偶氮二甲酸二叔丁酯(45mg, 0.20mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。将反应物在真空中浓缩并将残余物使用5-50% CH_3CN (0.1% TFA) 在 H_2O (0.1% TFA)中的溶液在反相C18-衍生化的 SiO_2 柱上纯化。将产物级分合并,并用 NaHCO_3 (饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩以得到4-[5-(反式-4-噻唑-2-基环己氧基)喹唑啉-7-基]吗啉(17.2mg, 38.5%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 9.42 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.74 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 7.26 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 6.83 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.63 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.63-4.42 (m, 1H), 4.01-3.84 (m, 4H), 3.49-3.31 (m, 4H), 3.30-3.10 (m, 1H), 2.39 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 4H), 2.04-1.58 (m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值396.162, 实测397.32 ($\text{M}+1$) $^+$ 。

[0835] 化合物(35)的制备



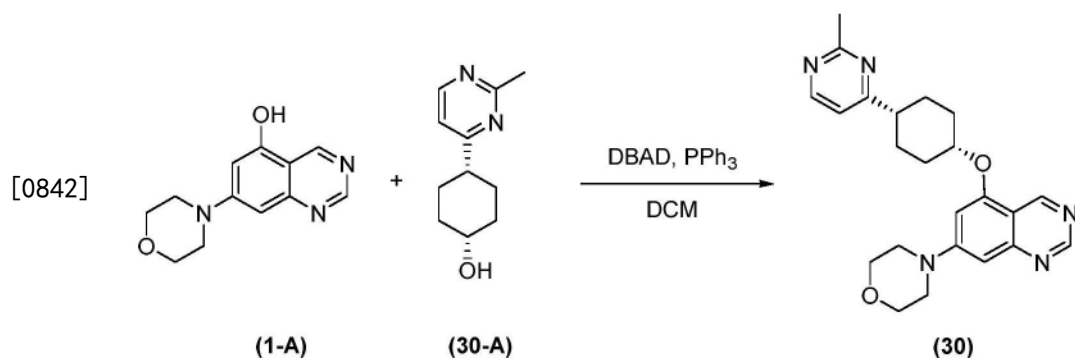
[0837] 向7-吗啉代喹唑啉-5-醇(25mg, 0.11mmol)、反式-4-噻唑-2-基环己醇(25mg, 0.14mmol)和 PPh_3 (46mg, 0.18mmol)在DCM(1mL)中的溶液中加入偶氮二甲酸二叔丁酯(40mg, 0.18mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。认为反应不完全,所以加入反式-4-噻唑-2-基环己醇(5mg)、 PPh_3 (11mg)和偶氮二甲酸二叔丁酯(10mg),并将反应物在室温搅拌2小时。将反应物在真空中浓缩,并将残余物使用5-40% CH_3CN (0.1%TFA)在 H_2O (0.1%TFA)中的溶液在反相C18-衍生化的 SiO_2 柱上纯化。将产物级分合并,并用 NaHCO_3 (饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩以得到4-(5-(顺式-4-(噻唑-2-基)环己基)氧基)喹唑啉-7-基)吗啉(14.8mg, 33.2%收率)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 9.47(s, 1H), 9.09(s, 1H), 7.74(d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 7.27(d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 6.84(d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 6.61(d, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 4.87(s, 1H), 3.96-3.84(m, 4H), 3.51-3.38(m, 4H), 3.31-3.16(m, 1H), 2.42-2.27(m, 2H), 2.22-2.05(m, 4H), 1.96-1.82(m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值396.162, 实测397.26($\text{M}+1$) $^+$ 。

[0838] 化合物30和38的制备

[0839] 化合物(30-A)和(30-B)的制备

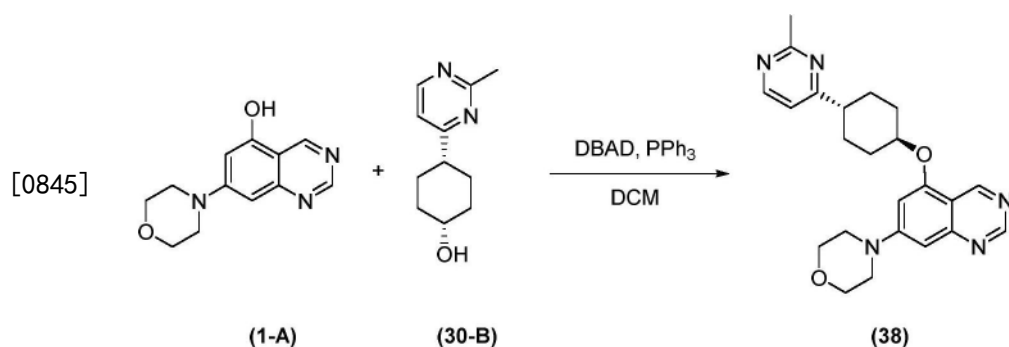
[0840] 以与关于化合物(29-E)和(29-F)类似的方式制备化合物(30-A)和(30-B)。使用 CO_2 和EtOH(0.2% Et_2NH)通过SFC纯化反式-和顺式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己醇的混合物(465mg, 2.42mmol),以产生反式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己醇(331mg, 1.69mmol) $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.53(d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 6.98(d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 3.82-3.62(m, 1H), 2.72(s, 3H), 2.62(tt, $J=12.0, 3.5\text{Hz}$, 1H), 2.23-2.09(m, 2H), 2.09-1.96(m, 2H), 1.70-1.35(m, 4H)和顺式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己醇(71mg, 0.35mmol) $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.55(d, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 7.05(d, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 4.22-4.08(m, 1H), 2.80-2.59(m, 4H), 2.08-1.61(m, 8H)。

[0841] 化合物30:4-[5-[顺式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备



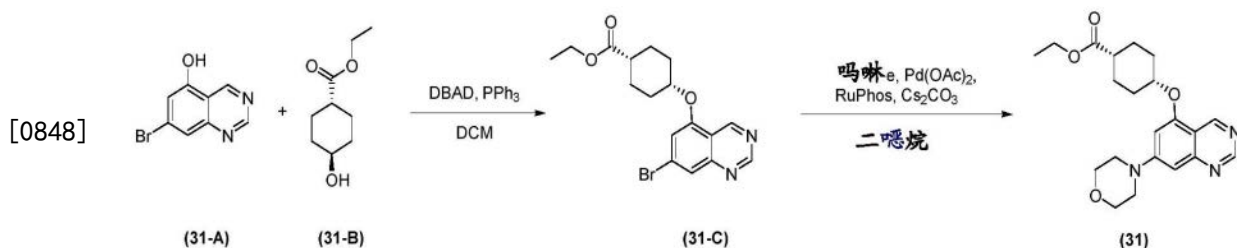
[0843] 向7-吗啉代喹唑啉-5-醇 (27.5mg, 0.12mmol)、反式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己醇 (35mg, 0.18mmol) 和PPh₃ (56mg, 0.21mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入偶氮二甲酸二叔丁酯 (49mg, 0.21mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。将反应物在真空中浓缩并将残余物使用5-40%CH₃CN (0.1%TFA) 在H₂O (0.1%TFA) 中的溶液在反相C18-衍生化的SiO₂柱上纯化。将产物级分合并, 并用NaHCO₃ (饱和) 中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩以得到4-[5-[顺式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己氧基]喹唑啉-7-基]吗啉 (18.5mg, 36.5%收率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.51 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.59 (d, J=5.2Hz, 1H), 7.06 (d, J=5.2Hz, 1H), 6.84 (d, J=1.7Hz, 1H), 6.61 (d, J=1.9Hz, 1H), 4.96-4.82 (m, 1H), 4.03-3.82 (m, 4H), 3.51-3.30 (m, 4H), 2.90-2.77 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.44-2.28 (m, 2H), 2.19-1.75 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值405.21646, 实测406.36 (M+1)⁺。

[0844] 化合物38: 4-[5-[反式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备



[0846] 向7-吗啉代喹唑啉-5-醇 (25mg, 0.11mmol)、顺式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己醇 (33mg, 0.16mmol) 和PPh₃ (52mg, 0.20mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入偶氮二甲酸二叔丁酯 (45mg, 0.20mmol)。将反应物在室温搅拌2天。将反应物在真空中浓缩并将残余物通过使用EtOAc的硅胶色谱法纯化, 以得到4-[5-[反式-4-(2-甲基嘧啶-4-基)环己氧基]喹唑啉-7-基]吗啉 (17mg, 0.041mmol, 37%收率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.57 (d, J=5.2Hz, 1H), 7.02 (d, J=5.1Hz, 1H), 6.83 (d, J=1.7Hz, 1H), 6.64 (d, J=2.0Hz, 1H), 4.63-4.41 (m, 1H), 4.05-3.83 (m, 4H), 3.53-3.29 (m, 4H), 2.86-2.76 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.51-2.33 (m, 2H), 2.25-2.10 (m, 2H), 1.96-1.62 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值405.21646, 实测406.29 (M+1)⁺。

[0847] 化合物31: 4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯的制备



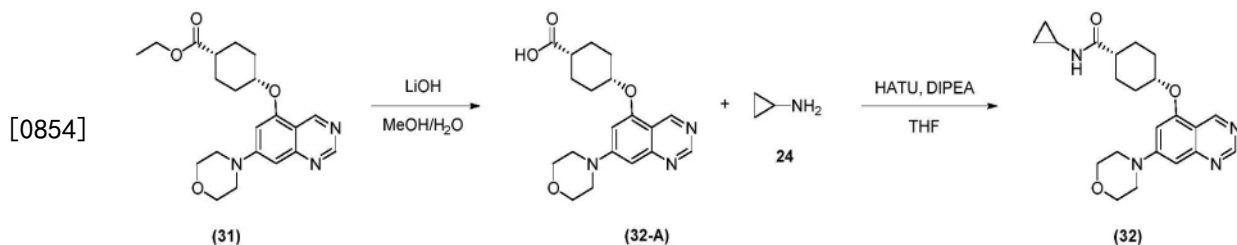
[0849] 化合物(31-C)的制备

[0850] 向7-溴喹唑啉-5-醇(500mg, 2.22mmol)、4-羟基环己烷甲酸乙酯(516mg, 3.00mmol)和PPh₃(937mg, 3.57mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入偶氮二甲酸二叔丁酯(819mg, 3.56mmol)。将反应物在室温搅拌2天。将反应物在真空中浓缩并将残余物通过使用EtOAc和庚烷的硅胶色谱法纯化,以得到顺式-4-(7-溴喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯(585mg, 69.4%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.74(s, 1H), 9.32(s, 1H), 7.79(s, 1H), 7.05(d, J=1.4Hz, 1H), 4.82-4.72(m, 1H), 4.19(q, J=7.1Hz, 2H), 2.58-2.43(m, 1H), 2.28-2.12(m, 2H), 2.12-1.74(m, 6H), 1.30(t, J=7.1Hz, 3H)。ESI-MS m/z计算值378.0579, 实测379.1(M+1)⁺。

[0851] 化合物(31)的制备

[0852] 给配备磁力搅拌棒的Biotage 0.5-2mL微波瓶装入在二噁烷(1.6mL)中的4-(7-溴喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯(100mg, 0.264mmol)、Pd(OAc)₂(6mg, 0.03mmol)和RuPhos(25mg, 0.054mmol),并用氮气在反应物中鼓泡10分钟。加入吗啉(36μL, 0.41mmol)和Cs₂CO₃(258mg, 0.792mmol),并将瓶用一次性的特氟隆隔膜帽密封。将瓶加热至100℃保持4.5小时。将反应物冷却至室温,并用水稀释,然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤,并浓缩。将残余物通过使用EtOAc的快速色谱法纯化,以得到4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯(90mg, 85%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.46(s, 1H), 9.10(s, 1H), 6.81(d, J=1.7Hz, 1H), 6.57(d, J=1.9Hz, 1H), 4.83-4.66(m, 1H), 4.19(q, J=7.1Hz, 2H), 4.01-3.83(m, 4H), 3.51-3.29(m, 4H), 2.48(tt, J=10.3, 3.9Hz, 1H), 2.30-2.12(m, 2H), 2.12-1.65(m, 6H), 1.30(t, J=7.1Hz, 3H)。ESI-MS m/z计算值385.20016, 实测386.28(M+1)⁺。

[0853] 化合物32:顺式-N-环丙基-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己烷甲酰胺的制备



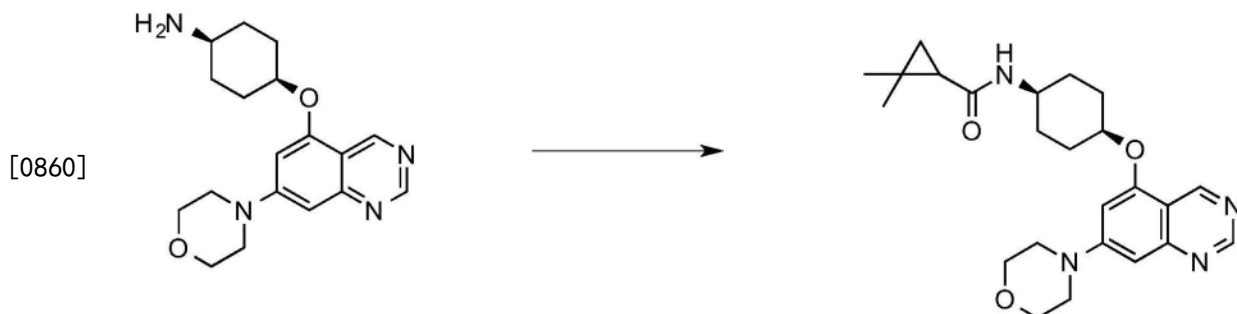
[0855] 化合物(32-A)的制备

[0856] 将4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯(210mg, 0.545mmol:化合物(31))和LiOH(20mg, 0.835mmol)在MeOH(3mL)和水(500μL)中的溶液在65℃搅拌1.5小时。将反应物冷却至室温并用6M HCl将pH调至1。将溶剂除去以得到4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸盐。

[0857] 化合物(32)的制备

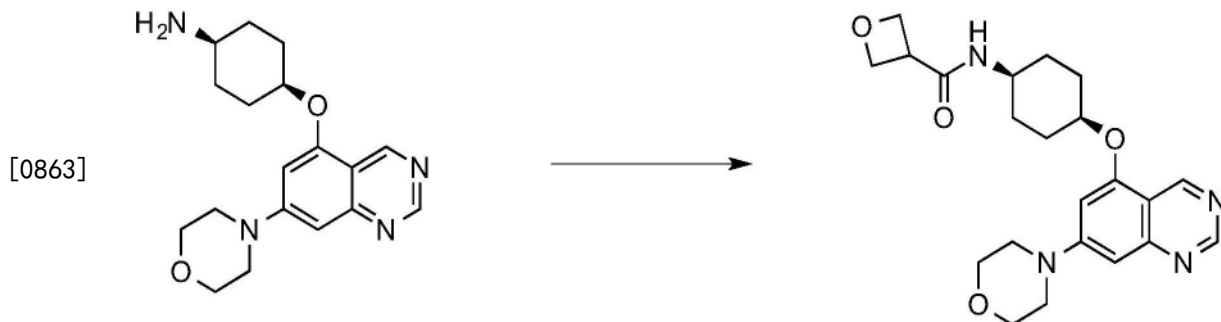
[0858] 向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸盐(46.4mg, 0.118mmol)、环丙胺(10 μ L, 0.14mmol)和HATU(49mg, 0.13mmol)在THF(2mL)中的溶液中加入DIPEA(82 μ L, 0.47mmol)。将反应物在室温搅拌40分钟。将反应物在真空中浓缩,并将残余物使用5-30% CH₃CN(0.1% TFA)在H₂O(0.1% TFA)中的溶液在反相C18-衍生化的SiO₂柱上纯化。将产物级分合并,并用NaHCO₃(饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,并用盐水洗涤,经MgSO₄干燥,过滤,并浓缩以得到顺式-N-环丙基-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己烷甲酰胺(27mg, 56%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.47(s, 1H), 9.11(s, 1H), 6.81(d, J=1.7Hz, 1H), 6.56(d, J=1.8Hz, 1H), 5.65(s, 1H), 4.87-4.72(m, 1H), 4.02-3.83(m, 4H), 3.48-3.35(m, 4H), 2.82-2.68(m, 1H), 2.37-2.17(m, 3H), 2.02-1.68(m, 8H), 0.90-0.75(m, 2H), 0.59-0.41(m, 2H)。ESI-MS m/z计算值396.21616, 实测397.31(M+1)⁺。

[0859] 化合物33:2,2-二甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)环丙烷-1-甲酰胺的制备



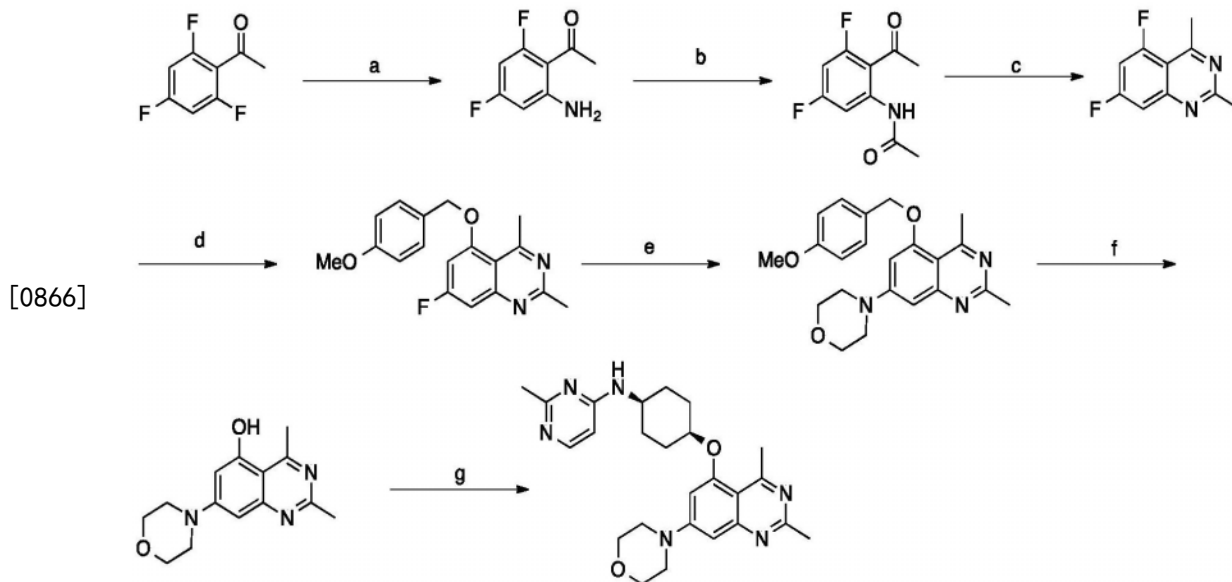
[0861] 在氮气下在室温将1-羟基苯并三唑一水合物(23mg, 0.170mmol)、3-(乙基亚氨基亚甲基氨基)-N,N-二甲基-丙烷-1-胺(盐酸(1)(49mg, 0.256mmol)和2,2-二甲基环丙烷甲酸(18mg, 0.158mmol)组合在DMF(280 μ L)中并搅拌40min。加入4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(35mg, 0.107mmol)并搅拌过夜。加入饱和碳酸氢钠,并用EtOAc(2 $\times$)萃取。将合并的有机层用水(2 $\times$)、盐水洗涤,经硫酸钠干燥,并在减压下浓缩。将残余物使用0-10% MeOH/DCM作为洗脱液在4g硅胶柱上色谱分离,并通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)进一步纯化。将有关级分脱水,并将残余物穿过PL-HC03 MP SPE以得到2,2-二甲基-N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)环丙烷-1-甲酰胺(11.5mg, 25%收率)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.45(s, 1H), 9.09(s, 1H), 6.78(d, J=1.9Hz, 1H), 6.57(d, J=2.0Hz, 1H), 5.57(d, J=8.2Hz, 1H), 4.74(q, J=3.2Hz, 1H), 4.05-3.84(m, 5H), 3.46-3.31(m, 4H), 2.19(dq, J=9.9, 3.3Hz, 2H), 1.97-1.55(m, 6H), 1.26(dd, J=8.0, 5.3Hz, 1H), 1.17(s, 3H), 1.15(s, 3H), 1.09(t, J=4.8Hz, 1H), 0.73(dd, J=8.0, 4.3Hz, 1H)。ESI-MS m/z=425.33(M+1)⁺。

[0862] 化合物34:N-((1s,4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)氧杂环丁烷-3-甲酰胺的制备



[0864] 在氮气下在室温将1-羟基苯并三唑一水合物(18mg, 0.133mmol)、3-(乙基亚氨基亚甲基氨基)-N,N-二甲基-丙烷-1-胺(盐酸(1)(38mg, 0.198mmol)和氧杂环丁烷-3-甲酸(13mg, 0.127mmol)和三乙胺(15 μ L, 0.1076mmol)组合在DMF(1mL)中并搅拌40min。加入4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己胺(27mg, 0.0822mmol), 并将反应物搅拌过夜。加入饱和碳酸氢钠, 并用EtOAc (2 $\times$) 萃取。将合并的有机层用水(2 $\times$)、盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 并在减压下浓缩。将得到的残余物使用0-10%甲醇/DCM梯度通过在4g硅胶上的色谱法纯化, 以得到N-((1s, 4s)-4-((7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基)环己基)氧杂环丁烷-3-甲酰胺(4mg, 11%收率)。¹H NMR (300MHz, CDC13) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (d, J=2.2Hz, 1H), 6.79 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.57 (d, J=2.1Hz, 1H), 5.51 (d, J=8.1Hz, 1H), 4.95-4.72 (m, 5H), 4.10-3.84 (m, 5H), 3.70 (tt, J=8.3, 6.7Hz, 1H), 3.39 (dd, J=5.8, 4.0Hz, 5H), 2.30-2.15 (m, 3H), 1.98-1.58 (m, 4H)。ESI-MS m/z=413.46(M+1)⁺。

[0865] 化合物36:N-[4-(2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-嘧啶-4-胺的制备



[0867] 试剂和条件: (a)NH₃, 90 $^{\circ}$ C, 22h; (b)AcCl, DIEA, DCM; (c)NH₃, EtOH; (d)NaH, PMB-OH, DMF; (e)吗啉, DIEA, iPrOH; (f)TFA, DCM; (g)甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯, CsCO₃, DMF

[0868] 步骤a

[0869] 在密封的耐压瓶中将1-(2,4,6-三氟苯基)乙酮(7g, 40.2mmol)和铵(40g, 665mmol, 30%w/w)的混合物在90 $^{\circ}$ C搅拌22h。冷却至室温以后, 将混合物用DCM萃取, 经

Na₂SO₄干燥,浓缩并通过120g硅胶柱纯化,用0-30%EtOAc/庚烷洗脱。这得到1-(2-氨基-4,6-二氟-苯基)乙酮(5.1g,74%)。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ6.66-6.27(m,2H),6.19-6.11(m,2H),2.59(dd,J=8.4,1.4Hz,3H)。

[0870] 步骤b

[0871] 在0℃向1-(2-氨基-4,6-二氟-苯基)乙酮(3.1g,18.1mmol)在DCM(30mL)中的溶液中加入DIEA(3.8mL,21.8mmol)和AcCl(2mL,28.1mmol)。将混合物搅拌1h并浓缩。将残余物用DCM稀释,用饱和NaHCO₃溶液洗涤并在真空中浓缩。将白色残余物用于下一步。这得到N-(2-乙酰基-3,5-二氟-苯基)乙酰胺(3.8g,17.8mmol,98.4%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ11.66(s,1H),8.39(ddd,J=11.7,2.6,1.6Hz,1H),6.60(ddd,J=12.2,8.2,2.6Hz,1H),2.67(d,J=8.5Hz,3H),2.24(s,3H)。

[0872] 步骤c

[0873] 将N-(2-乙酰基-3,5-二氟-苯基)乙酰胺(1.7g,8mmol)和2M NH₃在EtOH(80mL 2M,160mmol)中的混合物在90℃搅拌18h。将混合物在真空中浓缩并通过40g硅胶柱用0-30%EtOAc/己烷(hex)纯化。这得到5,7-二氟-2,4-二甲基-喹唑啉(1.2g,77%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.40(ddt,J=9.3,2.3,1.2Hz,1H),7.03(ddd,J=11.2,8.9,2.4Hz,1H),3.01(dd,J=6.0,0.9Hz,3H),2.83(s,3H)。

[0874] 步骤d

[0875] 向(4-甲氧基苯基)甲醇(270μL,2.0mmol)在DMF(5mL)中的溶液中加入NaH(110mg,2.75mmol),并将得到的混合物搅拌10min。向混合物中加入5,7-二氟-2,4-二甲基-喹唑啉(350mg,1.8mmol)在DMF(5mL)中的溶液,并继续搅拌另外30min。将混合物用H₂O猝灭,用DCM萃取,经Na₂SO₄干燥,浓缩。将粗制物通过40g硅胶柱纯化,用0-40%EtOAc/庚烷的梯度洗脱,得到7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2,4-二甲基-喹唑啉(300mg,37%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.51-7.36(m,2H),7.17(dd,J=9.4,2.3Hz,1H),7.07-6.91(m,2H),6.76(dd,J=10.9,2.4Hz,1H),5.15(s,2H),3.87(s,3H),2.97(s,3H),2.81(s,3H)。

[0876] 步骤e

[0877] 将7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2,4-二甲基-喹唑啉(300mg,0.96mmol)、吗啉(300μL,3.4mmol)和DIEA(300μL,1.7mmol)在iPrOH(3mL)中的混合物在160℃微波加热20min。将混合物在180℃微波加热30min,并然后在190℃微波加热60min。将混合物浓缩,通过硅胶色谱法纯化,用0-70%EtOAc/庚烷的梯度洗脱,得到4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2,4-二甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(60mg,0.158mmol,16.5%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.49-7.37(m,2H),7.03-6.90(m,2H),6.77(d,J=2.3Hz,1H),6.58(d,J=2.3Hz,1H),5.11(s,2H),3.99-3.81(m,7H),3.46-3.32(m,4H),2.88(s,3H),2.73(s,3H)。ESI-MS m/z计算值379.1896,实测380.1(M+1)⁺;保留时间:0.6分钟。

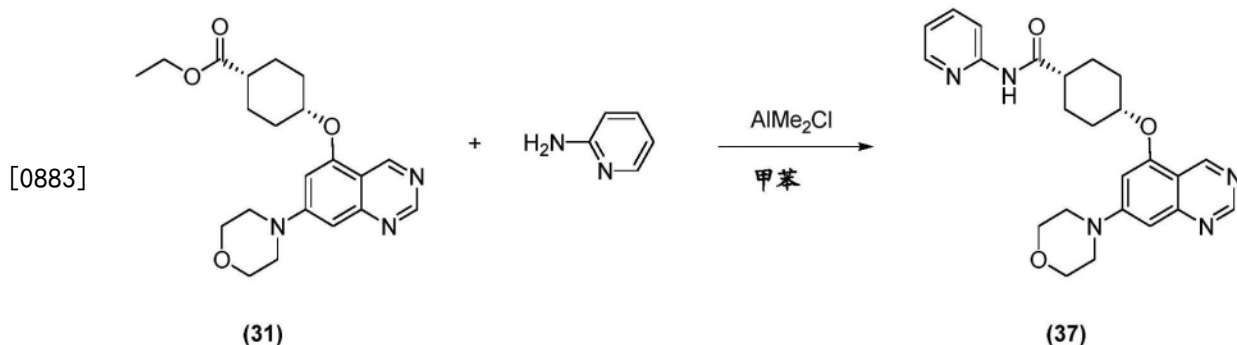
[0878] 步骤f

[0879] 向4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2,4-二甲基-喹唑啉-7-基]吗啉(60mg,0.16mmol)在DCM(10mL)中的溶液中加入TFA(1mL,13mmol),并将得到的溶液搅拌1h。将混合物浓缩并通过4g硅胶柱纯化,用0-5%MeOH/DCM洗脱,以得到2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(37mg,90%)。¹H NMR(300MHz,DMSO) δ6.69(s,2H),5.76(s,1H),3.74(t,J=4.9Hz,4H),3.36(s,4H),2.93(s,3H),2.58(s,3H)。

[0880] 步骤g

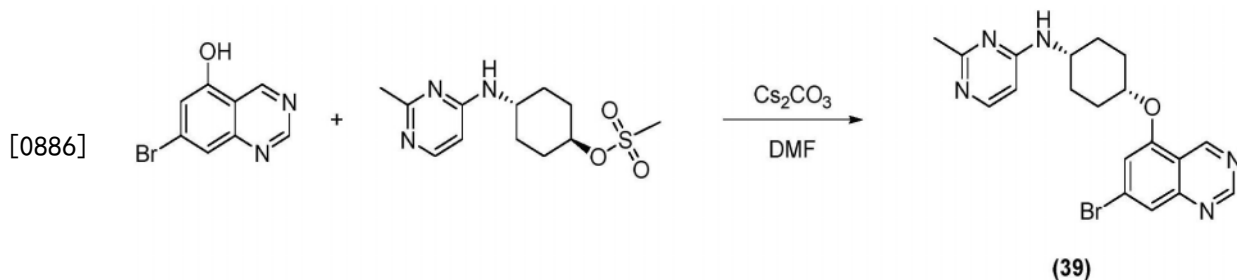
[0881] 将2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(34mg, 0.13mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(55mg, 0.19mmol)和碳酸铯(70mg, 0.21mmol)在DMF(1mL)中的混合物在90℃搅拌20h。将混合物用DCM稀释, 穿过硅藻土层过滤, 并浓缩。将粗制物通过硅胶色谱法纯化, 用0-10% MeOH/DCM洗脱, 得到N-[4-(2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-嘧啶-4-胺(6.1mg, 0.013mmol, 9.9%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.13(d, J=6.0Hz, 1H), 6.76(d, J=2.2Hz, 1H), 6.50(d, J=2.1Hz, 1H), 6.18(d, J=6.0Hz, 1H), 4.93(d, J=7.9Hz, 1H), 4.73(d, J=4.2Hz, 1H), 3.96-3.85(m, 4H), 3.42-3.28(m, 4H), 3.01(s, 3H), 2.73(s, 3H), 2.51(s, 3H), 2.32-2.19(m, 2H), 2.08-1.73(m, 9H)。ESI-MS m/z计算值448.25867, 实测449.32(M+1)⁺; 保留时间: 0.5分钟

[0882] 4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-N-(2-吡啶基)环己烷甲酰胺: 化合物37的制备



[0884] 在氮气下向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸乙酯(30mg, 0.078mmol: 化合物(30))和吡啶-2-胺(15mg, 0.16mmol)在甲苯(0.5mL)中的溶液中逐滴加入AlMe₂Cl(155 μL 1.0M, 0.155mmol)。完全加入以后, 将反应物加热至80℃保持30分钟。将反应物冷却至室温, 并在真空中浓缩。将残余物使用5-40% CH₃CN(0.1% TFA)在H₂O(0.1% TFA)中的溶液通过C18反相SiO₂柱上的MPLC纯化。将产物级分合并, 并用NaHCO₃(饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩以得到4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-N-(2-吡啶基)环己烷甲酰胺(21.8mg, 63.3%收率)。¹H-NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.49(s, 1H), 9.11(s, 1H), 8.28(d, J=7.7Hz, 2H), 8.16(s, 1H), 7.84-7.68(m, 1H), 7.15-7.02(m, 1H), 6.83(d, J=1.7Hz, 1H), 6.59(d, J=1.9Hz, 1H), 4.88-4.76(m, 1H), 4.05-3.81(m, 4H), 3.40(dd, J=14.8, 10.0Hz, 4H), 2.59-2.42(m, 1H), 2.42-2.25(m, 2H), 2.25-2.04(m, 2H), 2.04-1.71(m, 4H)。ESI-MS m/z计算值433.2114, 实测434.33(M+1)⁺。

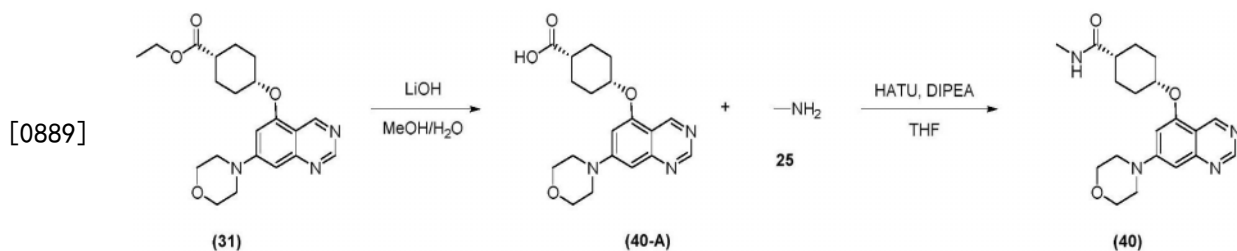
[0885] 化合物39:N-[4-(7-溴喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-嘧啶-4-胺的制备



[0887] 给配备磁力搅拌棒的微波瓶装入在DMF(0.5mL)中的7-溴喹唑啉-5-醇(31.3mg, 0.139mmol)、甲磺酸[4-[(2-甲基嘧啶-4-基)氨基]环己基]酯(120mg, 0.421mmol)和Cs₂CO₃

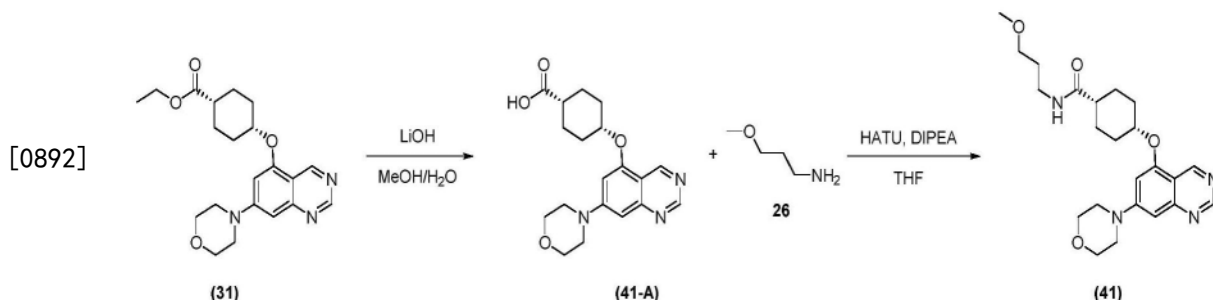
(136mg, 0.417mmol)。将瓶密封并在微波中在120℃加热10分钟。认为反应不完全, 所以将反应物在微波中在120℃加热10分钟, 并然后在140℃加热10分钟。将反应物过滤并在反相C18-衍生化的SiO₂柱上纯化。通过溶解在乙酸乙酯中并用饱和NaHCO₃水溶液洗涤, 将产物中和。分离各层, 并将水层用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩以得到N-[4-(7-溴喹唑啉-5-基)氧基环己基]-2-甲基-嘧啶-4-胺(19.3mg, 32.4%收率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.72 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.12 (d, J=6.1Hz, 1H), 7.81 (d, J=0.7Hz, 1H), 7.08 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.22 (d, J=6.0Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.90-4.75 (m, 1H), 3.90 (s, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.36-2.18 (m, 2H), 2.14-1.59 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值413.0851, 实测414.17 (M+1)⁺。

[0888] 化合物40:N-甲基-4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-环己烷甲酰胺的制备



[0890] 向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸盐(46.4mg, 0.118mmol)、甲基胺(100μL 2M, 0.200mmol)和HATU(55mg, 0.14mmol)在THF(1mL)和DMF(1mL)中的溶液中加入DIPEA(95μL, 0.55mmol)。将反应物在室温搅拌1小时。将反应物在真空中浓缩并将残余物通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)纯化。将有关级分脱水并用NaHCO₃(饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经MgSO₄干燥, 过滤, 并浓缩以得到N-甲基-4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-环己烷甲酰胺(30mg, 63%收率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.47 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.83 (d, J=1.7Hz, 1H), 6.57 (d, J=1.9Hz, 1H), 5.67-5.49 (m, 1H), 4.83-4.75 (m, 1H), 3.95-3.85 (m, 4H), 3.48-3.36 (m, 4H), 2.87 (d, J=4.8Hz, 3H), 2.38-2.24 (m, 3H), 2.11-1.84 (m, 4H), 1.83-1.67 (m, 2H)。ESI-MS m/z 计算值370.2005, 实测371.38 (M+1)⁺。

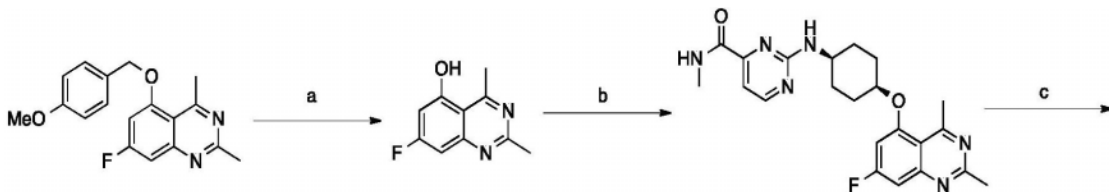
[0891] 化合物41:N-(3-甲氧基丙基)-4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-环己烷甲酰胺的制备



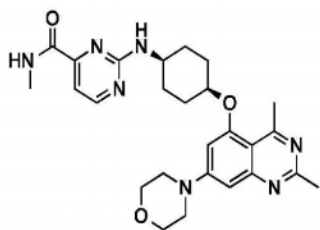
[0893] 向4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基环己烷甲酸盐(46mg, 0.13mmol)、3-甲氧基丙烷-1-胺(13mg, 0.15mmol)和HATU(55mg, 0.14mmol)在THF(1mL)中的溶液中加入DIPEA(95μL, 0.55mmol)。将反应物在室温搅拌1小时。将反应物在真空中浓缩并将残余物使用5-50% CH₃CN(0.1% TFA)在H₂O(0.1% TFA)中的溶液通过C18反相SiO₂柱上的MPLC纯化。将产物级分合并, 并用NaHCO₃(饱和)中和并然后用EtOAc萃取。将有机萃取物合并, 并用盐水洗涤, 经

MgSO₄干燥,过滤,并浓缩以得到N-(3-甲氧基丙基)-4-(7-吗啉代喹唑啉-5-基)氧基-环己烷甲酰胺(39.4mg,69.3%收率)。¹H-NMR(300MHz,CDCl₃) δ9.47(s,1H),9.10(s,1H),6.81(d,J=1.7Hz,1H),6.57(d,J=1.9Hz,1H),6.38-6.21(m,1H),4.83-4.72(m,1H),3.98-3.84(m,4H),3.53(t,J=5.6Hz,2H),3.49-3.29(m,9H),2.40-2.19(m,3H),2.12-1.63(m,8H)。ESI-MS m/z计算值428.24237。

[0894] 化合物42:2-[[4-(2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺的制备:



[0895]



[0896] 试剂和条件:(a) TFA,DCM;(b) 甲磺酸[4-[[4-(甲基氨甲酰基)-嘧啶-2-基]氨基]环己基]酯,CsCO₃,DMF;(c) 吗啉,DIEA,iPrOH

[0897] 步骤a

[0898] 向7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-2,4-二甲基-喹唑啉(130mg,0.41mmol)在DCM(1mL)中的溶液中加入TFA(0.5mL,6.5mmol)并继续在室温搅拌1h。将混合物浓缩并在12g硅胶柱上纯化,用0-4%MeOH/DCM洗脱,以得到7-氟-2,4-二甲基-喹唑啉-5-醇(70mg,87%)¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ7.00(ddd,J=28.8,9.8,2.4Hz,2H),3.17(s,3H),2.87(s,3H)。

[0899] 步骤b

[0900] 将7-氟-2,4-二甲基-喹唑啉-5-醇(45mg,0.23mmol)、甲磺酸[4-[[4-(甲基氨甲酰基)-嘧啶-2-基]氨基]环己基]酯(120mg,0.36mmol)和碳酸铯(200mg,0.61mmol)在DMF(1mL)中的混合物在90℃搅拌20h。将混合物用DCM稀释,穿过硅藻土层过滤,浓缩并使用0-5%MeOH/DCM通过4g硅胶柱纯化,以得到2-[[4-(7-氟-2,4-二甲基-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(10mg,10%)。ESI-MS m/z计算值424.2,实测425.3(M+1)⁺;保留时间:0.55分钟。

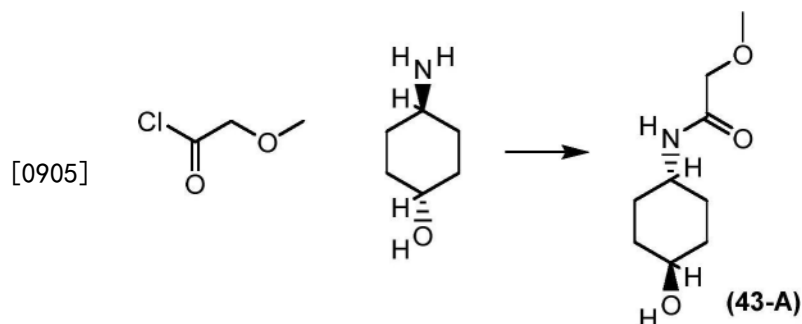
[0901] 步骤c

[0902] 将2-[[4-(7-氟-2,4-二甲基-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(10mg,0.023mmol)、吗啉(200μL,2.3mmol)和DIEA(400μL,2.3mmol)在iPrOH(0.5mL)中的混合物在90℃搅拌3天。将混合物浓缩并通过C18制备型HPLC(含有TFA调节剂的水/乙腈)纯化。将有关级分脱水,并将残余物穿过PL-HCO₃ MP SPE以得到2-[[4-(2,4-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(3.2mg,25%)。¹H NMR(300MHz,CDCl₃) δ8.52(d,J=4.9Hz,1H),7.78(s,1H),7.36(d,J=4.9Hz,1H),6.78(d,J=

2.2Hz, 1H), 6.55-6.47 (m, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.15-4.00 (m, 0H), 3.90 (dd, J=6.0, 3.8Hz, 4H), 3.43-3.32 (m, 4H), 3.11-2.98 (m, 6H), 2.80 (s, 0H), 2.33-2.18 (m, 2H), 2.13-1.77 (m, 6H)。ESI-MS m/z 计算值491.2645, 实测492.3 (M+1)⁺; 保留时间: 0.54分钟。

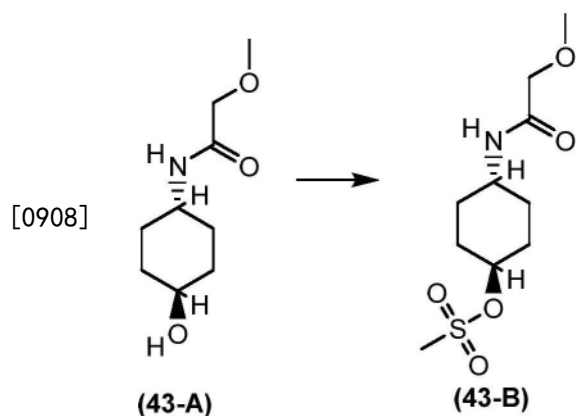
[0903] 化合物43: 2-甲氧基-N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]乙酰胺的制备

[0904] 化合物(43-A)的制备



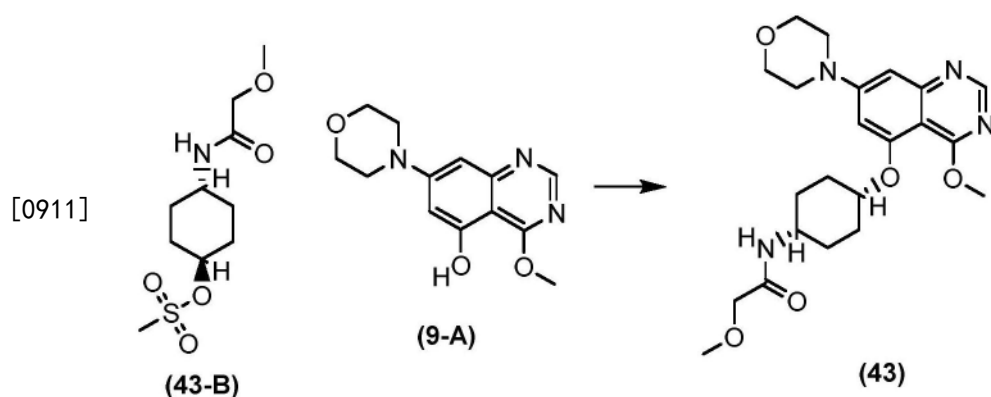
[0906] 向4-氨基环己烷-1-醇(5.01g, 42.19mmol)在DCM(50mL)中的0℃溶液中加入DIEA(14.7mL, 84.39mmol), 随后逐滴加入2-甲氧基乙酰氯(4.4mL, 47.31mmol)。将反应物搅拌5min, 然后除去冰浴, 并将反应物在室温搅拌过夜。然后将反应混合物转移至分液漏斗, 将有机层用1N HCl洗涤, 将水层用EtOAc萃取, 将有机层合并, 经Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩为淡棕色固体, 以得到2.4g粗产物。将该粗产物溶解在DCM中并注射到80g ISCO柱上, ELSD检测器, 0-7% MeOH/DCM。将期望的级分合并, 并在真空下浓缩, 以得到N-(4-羟基环己基)-2-甲氧基-乙酰胺(800mg)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ6.32 (s, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.79 (ddd, J=11.7, 8.1, 3.9Hz, 1H), 3.62 (tt, J=10.5, 3.9Hz, 1H), 3.41 (d, J=0.6Hz, 3H), 2.00 (dtd, J=11.8, 7.7, 7.1, 3.5Hz, 4H), 1.47-1.35 (m, 2H), 1.31-1.17 (m, 2H)。

[0907] 化合物(43-B)的制备



[0909] 向N-(4-羟基环己基)-2-甲氧基-乙酰胺(800mg, 4.144mmol)在DCM(9.467mL)中的溶液中加入DIEA(1.130g, 1.523mL, 8.744mmol)和MsCl(515.0mg, 348.0μL, 4.496mmol)。将混合物搅拌0.5h并用DCM稀释, 用H₂O洗涤, 经Na₂SO₄干燥, 穿过薄硅胶垫过滤, 将硅胶垫用DCM洗涤, 并浓缩。得到作为灰白色固体的甲磺酸[4-[(2-甲氧基乙酰基)氨基]环己基]酯(1.09g, 99.1%收率)。¹H NMR(300MHz, 氯仿-d) δ6.36 (d, J=8.1Hz, 1H), 4.65 (m, 1H), 3.87 (m, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 2.22-2.01 (m, 4H), 1.81-1.64 (m, 2H), 1.40-1.24 (m, 2H)。

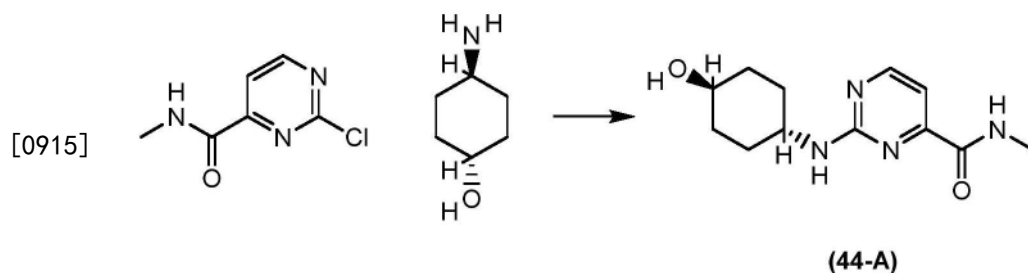
[0910] 化合物(43)的制备



[0912] 将甲磺酸[4-[(2-甲氧基乙酰基)氨基]环己基]酯(75mg, 0.2827mmol)、4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(三氟乙酸盐:化合物(9-A))(54mg, 50%纯度, 0.07194mmol)和 Cs_2CO_3 (251mg, 0.7704mmol)在DMF中的混合物密封在5mL微波管中并加热至100℃。从热取下并在室温搅拌过夜, 将反应混合物过滤, 浓缩, 并溶解于DCM中和注射到4g ISCO柱上, 用0-10%MeOH/DCM洗脱。将期望的级分收集, 合并, 并浓缩以得到22mg不纯的产物。将该物质溶解在MeOH中并在C18柱上纯化以得到24mg黄色油。将该物质溶解在DCM中并穿过Stratospheres碳酸盐柱以得到澄清溶液, 将其在真空下浓缩和在高真空下干燥过夜, 以得到2-甲氧基-N-[4-(4-甲氧基-7-吗啉代-喹唑啉-5-基)氧基环己基]乙酰胺(14mg, 43.8%收率)。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.48 (s, 1H), 7.54 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 6.78 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 6.68 (d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 3.75 (m, 5H), 3.35 (m, 4H), 3.30 (s, 3H), 2.01 (m, 2H), 1.84-1.53 (m, 6H)。

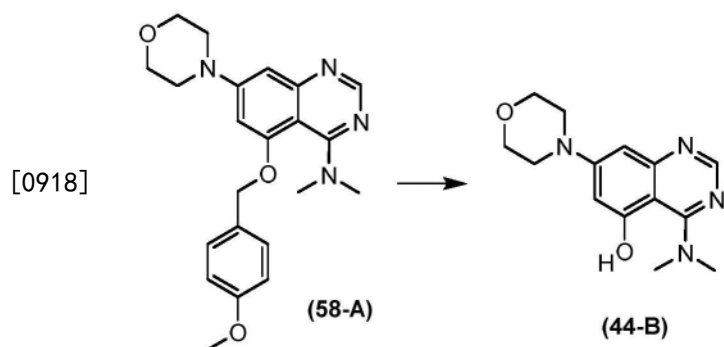
[0913] 化合物44: 2-[[4-[4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-基]氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺的制备

[0914] 2-[(4-羟基环己基)氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺: 化合物(44-A)的制备



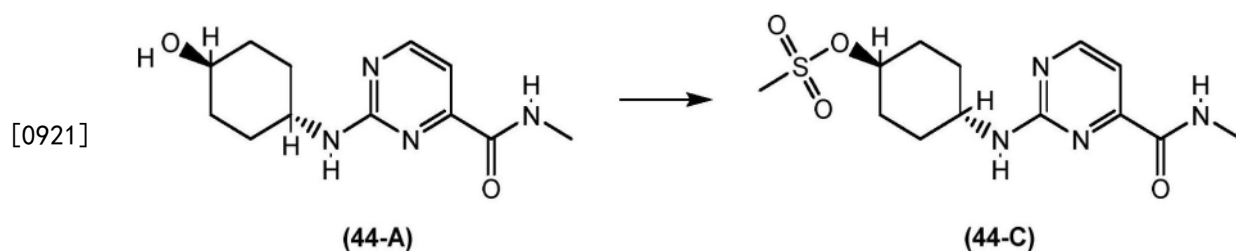
[0916] 将2-氯-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(4.5g, 26.23mmol)、4-氨基环己烷-1-醇(3g, 26.05mmol)在iPrOH(25.00mL)中的混合物加入DIEA(6mL, 34.45mmol)中并回流过夜, 然后浓缩以得到4.2g(96%) 2-[(4-羟基环己基)氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺。 ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.48 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.34 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 3.80 (dtt, $J=39.2, 9.9, 3.8\text{Hz}$, 2H), 3.51 (s, 1H), 3.03 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 3H), 2.29-02.00 (m, 4H), 1.65-1.22 (m, 4H)。

[0917] 4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇: 化合物(44-B)的制备



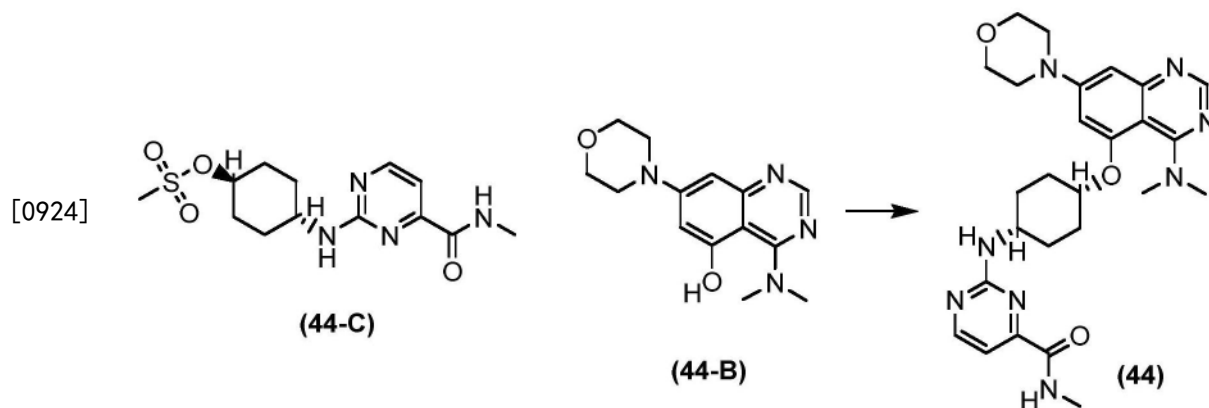
[0919] 将5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-N,N-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺(370mg, 0.8911mmol)在DCM(4.456mL)和TFA(5mL, 64.90mmol)中的溶液在50℃搅拌3h。然后将反应物浓缩至干燥,用饱和碳酸氢钠水溶液处理,并用EtOAc萃取3次。将合并的有机层浓缩至干燥,溶解在最小量EtOAc中并滴入庚烷中。将得到的褐色沉淀物过滤并干燥以得到作为褐色固体的4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇(240mg, 0.8749mmol, 98.20%),将其不经进一步纯化地使用。ESI-MS m/z 计算值274.14297,实测275.0(M+1)⁺;保留时间:0.55分钟。

[0920] 甲磺酸[4-[[4-(甲基氨甲酰基)嘧啶-2-基]氨基]环己基]酯:化合物(44-C)的制备



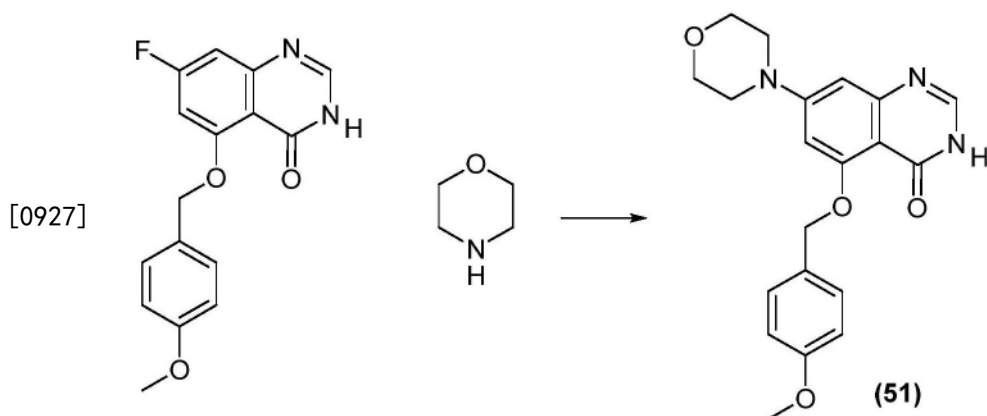
[0922] 将2-[(4-羟基环己基)氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺(4.3g, 17.18mmol)在DCM(50mL)中的溶液加入DIEA(15mL, 86.12mmol)和MsCl(2.8mL, 36.18mmol)。将溶液搅拌3h,然后浓缩,并用0-100%EtOAc/己烷(hex)从80g硅胶柱纯化,以得到甲磺酸[4-[[4-(甲基氨甲酰基)嘧啶-2-基]氨基]环己基]酯(5.2g, 15.83mmol, 92.17%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.49(d, J=4.9Hz, 1H), 7.73(s, 1H), 7.36(d, J=4.9Hz, 1H), 5.15(s, 1H), 4.73(tt, J=10.3, 3.8Hz, 1H), 3.92(dtd, J=10.7, 7.5, 3.7Hz, 1H), 3.11-2.98(m, 6H), 2.23(dq, J=12.7, 3.1, 2.5Hz, 4H), 1.92-1.63(m, 4H)。

[0923] 2-[[4-[4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-基]氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺:化合物(44)的制备



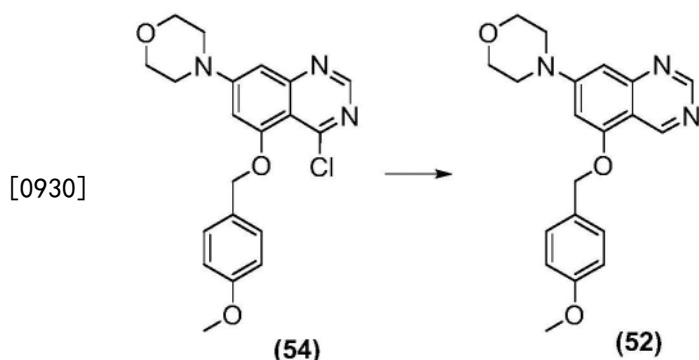
[0925] 将在DMF (1.367mL) 中的4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-醇 (75mg, 0.2734mmol)、甲磺酸[4-[[4-(甲基氨甲酰基)嘧啶-2-基]氨基]环己基]酯 (125.7mg, 0.3828mmol) 和碳酸铯 (267.2mg, 0.8202mmol) 在密闭试管中在100℃搅拌过夜。加入另外0.7当量的甲磺酸酯和在100℃搅拌另外3h。然后将反应物用水稀释和用EtOAc萃取3次。将合并的有机层浓缩至干燥并通过快速色谱法纯化,用0-20% MeOH在DCM中的溶液洗脱。将纯级分合并,浓缩,和低压冻干,以得到2-[[4-[[4-(二甲基氨基)-7-吗啉代-喹唑啉-5-基]氧基环己基]氨基]-N-甲基-嘧啶-4-甲酰胺 (19.7mg, 0.03694mmol, 13.51%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ8.49 (d, J=4.9Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.76 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.34 (d, J=4.9Hz, 1H), 6.78 (d, J=2.3Hz, 1H), 6.54 (d, J=2.3Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.06-3.78 (m, 5H), 3.31 (dd, J=14.5, 9.7Hz, 4H), 3.15 (s, 6H), 3.02 (d, J=5.1Hz, 3H), 2.12-2.00 (m, 2H), 1.81 (dd, J=30.2, 11.2Hz, 6H)。ESI-MS m/z 计算值506.2754, 实测507.0 (M+1)⁺; 保留时间: 0.64分钟。

[0926] 化合物51: 5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮的制备



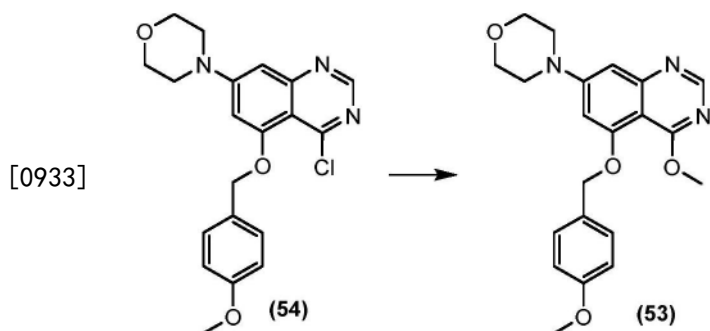
[0928] 向7-溴-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮 (1.38g, 3.821mmol)、叔丁醇盐(钠离子(1)) (1.11g, 11.55mmol)、Pd(OAc)₂ (43mg, 0.1915mmol) 和RuPhos (176mg, 0.3772mmol) 的混合物中加入吗啉 (467μL, 5.355mmol) 在1,4-二噁烷 (16.8mL) 中的溶液 (先加入14mL, 然后加入另外2.8mL, 因为混合物没有搅拌均匀)。将得到的混合物在100℃加热过夜。将混合物冷却至室温, 并在DCM和饱和NH₄Cl水溶液之间分配。分离各层, 并将水和漂浮的固体用DCM洗涤。将有机层合并, 并将水层过滤。将所有有机层合并和经Na₂SO₄干燥, 过滤, 并浓缩以得到1.3g产物。将该物质溶解在DCM和MeOH中并通过快速柱色谱法 (用DCM平衡过的40克柱, 用MeOH/DCM 0-10% 历时20min洗脱) 纯化以得到240mg白色固体。将来自过滤器和水层的固体物质溶解在MeOH/DCM中, 合并和浓缩, 再溶解在DCM/MeOH混合物中, 并加入14g硅藻土。将该混合物浓缩至接近干燥, 干燥加载到40g ISCO柱上, 并如上洗脱以得到作为白色固体的产物 (370mg)。将来自该柱的第一级分浓缩, 以得到作为灰白色固体的另外产物 (480mg)。将纯物质合并, 以得到1.1克5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ11.45 (s, 1H), 7.83 (d, J=3.1Hz, 1H), 7.57-7.45 (m, 2H), 6.99-6.87 (m, 2H), 6.60 (dd, J=39.0, 2.3Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 3.75 (m, 7H), 3.31 (m, 4H)。

[0929] 化合物52: 4-[5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备



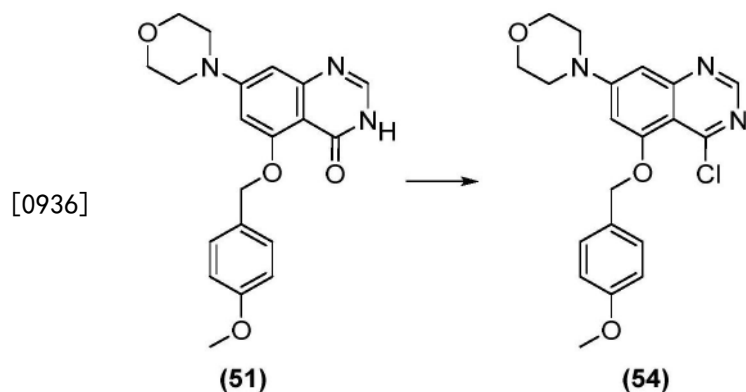
[0931] 向4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(8.0g, 20.73mmol)在 CH_2Cl_2 (470mL)中的溶液中加入NaCl(360mL)。将得到的两相混合物加热至回流(55℃铝珠子浴),并加入 NH_4OH (100mL 30% w/v, 856.0mmol)和锌(45.0g, 688.0mmol)。继续加热2.5h。将混合物穿过硅藻土过滤,并将滤垫用 CH_2Cl_2 和 H_2O 洗涤。将滤液分离进水层和有机层。将水层用 CH_2Cl_2 (2×)进一步萃取,用盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤,并浓缩。将粗残余物干燥加载到硅藻土上并通过硅胶色谱法(220g Isco柱,线性梯度0%→10%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到4-[5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(3.96g, 10.14mmol, 48.92%), ~90-95%纯。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 9.42(s, 1H), 9.09(s, 1H), 7.41(d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H), 7.01-6.92(m, 2H), 6.79(d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.64(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 5.16(s, 2H), 3.95-3.86(m, 4H), 3.84(s, 3H), 3.44-3.31(m, 4H)。ESI-MS m/z 计算值351.1583, 实测352.39($\text{M}+1$) $^+$; 保留时间: 0.63分钟。

[0932] 4-[4-甲氧基-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉: 化合物53的制备



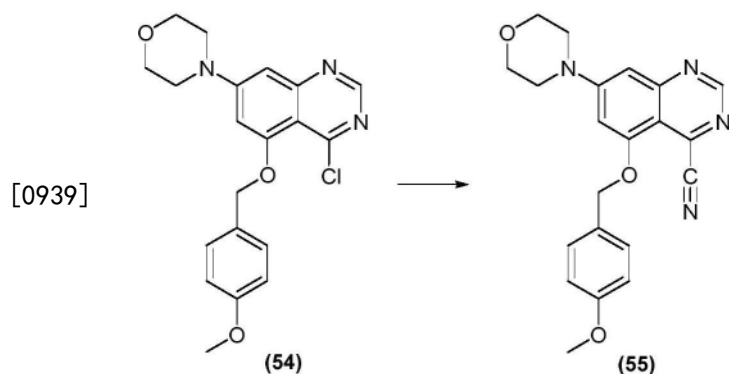
[0934] 将4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(450mg, 1.166mmol)、甲醇(0.236mL, 5.826mmol)、 K_2CO_3 (322mg, 2.330mmol)和DMF(5.0mL)组合在微波容器中并在微波中加热至150℃保持30分钟,导致部分转化,如LCMS所揭示的。再次在微波中加热至175℃保持1h。将反应混合物穿过玻璃料过滤,并将溶剂蒸发。将粗残余物通过硅胶色谱法(12g Isco金柱,线性梯度0%→10%MeOH/ CH_2Cl_2)纯化以得到4-[4-甲氧基-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(206mg, 0.5347mmol, 45.86%)。 ^1H NMR(300MHz, 氯仿- d) δ 8.61(s, 1H), 7.55-7.43(m, 2H), 7.04-6.93(m, 2H), 6.84(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.61(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 5.16(s, 2H), 4.13(s, 3H), 3.95-3.88(m, 4H), 3.86(s, 3H), 3.42-3.30(m, 4H).. ^1H ESI-MS m/z 计算值381.16885, 实测382.32($\text{M}+1$) $^+$; 保留时间: 0.65分钟。

[0935] 化合物54: 4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备



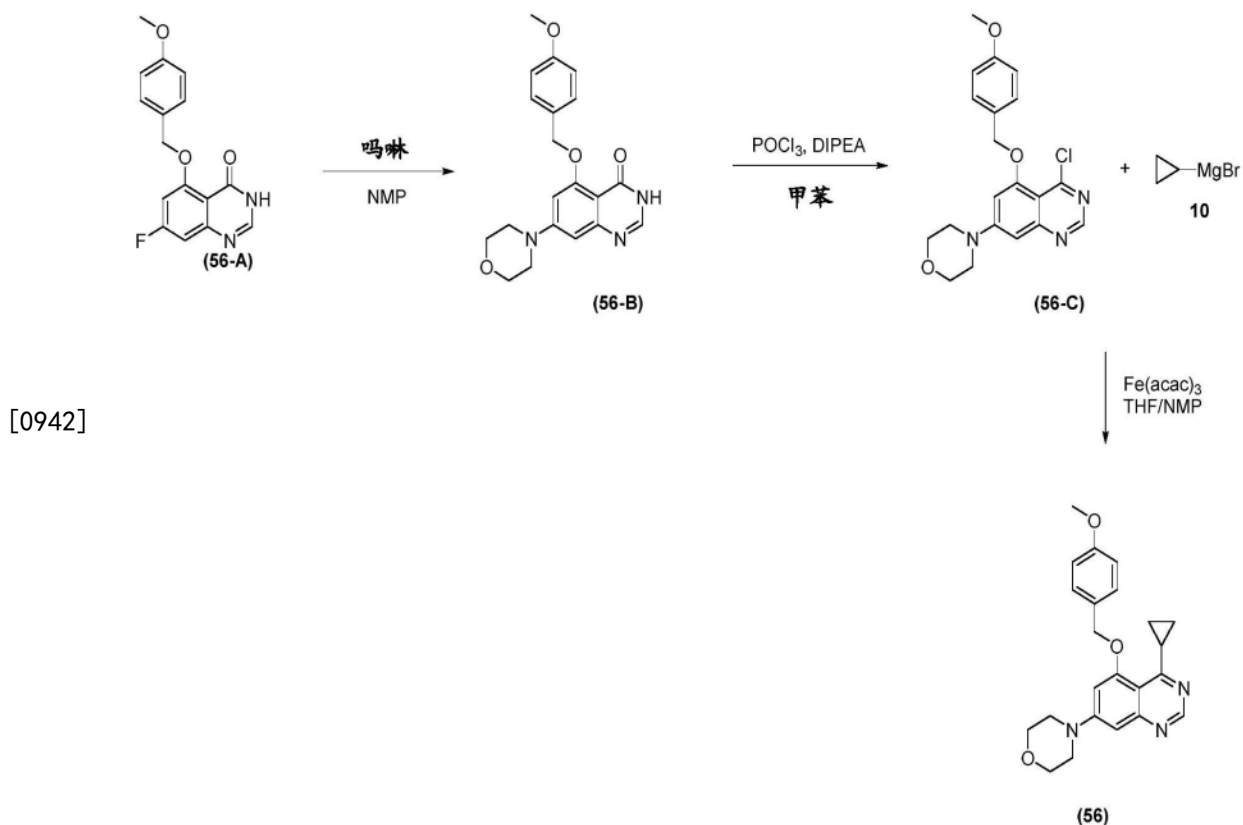
[0937] 向5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮(化合物(51):18.60g, 47.08mmol)在甲苯(250mL)中的悬浮液中加入N,N-二异丙基乙胺(41.00mL,235.4mmol),随后加入POCl₃(17.55mL,188.3mmol)。将反应物在80℃加热3小时。将反应物用CH₂Cl₂稀释和倒入饱和NaHCO₃水溶液中。分离各层,并将水层用CH₂Cl₂进一步萃取。将合并的有机层干燥(Na₂SO₄),过滤,并浓缩成橙色无定形固体。将粗残余物干燥加载到硅藻土上并通过硅胶色谱法(40g Isco金柱,线性梯度0%→15%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到4-[4-氯-5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(11.977g,31.04mmol,65.92%)。1H NMR(300MHz,氯仿-d) δ8.71(s,1H),7.51-7.40(m,2H),7.01-6.89(m,2H),6.84(d,J=2.4Hz,1H),6.66(d,J=2.4Hz,1H),5.16(s,2H),3.93-3.85(m,4H),3.83(s,3H),3.43-3.34(m,4H)。ESI-MS m/z计算值385.11932,实测386.32(M+1)+;保留时间:0.77分钟。

[0938] 化合物55:5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈的制备



[0940] 将4-[4-氯-5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(400mg,1.037mmol)、KCN(204mg,3.133mmol)、对甲苯磺酸钠(132mg,0.6798mmol)和DMF(7.2mL)的混合物密封并加热至80℃保持16h。将反应混合物在H₂O和CH₂Cl₂之间分配。分离各层,并将水层用CH₂Cl₂(2×20mL)进一步萃取。将合并的有机层用水洗涤2次和用盐水洗涤1次,干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法(12g Isco金柱,线性梯度0%→10%MeOH/CH₂Cl₂)纯化以得到5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-喹唑啉-4-甲腈(263.5mg,0.7000mmol,67.51%)。在热/真空下干燥以除去残余的DMF。1H NMR(300MHz,氯仿-d) δ9.08(s,1H),7.53-7.43(m,2H),6.98-6.91(m,2H),6.81(d,J=2.3Hz,1H),6.69(d,J=2.3Hz,1H),5.29(s,2H),3.95-3.85(m,4H),3.82(s,3H),3.48-3.36(m,4H)。ESI-MS m/z计算值376.15353,实测377.32(M+1)+;保留时间:0.81分钟。

[0941] 化合物56:4-[4-环丙基-5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉的制备



[0943] 化合物 (56-B) 的制备

[0944] 将7-氟-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮(5.63g, 18.8mmol)和吗啉(33mL, 380mmol)在无水NMP(60mL)中的溶液加热至120℃过夜。将反应物冷却至室温,并用水稀释。将沉淀物过滤和在真空下在55℃干燥以得到5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮(3.26g, 47.3%收率)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 11.46 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.51 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.95 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H), 6.60 (dd, $J=29.8, 2.1\text{Hz}$, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.90-3.58 (m, 7H), 3.31 (s, 4H)。

[0945] 化合物 (56-C) 的制备

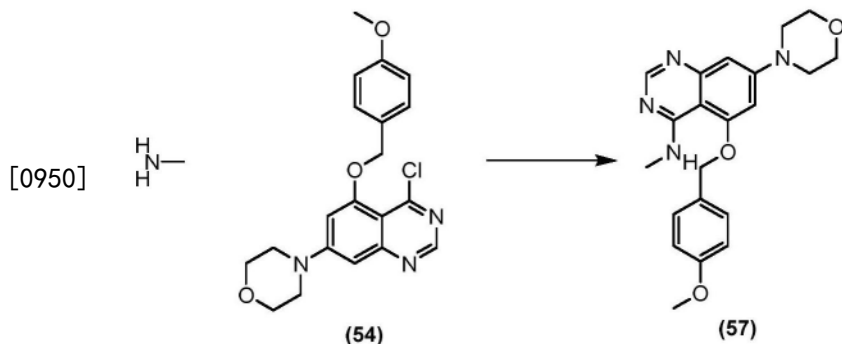
[0946] 向5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]-7-吗啉代-3H-喹唑啉-4-酮(2.0g, 5.4mmol)在甲苯(25mL)中的悬浮液中加入DIPEA(5.69mL, 32.7mmol), 随后加入 POCl_3 (2.54mL, 27.3mmol)。将反应物加热至80℃保持3.5小时。将反应物冷却至室温,用水稀释,并用EtOAc/DCM萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩。将残余物使用EtOAc和庚烷类通过快速色谱法纯化,以得到4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(1.46g, 69.5%收率)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.73 (s, 1H), 7.52-7.41 (m, 2H), 7.04-6.91 (m, 2H), 6.87 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.68 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.68 (d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.98-3.87 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 3.48-3.35 (m, 4H)。

[0947] 化合物 (56) 的制备

[0948] 在氮气下向4-[4-氯-5-[(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(200mg, 0.520mmol)和 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (55mg, 0.16mmol)在THF(5mL)和NMP(0.25mL)中的混合物中逐滴加入(环丙基)溴化镁(1.20mL 0.5M, 0.6000mmol)。将反应物在室温搅拌过夜。认为反应不完全并逐滴加入1mL(环丙基)溴化镁,并继续在室温搅拌5.5小时。将反应物倒入含有冰冷的

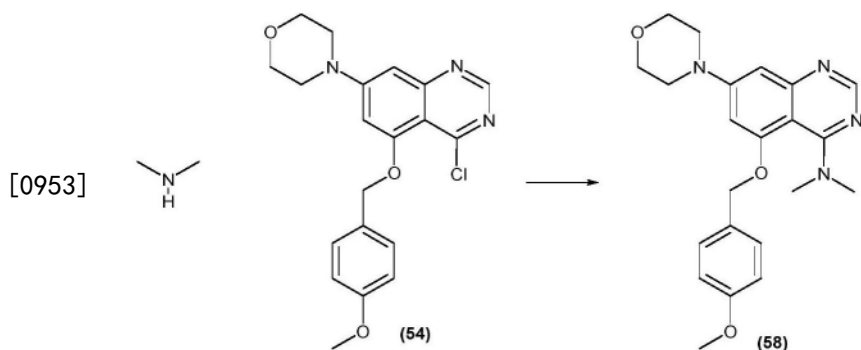
NH_4Cl 的分液漏斗,并用EtOAc萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩。将残余物使用EtOAc和庚烷类通过快速色谱法纯化以得到4-[4-环丙基-5-[4-甲氧基苯基]甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(176mg,84.8%收率)。 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 8.79(s,1H),7.48-7.35(m,2H),7.00-6.88(m,2H),6.83(d, $J=2.3\text{Hz}$,1H),6.65(d, $J=2.3\text{Hz}$,1H),5.15(s,2H),3.93-3.85(m,4H),3.84(s,3H),3.48-3.28(m,5H),1.35-1.22(m,2H),0.99-0.86(m,2H)。ESI-MS m/z 计算值391.1896,实测392.25($\text{M}+1$) $^+$ 。

[0949] 化合物57:5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-N-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺的制备



[0951] 向4-[4-氯-5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(500mg,1.296mmol)在1,4-二噁烷(6.480mL)中的溶液中加入甲基胺(3.240mL 2M,6.480mmol)在THF中的溶液。将反应物在60℃加热15分钟。将反应物用水稀释,并用EtOAc(3×)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,浓缩至干燥,溶解在最小量EtOAc中,并在剧烈搅拌下滴入冷庚烷类中。将得到的浅橙色沉淀物过滤和在真空下在50℃干燥过夜以得到5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-N-甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺(378mg,0.9638mmol,74.36%)。 $^1\text{H NMR}$ (300MHz,DMSO) δ 8.22(s,1H),7.88(t, $J=4.6\text{Hz}$,1H),7.48(dd, $J=9.1,2.4\text{Hz}$,2H),7.02-6.93(m,2H),6.74(d, $J=2.2\text{Hz}$,1H),6.51(d, $J=2.1\text{Hz}$,1H),5.33(s,2H),3.77-3.71(m,7H),3.28-3.18(m,4H),2.92(d, $J=4.7\text{Hz}$,3H)。ESI-MS m/z 计算值380.18484,实测381.0($\text{M}+1$) $^+$;保留时间:0.73分钟。

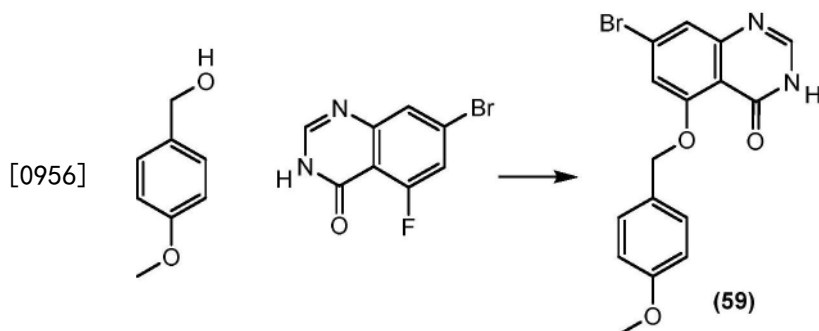
[0952] 化合物58:5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]-N,N-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺的制备



[0954] 将4-[4-氯-5-[4-(4-甲氧基苯基)甲氧基]喹唑啉-7-基]吗啉(500mg,1.296mmol)、二甲胺(盐酸(1)) (528.4mg,563.3 μL ,6.480mmol)和三乙胺(1.311g,1.806mL,12.96mmol)在1,4-二噁烷(6.480mL)中在60℃搅拌2h。将反应混合物用水稀释并用EtOAc萃取3次。将合并的有机层浓缩至干燥,溶解在最小量EtOAc中,并在剧烈搅拌下滴入冷庚烷中。将得到的褐色沉淀物过滤和在真空下在50℃干燥过夜,以得到384mg(71.4%)5-[4-(4-甲氧基苯基)

甲氧基]-N,N-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺,将其原样用于下一反应。5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-N,N-二甲基-7-吗啉代-喹唑啉-4-胺(384mg,0.9248mmol,71.36%) ¹H NMR (300MHz,DMSO) δ 8.21(s,1H),7.42(t,J=5.7Hz,2H),7.05-6.94(m,2H),6.79(d,J=2.2Hz,1H),6.57(d,J=2.1Hz,1H),5.14(s,2H),3.79-3.73(m,7H),3.35-3.31(m,4H),2.91(s,6H)。ESI-MS m/z计算值394.2005,实测395.0(M+1)⁺;保留时间:0.74分钟。

[0955] 7-溴-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮:化合物59的制备



[0957] 向(4-甲氧基苯基) 甲醇(31.1g,225.1mmol)在DMF(279.9mL)中的溶液中加入NaH(9.31g,232.8mmol)。将得到的混合物在室温搅拌1h。加入7-溴-5-氟-3H-喹唑啉-4-酮(27.33g,112.5mmol),并继续搅拌另外2h。通过加入水(600mL)猝灭,然后加入AcOH以实现固体的沉淀。将固体通过真空过滤进行收集,用水、然后用Et₂O洗涤。将固体在高真空下干燥过夜,得到7-溴-5-[(4-甲氧基苯基) 甲氧基]-3H-喹唑啉-4-酮(34.32g,80.2%)。 ¹H NMR (300MHz,DMSO-d₆) δ 12.07(s,1H),8.02(s,1H),7.55-7.42(m,2H),7.37(d,J=1.8Hz,1H),7.28(d,J=1.9Hz,1H),7.03-6.90(m,2H),5.20(s,2H),3.76(s,3H)

[0958] 实施例2:本发明的化合物的生物学测定

[0959] A.DNA-PK抑制测定法

[0960] 使用标准的放射测定法对化合物抑制DNA-PK激酶的能力进行了筛选。简而言之,在该激酶测定法中,考察了³³P-ATP中的末端³³P-磷酸(phosphate)向肽底物的转移。该测定法在384孔板中进行,最终体积为每孔50 μ L,含有大约6nM DNA-PK、50mM HEPES(pH 7.5)、10mM MgCl₂、25mM NaCl、0.01%BSA、1mM DTT、10 μ g/mL剪切的双链DNA(得自Sigma)、0.8mg/mL DNA-PK肽(Glu-Pro-Pro-Leu-Ser-Gln-Glu-Ala-Phe-Ala-Asp-Leu-Trp-Lys-Lys-Lys,得自American Peptide)和100 μ M ATP。因此,将本发明的化合物溶解于DMSO中以制备10mM初始储备溶液。然后在DMSO中进行系列稀释以获得最终溶液供测定。将DMSO或DMSO中的抑制剂的0.75 μ L等分试样添加至每孔,随后加入含有³³P-ATP(得自Perkin Elmer)的ATP底物溶液。通过添加DNA-PK、肽和ds-DNA来开始反应。45分钟后,用25 μ L的5%磷酸猝灭该反应。将反应混合物转移至MultiScreen HTS 384-孔PH平板(得自Millipore),让其结合一小时,并用1%磷酸洗涤三次。添加50 μ L Ultima GoldTM高效闪烁剂(得自Perkin Elmer)后,将样品在Packard TopCount NXT微量培养板闪烁和发光计数器(Packard BioScience)中计数。使用Microsoft Excel Solver宏(macros)将数据拟合至竞争性紧密结合抑制的动力学模型来计算K_i值。在下面表1和2中,对于DNA-PK的抑制而言小于0.001微摩尔的K_i被指示为“A”;对于DNA-PK的抑制而言等于或大于0.001微摩尔且小于0.01微摩尔的K_i被指示为“B”;对于DNA-PK的抑制而言等于或大于0.01微摩尔且小于0.1微摩尔的K_i被指示为“C”;对于DNA-PK的抑制而言等于或大于0.1微摩尔且小于1微摩尔的K_i被指示为“D”;且等于或大于1

微摩尔的 K_i 被指示为“E”。

[0961] B.DNA-PK细胞测定法

[0962] DNA-PK被募集到DNA中的双链断裂(DSB)并被其激活,并且在非同源末端连接(NHEJ)修复机制中起关键作用。激活后,DNA-PK在Ser2056处经历快速的自磷酸化。响应于DNA DSB的pDNA-PK(Ser2056)的测量提供了一种细胞信号传送测定以评价潜在的DNA-PK激酶抑制剂。

[0963] 新制癌菌素(NCS)被用作放射模拟物来诱导DNA DSB。夹心ELISA使用了Meso Scale Discovery电化学发光技术平台,该平台通常提供比传统ELISA格式更大的灵敏度。内部验证已经证实,该测定能够实现pDNA-PK(Ser2056)的高特异性和定量测量。

[0964] 将A549(人NSCLC)细胞以25,000个细胞/孔铺板在黑色透明底部96孔板(Costar#3904)上的100uL DMEM(Invitrogen目录号11995-040)中,所述DMEM补充了1%青霉素/链霉素(Invitrogen目录号15070-063)和10%FBS(Hyclone目录号SH30071.03HI),使其在37°C在5%CO₂中粘附过夜。次日,通过在Corning聚丙烯V型底部深孔板(目录号3357)中每孔添加100uL DMEM生长培养基来制备化合物和NCS溶液。使用对数设置和16点滴定单峰,使用HP Compound Dilution D300仪器将化合物添加到适当的孔中。

[0965] 通过将NCS以200ng/mL(最终测定浓度,50ng/mL)添加到DMEM培养基中来制备DMEM NCS溶液。将100uL的DMEM/NCS溶液加入含有化合物的孔中。然后立即将100uL该溶液加给A549细胞。然后将细胞在37°C温育15分钟。

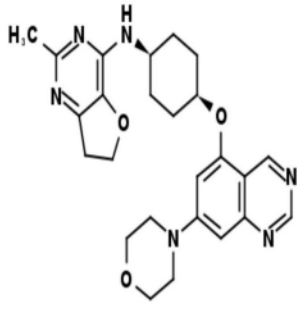
[0966] 通过将1%磷酸酶抑制剂(Sigma目录号P2850)和1%蛋白酶抑制剂(Sigma目录号P8340)添加到Lanthascreen细胞测定裂解缓冲液(Invitrogen目录号PV5598)中来制备完整的裂解缓冲液。通过轻拍并拍干,将板中的培养基除去。将60uL/孔的完整裂解缓冲液添加到每个孔中。然后将这些板在室温在裂解缓冲液中温育至少5分钟,以确保完全裂解。此时,可将裂解物转移至制备的ELISA板中。

[0967] 通过在摇动下在室温用150uL/孔的3%封闭剂A(Mesoscale目录号R93-BA)封闭Mesoscale山羊-抗-小鼠(GAM)平板1小时,制备准备的ELISA板。通过在1%封闭剂A中将小鼠单克隆抗-总DNA-PK(AbCAM目录号ab1832)稀释至3ug/mL,制备捕获抗体。将封闭的板用200uL D-PBS漂洗一次。将捕获抗体(25uL/孔)添加到每个孔中,并在摇动的同时在室温温育1小时。将其用200uL D-PBS漂洗一次,然后将来自细胞板的25uL制备的细胞裂解物添加至Mesoscale GAM ELISA板。然后将裂解物在板上在室温在摇动下温育1小时。在1%封闭剂A中以1/1000稀释度(至450ng/mL的终浓度)制备检测抗体(Epitomics兔抗-pS2056-DNA-PK)。将GAM板用200uL D-PBS洗涤1次,并然后将25uL/孔的检测抗体加入板中。在室温在摇动下温育1小时。通过将Sulfo-Tag山羊-抗-兔抗体(Mesoscale目录号R32AB-1)以1/500稀释度(1ug/mL)加入1%封闭剂A中,制备Sulfotag。将GAM板用200uL D-PBS洗涤,然后向每个孔中加入25uL Sulfotag制剂。一旦已经将平板与最终溶液Sulfotag一起温育1小时,就用200uL D-PBS洗涤它们1次。通过在ddH₂O中稀释4X缓冲液,制备1X读取缓冲液(Mesoscale目录号R32-TC)。将150uL 1X缓冲液添加到GAM板的每个孔中,然后在Sector Imager 2400上读取该板。相对于每种化合物的浓度绘制读数(电化学发光),并使用Prism软件(Macintosh的GraphPad Prism版本6.0e)生成IC₅₀。

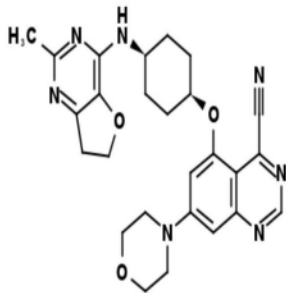
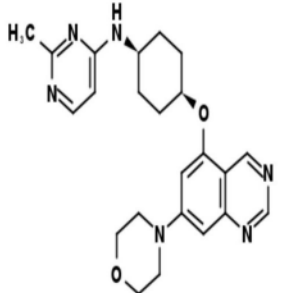
[0968] 在下面表1和2中,对于DNA-PK的抑制而言小于0.10微摩尔的IC₅₀被指示为“A”;对

于DNA-PK的抑制而言等于或大于0.10微摩尔且小于1.0微摩尔的 IC_{50} 被指示为“B”；且对于DNA-PK的抑制而言等于或大于1.0微摩尔的 IC_{50} 被指示为“C”。

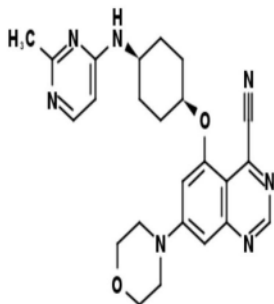
[0969] 表1:本发明的某些化合物的表征数据以及 K_i 和 IC_{50} 值

[0970] 化合物编号	分子	M+1	LCMS 保留时间 (方法)	NMR	$K_i(\mu M)$ DNA-PK	$IC_{50}(\mu M)$
[0971] 1		463.26	0.5 (A)	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.58 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.59 (t, J = 9.0 Hz, 2H), 4.52 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.24 - 4.11 (m, 1H), 3.94 - 3.83 (m, 4H), 3.42 - 3.31 (m, 4H), 3.19 (t, J = 9.0 Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.21 (d, J = 13.1 Hz, 2H), 1.99 (dd, J = 12.6, 3.6 Hz, 2H), 1.90 - 1.72 (m, 4H).	A	A

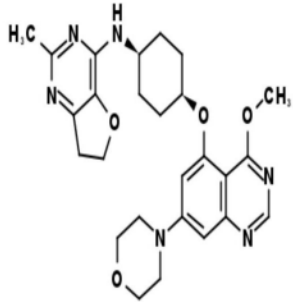
[0972]

2		488.3 4	0.63 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.08 (s, 1H), 6.83 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.84 (s, 1H), 4.64 (dd, J = 8.6, 4.2 Hz, 1H), 4.62 - 4.52 (m, 2H), 4.27 - 4.17 (m, 1H), 3.94 - 3.85 (m, 4H), 3.51 - 3.40 (m, 4H), 3.18 (t, J = 9.1 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.33 - 2.22 (m, 2H), 2.07 - 1.86 (m, 6H).	A	A
3		421.4 2	0.55 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.45 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.12 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.86 - 6.77 (m, 1H), 6.60 (d, J = 2.2	A	A

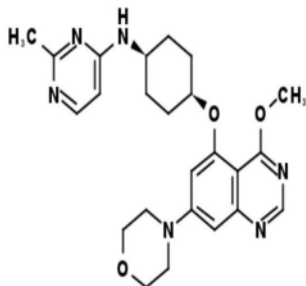
[0973]

				Hz, 1H), 6.18 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.79 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.02 - 3.80 (m, 5H), 3.48 - 3.30 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.32 - 2.20 (m, 2H), 2.07 - 1.95 (m, 2H), 1.94 - 1.76 (m, 4H)。		
4		446.3 5	0.61 (A)	¹ H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.08 (s, 1H), 8.06 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.71 - 6.63 (m, 1H), 6.14 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.93 (s, 1H), 4.85 (s, 1H), 4.06 - 3.79 (m, 5H), 3.49 (s, 3H), 3.48 - 3.40 (m,	A	A

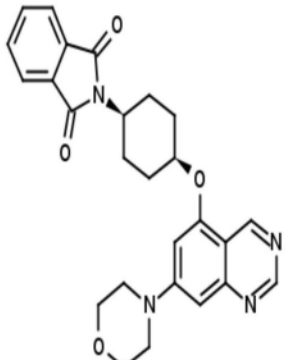
[0974]

				4H), 2.49 (s, 3H), 2.34 - 2.21 (m, 2H), 2.13 - 1.85 (m, 6H)。		
5		493.3 4	0.58 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.58 (s, 1H), 6.80 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.58 (t, J = 9.1 Hz, 2H), 4.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.13 (s, 3H), 3.93 - 3.82 (m, 4H), 3.38 - 3.27 (m, 4H), 3.19 (t, J = 9.1 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.25 - 2.13 (m, 2H), 1.99 - 1.74 (m, 6H)。	A	A

[0975]

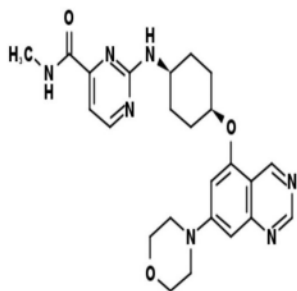
6		451.3	5	0.57 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.58 (s, 1H), 8.12 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.12 (s, 3H), 3.94 - 3.84 (m, 4H), 3.70 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.41 - 3.25 (m, 4H), 2.49 (s, 3H), 2.21 (d, J = 11.0 Hz, 2H), 1.98 - 1.73 (m, 6H).	A	A
---	---	-------	---	----------	--	---	---

[0976]

7		459.3 1	0.66 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.80 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 9.15 (s, 1H), 7.89 - 7.78 (m, 2H), 7.78 - 7.65 (m, 2H), 6.80 (dd, J = 2.3, 0.6 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 4.30 (tt, J = 12.5, 4.1 Hz, 1H), 3.96 - 3.82 (m, 4H), 3.47 - 3.30 (m, 4H), 2.83 (qd, J = 12.8, 3.4 Hz, 2H), 2.35 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 1.84 - 1.62 (m, 4H).	B	B
---	--	------------	----------	---	---	---

[0977]

8



464.3

5

0.58 (A)

¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d)

δ 9.45 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.49 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.86 - 4.70 (m, 1H), 4.15 - 3.96 (m, 1H), 3.96 - 3.78 (m, 4H), 3.49 - 3.33 (m, 4H), 3.00 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 2.32 - 2.14 (m, 2H), 2.10 - 1.96 (m, 2H), 1.96 - 1.74 (m, 4H).

¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d)

δ 9.45 (s, 1H),

A

A

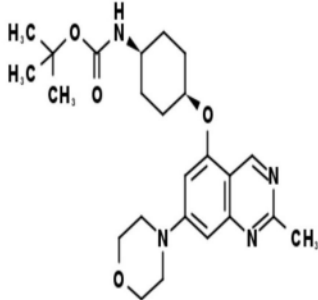
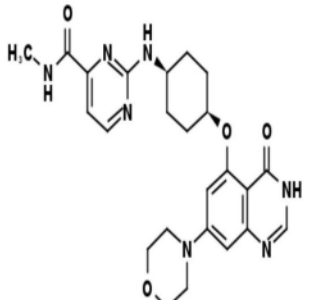
[0978]

				9.10 (s, 1H), 8.50 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.33 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.86 - 6.74 (m, 1H), 6.59 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.03 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.95 - 3.82 (m, 4H), 3.39 (dd, J = 5.7, 4.1 Hz, 4H), 3.01 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.24 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 2.08 - 1.96 (m, 2H), 1.96 - 1.68 (m, 4H)。		
--	--	--	--	---	--	--

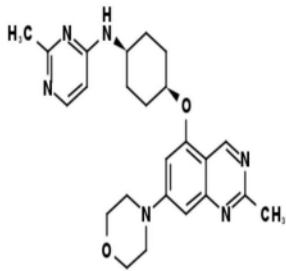
[0979]

9		494.3 3	0.6 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.60 (s, 1H), 8.49 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.38 - 7.30 (m, 1H), 6.91 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.18 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 4.04 - 3.83 (m, 5H), 3.42 - 3.32 (m, 4H), 3.01 (d, J = 5.2 Hz, 3H), 2.22 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 2.06 - 1.93 (m, 2H), 1.83 (t, J = 9.4 Hz, 4H).	A	A
---	--	------------	---------	--	---	---

[0980]

10		443.2	0.6 (C)	¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ 9.32 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.50 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 3.89 (t, J = 4.9 Hz, 4H), 3.63 (s, 1H), 3.42 (t, J = 4.9 Hz, 4H), 2.84 (s, 3H), 2.17 (d, J = 13.4 Hz, 2H), 1.97 - 1.60 (m, 6H), 1.47 (s, 9H)。	B	C
11		480.3 3	0.57 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.46 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.87 (dd, J = 5.4, 4.5 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.48	A	C

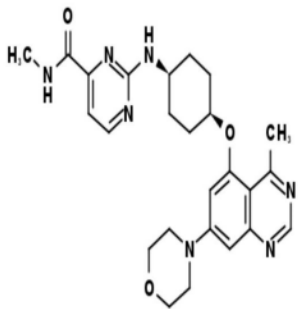
[0981]

				(d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.76 - 5.31 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.99 (dt, J = 8.1, 4.0 Hz, 1H), 3.92 - 3.74 (m, 4H), 3.42 - 3.22 (m, 4H), 2.98 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.32 - 2.12 (m, 2H), 2.12 - 1.84 (m, 4H), 1.77 (td, J = 13.2, 11.9, 3.2 Hz, 2H)。		
12		435.2	0.49 (A)	¹ H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.38 (s, 1H), 8.10 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.80 - 6.69 (m, 1H), 6.54 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.01 -	B	B

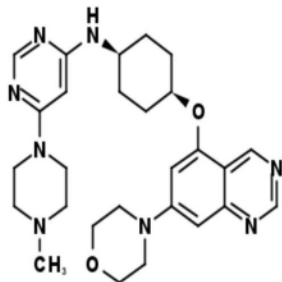
[0982]

				3.82 (m, 4H), 3.38 (dd, J = 6.0, 3.9 Hz, 4H), 2.81 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.25 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.12 - 1.68 (m, 6H)., 1H NMR (400 MHz, CDCl3) δ 9.27 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.19 - 6.05 (m, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 3.80 (t, J = 4.9 Hz, 5H), 3.29 (dd, J = 6.8, 3.1 Hz, 4H), 2.71 (d, J = 1.9 Hz, 3H), 2.43 (d, J = 1.8 Hz, 4H), 2.14		
--	--	--	--	---	--	--

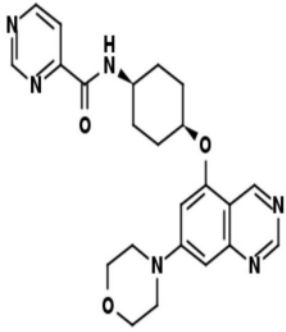
[0983]

				(d, $J = 13.8$ Hz, 2H), 2.01 - 1.68 (m, 6H).		
13		478.4 4	0.59 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.87 (s, 1H), 8.49 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.79 - 4.69 (m, 1H), 4.03 (ddt, $J = 13.1, 7.8, 4.4$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 5.7, 4.1$ Hz, 4H), 3.42 - 3.27 (m, 4H), 3.05 (s, 3H),	A	A

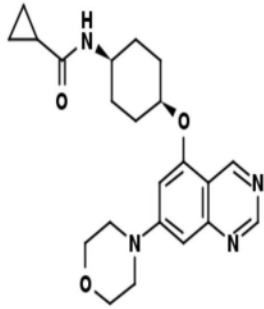
[0984]

				3.01 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.31 - 2.16 (m, 2H), 2.13 - 2.00 (m, 2H), 2.00 - 1.75 (m, 4H).		
14		505.4 4	0.53 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 4.85 - 4.62 (m, 2H), 3.97 - 3.74 (m, 5H), 3.60 - 3.55 (m, 4H), 3.45 - 3.27 (m, 4H), 2.52 - 2.46 (m, 4H), 2.33 (d, J = 2.5 Hz, 3H), 2.26 - 2.15 (m, 2H), 2.05 - 1.91 (m, 2H), 1.91 -	A	A

[0985]

				1.64 (m, 4H).		
15		435.3 5	2.48 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.47 (s, 1H), 9.26 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.97 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 5.1, 1.5 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.82 - 6.75 (m, 1H), 6.58 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.83 - 4.73 (m, 1H), 4.20 - 4.07 (m, 1H), 3.95 - 3.82 (m, 4H), 3.43 - 3.31 (m, 4H), 2.33 - 2.17 (m, 2H),	A	A

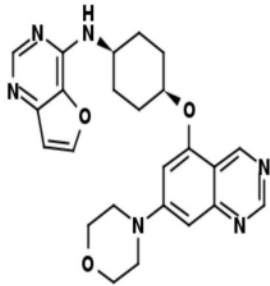
[0986]

				2.06 - 1.82 (m, 6H).		
16		397.4 4	0.58 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.78 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.73 - 5.54 (m, 1H), 4.74 (t, J = 3.9 Hz, 1H), 3.97 (ddd, J = 14.9, 6.4, 4.1 Hz, 1H), 3.92 - 3.81 (m, 4H), 3.45 - 3.30 (m, 4H), 2.19 (dd, J = 12.1, 2.7 Hz, 2H), 1.95 - 1.59 (m, 6H), 1.34 (tt, J = 7.7, 4.6 Hz,	A	A

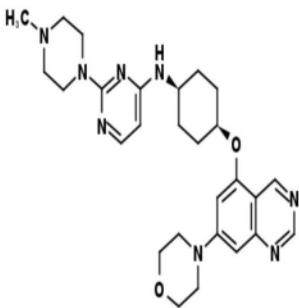
[0987]

				1H), 1.03 - 0.91 (m, 2H), 0.79 - 0.68 (m, 2H).; 1H NMR (400 MHz, 氯 仿-d) δ 9.44 (s, 1H), 9.09 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.60 - 6.52 (m, 1H), 5.73 - 5.52 (m, 1H), 4.73 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.97 (ddt, J = 10.2, 7.3, 3.8 Hz, 1H), 3.89 (td, J = 4.9, 1.3 Hz, 4H), 3.38 (td, J = 4.9, 1.3 Hz, 4H), 2.28 - 2.09 (m, 2H), 1.89 (dt, J = 13.0, 4.2 Hz, 2H), 1.85 - 1.60 (m, 4H), 1.39 - 1.28 (m, 1H), 1.03 -		
--	--	--	--	--	--	--

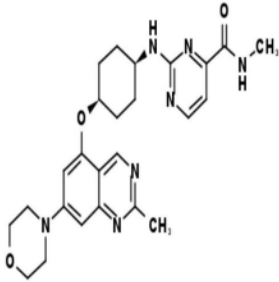
[0988]

				0.90 (m, 2H), 0.80 - 0.69 (m, 2H).		
17		447.1 2	0.55 (A)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.49 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.76 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 2.2, 0.5 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.17 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 4.45 - 4.29 (m, 1H), 3.94 - 3.90 (m, 4H), 3.45 - 3.39 (m, 4H), 2.30 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 2.15 - 2.06 (m, 2H), 1.99 - 1.86 (m,	A	A

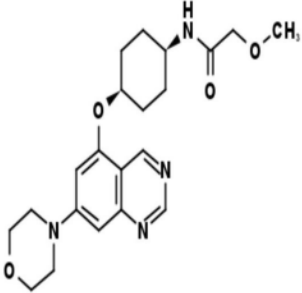
[0989]

				4H)。		
18		505.4 9	0.53 (A)	1H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.43 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.89 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 6.85 - 6.72 (m, 1H), 6.57 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.68 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.60 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.95 - 3.70 (m, 9H), 3.44 - 3.32 (m, 4H), 2.49 - 2.39 (m, 4H), 2.32 (s, 3H), 2.27 - 2.14 (m, 2H), 2.05 - 1.92 (m, 2H), 1.92 -	A	A

[0990]

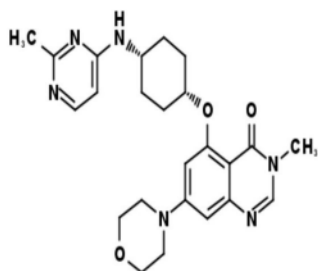
				1.76 (m, 4H).		
19		478.2	0.53 (C)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.28 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.12 (dd, J = 4.8, 0.7 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.94 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 3.82 (dp, J = 13.9, 4.2 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 5.9, 3.8 Hz, 4H), 3.21 - 3.12 (m, 4H), 2.80 (d, J = 5.0	B	A

[0991]

				Hz, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.12 - 1.95 (m, 2H), 1.88 - 1.75 (m, 2H), 1.73 - 1.51 (m, 4H). [1]		
20		401.3 2	0.56 (C)	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.45 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.79 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.75 (p, J = 3.2 Hz, 1H), 4.06 - 3.93 (m, 1H), 3.94 - 3.84 (m, 6H), 3.45 (s, 3H), 3.42 - 3.33 (m, 4H), 2.26 - 2.14 (m, 2H), 1.93 - 1.61 (m, 6H).	B	C

[0992]

21

451.3
3

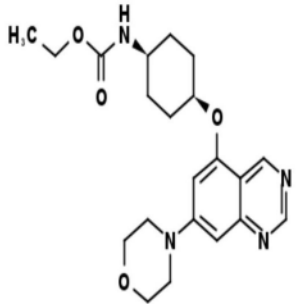
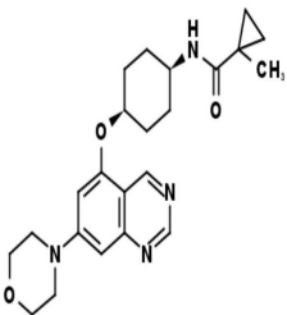
0.51 (A)

B

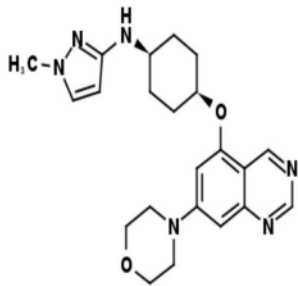
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 8.08 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.18 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.97 - 3.81 (m, 4H), 3.53 (d, J = 10.6 Hz, 3H), 3.40 - 3.25 (m, 4H), 2.52 (s, 3H), 2.23 (d, J = 12.9 Hz, 2H), 2.05 - 1.70 (m, 7H).

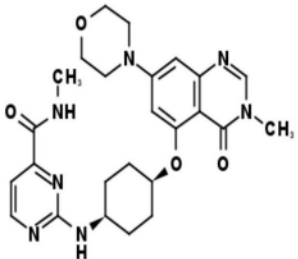
[0993]

22		401.3 2	0.63 (C)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.85 - 6.72 (m, 1H), 6.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.78 - 4.56 (m, 2H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.96 - 3.82 (m, 4H), 3.66 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.46 - 3.31 (m, 4H), 2.25 - 2.08 (m, 2H), 1.90 (dt, J = 12.5, 4.1 Hz, 2H), 1.84 - 1.61 (m, 4H), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H).	A	A
23		411.3 1	0.62 (C)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.46 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.85 - 6.74 (m, 1H), 6.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H),	A	A

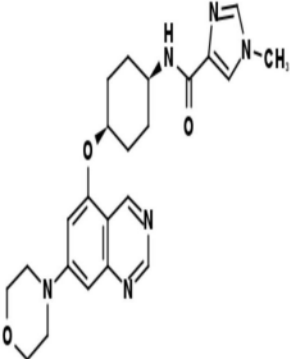
[0994]

				5.67 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.74 (t, J = 3.2 Hz, 1H), 4.04 - 3.80 (m, 5H), 3.47 - 3.32 (m, 4H), 2.28 - 2.14 (m, 2H), 1.96 - 1.83 (m, 2H), 1.83 - 1.51 (m, 4H), 1.35 (s, 3H), 1.19 (q, J = 3.8 Hz, 2H), 0.65 - 0.53 (m, 2H).		
24		409.3 3	0.51 (C)	1H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.43 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 9.09 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.53 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 4.76 - 4.66 (m, 1H),	A	A

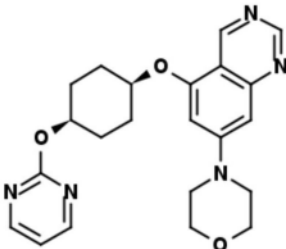
[0995]

				3.88 (dt, J = 5.0, 3.0 Hz, 4H), 3.72 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 3.49 - 3.33 (m, 5H), 2.18 (dd, J = 13.8, 4.1 Hz, 3H), 1.99 (dt, J = 11.7, 3.7 Hz, 2H), 1.89 - 1.63 (m, 4H).		
25		494.3 7	0.6 (C)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.28 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.99 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.92 - 3.80 (m, 4H), 3.50 (s, 3H),	B	

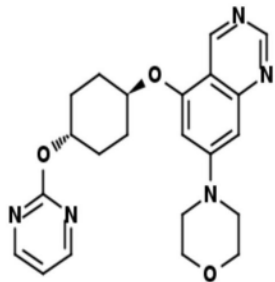
[0996]

				3.37 - 3.23 (m, 4H), 3.01 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.27 - 2.15 (m, 2H), 2.07 - 1.95 (m, 2H), 1.90 (dd, J = 13.0, 4.2 Hz, 2H), 1.79 (t, J = 12.8 Hz, 2H)。		
26		433.0 5	0.25 (C)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.44 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 7.51 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 7.40 - 7.34 (m, 1H), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.74 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.11 (tq, J = 9.9, 6.2, 5.3 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 5.9, 3.9	B	

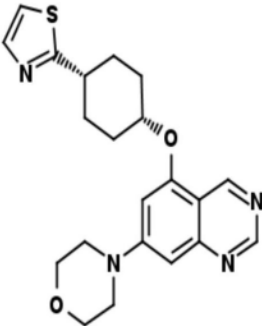
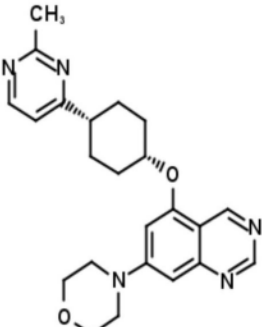
[0997]

				Hz, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.43 - 3.33 (m, 4H), 2.29 - 2.17 (m, 2H), 2.04 - 1.73 (m, 6H).		
27		408.3 5	0.63 (C)	¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.45 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.53 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 6.93 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 6.85 - 6.72 (m, 1H), 6.60 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.20 (dq, J = 7.6, 3.7 Hz, 1H), 4.67 (dt, J = 6.3, 3.1 Hz, 1H), 3.99 - 3.79 (m, 4H), 3.51 - 3.15 (m, 4H), 2.38 - 2.06 (m, 4H), 2.11 - 1.78 (m,	A	

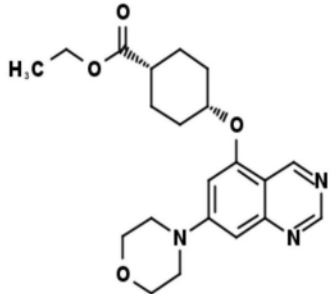
[0998]

				4H)。		
28		408.3 9	0.62 (C)	1H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 9.43 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.54 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 6.95 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 2.1, 0.8 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.29 - 5.24 (m, 1H), 4.80 - 4.59 (m, 1H), 4.11 - 3.77 (m, 4H), 3.58 - 3.30 (m, 4H), 2.33 - 2.20 (m, 4H), 2.04 - 1.70 (m, 4H)。	A	

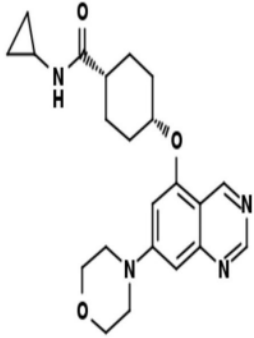
[0999]

29		397.2 6	0.53 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.74 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.87 (s, 1H), 3.96 - 3.84 (m, 4H), 3.51 - 3.38 (m, 4H), 3.31 - 3.16 (m, 1H), 2.42 - 2.27 (m, 2H), 2.22 - 2.05 (m, 4H), 1.96 - 1.82 (m, 2H).		
30		406.3 6	0.51 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.51 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.59 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 6.84 (d, J		

[1000]

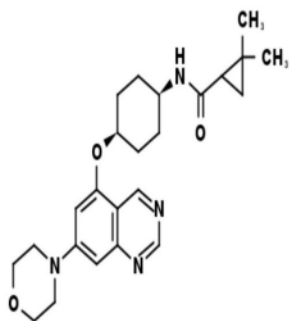
				= 1.7 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.96 - 4.82 (m, 1H), 4.03 - 3.82 (m, 4H), 3.51 - 3.30 (m, 4H), 2.90 - 2.77 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.44 - 2.28 (m, 2H), 2.19 - 1.75 (m, 6H)。		
31		386.2 8	0.58 (A)	1H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 9.46 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 6.81 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.83 - 4.66 (m, 1H), 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.01 - 3.83 (m, 4H), 3.51 - 3.29 (m, 4H), 2.48 (tt, J = 10.3, 3.9 Hz, 1H), 2.30 -		

[1001]

				2.12 (m, 2H), 2.12 - 1.65 (m, 6H), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H)。		
32		397.3 1	0.53 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 6.81 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.65 (s, 1H), 4.87 - 4.72 (m, 1H), 4.02 - 3.83 (m, 4H), 3.48 - 3.35 (m, 4H), 2.82 - 2.68 (m, 1H), 2.37 - 2.17 (m, 3H), 2.02 - 1.68 (m, 8H), 0.90 - 0.75 (m, 2H), 0.59 - 0.41 (m, 2H)。		

[1002]

33

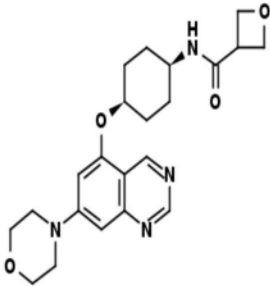
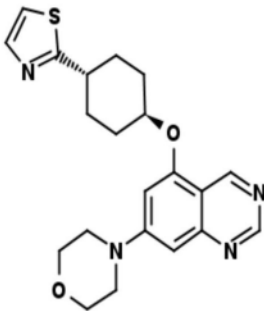
425.3
3

0.57 (A)

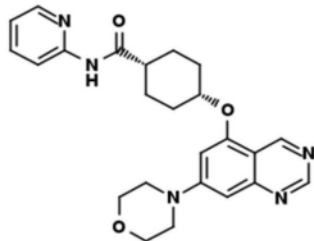
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 9.45 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.78 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.57 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.74 (q, J = 3.2 Hz, 1H), 4.05 - 3.84 (m, 5H), 3.46 - 3.31 (m, 4H), 2.19 (dq, J = 9.9, 3.3 Hz, 2H), 1.97 - 1.55 (m, 6H), 1.26 (dd, J = 8.0, 5.3 Hz, 1H), 1.17 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.09 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 0.73 (dd, J = 8.0, 4.3 Hz, 1H).

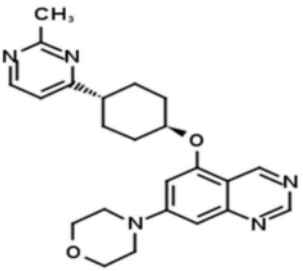
[1003]

34		413.4 6	0.55 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.42 (s, 1H), 9.08 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.51 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 4.95 - 4.72 (m, 5H), 4.10 - 3.84 (m, 5H), 3.70 (tt, J = 8.3, 6.7 Hz, 1H), 3.39 (dd, J = 5.8, 4.0 Hz, 5H), 2.30 - 2.15 (m, 3H), 1.98 - 1.58 (m, 4H).	
35		397.3 2	0.57 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.42 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.74 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 1.8 Hz, 1H),	

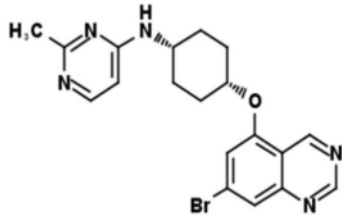
[1005]

				3H), 2.32 - 2.19 (m, 2H), 2.08 - 1.73 (m, 9H)。		
37		434.3 3	0.48 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.49 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.28 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 8.16 (s, 1H), 7.84 - 7.68 (m, 1H), 7.15 - 7.02 (m, 1H), 6.83 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.88 - 4.76 (m, 1H), 4.05 - 3.81 (m, 4H), 3.40 (dd, J = 14.8, 10.0 Hz, 4H), 2.59 - 2.42 (m, 1H), 2.42 - 2.25 (m, 2H), 2.25 -		

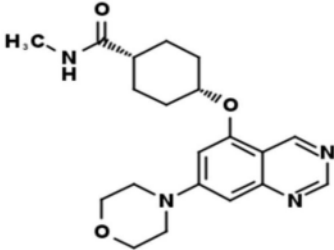
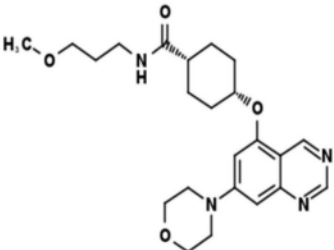
[1006]

				2.04 (m, 2H), 2.04 - 1.71 (m, 4H)。		
38		406.2 9	0.5 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.57 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.63 - 4.41 (m, 1H), 4.05 - 3.83 (m, 4H), 3.53 - 3.29 (m, 4H), 2.86 - 2.76 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.51 - 2.33 (m, 2H), 2.25 - 2.10 (m, 2H), 1.96 -		

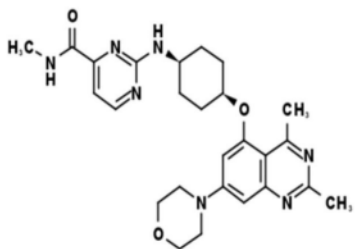
[1007]

				1.62 (m, 6H).		
39		414.1 7	0.55(A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.72 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.12 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 5.04 (s, 1H), 4.90 - 4.75 (m, 1H), 3.90 (s, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.36 - 2.18 (m, 2H), 2.14 - 1.59 (m, 6H).		

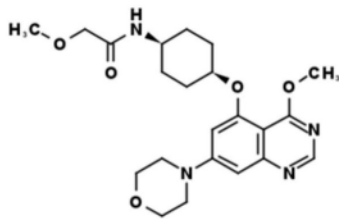
[1008]

40		371.3 8	0.53 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 6.83 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.67 - 5.49 (m, 1H), 4.83 - 4.75 (m, 1H), 3.95 - 3.85 (m, 4H), 3.48 - 3.36 (m, 4H), 2.87 (d, J = 4.8 Hz, 3H), 2.38 - 2.24 (m, 3H), 2.11 - 1.84 (m, 4H), 1.83 - 1.67 (m, 2H)。	
41		429.2 9	0.52 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.47 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 6.81 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.38 - 6.21 (m, 1H),	

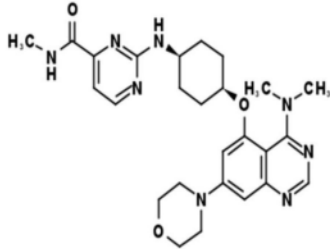
[1009]

				4.83 - 4.72 (m, 1H), 3.98 - 3.84 (m, 4H), 3.53 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.49 - 3.29 (m, 9H), 2.40 - 2.19 (m, 3H), 2.12 - 1.63 (m, 8H)。		
42		492.3	0.54 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.36 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.55 - 6.47 (m, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.15 - 4.00 (m, 0H), 3.90 (dd, J = 6.0, 3.8 Hz, 4H), 3.43 - 3.32 (m, 4H), 3.11 - 2.98 (m, 6H), 2.80 (s, 0H), 2.33 -		

[1010]

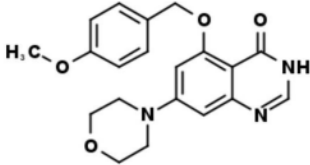
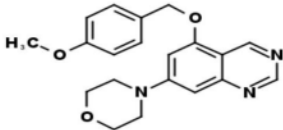
				2.18 (m, 2H), 2.13 - 1.77 (m, 6H).		
43		431.2 5	2.19 (A)	¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.48 (s, 1H), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.79 (s, 2H), 3.75 (m, 5H), 3.35 (m, 4H), 3.30 (s, 3H), 2.01 (m, 2H), 1.84 - 1.53 (m, 6H).		

[1011]

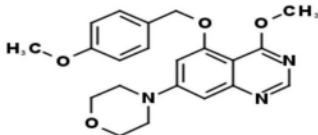
44		507	0.64 (C)	¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.76 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.06 - 3.78 (m, 5H), 3.31 (dd, J = 14.5, 9.7 Hz, 4H), 3.15 (s, 6H), 3.02 (d, J = 5.1 Hz, 3H), 2.12 - 2.00 (m, 2H), 1.81 (dd, J = 30.2, 11.2 Hz, 6H).
----	---	-----	----------	--

[1012] 表2:本发明的某些化合物的表征数据以及K_i和IC₅₀值

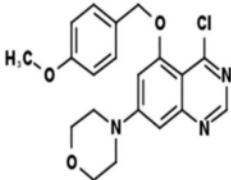
[1013]

化合物编号	分子	M+1	LCMS 保留时间	NMR	Ki(μM) DNA -PK	IC ₅₀ (μM)
51		368.14	0.63 (A)	¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 11.47 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.51 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.65 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.88 - 3.59 (m, 7H), 3.33 - 3.27 (m, 4H).	D	C
52		352.16	0.58 (A)	¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ 9.42 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2H),	B	C

[1014]

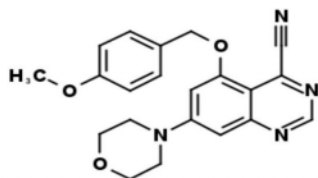
				7.01 - 6.92 (m, 2H), 6.79 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.95 - 3.86 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.44 - 3.31 (m, 4H)。		
53		382.14	0.62 (A)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.99 - 6.92 (m, 2H), 6.82 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.11 (s, 3H), 3.90 - 3.85 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.37 - 3.31 (m, 4H)。 ¹H NMR (300 MHz, 氯仿-d) δ 8.61 (s, 1H), 7.55 - 7.43 (m,	C	C

[1015]

				2H), 7.04 - 6.93 (m, 2H), 6.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.13 (s, 3H), 3.95 - 3.88 (m, 4H), 3.86 (s, 3H), 3.42 - 3.30 (m, 4H)。		
54		386.1	0.74 (A)	¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.45 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.98 - 6.91 (m, 2H), 6.84 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.97 - 3.85 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.48 - 3.29 (m, 4H)。	C	

[1016]

55



377.14

0.77 (A)

¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ 9.07 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.94 - 3.84 (m, 4H), 3.82 (s, 3H), 3.48 - 3.35 (m, 4H).

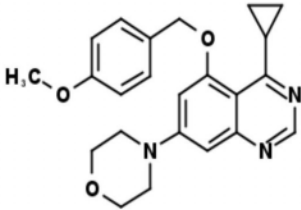
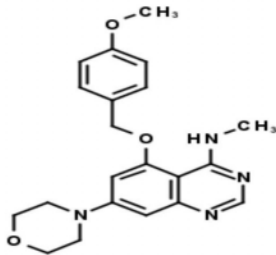
¹H NMR

(300 MHz, 氯仿-d) δ 9.09 (s, 1H), 7.58 - 7.44 (m, 2H), 7.03 - 6.90 (m, 2H), 6.82 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.31 (s, 2H), 3.98 - 3.86 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.51 - 3.38 (m, 4H).

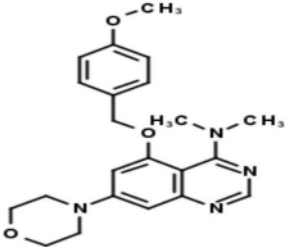
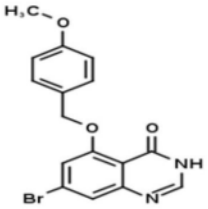
B

C

[1017]

56		392.25	0.63 (A)	¹H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.79 (s, 1H), 7.48 - 7.35 (m, 2H), 7.00 - 6.88 (m, 2H), 6.83 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 3.93 - 3.85 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.48 - 3.28 (m, 5H), 1.35 - 1.22 (m, 2H), 0.99 - 0.86 (m, 2H).	B
57		381	0.73 (C)	¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (s, 1H), 7.88 (t, J = 4.6 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 9.1, 2.4 Hz, 2H), 7.02 - 6.93 (m, 2H), 6.74 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.1 Hz, 1H),	

[1018]

				5.33 (s, 2H), 3.77 - 3.71 (m, 7H), 3.28 - 3.18 (m, 4H), 2.92 (d, J = 4.7 Hz, 3H)。		
58		395	0.74 (C)	¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.21 (s, 1H), 7.42 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 7.05 - 6.94 (m, 2H), 6.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.79 - 3.73 (m, 7H), 3.35 - 3.31 (m, 4H), 2.91 (s, 6H)。		
59				¹H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 12.07 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.55 - 7.42 (m, 2H), 7.37 (d, J = 1.8 Hz, 1H),		

[1019]			7.28 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.03 - 6.90 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).
--------	--	--	--

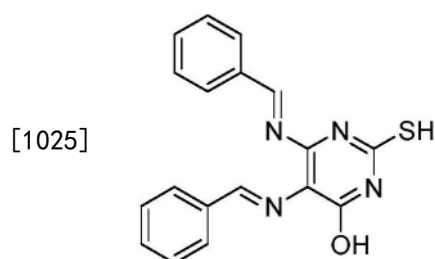
[1020] 基因编辑实施例

[1021] 下列实施例,包括进行的实验和获得的结果,仅为了例证目的而提供,且不应解释为对本公开内容的限制。

[1022] 实施例3:材料和方法

[1023] 交通指挥灯报道因子 (TLR) 测定:HEK293-EGIP (增强型绿色荧光抑制蛋白) 稳定细胞系购自System Biosciences (SBI)。HEK293-EGIP细胞系带有具有终止密码子的断裂的GFP编码序列和来自AAVS1基因座的53-bp基因组片段。将细胞维持在含有高葡萄糖 (Life Technologies, 目录号10313-039) 的DMEM (Life Technologies, 目录号10313-039) 中,其补充了10%热灭活的FBS (胎牛血清, Expression Systems Inc.)、Glutamax和青霉素+链霉素,并在37°C和5%CO₂下培养。

[1024] 细胞转染和NHEJ抑制剂处理:用二合一gRNA/CRISPR-Cas9双质粒载体、质粒修复供体 (来自System Biosciences的质粒) 转染HEK293-EGIP稳定的细胞。按照生产商的方案使用Amaya核转染器 (nucleofector) 系统 (Lonza) 进行转染。16小时后,用各种浓度的由式 (I) 表示的化合物处理细胞,包括1μM、2.5μM、5μM和10μM化合物。Scr7的结构如下所示:



[1026] 且可以用作对照。另外24小时温育后,将更换培养基。转染后5天进行FACS分析;然后收集细胞用于基因组DNA分离和PCR基因分型。

[1027] 细胞分选和流式细胞计量术:对于流式细胞计量术分析,将HEK293细胞用胰蛋白酶消化并重新悬浮于PBS/1%BSA FACS缓冲液中,并用Fortessa流式细胞计 (Becton Dickinson) 进行分析。将一部分细胞离心并用于分离基因组DNA。

[1028] 化合物处理后的细胞活力测定:为了评估NHEJ抑制剂处理的潜在毒性,在暴露于不同浓度的化合物后评估细胞活力。通过CellTiter Glo (Promega) 试剂盒确定HEK293-EGIP的细胞活力。在有化合物 (1μM、2.5μM、5μM和10μM) 存在下使得用质粒供体转染的细胞生长24、48或72h,并进行CellTiter Glo测定。每个实验一式三份地重复独立的3次。为了维持能够进入HDR所需的S/G2的健康细胞,用2.5μM浓度的化合物处理细胞。

[1029] 基因组DNA分离、PCR基因分型和凝胶定量:专门设计的PCR引物对会提供另一种评估HDR介导的基因组编辑以获得功能性eGFP阳性细胞的方法。基因分型PCR引物对如下所

示,其对应于SEQ ID NO:6和7。219碱基对PCR产物对应于未修饰的细胞,163碱基对核苷酸对应于通过HDR进行的修饰。这些条带在>2.5%凝胶上的强度允许通过使用Bio-Imager的密度测定法估算HDR。该技术允许抑制剂对HDR的改善的相对排序。通过计算对应于“插入”的PCR条带除以“总”(插入和未修饰)的比率,对每个泳道测量的强度进行归一化。通过对比具有化合物的插入与没有化合物的插入的比率来计算倍数变化。

[1030] 实施例4:用于监测HDR效率的测定

[1031] 将进行测定以确定HEK293-EGIP细胞中的HDR效率。为此目的,使用靶向人AAVS1基因座的双顺反子构建体(图1A)。双顺反子载体系统共表达由EF1启动子驱动的人密码子优化的Cas9,以及由H1启动子驱动的由嵌合crRNA-tracrRNA转录物组成的定制指导RNA(gRNA)。hspCas9包含在N端和C端的两个核定位信号(NLS)以确保hspCas9蛋白向细胞核中的有效输入。hspCas9可读框(ORF)之后是称为WPRE(土拨鼠病毒转录后调节元件)的调节元件,以增强基因表达并稳定mRNA转录物。

[1032] 使用在上面和图1A中所描述的双顺反子构建体,将经工程改造的人细胞系EGIP HEK293用于监测HDR效率。EGIP HEK293报道因子细胞系购自SBI。HEK293-EGIP细胞系带有具有终止密码子的断裂的GFP编码序列和来自AAVS1基因座的53-bp基因组片段。通过用EF1 α 启动子对293T细胞的慢病毒感染来产生稳定的系,以驱动eGFP的表达,然后进行嘌呤霉素选择。修饰eGFP序列以从人AAVS1安全港站点插入56个核苷酸的插入片段(大写)。该序列包含在eGFP翻译序列的氨基酸T109之后的终止密码子(红色的TAA)。靶向的指导序列以粗字母显示。用指导和供体转染后,将在断裂的eGFP内的AAVS1位点切割,供体构建体提供同源序列来修复eGFP,这通过除去终止密码子和AAVS1插入物(insert)实现。使用该系统,接受HDR供体修复的经编辑细胞将生成GFP阳性细胞。因此,共转染Cas9、靶向AAVS1的gRNA和AAVS1/EGFP拯救供体会通过HDR恢复序列以产生GFP+细胞。

[1033] GFP阳性细胞的数量与同源性定向修复的效率成正比。

[1034] 对于这些测定,使用Amaxa核转染器(Lonza)通过电穿孔将二合一Cas9-sgRNA $\square$ 和eGFP供体模板载体引入HEK293 EGIP细胞中,以驱动Cas9-sgRNA和eGFP供体模板的合成。转染后16小时添加化合物,然后在48小时后更换培养基。然后,允许细胞在FACS分析之前繁殖另外72小时。

[1035] HDR供体模板序列包含266个核苷酸的5'同源性臂(粗体,黑色和带下划线)和378个核苷酸的3'同源性臂(斜体和带下划线)(参见下面的SEQ ID NO:1)。在用指导RNA和供体模板转染后,在断裂的eGFP内的AAVS1位点将被切割,并且供体构建体将提供同源序列以修复eGFP,除去终止密码子和AAVS1插入物。

[1036] 下面显示了用于交通指挥灯报道因子测定中的HDR模板序列(SEQ ID NO:1):

[1037] TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTA
ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCG
CTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAC
GACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAACTAGTGCGACGTAAACGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAG
GGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCC

TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
CAAGGTGAAGTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACC
CCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGTCGACAC
CGGTGATATCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA
CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG
GCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA
AAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCC
TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTG
TGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA
CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC
TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT
TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCA
GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAC
GAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTGATCCCCGCCA
CGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGT
TGTCGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCGTCAA
GTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAA
ACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTC
ACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCT
ATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATG
GCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATC
AACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAA
ACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTT
CTAATACCTGGAATGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
CTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACG
CTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATT
GCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCA
AGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTAATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCAT
GATGATATATTTTTATCTTGTCATGTAAACATCAGAGATTTTGAGACACAATTCATCGATGATGGTTGAGATGTG
TATAAGAGACAGATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA
AAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATG

ACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC (SEQ ID NO:1)

[1038] 用于本文所述的测定的引物位点如下所示。这些引物位点位于供体序列内。在基因组模板上的PCR反应将产生700个核苷酸的产物,其中NHEJ有望产生约300个核苷酸和400个核苷酸长度的片段。发生HDR事件后,使用提供的供体模板的预期PCR产物为644个核苷酸。用于测定的引物位点包括以下序列。

[1039] 指导RNA_1:GTCCCCTCCACCCACAGTG (SEQ ID NO:2)

[1040] 指导RNA_2:GGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO:3)

[1041] 正向测量引物(forward surveyor primer):GCGACGTAAACGGCCACAAG (SEQ ID NO:4)

[1042] 反向测量引物(reverse surveyor primer):GTCCATGCCGAGAGTGATCC (SEQ ID NO:5)

[1043] HDR引物_1:ACTTCTTCAAGTCGCCATGCCC (SEQ ID NO:6)

[1044] HDR引物_2:ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCG (SEQ ID NO:7)

[1045] 实施例3:评价用于增加CRISPR-基因组编辑HDR效力的DNA-PK抑制剂

[1046] 将HEK293-EGIP细胞用以下构建体进行核转染,并如下所述进行培养:仅双表达gRNA-Cas9,具有供体修复模板的双表达gRNA-Cas9,具有供体模板的双表达gRNA-Cas9和用2.5 μ M化合物1培养细胞,以及具有供体修复模板的双表达gRNA-Cas9和用2.5 μ M假定连接酶(putative ligase)IV抑制剂Scr7培养细胞。细胞与式(I)的化合物或与Scr7接触24小时。

[1047] 评价与gRNA-Cas9和仅供体模板条件增加相比的CRISPR基因组编辑的HEK-EGIP细胞的量。关于CRISPR-基因组编辑的HEK-EGIP细胞的量与gRNA-Cas9和仅供体模板条件相比的增加,评价式(I)的化合物向用gRNA-Cas9和供体模板核转染的HEK293-EGIP细胞的培养基中的添加。

[1048] 在某些实施方案中,在有供体修复模板存在下,通过荧光激活细胞分选仪(FACS)定量使用CRISPR-Cas9系统增强DNA修复过程的倍数增加。在转染后10天进行流式细胞计量术分析。一式三份地进行流式细胞计量术实验。

[1049] 在某些实施方案中,使用稳健的“交通指挥灯报道因子”(TLR)测定(图1B)来定量在CRISPR-Cas9系统中HDR介导的DNA修复过程的增强中的倍数增加。在TLR系统中,表达“破碎的”绿色荧光蛋白eGFP的HEK293-EGIP稳定的细胞系在有DNA供体模板存在下依赖于HDR介导的修复以产生功能性eGFP(参见图1B和1C)。如图1C中的实验工作流程所示,功能性GFP阳性细胞通过HDR途径出现,其中56nt插入被正确的DNA序列替代。在通过电穿孔转染后48小时,通常会出现GFP阳性细胞。一式三份地进行流式细胞计量术分析。

[1050] 实施例5:用于增加HDR基因组编辑的小分子NHEJ抑制剂的对比

[1051] 对于本文所述的任何化合物,在与DNA-PK抑制剂接触后,利用HEK293-EGIP细胞系进行进一步实验以确定HDR效率。

[1052] 对于这些实验,对HEK293-EGIP细胞用仅供体模板或供体模板和Cas9-sgRNA进行核转染。为了测试本文所述的化合物的增强HDR编辑的能力,给用单独供体模板或供体模板和Cas9-sgRNA进行核转染的细胞施用本文所述的Scr7或DNA-PK抑制剂。

[1053] 通过传统的“终点”PCR引物基因分型和基于琼脂糖条带强度的定量来确定HDR重组状态。引物产生不同的扩增子:219碱基对核苷酸条带对应于未修饰的细胞,和163碱基对

核苷酸产物对应于HDR事件。在>2.5%凝胶上的这些条带的强度允许使用Bio-Imager通过密度测定法估算HDR。该技术允许NHEJ的抑制剂对HDR的改善的条件的相对排序。这些测定的基因分型PCR引物对如下所示。

[1054] HDR引物_1ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCC (SEQ ID NO:6)

[1055] HDR引物_2ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCG (SEQ ID NO:7)

[1056] Cas9蛋白和sgRNA可以以合成RNA的形式递送,而不是从SBI购买的载体系统。除了提高HDR效率外,我们的内部基因组编辑实验表明,与DNA转染相比,在核糖核蛋白蛋白(RNP)转染后的细胞活力更高。此外,S/G2期的细胞同步化也可以刺激HDR (Lin S等人 .Elife.2014Dec 15;3,2014)。基因组编辑的这些新策略和稳健检测,诸如数字微滴PCR和下一代测序,将用于简化基因组编辑以用于治疗和研究目的。

[1057] 实施例6:施用DNA-PK抑制剂化合物以增加基因编辑的评价

[1058] 进行测定以确定DNA-PK抑制剂的允许编辑靶基因的能力。对于这些测定,将评估丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1基因从M到Z形式的编辑。为此目的,将用gRNA和Cas9蛋白对Huh7肝细胞癌细胞进行核转染,使用或不用其中引入了KpnI位点的供体修复模板。然后在有DMSO或2.5 μ M本文描述的DNA-PK抑制剂化合物存在下将核转染的细胞培养三天,此后,扩增基因组DNA并评估KpnI位点的引入。

[1059] 该测定如下工作:当编辑丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1基因时,KpnI内切核酸酶能够消化基因片段,只有在编辑丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1基因时,在凝胶上才会出现消化过的条带。相反,当未编辑丝氨酸蛋白酶抑制蛋白A1时,KpnI内切核酸酶不能切割基因片段,因此在凝胶上不会出现新的消化过的条带。

[1060] 尽管为了清楚理解的目的已经通过具体说明和实施例对前述发明进行了比较详细的描述,但是本领域普通技术人员考虑到本发明的教导会容易地明白,可以对其做出某些变化和改进,而不偏离所附权利要求书的精神或范围。

[1061] 本文提供的所有参考文献通过引用整体并入本文中。本文中使用的缩写、符号和惯例与当代科学文献中所使用的那些一致。参见例如Janet S.Dodd,编,The ACS Style Guide:A Manual for Authors and Editors,第2版,Washington,D.C.:American Chemical Society,1997。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> Vertex Pharmaceuticals Incorporated
- [0003] MAXWELL, John Patrick
- [0004] JACKSON, Katrina Lee
- [0005] TANG, Qing
- [0006] MORRIS, Mark A.
- [0007] RONKIN, Steven A.
- [0008] XU, Jinwang
- [0009] COTTRELL, Kevin M.
- [0010] CHARIFSON, Paul S.
- [0011] <120> DNA-PK抑制剂
- [0012] <130> 14390-688
- [0013] <150> US 62/618,339
- [0014] <151> 2018-01-17
- [0015] <160> 12
- [0016] <170> PatentIn 3.5版
- [0017] <210> 1
- [0018] <211> 20
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> AAVS1靶位点
- [0023] <400> 1
- [0024] accccacagt ggggccacta 20
- [0025] <210> 2
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <223> NAV1.7靶标
- [0031] <400> 2
- [0032] ggctgagcgt ccatcaacca 20
- [0033] <210> 3
- [0034] <211> 100
- [0035] <212> RNA
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> AAVS1 sgRNA

[0039] <220>
[0040] <221> misc_feature
[0041] <222> (1) .. (3)
[0042] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0043] <220>
[0044] <221> misc_feature
[0045] <222> (97) .. (99)
[0046] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0047] <400> 3
[0048] accccacagu ggggccacua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[0049] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[0050] <210> 4
[0051] <211> 100
[0052] <212> RNA
[0053] <213> 人工序列
[0054] <220>
[0055] <223> NAV1.7 sgRNA
[0056] <220>
[0057] <221> misc_feature
[0058] <222> (1) .. (3)
[0059] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0060] <220>
[0061] <221> misc_feature
[0062] <222> (97) .. (99)
[0063] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0064] <400> 4
[0065] ggcugagcgu ccaucaacca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
[0066] cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
[0067] <210> 5
[0068] <211> 90
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 人工序列
[0071] <220>
[0072] <223> AAVS1 PAM
[0073] <220>
[0074] <221> misc_feature
[0075] <222> (1) .. (3)
[0076] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0077] <220>

[0078] <221> misc_feature
[0079] <222> (87) .. (89)
[0080] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0081] <400> 5
[0082] gggtactttt atctgtcccc tccacccac agtggggcca gaattctcag ctagggacag 60
[0083] gattggtgac agaaaagccc catccttagg 90
[0084] <210> 6
[0085] <211> 90
[0086] <212> DNA
[0087] <213> 人工序列
[0088] <220>
[0089] <223> AAVS1 非-PAM
[0090] <220>
[0091] <221> misc_feature
[0092] <222> (1) .. (3)
[0093] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0094] <220>
[0095] <221> misc_feature
[0096] <222> (87) .. (89)
[0097] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0098] <400> 6
[0099] cctaaggatg gggcttttct gtcaccaatc ctgtccctag ctgagaattc tggccccact 60
[0100] gtggggtgga ggggacagat aaaagtaccc 90
[0101] <210> 7
[0102] <211> 90
[0103] <212> DNA
[0104] <213> 人工序列
[0105] <220>
[0106] <223> NAV1.7 PAM
[0107] <220>
[0108] <221> misc_feature
[0109] <222> (1) .. (3)
[0110] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0111] <220>
[0112] <221> misc_feature
[0113] <222> (87) .. (89)
[0114] <223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0115] <400> 7
[0116] agctgtccat tggggagcat gagggctgag cgtccatcaa ctgagaattc ccaggagac 60

[0117]	cacaccgttg cagtccacag cactgtgcat 90
[0118]	<210> 8
[0119]	<211> 90
[0120]	<212> DNA
[0121]	<213> 人工序列
[0122]	<220>
[0123]	<223> NAV1.7 非-PAM
[0124]	<220>
[0125]	<221> misc_feature
[0126]	<222> (1) .. (3)
[0127]	<223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0128]	<220>
[0129]	<221> misc_feature
[0130]	<222> (87) .. (89)
[0131]	<223> 2'-O-甲基 3'-硫代磷酸酯
[0132]	<400> 8
[0133]	atgcacagtg ctgtggactg caacggtgtg gtctccctgg gaattctcag ttgatggacg 60
[0134]	ctcagccctc atgctcccca atggacagct 90
[0135]	<210> 9
[0136]	<211> 20
[0137]	<212> DNA
[0138]	<213> 人工序列
[0139]	<220>
[0140]	<223> AAVS1 FW
[0141]	<400> 9
[0142]	ggacaacccc aaagtacccc 20
[0143]	<210> 10
[0144]	<211> 20
[0145]	<212> DNA
[0146]	<213> 人工序列
[0147]	<220>
[0148]	<223> AAVS1 RV
[0149]	<400> 10
[0150]	aggatcagtg aaacgcacca 20
[0151]	<210> 11
[0152]	<211> 20
[0153]	<212> DNA
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

-
- [0156] <223> NAV1.7 FW
[0157] <400> 11
[0158] gccagtgggt tcagtgggtat 20
[0159] <210> 12
[0160] <211> 25
[0161] <212> DNA
[0162] <213> 人工序列
[0163] <220>
[0164] <223> NAV1.7 RV
[0165] <400> 12
[0166] tcagcattat ccttgcattt tctgt 25

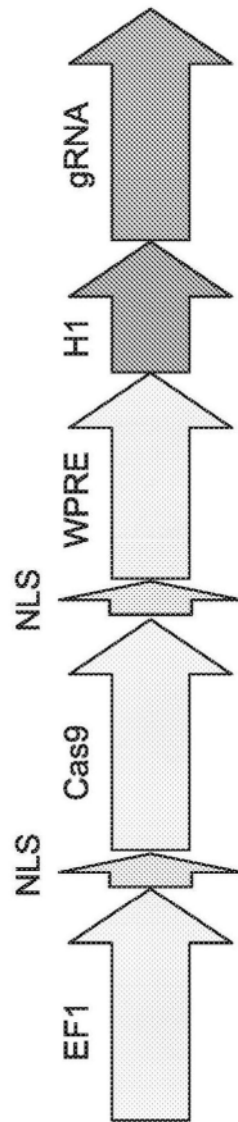


图1A

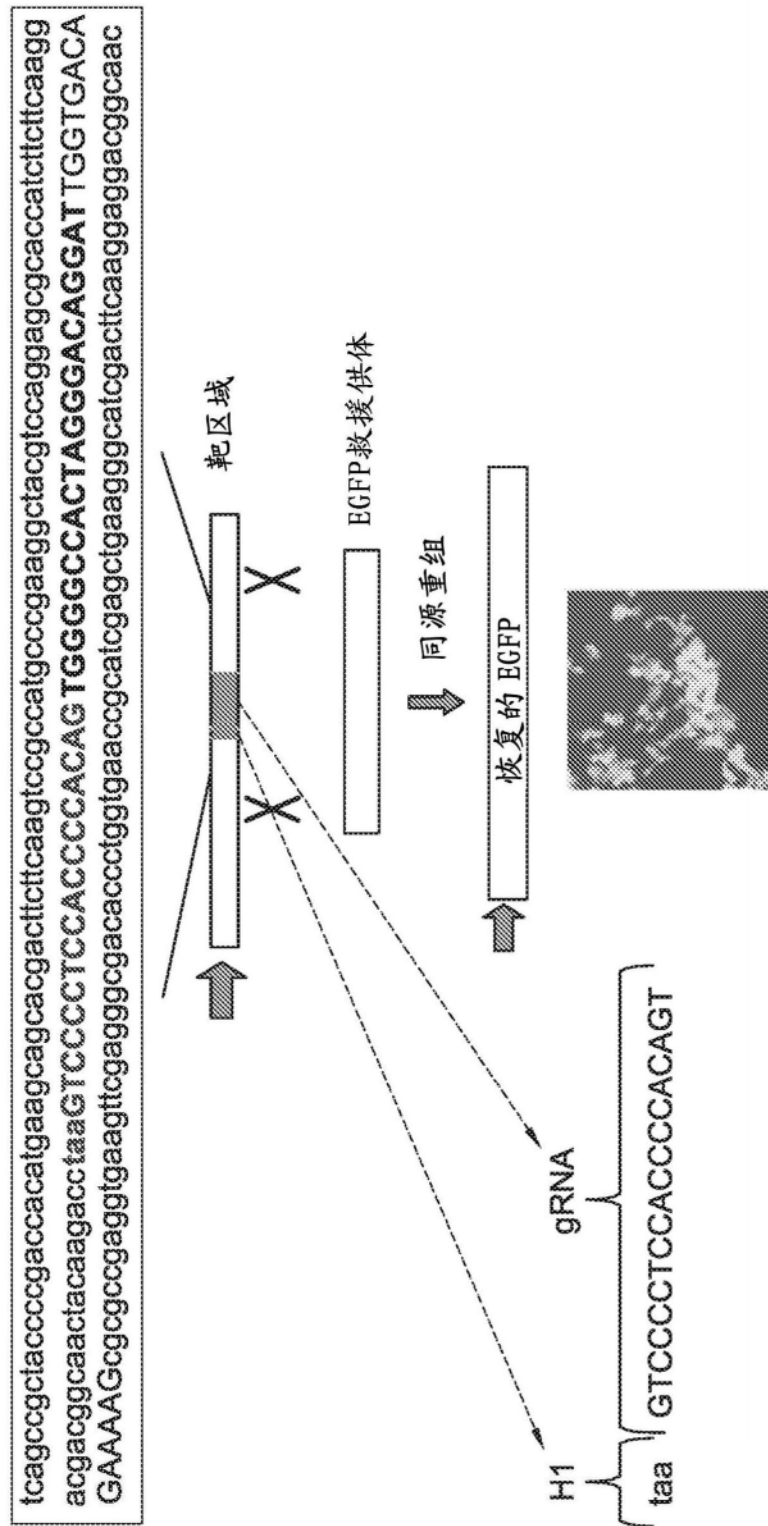


图1B

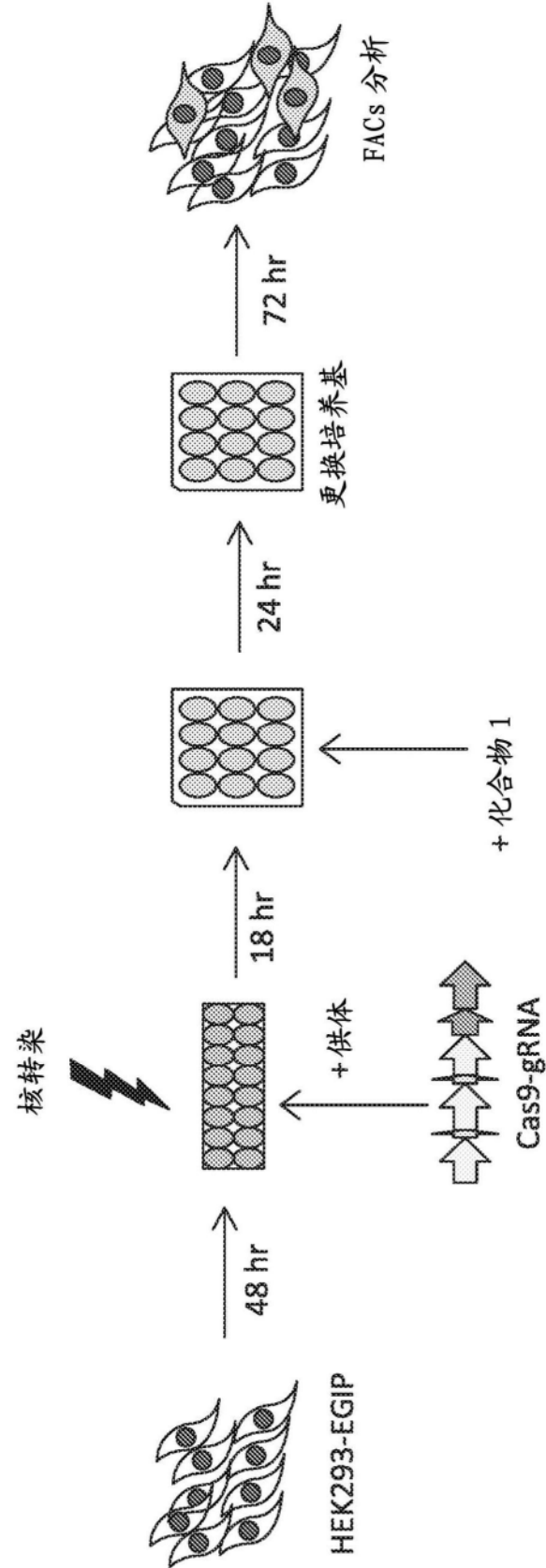


图1C