



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020013626-3 A2



(22) Data do Depósito: 16/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 01/12/2020

(54) **Título:** COMPOSTOS DE QUINOXALINONA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E KITS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE EDIÇÃO DE GENOMA

(51) **Int. Cl.:** C07D 403/12; C07D 405/14; C07D 241/44; C07D 491/048; C07D 498/08; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 17/01/2018 US 62/618,385.

(71) **Depositante(es):** VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED.

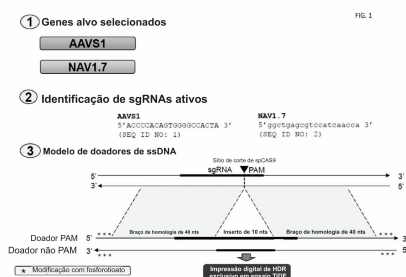
(72) **Inventor(es):** SUDIPTA MAHAJAN; MARC SAUL WEINBERG; DIEGO SEBASTIAN D'ASTOLFO; KEVIN M. COTTRELL; MARK A. MORRIS; JOHN PATRICK MAXWELL.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019013785 de 16/01/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/143677 de 25/07/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 02/07/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a compostos, métodos para editar uma região(ões) genômica(s) alvo, métodos para reparar uma quebra de DNA por uma via HDR, métodos para inibir ou suprimir o reparo de uma quebra de DNA por uma via NHEJ, e métodos para modificar a expressão de um gene(s) ou proteína(s) que compreendem administrar a uma ou mais células que incluem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um inibidor de Proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) descrito neste documento. Kits e composições para editar um gene alvo compreendem um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK aqui descritos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSTOS DE QUINOXALINONA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E KITS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE EDIÇÃO DE GENOMA"**.

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisória US. No. 62/618.385, depositado em 17 de janeiro de 2018, cujo conteúdo inteiro é aqui incorporado por referência.

Listagem de Sequencias

[002] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi enviada eletronicamente no formato ASCII e é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A cópia ASCII, criada em 16 de janeiro de 2019, é denominada 14390-687 Sequence Listing_ST25.txt e tem 4 KB de tamanho.

Campo da Invenção

[003] Esta invenção refere-se geralmente a compostos, composições, métodos e kits para aumentar a eficiência da edição de genoma, administrando um inibidor de Proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) e um sistema de edição de genoma a uma célula(s).

Antecedentes da Invenção

[004] São necessárias tecnologias precisas de direcionamento de genoma para permitir a engenharia sistemática de variações genéticas. O uso de sistemas de edição de genoma, especificamente a tecnologia de edição de genoma baseada em endonuclease CRISPR, cresceu exponencialmente nos últimos anos. O sistema imune inato bacteriano CRISPR-Cas9 do tipo II emergiu como uma ferramenta eficaz de edição de genoma para modificação dirigida do genoma humano (Wiedenheft, B. 2012; Hsu, P.D. et al. 2014). Recentemente, os sistemas de edição de genoma CRISPR-Cpf foram descritos. A edição do genoma baseado em endonuclease CRISPR depende, em parte, das vias de junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e de reparo

dirigido por homologia (HDR) para reparar as quebras em fita dupla do DNA. Os mecanismos de reparo celular favorecem NHEJ sobre HDR.

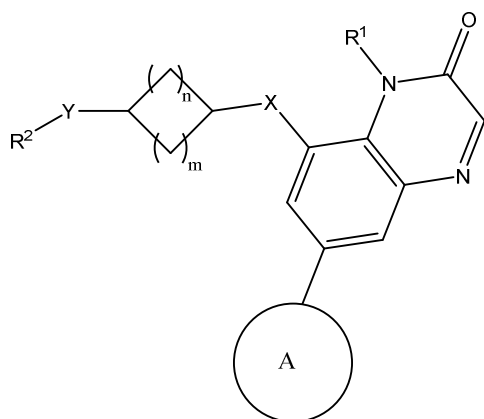
[005] Embora a obtenção de inserções ou exclusões (indels) de NHEJ seja até 70% eficaz em alguns relatórios, a eficiência de HDR permanece desafiadora, com taxas inferiores a 1%.

[006] Conseqüentemente, existe uma necessidade de aumentar a eficiência da edição do genoma, em particular a eficiência de HDR.

Sumário da Invenção

[007] A presente invenção pode melhorar a eficiência de HDR suprimindo enzimas NHEJ, tal como DNA-PK, usando inibidores de DNA-PK.

[008] Em algumas modalidades, a descrição fornece um composto representado pela Fórmula Estrutural (I):



(I), ou um sal farmacologicamente acei-

tável ou um co-cristal do mesmo.

[009] m e n são independentemente 1 ou 2.

[0010] X é O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila.

[0011] Y é uma ligação, O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila.

[0012] R¹ é C₁-C₄ alquila.

[0013] Um anel arila ou heteroarila de 5 ou 6 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S, em que o anel arila e heteroarila pode ser substituído por 0, 1, 2 ou 3 substituintes R³ selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, C₁-C₄-alquila, C₃-C₆ cicloalquila,

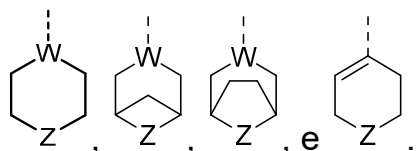
C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi, C₁-C₄ haloalcóxi, C(=O)NHR¹, e um anel heterocicloalquila ou heteroarila de 5 ou 6 membros em que cada anel contém 1, 2 ou 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O e S; em que R¹ é C₁-C₄ alquila; ou em que dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel arila ou heteroarila podem formar um anel de 5 ou 6 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S; ou COOR⁴ em que R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[0014] Cada C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi e C₁-C₄-haloalcóxi pode ainda ser substituído por OR⁵ ou NR⁶R⁷.

[0015] Cada um de R⁵, R⁶ e R⁷ é independentemente H, C₁-C₄ alquila ou C₃-C₆ cicloalquila.

[0016] R⁶ e R⁷ e o átomo de nitrogênio ao qual eles estão ligados podem formar um anel saturado de 5 ou 6 membros que pode conter 0 ou 1 heteroátomo adicional selecionado a partir de N, O e S e em que o anel pode ser ainda substituído por C₁-C₄ alquila.

[0017] O anel A é selecionado a partir do grupo que consiste em

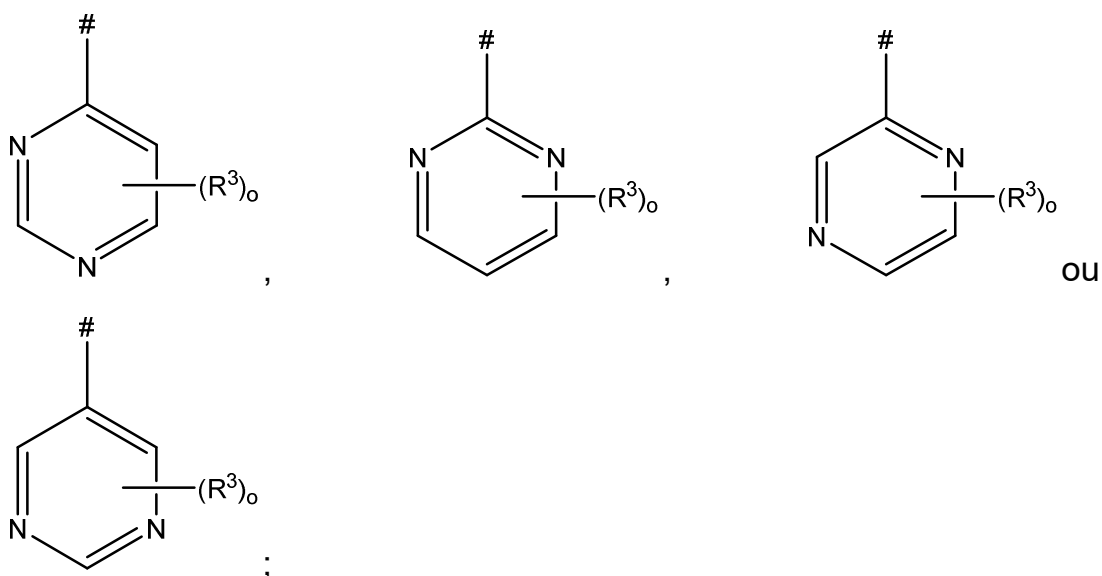


[0018] W é N ou CR³; e Z é O ou S; em que R³ é H ou C₁-C₄ alquila.

[0019] Em algumas modalidades, a descrição fornece um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo, em que R² é um anel aromático ou heteroaromático de 5 ou 6 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S, em que o anel aromático ou heteroaromático pode ser substituído por 0, 1 ou 2 substituintes R³ selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi, C₁-C₄ haloalcóxi e C(=O)NHR¹ em que R¹ é C₁-C₄

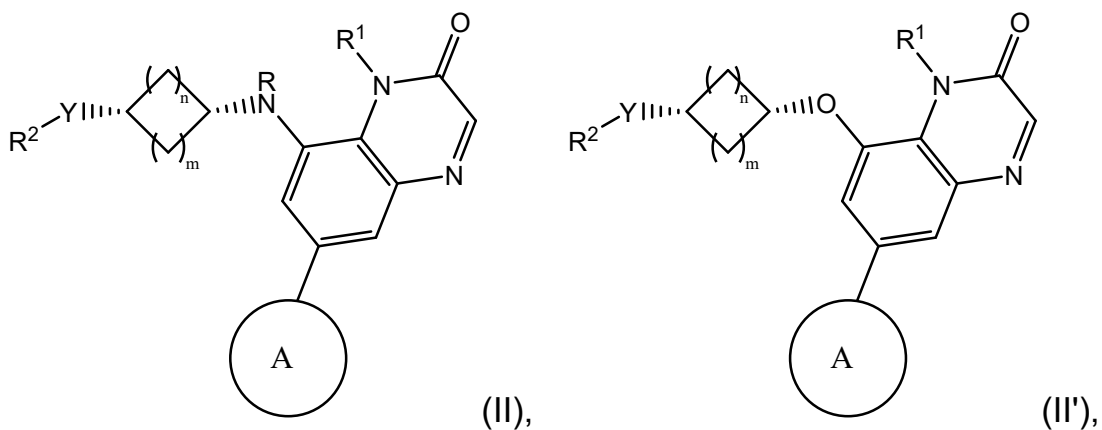
alquila; ou em que dois grupos R^3 conectados a átomos de carbono adjacentes do anel aromático ou heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S; ou $COOR^4$ em que R^4 é C_1 - C_4 alquila ou benzila.

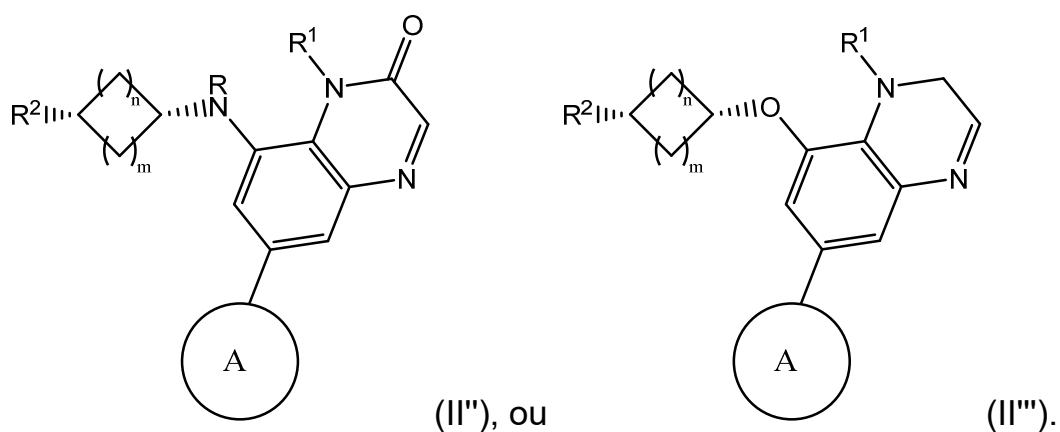
[0020] Em algumas modalidades, R^2 é:



em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (I); e o é 0, 1 ou 2.

[0021] Em algumas modalidades, o composto é representado pela Fórmula Estrutural (II), Fórmula Estrutural (II'), Fórmula Estrutural (II'') ou Fórmula Estrutural (II'''):

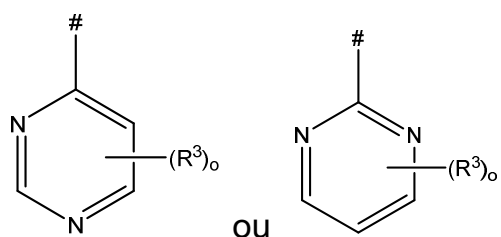




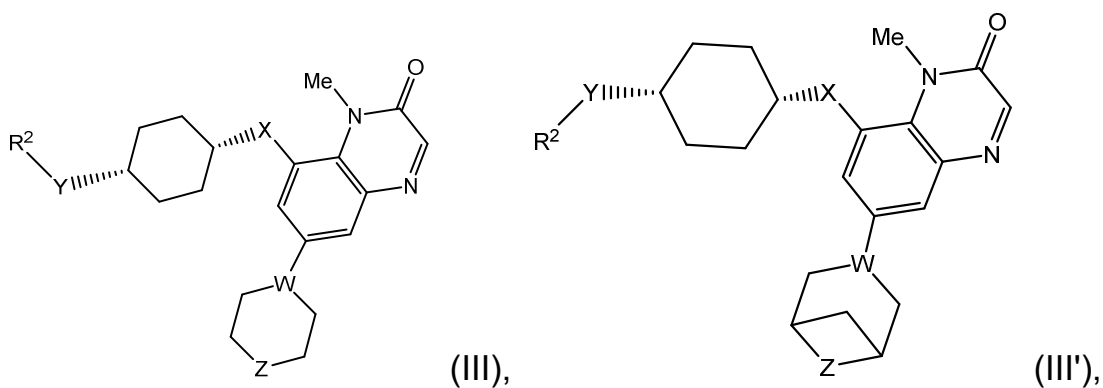
ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos ou seus co-cristais.

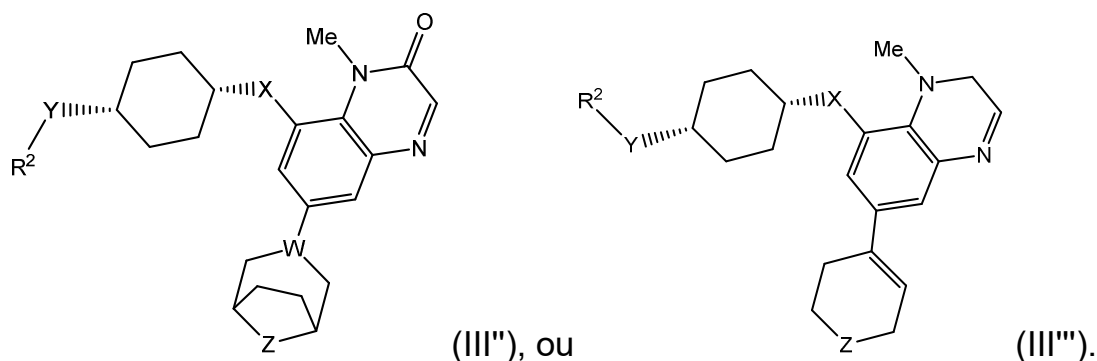
[0022] Em algumas modalidades, o Anel A é selecionado a partir

do grupo que consiste em , e R² é:

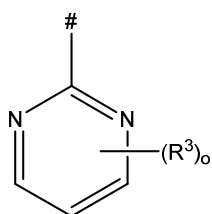
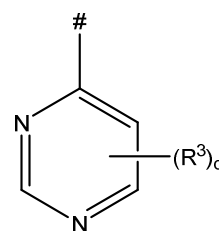


[0023] Em outras modalidades, o composto de fórmula (I) é representado pela fórmula estrutural (III), fórmula estrutural (III'), fórmula estrutural (III'') ou fórmula estrutural (III'''):





[0024] Em algumas modalidades, R^2 é:



[0025] Em algumas modalidades, o composto é um co-cristal que inclui um composto tendo uma estrutura de Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), e um formador de co-cristal selecionado a partir de ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico.

[0026] A descrição também fornece um método para editar uma ou mais regiões genômicas alvo, o método inclui administrar uma ou mais células que têm uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

[0027] Em algumas modalidades, a descrição fornece um método para editar uma ou mais regiões genômicas alvo, o método inclui administrar uma ou mais células que têm uma ou mais regiões genômi-

cas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

[0028] Em algumas modalidades, a descrição também fornece um método para reparar uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por meio de uma via de reparo dirigido por homologia (HDR), o método inclui administrar a uma ou mais células que têm uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

[0029] O sistema de edição de genoma interage com um ácido(s) nucleico(s) das regiões genômicas alvo, resultando em uma quebra de DNA, e em que a quebra de DNA é reparada pelo menos em parte por uma via HDR.

[0030] A descrição também fornece um método para inibir ou suprimir o reparo de uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por uma via NHEJ, o método inclui administrar uma ou mais células que têm uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

[0031] O sistema de edição de genoma interage com um ácido nucleico de uma ou mais regiões genômicas alvo, resultando em uma quebra de DNA, e em que o reparo da quebra de DNA por uma via NHEJ é inibido ou suprimido.

[0032] A descrição também fornece um método para modificar a expressão de um ou mais genes ou proteínas; o método inclui administrar uma ou mais células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

[0033] O sistema de edição de genoma interage com um ácido(s) nucleico(s) de uma ou mais regiões genômicas alvo de um gene(s) alvo, resultando na edição de uma ou mais regiões genômicas alvo e em que a edição modifica a expressão de um gene(s) a jusante e / ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo.

[0034] Em algumas modalidades, a quebra de DNA inclui uma quebra em fita dupla de DNA (DSB).

[0035] Em algumas modalidades, o composto é um co-cristal que inclui um composto com uma estrutura de Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), e um formador de co-cristal selecionado a partir de ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico.

Breve Descrição dos Desenhos

[0036] A Figura 1 representa o modelo dos ensaios de edição de genes.

[0037] A Figura 2 é um gráfico que mostra as taxas de edição de genes em BECs tratadas com um inibidor de DNA-PK.

[0038] As Figuras 3A e 3B são gráficos que mostram taxas de edição de genes após o tratamento com inibidor de DNA-PK em células CD34+ a partir de dois doadores diferentes.

[0039] A Figura 4 é um gráfico que mostra as taxas de edição de

genes em iPSCs tratadas com um inibidor de DNA-PK.

[0040] A Figura 5 é um gráfico que mostra a cinética de edição de genes em BECs no EC_{max} do inibidor de DNA-PK.

[0041] A Figura 6 é um gráfico que mostra a cinética de edição de genes em BECs no EC₅₀ do inibidor de DNA-PK.

[0042] A Figura 7 é um gráfico de barras que mostra as taxas de HDR para componentes de edição de genes entregues por transfecção mediada por lipídios em BECs.

Descrição Detalhada

[0043] A menos que definido de outra forma, os termos científicos e técnicos usados em conjunto com esta descrição devem ter os significados que são comumente entendidos pelos versados na técnica. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em conjunto com as técnicas de cultura de células e tecidos, biologia molecular e química de proteínas e oligo- ou polinucleotídeos e hibridização aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. As técnicas padrão são usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos, e cultura e transformação de tecidos (por exemplo, eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como comumente realizado na técnica ou como aqui descrito. As técnicas e procedimentos anteriores são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo desta descrição. Ver, por exemplo, Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). As nomenclaturas utilizadas em conjunto com, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem co-

nhecidas e comumente usadas na técnica. As técnicas padrão são usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, e entrega e tratamento de pacientes. Geralmente, os elementos químicos são identificados de acordo com a Tabela Periódica dos Elementos, versão CAS, e o Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. 1994. Além disso, os princípios gerais da química orgânica são descritos em "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, e "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª Ed., Smith, M.B. e March, J., eds. John Wiley & Sons, Nova Iorque: 2001, cujo conteúdo total é aqui incorporado por referência. Conforme utilizado de acordo com esta descrição, os termos definidos nesta descrição, a menos que indicado ao contrário, devem ser entendidos como tendo os significados aqui definidos.

[0044] Em algumas modalidades, a eficiência de editar as regiões genômicas alvo em uma ou mais células é aumentada em comparação com a de célula ou células idênticas, mas sem o composto.

[0045] Em algumas modalidades, a eficiência do reparo da quebra de DNA nas regiões genômicas alvo nas uma ou mais células por uma via HDR é aumentada em comparação com a célula ou células idênticas, mas sem o composto.

[0046] Em algumas modalidades, a eficiência de inibir ou suprimir o reparo da quebra de DNA nas regiões genômicas alvo nas uma ou mais células por uma via NHEJ é aumentada em comparação com a de células ou células idênticas, mas sem o composto.

[0047] Em algumas modalidades, a eficiência é aumentada em pelo menos 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou 100 vezes em comparação com célula ou células idênticas, mas sem composto.

[0048] Em algumas modalidades, a eficiência é medida pela frequência da integração de polinucleotídeos alvo. Em algumas modali-

dades, a eficiência é medida pela frequência da mutagênese dirigida. Em algumas modalidades, a mutagênese dirigida compreende mutações pontuais, deleções e / ou inserções.

[0049] Em algumas modalidades, a expressão de um gene(s) e / ou proteína(s) a jusante associado(s) ao(s) gene(s) alvo é aumentada em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração. Por exemplo, a dita expressão é aumentada em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração.

[0050] Em algumas modalidades, a expressão de um gene(s) e / ou proteína(s) a jusante associado(s) ao(s) gene(s) alvo é diminuída em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração. Por exemplo, a expressão do gene é diminuída em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, ou 99% em comparação com o nível de expressão de linha de base em uma ou mais células antes da administração.

[0051] Em algumas modalidades, a expressão de um gene(s) e / ou proteína(s) a jusante associado(s) ao(s) gene(s) alvo é substancialmente eliminada nas uma ou mais células.

[0052] Em algumas modalidades, a célula é sincronizada na fase do ciclo celular S ou G2.

[0053] Em algumas modalidades, as uma ou mais células que são administradas ou colocadas em contato com o dito composto aumentaram a sobrevivência em comparação com uma ou mais células que não foram administradas ou colocadas em contato com o dito composto.

[0054] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma

e o composto são administrados às, uma ou mais, células simultaneamente. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma e o composto são administrados às, uma ou mais, células sequencialmente. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é administrado às, uma ou mais, células antes do composto. Em algumas modalidades, o composto é administrado às, uma ou mais, células antes do sistema de edição de genoma.

[0055] Em algumas modalidades, as uma ou mais células são células cultivadas. Em algumas modalidades, as uma ou mais células são células *in vivo* dentro de um organismo. Em algumas modalidades, as uma ou mais células são células *ex vivo* a partir de um organismo.

[0056] Em algumas modalidades, o organismo é um mamífero. Em algumas modalidades, o organismo é um ser humano.

[0057] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma e o composto são administrados por uma mesma via. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma e o composto são administrados por uma via diferente. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é administrado por via intravenosa e o composto é administrado por via oral.

[0058] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é selecionado a partir de um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema de nuclease com efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR, ou um sistema baseado em NgAgo.

[0059] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em CRISPR. Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas ou um sistema CRISPR-Cpf.

[0060] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas e em que o sistema CRISPR-Cas inclui:

(a) pelo menos um elemento de RNA guia que inclui: (i) um RNA alvo que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos em uma ou mais regiões genômicas alvo ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; (ii) e um RNA ativador que inclui uma sequência de nucleotídeos capaz de hibridizar com o RNA alvo ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA ativador; e (b) um elemento de proteína Cas que inclui uma proteína Cas ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cas.

[0061] Em algumas modalidades, o RNA alvo e o RNA ativador são fusionados como uma molécula única.

[0062] Em algumas modalidades, a proteína Cas é uma proteína Cas9 do Tipo II. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é uma SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou D10A nickase, ou qualquer combinação das mesmas.

[0063] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cpf e o sistema CRISPR-Cpf inclui: (a) pelo menos um elemento de RNA guia ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o elemento de RNA guia, o RNA guia que inclui um RNA alvo que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos nas uma ou mais regiões genômicas alvo; e (b) um elemento da proteína Cpf que inclui uma proteína Cpf ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cpf.

[0064] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é entregue por um ou mais vetores.

[0065] Em algumas modalidades, os um ou mais vetores são selecionados a partir de vetores virais, plasmídeos ou ssDNAs.

[0066] Em algumas modalidades, os vetores virais são selecionados a partir de vetores retrovirais, lentivirais, adenovirais, adenoassociados e vetores virais herpes simplex.

[0067] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é entregue por RNA sintético.

[0068] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é entregue por uma nanoformulação.

[0069] Em algumas modalidades, é fornecido um kit ou composição para editar uma ou mais regiões genômicas alvo. Em algumas modalidades, o kit ou composição inclui um sistema de edição de genoma; e

um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo. Em algumas modalidades, o composto do kit ou composição é representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo, em que cada um de R¹ e R² é hidrogênio ou deutério.

[0070] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma do kit ou composição é um sistema baseado em meganucleases, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema de nuclease baseada em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR, ou sistema baseado em NgAgo. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma do kit ou composição é um sistema baseado em CRISPR. Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR do kit ou composição é um sistema CRISPR-Cas ou um sistema CRISPR-Cpf.

[0071] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR

do kit ou composição é um sistema CRISPR-Cas, e o sistema CRISPR-Cas inclui: (a) pelo menos um elemento de RNA guia que inclui: (i) um RNA alvo que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos em uma ou mais regiões genômicas alvo ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; (ii) e um RNA ativador que inclui uma sequência de nucleotídeos capaz de hibridizar com o RNA alvo, ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA ativador; e (b) um elemento de proteína Cas que inclui uma proteína Cas ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cas.

[0072] Em algumas modalidades, a proteína Cas do kit ou composição é uma proteína Cas9 do Tipo II. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 do kit ou composição é uma SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou D10A nickase ou qualquer combinação das mesmas.

[0073] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR do kit ou composição é um sistema CRISPR-Cpf, e o sistema CRISPR-Cpf inclui: (a) um RNA alvo que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos nas uma ou mais regiões genômicas alvo, ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; e (b) um elemento de proteína Cpf que inclui uma proteína Cpf ou um ácido nucleico que inclui uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cpf.

[0074] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma do kit ou composição é incluído ou empacotado em um ou mais vetores. Em algumas modalidades, os um ou mais vetores são selecionados a partir de vetores virais, plasmídeos ou ssDNAs. Em algumas modalidades, os vetores virais são selecionados a partir do grupo que

consiste em vetores retrovirais, lentivirais, adenovirais, adenoassociados e vetores virais herpes simplex.

[0075] Em algumas modalidades, o composto do kit ou composição compreende um composto selecionado a partir da Tabela 1.

[0076] Em algumas modalidades, o composto do kit ou composição é um co-cristal incluindo um composto com uma estrutura de Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), e um formador de co-cristal selecionado a partir de ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico.

[0077] Em algumas modalidades, o composto do kit ou composição é um co-cristal que inclui (a) um composto selecionado a partir da Tabela 1 e (b) ácido adípico.

[0078] Outras características, objetivos e vantagens da invenção são evidentes na descrição detalhada a seguir. Dever-se-ia entender, no entanto, que a descrição detalhada, embora indique modalidades e aspectos da invenção, é dada apenas a título de ilustração, e não limitação. Várias alterações e modificações dentro do escopo da invenção serão evidentes para os versados na técnica a partir da descrição detalhada.

[0079] Em algumas modalidades, esta descrição fornece métodos, composições e kits para editar um genoma alvo, por exemplo, corrigindo uma mutação. Tais métodos, composições e kits podem aumentar a eficiência da edição do genoma através do uso de um inibidor de DNA-PK.

[0080] Um sistema de edição de genoma pode estimular ou induzir uma quebra(s) de DNA, tal como DSB(s), no locus desejado no genoma (ou região genômica alvo). A criação da clivagem de DNA solicita que as enzimas celulares reparem o sítio da quebra através da via NHEJ propensa a erros ou através da via HDR sem erros. Em NHEJ, a

lesão do DNA é reparada pela fusão das duas extremidades da quebra de DNA em uma série de processos enzimáticos que envolvem o heterodímero Ku70/80 e as enzimas proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK). O mecanismo de reparo envolve amarrar e alinhar duas extremidades de DNA, ressecção, alongamento e ligação (Rouet e outros; Dexheimer T. DNA repair pathways and mechanisms. Em: Mathews L, Cabarcas S, Hurt E, editores. Dordrecht: Springer; 2013. pág. 19 a 32) resultando na formação de pequenas mutações de inserção ou deleção (indels) no sítio da quebra. Os indels introduzidos na sequência de codificação de um gene podem causar mutações prematuras no códon de parada ou no deslocamento de quadro que levam à produção de proteínas truncadas não funcionais. O mecanismo da via HDR é menos compreendido e envolve um conjunto diferente de proteínas de reparo, tal como Rad51, que estimulam a invasão de fitas por um modelo de reparo de doador para inserção de base ou substituição de genes. Portanto, o HDR permite a introdução de um modelo de DNA exógeno para fornecer o resultado desejado da edição de DNA dentro de um genoma e pode ser uma estratégia poderosa para modelagem de doenças tradicionais e edição terapêutica de genoma para restaurar a função do gene.

[0081] Das duas vias de reparo do DNA, a NHEJ ocorre com uma frequência muito mais alta e relatórios de mais de 70% de eficiência podem ser alcançados mesmo em neurônios (Swiech e outros, "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9", Nat Biotechnol. 2015 Jan; 33 (1): 102-62014). Entretanto, a correção do gene em HDR ocorre em frequência muito baixa e durante as fases S e G2, quando a replicação do DNA é concluída e as cromátides irmãs estão disponíveis para servir como modelos de reparo (Heyer e outros, Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annual Review of Genetics 44: 113 a 139, 2010). Como NHEJ ocorre

durante todo o ciclo celular, em competição e é favorecido por HDR durante as fases S e G2, a inserção dirigida através da via HDR permanece um desafio e um foco de estudos contínuos.

[0082] A proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) desempenha um papel em vários processos de reparo do DNA. A DNA-PK participa do reparo de quebra em fita dupla do DNA através da ativação da via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ). Acredita-se que a NHEJ proceda através de três etapas: reconhecimento dos DSBs, processamento de DNA para remover extremidades não ligáveis ou outras formas de danos nos terminais, e finalmente a ligação das extremidades do DNA. O reconhecimento do DSB é realizado pela ligação do heterodímero Ku às extremidades irregulares do DNA, seguido pelo recrutamento de duas moléculas da subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs ou DNA-PK) para os lados adjacentes do DSB; isso serve para proteger os terminais quebrados até que enzimas de processamento adicionais sejam recrutadas. Dados recentes suportam a hipótese de que DNA-PKcs fosforila a enzima de processamento, Artemis, e também a si mesma para preparar as extremidades do DNA para processamento adicional. Em alguns casos, a DNA polimerase pode ser necessária para sintetizar novas extremidades antes da etapa de ligação. Acredita-se que a autofosforilação de DNA-PKcs induza uma alteração conformacional que abre a cavidade central de ligação do DNA, libera DNA-PKcs do DNA, e facilita a re-ligação final das extremidades do DNA.

[0083] Em algumas modalidades, esta descrição fornece métodos, composições e kits para aprimorar a edição de genes, aumentando particularmente a eficiência do reparo de quebra(s) de DNA por uma via HDR, ou a eficiência de inibir ou suprimir o reparo de quebra(s) de DNA por uma via NHEJ, em sistemas de edição de genoma, incluindo reparo por HDR baseado em CRISPR em células. Embora não esteja

vinculado a uma teoria específica, acredita-se que um sistema de edição de genoma administrado a uma célula(s) interage com um ácido nucleico do gene alvo, resultando em ou causando uma quebra de DNA; essa quebra de DNA é reparada por várias vias de reparo, por exemplo, HDR, e um inibidor de DNA-PK administrado a uma célula inibe, bloqueia ou suprime uma via de reparo NHEJ, e a frequência ou eficiência da via de reparo de DNA HDR pode ser aumentada ou promovida.

[0084] A interação entre um sistema de edição de genoma e um ácido nucleico do gene alvo pode ser hibridização de pelo menos parte do sistema de edição de genoma com o ácido nucleico do gene alvo, ou qualquer outro reconhecimento do(s) ácido(s) nucleico(s) do gene alvo pelo sistema de edição de genes. Em algumas modalidades, essa interação é uma interação proteína-DNA ou hibridização entre pares de bases.

[0085] Em algumas modalidades, esta descrição fornece métodos para editar uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s), através de administrar à(s) célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK. A edição pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente. A edição de uma ou mais regiões genômicas alvo inclui qualquer tipo de manipulação genética ou engenharia do genoma de uma célula. Em algumas modalidades, a edição de uma ou mais regiões genômicas alvo pode incluir inserções, deleções ou substituições de regiões genômicas em uma célula(s). As regiões genômicas compreendem o material genético de uma célula(s), tal como DNA, RNA, polinucleotídeos e oligonucleotídeos. As regiões genômicas em uma célula(s) também compreendem os genomas das mitocôndrias ou cloroplastos contidos em uma célula(s).

[0086] Em algumas modalidades, as inserções, deleções ou substituições podem estar em uma região genômica codificante ou não co-

dificante, em regiões intrônicas ou exônicas, ou em qualquer combinação das mesmas, incluindo segmentos sobrepostos ou não sobrepostos. Como usado aqui, uma "região não codificante" refere-se a regiões genômicas que não codificam uma sequência de aminoácidos. Por exemplo, as regiões não codificantes incluem íntrons. As regiões codificantes se referem às regiões genômicas que codificam para uma sequência de aminoácidos. Por exemplo, as regiões codificantes incluem éxons.

[0087] Em algumas modalidades, a edição de uma ou mais regiões genômicas alvo pode ocorrer em qualquer uma ou mais regiões alvo em um genoma de uma célula(s). Em algumas modalidades, a edição de uma ou mais regiões genômicas alvo pode ocorrer, por exemplo, em um éxon, um íntron, um sítio de início da transcrição, em uma região promotora, uma região potenciadora, uma região silenciadora, uma região isolante, um anti-repressor, um elemento regulador pós-tradução, um sinal de poliadenilação (por exemplo, poli A mínimo), uma região conservada, um sítio de ligação ao fator de transcrição, ou qualquer combinação dos mesmos.

[0088] Em algumas modalidades, a administração a uma célula(s) com um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma resulta em maior eficiência de edição de genoma dirigida em comparação com condições em que um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula. Em algumas modalidades, a eficiência de edição aumentada é de cerca de 1 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou 100 vezes, em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma e não um inibidor de DNA-PK é administrado a uma célula. A

eficiência da edição de genoma pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por qualquer método que determine a frequência da integração de polinucleotídeos dirigida ou medindo-se a frequência da mutagênese dirigida. As integrações de polinucleotídeos dirigidas também podem resultar em alteração ou substituição de uma sequência em um genoma, cromossomo ou em uma região de interesse na cromatina celular. As integrações de polinucleotídeos dirigidas podem resultar em mutações dirigidas, incluindo, mas não limitadas a, mutações pontuais (ou seja, conversão de um único par de bases em um par de bases diferente), substituições (ou seja, conversão de uma pluralidade de pares de bases em uma sequência diferente de comprimento idêntico), inserções de um ou mais pares de bases, deleções de um ou mais pares de bases e qualquer combinação das alterações de sequências mencionadas acima.

[0089] Em algumas modalidades, os métodos de edição de uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s) envolvem administrar à(s) célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, a(s) célula(s) é sincronizada na fase do ciclo celular S ou G2. A sincronização da(s) célula(s) na fase do ciclo celular S ou G2 pode ser alcançada por qualquer método conhecido na técnica. Como um exemplo não limitante, os agentes que podem ser usados para sincronizar uma célula(s) na fase do ciclo celular S ou G2 incluem afidicolina, hidroxureia, lovastatina, mimosina, nocodazol, timidina ou qualquer combinação dos mesmos. (Ver, Lin e outros "Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery", *Elife*. 15 de dezembro de 2014; 3). Em algumas modalidades, os agentes para sincronização celular podem ser administrados a qualquer momento durante o processo de edição de genes. Em algumas modalidades, uma célula(s) pode ser sincronizada na fase S ou G2 do ciclo celular antes, durante

ou depois de administrar a uma célula um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK.

[0090] Em algumas modalidades, os métodos de edição de uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s), através de administrar à(s) célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK resultam em maior sobrevivência celular em comparação com condições em que um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK não foram administrados a uma célula(s) ou em comparação com condições em que apenas um sistema de edição de gene é colocado em contato ou administrado a uma célula(s) e não um inibidor de DNA-PK.

[0091] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para reparar uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por meio de uma via HDR. A administração a uma célula(s) de um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK resulta em uma quebra de DNA de uma região alvo do genoma, e a quebra de DNA é subsequentemente reparada, pelo menos em parte, por uma via HDR. Esses métodos resultam em quantidades aumentadas de reparo mediado por HDR (por exemplo, via HDR) em uma ou mais regiões genômicas alvo, resultando em maior eficiência do reparo mediado por HDR em comparação com as condições nas quais um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula(s). Em algumas modalidades, a eficiência do reparo mediado pela via HDR da quebra de DNA é de cerca de 1 vezes, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou 100 vezes, em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula(s) ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma e não um inibidor de DNA-PK é administrado a uma célula(s).

A eficiência do reparo mediado pela via HDR pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, determinando-se a frequência da integração de polinucleotídeos dirigida ou medindo-se a frequência da mutagênese dirigida.

[0092] Em algumas modalidades, os métodos aqui fornecidos reparam a quebra de DNA aumentando a eficiência da via HDR.

[0093] A via HDR pode ser "canônica" ou "alternativa". "HDR" (reparo dirigido por homologia) refere-se a uma forma especializada de reparo de DNA que ocorre, por exemplo, durante o reparo de quebras em fita dupla ou um "nick" de DNA em uma célula(s). O HDR das quebras em fita dupla é geralmente baseado na homologia da sequência de nucleotídeos, usa uma molécula "doadora" para moldar o reparo de uma molécula "alvo" (por exemplo, a que sofreu a quebra em fita dupla), e pode levar à transferência de informação genética do doador para o alvo. O HDR canônico de quebras em fita dupla é geralmente baseado em BRCA2 e RAD51 e normalmente emprega uma molécula doadora de dsDNA. HDR não canônico ou "alternativo" é um mecanismo de HDR suprimido pelos genes BRCA2, RAD51 e / ou genes relacionados à funcionalidade. HDR alternativo pode usar uma molécula doadora de ssDNA ou dsDNA "nicked". Ver, por exemplo, WO 2014172458.

[0094] Em algumas modalidades, os métodos de reparo de uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por uma via HDR, através de administrar à(s) célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK resultam em maior sobrevivência celular em comparação com as condições nas quais um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK não são administrados a uma célula ou em comparação com condições nas quais apenas um sistema de edição de gene é administrado a uma célula e não um inibidor de DNA-PK.

[0095] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para inibir ou suprimir o reparo mediado por NHEJ de uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s). Em algumas modalidades, a inibição ou supressão do reparo mediado por NHEJ de uma quebra de DNA é realizada inibindo-se ou suprimindo-se a via NHEJ. A via NHEJ pode ser clássica ("canônica") ou uma via NHEJ alternativa (alt-NHEJ, ou junção de extremidades mediada por micro-homologia (MMEJ)). A via NHEJ ou a via alt-NHEJ é suprimida em uma célula através de administrar a uma célula um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK.

[0096] A via de reparo NHEJ clássica é uma via de reparo de quebra em fita dupla de DNA, na qual as extremidades da quebra em fita dupla são ligadas sem homologia extensiva. O reparo NHEJ clássico usa vários fatores, incluindo heterodímero DNA KU70/80 (KU), XRCC4, Ligase IV, e subunidade catalítica de proteína quinases dependentes de DNA (DNA-PKcs). Alt-NHEJ é outra via para reparar quebras em fita dupla. Alt-NHEJ usa uma sequência micro-homóloga de 5 a 25 pares de bases durante o alinhamento das extremidades quebradas antes de uni-las. Alt-NHEJ é amplamente independente do heterodímero KU70/80 (KU), XRCC4, Ligase IV, subunidade catalítica da proteína quinases dependentes de DNA (DNA-PKcs), RAD52 e ERCC1. Ver, Bennardo e outros, "Alternative-NHEJ is a Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair", PLOS Genetics, 27 de junho de 2008.

[0097] Em algumas modalidades, os métodos para inibir ou suprimir reparo mediado por NHEJ de uma quebra de DNA pela via NHEJ em uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s) inibindo ou suprimindo a via NHEJ através de administrar a uma célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK resultam em eficiência aumentada de inibição ou supressão do reparo mediado por

NHEJ da quebra de DNA em comparação com uma célula(s) que não recebeu um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK, ou em comparação com uma condição em que uma célula(s) recebe um sistema de edição de genoma e não um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, a eficiência aumentada para inibir ou suprimir o reparo de uma quebra de DNA através da via NHEJ colocando em contato uma célula(s) com um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma é de aproximadamente 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou 100 vezes, em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula(s), ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma e não um inibidor de DNA-PK é administrado a uma célula(s). A eficiência de inibição ou supressão do reparo de uma quebra de DNA pela via NHEJ pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, determinando a frequência da integração de polinucleotídeos dirigida ou medindo a frequência da mutagênese dirigida.

[0098] Em algumas modalidades, os métodos para inibir ou suprimir reparo mediado por NHEJ de uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo em uma células(s) através da inibição ou supressão da via NHEJ através de administrar a uma célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK resultam em maior sobrevivência celular em comparação com condições em que um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK não entraram em contato ou não foram administrados a uma célula(s), ou em comparação com condições em que somente um sistema de edição de genes é colocado em contato ou administrado a uma célula(s) e não um inibidor de DNA-PK.

[0099] A quebra de DNA pode ser uma quebra em fita dupla (DSB)

ou duas quebras em fita simples (por exemplo, dois "nicks" de DNA). O DSB pode ter extremidade cega ou ter uma protusão 5' ou 3'; se as fitas estiverem separadas demais, as protusões continuarão a se anelar e existirão como dois "nicks", não um DSB.

[00100] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para modificar a expressão de um ou mais genes (um gene(s) alvo)) e / ou proteínas correspondentes ou a jusante, administrando a uma célula(s) um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma pode criar, por exemplo, inserções, deleções, substituições, modificações ou rompimentos em uma região genômica alvo de um gene(s) alvo da(s) célula(s), resultando na expressão modificada do(s) gene(s) alvo. Em algumas modalidades, a inserção, deleção, substituição, modificação ou rompimento podem resultar na expressão dirigida de uma proteína específica, ou grupo de proteínas, ou proteínas a jusante. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma pode criar inserções, deleções ou substituições em regiões não codificantes ou regiões codificantes. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma pode criar inserções, deleções, substituições, modificações ou rompimentos em uma região promotora, região potenciadora e / ou qualquer outro elemento regulador genético, incluindo um éxon, um íntron, um sítio de início da transcrição, uma região silenciadora, uma região isolante, um anti-repressor, um elemento regulador pós-tradução, um sinal de poliadenilação (por exemplo, poli A mínimo), uma região conservada, um sítio de ligação ao fator de transcrição, ou quaisquer combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma pode criar inserções, deleções, substituições, modificações ou rompimentos em mais de uma região alvo, simultaneamente ou sequencialmente. Em algumas modalidades, a administração a uma célula com um sistema de edição de genoma e um inibidor

de DNA-PK pode permitir a expressão de genes modificados dirigida na(s) célula(s). Essa expressão de genes modificados dirigida pode levar à expressão de proteínas específicas e proteínas a jusante.

[00101] Em algumas modalidades, a expressão de um gene e / ou proteína a jusante é aumentada em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma é administrado a uma célula e não um inibidor de DNA-PK.

[00102] Em algumas modalidades, a expressão gênica de um gene e / ou proteína a jusante diminui em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma é administrado a uma célula(s) e não um inibidor de DNA-PK.

[00103] A célula dos métodos aqui mencionados pode ser qualquer célula. Em algumas modalidades, a célula é uma célula de vertebrado. Em algumas modalidades, a célula de vertebrado é uma célula de mamífero. Em alguma modalidade, a célula de vertebrado é uma célula humana.

[00104] A célula pode ser qualquer tipo de célula em qualquer estágio do desenvolvimento. Em algumas modalidades, a célula pode ser uma célula diferenciada, uma célula-tronco totipotente, uma célula-tronco pluripotente, uma célula-tronco embrionária, uma célula germinativa embrionária, uma célula-tronco adulta, uma célula precursora, uma célula-tronco pluripotente induzida, ou qualquer combinação das

mesmas. Uma célula diferenciada é uma célula especializada que desempenha uma função específica em um tecido. Uma célula-tronco totipotente é uma célula não diferenciada de um embrião, feto ou adulto que pode se dividir por períodos prolongados e tem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula de qualquer uma das três camadas germinativas de um organismo. Uma célula-tronco pluripotente é uma célula não diferenciada de um embrião, feto ou adulto que pode se dividir por períodos prolongados e tem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula de um organismo, exceto tecido extraembrionário ou placenta. Uma célula-tronco embrionária é uma célula-tronco não diferenciada que é encontrada na massa celular interna de um embrião e tem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula de qualquer uma das três camadas germinativas. Uma célula germinativa embrionária é uma célula embrionária que pode dar origem a células reprodutivas, tal como espermatozoides ou óvulos. Uma célula-tronco adulta é uma célula não diferenciada encontrada em tecido diferenciado, capaz de se autorrenovar e pode se diferenciar em qualquer uma das células do tecido em que reside. Uma célula precursora ou progenitora é uma célula parcialmente diferenciada que tipicamente só pode se diferenciar em um tipo de célula (por exemplo, uma célula unipotente). Uma célula-tronco pluripotente induzida é um tipo de célula-tronco pluripotente que é gerada a partir de uma célula adulta diferenciada ou parcialmente diferenciada. Ver, por exemplo, WO 2010/017562.

[00105] Conforme usado neste documento, a forma singular "um", "uma" e "o", "a" incluem referências plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo suas misturas. Por exemplo, "uma ou mais células" e "uma célula(s)" são usadas aqui de forma intercambiável. Da mesma forma, "uma ou mais regiões genômicas al-

vo" e "uma região genômica alvo" são aqui utilizadas de forma intercambiável.

[00106] Os termos "aproximadamente" e "cerca de" são usados de forma intercambiável neste documento. O termo "aproximadamente" ou "cerca de", aplicado a um ou mais valores de interesse, refere-se a um valor semelhante a um valor de referência indicado. Em certas modalidades, o termo "aproximadamente" ou "cerca de" refere-se a um intervalo de valores que estão dentro de 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12 %, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ou menos em qualquer direção (maior ou menor que) do valor de referência indicado, a menos que indicado ao contrário ou evidente a partir do contexto (exceto quando esse número exceder 100% de um valor possível).

[00107] Os termos "polinucleotídeo", "nucleotídeo", "sequência de nucleotídeos", "ácido nucleico" e "oligonucleotídeo" são usados de forma intercambiável. Eles referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, desoxirribonucleotídeos (DNA) ou ribonucleotídeos (RNA), ou seus análogos. Os polinucleotídeos podem ter qualquer estrutura tridimensional e podem desempenhar qualquer função, conhecida ou desconhecida. A seguir, são apresentados exemplos não limitantes de polinucleotídeos: regiões codificantes ou não codificantes de um gene ou fragmento de gene, loci (locus) definidos a partir da análise de ligação, éxons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência, RNA ribossômico, RNA interferente curto (siRNA), RNA de alça curta (shRNA), micro-RNA (miRNA), ribozimas, cDNA, polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, plasmídeos, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico, e iniciadores. Um polinucleotídeo pode compreender um ou mais nucleotídeos modificados, tal como nucleotídeos metilados e análogos de nucleotí-

deos. Se presentes, modificações na estrutura do nucleotídeo podem ser transmitidas antes ou após a montagem do polímero. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeo. Um polinucleotídeo pode ser modificado adicionalmente após a polimerização, tal como por conjugação com um componente de marcação. O termo "ssDNA" significa uma molécula de DNA de fita simples. O termo "ssODN" significa oligodesoxinucleotídeos de fita simples.

[00108] O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" citado aqui inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" citado aqui inclui nucleotídeos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e similares. O termo "ligações oligonucleotídicas" citado aqui inclui ligações oligonucleotídicas tal como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato, fosforomidato e similares. Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador para detecção, se desejado.

[00109] O termo "RNA sintético" refere-se ao RNA que é manipulado ou que não ocorre naturalmente.

[00110] Como aqui utilizado, o termo "ocorrência natural" é um termo da técnica compreendido por pessoas versadas na técnica e significa a forma típica de um organismo, cepa, gene ou característica, uma vez que ocorre na natureza como distinto das formas mutantes ou variantes.

[00111] Os termos "ocorrência não natural" ou "manipulado" são usados de forma intercambiável e indicam o envolvimento da mão do homem. Os termos, quando se referem a moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeos, significam que a molécula de ácido nucleico ou o polipeptídeo está pelo menos substancialmente livre de pelo menos um outro componente com o qual eles estão naturalmente associados na natureza e como encontrados na natureza.

[00112] "Complementaridade" refere-se à capacidade de um ácido nucleico de formar ligações hidrogênio com outro ácido nucleico ou por Watson-Crick tradicional ou outros tipos não tradicionais. Uma complementaridade percentual indica a porcentagem de resíduos em uma molécula de ácido nucleico que pode formar ligações hidrogênio (por exemplo, pareamento de bases Watson-Crick) com uma segunda sequência de ácido nucleico (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% complementares). "Perfeitamente complementar" significa que todos os resíduos contíguos de uma sequência de ácido nucleico se ligarão ao hidrogênio com o mesmo número de resíduos contíguos em uma segunda sequência de ácido nucleico. "Substancialmente complementar", conforme usado aqui, refere-se a um grau de complementaridade que é pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% em uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ou mais nucleotídeos, ou refere-se a dois ácidos nucleicos que hibridizam sob condições rigorosas.

[00113] Como usado aqui, "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polinucleotídeo é transcrito a partir de um modelo de DNA (tal como em mRNA ou outro transcrito de RNA) e / ou o processo pelo qual um mRNA transcrito é subsequentemente traduzido em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Transcritos e polipeptídeos codificados podem ser coletivamente chamados de "produto gênico". Se o polinucleotídeo for derivado de DNA genômico, a expressão pode incluir o "splicing" do mRNA em uma célula eucariótica.

[00114] Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados aqui de forma intercambiável para se referir a polímeros de aminoácidos de qualquer comprimento. O polímero pode ser linear ou ramificado, pode compreender aminoácidos modificados, e pode ser interrompido por não aminoácidos. Os termos também abrangem um

polímero de aminoácido que foi modificado; por exemplo, formação de ligação dissulfeto, glicosilação, lipidação, acetilação, fosforilação ou qualquer outra manipulação, tal como conjugação com um componente de marcação. Como usado aqui, o termo "aminoácido" inclui aminoácidos naturais e / ou não naturais ou sintéticos, incluindo glicina e os isômeros ópticos D ou L, e análogos de aminoácidos e peptidomiméticos.

[00115] O termo "agente" é usado aqui para denotar um composto químico, uma molécula pequena, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato feito de materiais biológicos.

[00116] Os termos "indivíduo", "indivíduo" e "paciente" são usados de forma intercambiável aqui para se referir a um vertebrado, tal como um mamífero ou um ser humano. Os mamíferos incluem, entre outros, murinos, símios, humanos, animais de criação, animais de esporte, e animais de estimação.

[00117] Conforme usado neste documento, "tratamento" ou "tratando" ou "paliação" ou "melhora" são usados de forma intercambiável. Estes termos se referem a uma abordagem para fornecer resultados benéficos ou desejados, incluindo, mas não limitados a um benefício terapêutico e / ou um benefício profilático. Por benefício terapêutico entende-se qualquer melhora terapeuticamente relevante ou efeito sobre uma ou mais doenças, condições ou sintomas sob tratamento. Para benefício profilático, as composições podem ser administradas a um indivíduo em risco de desenvolver uma doença, condição ou sintoma específico, ou a um indivíduo que relata um ou mais dos sintomas fisiológicos de uma doença, mesmo que a doença, condição ou sintoma possa ainda não ter se manifestado. Estes termos também significam o tratamento de uma doença em um mamífero, por exemplo, em um ser humano, incluindo (a) inibir a doença, isto é, impedir ou prevenir

seu desenvolvimento; (b) aliviar a doença, isto é, causar regressão do estado da doença; ou (c) curar a doença.

[00118] O termo "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à quantidade de um agente que é suficiente para efetuar resultados benéficos ou desejados. A quantidade terapeuticamente eficaz pode variar dependendo de um ou mais de: o indivíduo e a condição da doença a ser tratada, o peso e a idade do indivíduo, a gravidade da condição da doença, o modo de administração e similares, que podem ser facilmente determinados por um versado na técnica. O termo também se aplica a uma dose que fornecerá uma imagem para detecção por qualquer um dos métodos de captura de imagem aqui descritos. A dose específica pode variar dependendo de um ou mais de: o agente particular escolhido, o regime de dosagem a ser seguido, se é administrado em combinação com outros compostos, o tempo de administração, o tecido a ser imageado, e o sistema de entrega física em que é transportado.

[00119] Como usado neste documento, "administrar" refere-se a contato, injeção, distribuição, entrega ou aplicação de um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK a uma célula ou um indivíduo. Em algumas modalidades, a administração é colocar em contato um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK com uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração é entregar um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK a uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração é aplicar um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK a uma célula. Em algumas modalidades, a administração é injetar um sistema de edição de genoma e / ou um inibidor de DNA-PK a uma célula. A administração pode ocorrer *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. A administração de um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK a uma célula(s) pode ser feita simultaneamente ou sequenci-

almente.

[00120] O termo "adquirido" em referência a uma condição ou doença aqui utilizada significa um distúrbio ou condição médica que se desenvolve de forma pós-fetal; em contraste com um distúrbio congênito, que está presente no nascimento. Um distúrbio congênito pode ser antecedente a um distúrbio adquirido.

[00121] Os termos condição ou doença "congênita" ou "hereditária" são um distúrbio genético encontrado no genoma de um indivíduo que está presente em um indivíduo ao nascer. O "genoma", conforme usado neste documento, inclui todo o material genético no núcleo e no citoplasma, e inclui ainda o genoma mitocondrial e o genoma ribossômico. O distúrbio congênito ou hereditário pode ser expresso a qualquer momento durante a vida do indivíduo, por exemplo, no nascimento ou na idade adulta.

[00122] O termo "distúrbio genético" ou "doença genética" inclui mutações hereditárias ou adquiridas no genoma de um indivíduo que causa ou pode causar doença.

[00123] Os termos "polimorfismos" ou "variações genéticas" significam diferentes formas de um gene em um locus genético.

[00124] Um "vetor viral" é definido como um vírus ou partícula viral produzida de forma recombinante que compreende um polinucleotídeo a ser entregue em uma célula hospedeira, *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Exemplos de vetores virais incluem vetores retrovirais, vetores adeno-virais, vetores de vírus adenoassociados, vetores adenovirais, vetores lentivirais, vetores virais de herpes simplex, vetores virais quiméricos e similares. Em algumas modalidades, onde a transferência de genes é mediada por um vetor retroviral, um construto de vetor refere-se ao polinucleotídeo que compreende o genoma retroviral ou parte dele.

[00125] Algumas modalidades da descrição referem-se a sistemas de vetores compreendendo um ou mais vetores, ou vetores como tais.

Os vetores podem ser projetados para expressão de transcritos de CRISPR (por exemplo, transcritos de ácidos nucleicos, proteínas ou enzimas) em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, os transcritos de CRISPR podem ser expressos em células de bactérias, tal como *Escherichia coli*, células de inseto (usando vetores de expressão de baculovírus), células de levedura, ou células de mamífero.

[00126] As células podem ser células primárias, células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), células-tronco embrionárias (hESCs), células-tronco adultas, células progenitoras ou linhagens celulares. As "células primárias" são células retiradas diretamente do tecido vivo e colocadas in vitro para crescimento. As células primárias têm poucas duplicações populacionais, e têm uma vida útil finita para duplicações populacionais in vitro. "Células-tronco", "células-tronco embrionárias" e "células-tronco pluripotentes induzidas" são células não especializadas e não diferenciadas, capazes de se autorrenovar e com potencial para se diferenciar em células de diferentes tipos com função especializada. "Linhagens celulares" incluem culturas de células derivadas de um tipo de célula ou de um conjunto de células do mesmo tipo que podem se proliferar indefinidamente. Exemplos não limitantes de linhagens celulares de mamíferos podem incluir células CD34, células 293, células HEK, células CHO, células BHK, células CV-1, células Jurkat, células HeLa ou quaisquer variantes das mesmas.

[00127] Em algumas modalidades, um vetor é capaz de dirigir a expressão de uma ou mais sequências em células de mamíferos usando um vetor de expressão em mamíferos. Exemplos de vetores de expressão em mamíferos incluem pCDM8 e pMT2PC. Quando utilizadas em células de mamíferos, as funções de controle do vetor de expressão são normalmente fornecidas por um ou mais elementos reguladores. Por exemplo, os promotores comumente usados são derivados de polioma, adenovírus 2, citomegalovírus, vírus símio 40, e outros des-

critos aqui e conhecidos na técnica. Outros promotores podem incluir, por exemplo, promotor EF1 ou promotor alfa EF1. Para outros sistemas de expressão adequados para células procarióticas e eucarióticas, ver, por exemplo, os capítulos 16 e 17 de Sambrook, e outros, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989.

[00128] Como usado aqui, os termos "etiqueta" ou "marcado" se referem à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, pela incorporação de um aminoácido radiomarcado ou pela conexão a um polipeptídeo de porções biotinila que podem ser detectadas pela avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou calorimétricos). Em certas situações, a etiqueta ou marcador também pode ser terapêutica. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser utilizados. Exemplos de etiquetas para polipeptídeos incluem, entre outras, radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, lantanídeo fósforo), etiquetas enzimáticas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, p-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), grupos quimioluminescentes, biotinila, epítopos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de zíperes de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metais, marcadores de epítipo). Em algumas modalidades, as etiquetas são acopladas por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o potencial de impedimento estérico. O termo "agente farmacêutico ou fármaco", conforme aqui utilizado, refere-se a um composto ou composição química capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando ad-

ministrado adequadamente a um paciente.

[00129] Como aqui utilizado, "substancialmente puro" significa que uma espécie em questão é a espécie predominante presente (isto é, em uma base molar é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição). Em algumas modalidades, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie em questão compreende pelo menos cerca de 50% (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

[00130] Geralmente, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição. Em algumas modalidades, uma composição substancialmente pura compreende mais de cerca de 85%, 90%, 95% e 99% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição. Em algumas modalidades, a espécie em questão é purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não são detectadas na composição por métodos de detecção convencionais), em que a composição consiste essencialmente de uma única espécie macromolecular.

Sistema de Edição de Genoma

[00131] Vários tipos de sistemas de engenharia de genoma podem ser usados. Os termos "sistema de edição de genoma", "sistema de edição de genes" e similares, são usados de forma intercambiável neste documento e se referem a um sistema ou tecnologia que edita um gene alvo ou a função ou expressão do mesmo. Um sistema de edição de genoma compreende: pelo menos um componente de endonuclease, permitindo a clivagem de uma região(ões) genômica(s) alvo (ou sequência(s) alvo); e pelo menos um elemento de direcionamento de genoma que leva o componente de endonuclease para uma região(ões) genômica(s) alvo ou tem como alvo essa região(ões) genômica(s) alvo. Exemplos de elemento de direcionamento de genoma in-

cluem um domínio de ligação ao DNA (por exemplo, proteína de ligação ao DNA dedo de zinco ou um domínio de ligação ao DNA TALE), elementos de RNA guia (por exemplo, RNA guia CRISPR), e elementos de DNA guia (por exemplo, DNA guia NgAgo). Os elementos programáveis de direcionamento de genoma e endonucleases permitem a edição precisa do genoma, introduzindo quebras de DNA, tal como quebras em fita dupla (DSBs) em loci genômicos específicos. As DSBs subsequentemente recrutam máquinas de reparo endógenas para junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR) ao sítio da DSB para mediar a edição do genoma. O "componente de endonuclease" compreende uma endonuclease ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica essa endonuclease.

[00132] O termo "endonuclease" refere-se a qualquer enzima de ocorrência natural, mutante, variante ou manipulada capaz de catalisar a hidrólise (clivagem) de uma ligação entre ácidos nucleicos dentro de uma molécula de DNA ou RNA. As endonucleases podem reconhecer e clivar uma molécula de DNA ou RNA em suas regiões genômicas alvo. Exemplos de endonucleases incluem uma endonuclease teleguiada; enzima de restrição tal como FokI; uma nuclease quimérica dedo de zinco (ZFN) resultante da fusão de domínios dedo de zinco manipulados com o domínio catalítico de uma enzima de restrição tal como FokI; enzimas Cas, e enzimas Cpf. As endonucleases químicas nas quais um clivante químico ou peptídico é conjugado a um polímero de ácidos nucleicos ou a outro DNA que reconhece uma sequência alvo específica, dirigindo assim a atividade de clivagem a uma sequência específica, estão compreendidas no termo "endonuclease". Exemplos de enonucleases químicas incluem nucleases sintéticas como conjugados de ortofenantrolina, uma molécula de clivagem de DNA, e oligonucleotídeos formadores de triplex (TFOs).

[00133] Por "variante", entende-se uma proteína recombinante obtida pela substituição de pelo menos um resíduo na sequência de aminoácidos da proteína de origem por um aminoácido diferente.

[00134] Em algumas modalidades, endonucleases tal como ZFNs, TALENs e / ou meganucleases compreendem um domínio de clivagem e / ou meio-domínio de clivagem. O domínio de clivagem pode ser homólogo ou heterólogo ao domínio de ligação ao DNA. Por exemplo, um domínio de ligação ao DNA do dedo de zinco e um domínio de clivagem de uma nuclease ou um domínio de ligação ao DNA de meganuclease e um domínio de clivagem de uma nuclease diferente podem ser usados. Domínios de clivagem heterólogos podem ser obtidos a partir de qualquer endonuclease ou exonuclease. Endonucleases exemplificativas das quais um domínio de clivagem pode ser derivado incluem, mas não estão limitadas a, endonucleases de restrição e endonucleases teleguiadas. Ver, por exemplo, WO 2013/130824. Enzimas adicionais que clivam o DNA são conhecidas (por exemplo, Nuclease S1; nuclease de feijão-mungo; DNase I pancreática; nuclease microcócica; endonuclease HO de levedura; ver também Linn e outros (Eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Uma ou mais dessas enzimas (ou seus fragmentos funcionais) podem ser usadas como fonte de domínios de clivagem e meio-domínios de clivagem.

[00135] Um meio-domínio de clivagem pode ser derivado de qualquer nuclease ou porção da mesma, como estabelecido acima, que requer dimerização para a atividade de clivagem. Em algumas modalidades, são necessárias duas proteínas de fusão para a clivagem se as proteínas de fusão compreenderem meio-domínios de clivagem. Em algumas modalidades, uma única proteína compreendendo dois meio-domínios de clivagem pode ser usada. Em algumas modalidades, os dois meio-domínios de clivagem podem ser derivados da mesma en-

donuclease (ou seus fragmentos funcionais). Em algumas modalidades, cada meio-domínio de clivagem pode ser derivado de uma endonuclease diferente (ou seus fragmentos funcionais). Além disso, os sítios alvo para as duas proteínas de fusão são preferencialmente dispostos, um em relação ao outro, de modo que a ligação das duas proteínas de fusão aos seus respectivos sítios alvo coloca os meio-domínios de clivagem em uma orientação espacial um com o outro, o que permite que os meio-domínios de clivagem formem um domínio de clivagem funcional, por exemplo, por dimerização. Assim, em certas modalidades, as bordas próximas dos sítios alvo são separadas por 5 a 50 nucleotídeos, 5 a 8 nucleotídeos ou por 15 a 18 nucleotídeos. Nota-se que qualquer número integral de nucleotídeos ou pares de nucleotídeos pode estar entre dois sítios alvo (por exemplo, de 2 a 50 pares de nucleotídeos ou mais). Em algumas modalidades, o sítio de clivagem fica entre os sítios alvo.

[00136] As endonucleases de restrição (enzimas de restrição) estão presentes em muitas espécies e são capazes de ligação sequênciaspecífica ao DNA (em um sítio de reconhecimento) e clivagem de DNA em ou próximo ao sítio de ligação. Certas enzimas de restrição (por exemplo, Tipo IIS) clivam o DNA em sítios removidos do sítio de reconhecimento e têm domínios de ligação e clivagem separáveis. Por exemplo, a enzima Tipo IIS Fok I catalisa a clivagem do DNA de fita dupla. Ver, por exemplo, as patentes US 5.356.802, 5.436.150 e 5.487.994; assim como Li e outros (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4275 a 4279; Li e outros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2764 a 2768; Kim e outros (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 883 a 887; Kim e outros (1994b) J. Biol. Chem. 269: 31.978 a 31.982.

[00137] Em algumas modalidades, o componente de endonuclease compreende uma proteína(s) de fusão que inclui um domínio de clivagem (ou meio-domínio de clivagem) de pelo menos uma enzima de

restrição Tipo IIS e um ou mais domínios de ligação dedo de zinco, que podem ou não ser manipulados. Uma enzima de restrição exemplificativa do tipo IIS, cujo domínio de clivagem é separável do domínio de ligação, é Fok I. Essa enzima particular é ativa como um dímero. Bitinaite e outros (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10.570 a 10.575. A porção da enzima Fok I usada em tais proteínas de fusão é considerada um meio-domínio de clivagem. Assim, para a clivagem de fita dupla dirigida e / ou substituição dirigida de sequências celulares usando fusões de dedo de zinco ou TALE-Fok I, duas proteínas de fusão, cada uma compreendendo um meio-domínio de clivagem FokI, podem ser usadas para reconstituir um domínio de clivagem cataliticamente ativo. Alternativamente, uma única molécula de polipeptídeo contendo um domínio de ligação dedo de zinco e dois meio-domínios de clivagem de Fok I também podem ser utilizados.

[00138] As enzimas de restrição do tipo IIS exemplificativas são descritas na Publicação Internacional WO 07/014275, aqui incorporada em sua totalidade. Enzimas de restrição adicionais também contêm domínios de ligação e clivagem separáveis, e estas são consideradas pela descrição. Ver, por exemplo, Roberts e outros (2003) Nucleic Acids Res. 31: 418 a 420.

[00139] Em certas modalidades, o domínio de clivagem compreende um ou mais meio-domínios de clivagem manipulados (também chamados de mutantes do domínio de dimerização) que minimizam ou impedem a homodimerização, como descrito, por exemplo, nas Publicações de Patente US Nos. 20050064474 e 20060188987 e WO 2013/130824. Exemplos de meio-domínios de clivagem manipulados de Fok I que formam heterodímeros obrigatórios incluem um par no qual um primeiro meio-domínio de clivagem inclui mutações nos resíduos de aminoácidos nas posições 490 e 538 de Fok I e um segundo meio-domínio de clivagem inclui mutações nos resíduos de aminoáci-

do 486 e 499. Ver, por exemplo, a Publicação de Patente US No. 2008/0131962 e 2011/0201055. Os meio-domínios de clivagem manipulados aqui descritos podem ser preparados usando qualquer método adequado, por exemplo, por mutagênese sítio-dirigida de meio-domínios de clivagem de ocorrência natural (Fok I), como descrito nas Publicações de Patente U.S. Nos. 20050064474 e 20080131962.

[00140] O termo "editar", "edições", "edição" e similares se referem a qualquer tipo de manipulação, alteração, modificação ou modulação (em cada caso que inclui, mas não está limitado a, por meio de nocaute genético, marcação de genes, rompimento de genes, mutação de genes, inserção de genes, deleção de genes, ativação de genes, silenciamento de genes ou inserção de genes).

[00141] Como usado neste documento, "modificação genética", "edição de genoma", "modificação de genoma", "modificação de gene" e "edição de gene", referem-se a qualquer adição, deleção, nocaute, marcação, mutação, ativação, silenciamento, modificação e / ou rompimento aos nucleotídeos de uma célula. A célula neste contexto pode ser *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

[00142] Por "região genômica alvo", "gene alvo", "alvo de DNA", "sequência alvo de DNA", "sequência alvo", "sequência de nucleotídeos alvo", "sítio alvo", "alvo", "sítio de interesse", "sítio de reconhecimento", "sítio de reconhecimento de polinucleotídeo", "sequência de reconhecimento", "sítio de clivagem" entende-se uma sequência de polinucleotídeo que é reconhecida e clivada por um sistema de edição de genoma. Estes termos referem-se a uma localização distinta de DNA, preferencialmente uma localização genômica, na qual uma quebra de DNA (clivagem) deve ser induzida pelo sistema de edição do genoma.

[00143] A edição mencionada acima, incluindo manipulação, alteração, modificação e modulação, pode ocorrer simultaneamente ou se-

quencialmente. Qualquer sistema de edição de genoma conhecido na técnica pode ser usado. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema baseado em nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR, ou sistema baseado em NgAgo.

[00144] Baseado em meganuclease, baseado em ZFN e baseado em TALEN, cada um compreende pelo menos um domínio de ligação ao DNA ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de ácido nucleico que codifica o domínio de ligação a DNA, e alcança direcionamento ou reconhecimento específico de um região(ões) genômica(s) alvo através de interações proteína-DNA. Um sistema baseado em CRISPR compreende pelo menos um elemento de RNA guia ou um ácido nucleico que compreende uma sequência(s) de ácidos nucleicos codificando o elemento de RNA guia e alcança direcionamento ou reconhecimento específico de uma região genômica alvo via pares de bases diretamente com o DNA da(s) região(ões) genômica(s) alvo. Um sistema baseado em NgAgo compreende pelo menos um elemento de DNA guia ou um ácido nucleico que compreende uma sequência(s) de ácido nucleico que codifica o elemento de DNA guia e atinge direcionamento ou reconhecimento específico de uma região genômica alvo por pares de bases diretamente com o DNA da(s) região(ões) genômica(s) alvo.

[00145] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em meganuclease. Um sistema baseado em meganuclease emprega meganucleases que são endonucleases com grandes sítios de reconhecimento (> 14 pb), e seus domínios de ligação ao DNA também são responsáveis pela clivagem das sequências alvo. O domínio de ligação ao DNA das meganucleases pode ter uma

sequência alvo de DNA de fita dupla de 12 a 45 pb. Em algumas modalidades, a meganuclease é uma enzima dimérica, em que cada domínio de meganuclease está em um monômero, ou uma enzima monomérica compreendendo os dois domínios em um único polipeptídeo. Não apenas as meganucleases de ocorrência natural, mas também várias variantes de meganucleases foram geradas pela manipulação de proteínas para cobrir uma miríade de combinações únicas de sequências. Em algumas modalidades, meganucleases quiméricas com um sítio de reconhecimento composto por um meio-sítio de meganuclease A e um meio-sítio de proteína B também podem ser usadas. Exemplos específicos de tais meganucleases quiméricas compreendendo os domínios proteicos de I-Dmol e I-Crel. Exemplos de meganucleases incluem endonucleases teleguiadas da família LAGLIDADG.

[00146] A meganuclease LAGLIDADG pode ser I-SceI, I-ChuI, I-CreI, I-CsmI, PI-SceI, PI-TliI, PI-MtuI, I-CeuI, I-SceII, I-SceIII, HO, PI-CivI, PI-CtrI, PI-AaeI, PI-BsuI, PI-DhaI, PI-DraI, PI-MavI, PI-MchI, PI-MfuI, PI-MfiI, PI-MgaI, PI-MgoI, PI-MinI, PI-MkaI, PI-MleI, PI-MmaI, PI-MshI, PI-MsmI, PI-MthI, PI-MtuI, PI-MxeI, PI-NpuI, PI-PfuI, PI-RmaI, PI-SpbI, PI-SspI, PI-FacI, PI-MjaI, PI-PhiI, PI-TaqI, PI-ThyI, PI-TkoI, PI-TspI ou I-MsoI; ou pode ser um mutante funcional ou uma variante do mesmo, seja homodimérico, heterodimérico ou monomérico. Em algumas modalidades, a meganuclease de LAGLIDADG é um derivado de I-CreI. Em algumas modalidades, a meganuclease LAGLIDADG compartilha pelo menos 80% de similaridade com a meganuclease I-CreI LAGLIDADG natural. Em algumas modalidades, a meganuclease LAGLIDADG compartilha pelo menos 80% de similaridade com os resíduos 1-152 da meganuclease I-CreI LAGLIDADG natural. Em algumas modalidades, a meganuclease de LAGLIDADG pode consistir de dois monômeros que compartilham pelo menos 80% de similaridade

com os resíduos 1-152 da meganuclease natural de I-CreI LAGLIDADG ligados entre si, com ou sem um peptídeo de ligação.

[00147] A "meganuclease LAGLIDADG" refere-se a uma endonuclease teleguiada da família LAGLIDADG, conforme definido por Stoddard e outros (Stoddard, 2005), ou uma variante manipulada que compreende um polipeptídeo que compartilha pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% de identidade ou mais ou similaridade com a dita endonuclease teleguiada natural. Tais meganucleases LAGLIDADG manipuladas podem ser derivadas de meganucleases monoméricas ou diméricas. Quando derivadas de meganucleases diméricas, essas meganucleases LAGLIDADG manipuladas podem ser endonucleases de cadeia única ou diméricas.

[00148] Por "I-CreI" entende-se a meganuclease natural de ocorrência natural I-CreI com a sequência do código de acesso pdb 1g9y. As funções de reconhecimento e clivagem de DNA de meganucleases geralmente estão entrelaçadas em um único domínio. Ao contrário das meganucleases, os domínios de ligação ao DNA dos sistemas baseados em ZFN e baseados em TALEN são distintos da endonuclease para a função de clivagem. O sistema baseado em ZFN compreende: pelo menos uma proteína dedo de zinco ou uma variante da mesma, ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codificam a proteína dedo de zinco ou variante da mesma como seu domínio de ligação ao DNA; e um elemento de endonuclease, tal como nuclease dedo de zinco (ZFN) ou domínio de clivagem FokI. A proteína dedo de zinco (ZFP) não ocorre naturalmente, pois é manipulada para se ligar a um sítio alvo de escolha. Ver, por exemplo, Beerli e outros (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 135 a 141; Pabo e outros (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70: 313 a 340; Isalan e outros (2001) *Nature Biotechnol.* 19: 656 a 660; Segal e outros (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632 a 637; Choo e outros (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.*

10: 411 a 416; Patentes U.S. Nos. 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; e Publicações de Patentes U.S Nos. 2005/0064474, 2007/0218528, 2005/0267061.

[00149] Um domínio de ligação dedo de zinco manipulado pode ter uma nova especificidade de ligação, em comparação com uma proteína dedo de zinco de ocorrência natural. Os métodos de manipulação incluem, entre outros, design racional e vários tipos de seleção. O design racional inclui, por exemplo, o uso de bancos de dados compreendendo sequências de nucleotídeos tripletos (ou quadrupletos) e sequências individuais de aminoácidos dedos de zinco, nas quais cada sequência de nucleotídeos tripleto ou quadrupeto está associada a uma ou mais sequências de aminoácidos dedos de zinco que se ligam ao tripleto ou quadrupeto particular. Ver, por exemplo, as Patentes US. Nos. 6.453.242 e 6.534.261, de copropriedade, incorporadas por referência aqui em sua totalidade.

[00150] Vários tipos de métodos de seleção podem ser usados com os métodos aqui citados. Métodos de seleção exemplificativos, incluindo exibição de fagos e sistemas de dois híbridos, são descritos nas Patentes US 5.789.538, 5.925.523, 6.007.988, 6.013.453, 6.410.248, 6.140.466, 6.200.759, e 6.242.568, bem como WO 98/37186, WO 98/53057, WO 00/27878, WO 01/88197 e GB 2.338.237. Além disso, o aprimoramento da especificidade de ligação para domínios de ligação dedo de zinco foi descrito, por exemplo, no documento WO 02/077227. Além disso, conforme descrito nestas e outras referências, os domínios dedo de zinco e / ou proteínas dedo de zinco com vários dedos podem ser ligados entre si usando quaisquer sequências ligantes adequadas, incluindo, por exemplo, ligantes de 5 ou mais aminoácidos de comprimento. Ver também as Patentes U.S. Nos. 6.479.626, 6.903.185, e 7.153.949 para sequências ligantes exemplificativas de 6

ou mais aminoácidos de comprimento. As proteínas aqui descritas podem incluir qualquer combinação de ligantes adequados entre os dedos de zinco individuais da proteína. A seleção de sítios alvo; ZFPs e métodos para o projeto e a construção de proteínas de fusão (e polinucleotídeos que os codificam) são conhecidos dos versados na técnica e descritos em detalhes nas Patentes U.S. Nos. 6.140.0815, 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, e WO 03/016496.

[00151] Além disso, conforme descrito nestas e em outras referências, os domínios dedos de zinco e / ou proteínas dedos de zinco com vários dedos podem ser ligados entre si usando quaisquer sequências de ligação adequadas, incluindo, por exemplo, ligantes de 5 ou mais aminoácidos de comprimento. Ver também as Patentes U.S. Nos. 6.479.626, 6.903.185, e 7.153.949 para sequências ligantes exemplificativas de 6 ou mais aminoácidos de comprimento. As proteínas aqui descritas podem incluir qualquer combinação de ligantes adequados entre os dedos de zinco individuais da proteína.

[00152] Um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN) refere-se a um sistema de edição de genoma que emprega um ou mais domínios de ligação de Efetores tipo ativador de transcrição (TALE) - DNA de e um elemento de endonuclease, tal como o domínio de clivagem Fok1. O domínio de ligação TALE - DNA compreende uma ou mais unidades de repetição TALE, cada uma tendo 30-38 (tal como 31, 32, 33, 34, 35 ou 36) aminoácidos de comprimento. O domínio de ligação TALE - DNA pode empregar uma proteína TALE de comprimento total ou fragmento da mesma, ou uma variante da mesma. O domínio de ligação TALE - DNA pode ser fusi-

onado ou ligado ao domínio da endonuclease por um ligante.

[00153] Os termos "sistema baseado em CRISPR", "sistema de edição de genes baseado em CRISPR", "edição de genoma - CRISPR", "edição de gene - CRISPR", "edição de genoma baseado em endonuclease CRISPR" e similares são usados aqui de forma intercambiável, e coletivamente se referem a um sistema de edição de genoma que compreende um ou mais elementos de RNA guia; e um ou mais elementos de endonuclease guiados por RNA. O elemento de RNA guia compreende um RNA alvo compreendendo uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos em uma ou mais regiões genômicas alvo ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de nucleotídeo que codifica o RNA alvo. O elemento de endonuclease guiado por RNA compreende uma endonuclease que é guiada ou levado para uma região genômica alvo por um elemento de RNA guia; ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de nucleotídeos que codifica tal endonuclease. Exemplos desse sistema de edição de genes baseado em CRISPR incluem sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas ou um sistema CRISPR-Cpf.

[00154] Como aqui utilizado, os termos "elemento de RNA guia", "RNA guia", "gRNA", "molécula de gRNA" e "RNA guia sintético" são usados de forma intercambiável e referem-se à sequência de polinucleotídica que compreende um RNA alvo que hibridiza com uma sequência nucleica alvo ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de nucleotídeos que codificam o RNA alvo. Um RNA alvo de gRNA compreende um domínio de direcionamento que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar à sequência de nucleotídeos em uma região genômica alvo. A frase "substancialmente complementar" significa um grau de complementaridade que é pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%,

99% ou 100% em uma região de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleotídeos ou mais, ou refere-se a dois ácidos nucleicos que hibridizam sob condições rigorosas.

[00155] Um elemento de RNA guia pode compreender ainda um RNA ativador que é capaz de hibridizar com o RNA alvo, ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de nucleotídeos que codifica o RNA ativador. O RNA ativador e o RNA alvo podem ser separados ou fusionados como um único ácido nucleico através de uma sequência de ciclo de ligação para formar uma única molécula de gRNA. Uma molécula de gRNA pode compreender um número de domínios. Por exemplo, esse gRNA compreende, por exemplo, de 5' a 3': um domínio de direcionamento (que é complementar a um ácido nucleico alvo); um primeiro domínio de complementaridade; um domínio de ligação; um segundo domínio de complementaridade (que é complementar ao primeiro domínio de complementaridade); um domínio proximal; e opcionalmente, um domínio de cauda. Ver WO 2015048557.

[00156] Um "primeiro domínio de complementaridade" tem complementaridade substancial com o segundo domínio de complementaridade, e pode formar uma região dúplex sob pelo menos algumas condições fisiológicas.

[00157] Um "domínio de ligação" serve para ligar o primeiro domínio de complementaridade com o segundo domínio de complementaridade de um gRNA unimolecular. O domínio de ligação pode ligar o primeiro e o segundo domínio de complementaridade de forma covalente ou não covalente.

[00158] Um "domínio proximal" pode ter 3 a 25 nucleotídeos de comprimento ou 5 a 20 nucleotídeos de comprimento. O domínio proximal pode compartilhar homologia ou ser derivado de um domínio proximal de ocorrência natural.

[00159] Um "domínio de cauda" pode estar ausente ou ter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos de comprimento. O domínio de cauda pode incluir sequências que são complementares entre si e que, em pelo menos algumas condições fisiológicas, formam uma região dúplex.

[00160] O elemento de RNA guia pode formar um complexo com uma endonuclease do elemento de endonuclease guiada por RNA, tal como a endonuclease Cas ("complexo de gRNA / nuclease"). Um exemplo de complexo gRNA / nuclease é um complexo CRISPR como descrito abaixo em relação a um sistema baseado em CRISPR. Em algumas modalidades, o complexo CRISPR compreende uma endonuclease do sistema de endonuclease guiada por RNA que é complexada com o RNA alvo. Em algumas modalidades, o complexo CRISPR compreende uma endonuclease do sistema de endonuclease guiada por RNA que é complexada com o RNA alvo e o RNA ativador.

[00161] O domínio de direcionamento do RNA alvo promove direcionamento ou teleguia específico de um complexo de gRNA / nuclease a uma sequência de nucleotídeos alvo. Em algumas modalidades, o domínio de direcionamento pode ser de 10 a 30 pb, tal como 15 a 25 pb, 18 a 22 pb, ou 20 pb.

[00162] Os métodos para projetar gRNAs são conhecidos na técnica, incluindo métodos para selecionar, projetar e validar o domínio alvo. Ver, por exemplo, WO 2015048577, Mali e outros, 2013 SCIENCE 339 (6121): 823 a 826; Hsu e outros, 2013 NATBIOTECHNOL, 31 (9): 827-32; Fu e outros, 2014 NATBTOTECHNOL, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer e outros, 2014 NAT METHODS 11 (2): 122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae e outros, 2014 BIOTNFORMATICS PubMed PMID: 24463181; Xiao A e outros, 2014 BIOINFORMATICS Pub Med PMID: 24389662.

[00163] Em algumas modalidades, endonucleases guiadas por

RNA, tal como uma enzima ou proteína Cas (por exemplo, proteína Cas9 tipo II) ou enzima ou proteína Cpf (por exemplo, proteína Cpf1) podem ser usadas. Em algumas modalidades, uma versão modificada dessa enzima ou proteína Cas ou Cpf também pode ser usada.

[00164] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas. O sistema CRISPR-Cas compreende: (a) pelo menos um elemento de RNA guia ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência(s) de nucleotídeos que codifica o elemento de RNA guia, o elemento de RNA guia compreendendo um RNA alvo que inclui uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a um sequência de nucleotídeos em uma ou mais regiões genômicas alvo, e um RNA ativador que inclui uma sequência de nucleotídeos capaz de hibridizar com o RNA alvo; e (b) um elemento de proteína Cas compreendendo uma proteína Cas ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cas. O RNA alvo e os RNAs ativadores podem ser separados ou fusionados em um único RNA.

[00165] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR inclui sistemas CRISPR de classe 1 e / ou CRISPR de classe 2. Os sistemas de classe 1 empregam várias proteínas Cas juntamente com os RNAs CRISPR (crRNA) como RNA alvo para construir uma endonuclease funcional. Os sistemas CRISPR de classe 2 empregam uma única proteína Cas e um crRNA como o RNA alvo. Os sistemas CRISPR de classe 2, incluindo o sistema baseado em Cas9 do tipo II, compreendem uma única proteína Cas para mediar a clivagem, em vez do complexo de multi-subunidades usado pelos sistemas de classe 1. O sistema baseado em CRISPR também inclui o sistema CRISPR de Classe II, Tipo V, que emprega uma proteína Cpf1 e um crRNA como RNA alvo.

[00166] A proteína Cas é uma nuclease de cadeia dupla associada

a CRISPR (Cas). Em algumas modalidades, o sistema CRISPR-Cas compreende uma proteína Cas9. Em algumas modalidades, a proteína Cas9 é SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou D10A nickase. O termo "proteína Cas", tal como a proteína Cas9, inclui a proteína Cas de ocorrência natural ou seus derivados funcionais (tal como versões truncadas ou variantes da proteína Cas de ocorrência natural com atividade de nuclease).

[00167] Em algumas modalidades, proteínas Cas9 de espécies que não *S. pyogenes* e *S. thermophiles* podem ser usadas. Espécies de proteínas Cas9 adicionais que podem ser obtidas e usadas aqui incluem: *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces sp.*, *Cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*; *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides sp.*, *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium sp.*, *Brevibacillus laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium dolichum*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Eubacterium dolichum*, *gamma proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis sp.*, *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria sp.*, *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas sp.*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutells*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum sp.*, *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas sp.*, *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Strep-*

tococcus sp., *Subdoligranulum sp.*, *Tistrella mobilis*, *Treponema sp.*, ou *Verminephrobacter eiseniae*.

[00168] Em algumas modalidades, um ou mais elementos de um sistema baseado em CRISPR são derivados de um sistema CRISPR de tipo I, tipo II ou tipo III.

[00169] Em algumas modalidades, um ou mais elementos de um sistema baseado em CRISPR são derivados de um organismo particular que compreende um sistema CRISPR endógeno, tal como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Francisella tularensis*, *Prevotella sp.*, *Acidaminococcus sp.* e *Lachnospiraceae sp.* Em geral, um sistema baseado em CRISPR é caracterizado por elementos que promovem a formação de um complexo CRISPR nas regiões genômicas alvo ou no sítio de uma sequência alvo (também conhecido como proto-espaçador no contexto de um sistema CRISPR endógeno). No contexto da formação de um complexo CRISPR, "sequência alvo" refere-se a uma sequência na qual uma sequência guia é projetada para ter complementaridade substancial, onde a hibridização entre uma sequência alvo e uma sequência guia promove a formação de um complexo CRISPR. A complementaridade total não é necessariamente exigida, desde que haja complementaridade suficiente para causar hibridização e promover a formação de um complexo CRISPR. Uma sequência alvo pode compreender qualquer polinucleotídeo, tal como DNA ou RNA polinucleotídeos. Em algumas modalidades, uma sequência alvo está localizada no núcleo ou citoplasma de uma célula(s). Em algumas modalidades, a sequência alvo pode estar dentro de uma organela de uma célula(s) eucariótica(s), por exemplo, mitocôndria ou cloroplasto.

[00170] Uma sequência ou modelo que pode ser usada para recombinação no sítio alvo compreendendo as sequências alvo é chamada de um "modelo de edição" ou "polinucleotídeo de edição" ou

"sequência de edição". Um polinucleotídeo de modelo exógeno pode ser chamado de um modelo de edição ou modelo de doador. Em algumas modalidades, o DNA de fita simples e o DNA de fita dupla ou de origem sintética ou de origem biológica podem ser usados. A título de exemplo não limitante, modelos de edição adequados incluem ssODN, dsODN, produtos de PCR, plasmídeos e vírus, incluindo AAV, adenovírus, retrovírus, lentivírus, etc. Modelos de edição adicionais também são possíveis. Em algumas modalidades, a recombinação é recombinação homóloga.

[00171] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas9. O RNA alvo do sistema CRISPR-Cas9 compreende um RNA alvo CRISPR (crRNA) e o RNA ativador do sistema CRISPR-Cas 9 compreende um RNA CRISPR com transativação (tracrRNA). O elemento de proteína Cas do sistema CRISPR-Cas9 emprega uma proteína Cas9. O crRNA e o tracrRNA podem ser separados ou combinados em um único construto de RNA por meio de uma sequência de ciclo de ligação. Esse construto de RNA combinado é chamado de RNA guia único (sgRNA; ou RNA guia).

[00172] No que diz respeito às informações gerais sobre os sistemas CRISPR-Cas, seus componentes, e entrega de tais componentes, incluindo métodos, materiais, veículos de entrega, vetores, partículas, AAV e sua fabricação e utilização, incluindo quantidades e formulações, podem ser encontrados em: Patentes US. Nos. 9.999.641, 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 e 8.697.359; Publicações de Patente 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 e US 2014-0179006 A1, US 2014-0170753; Patentes europeias EP 2 784 162 B1 e EP 2 771 468 B1; Pedidos de Patente europeia EP 2 771 468 (EP13818570,7), EP 2 764 103 (EP13824232,6) e EP 2 784 162 (EP14170383,5); e Publicações de Patente PCT WO 2014/093661, WO 2014/093694, WO 2014/093595, WO 2014/093718, WO 2014/093709, WO 2014/093622, WO 2014/093635, WO 2014/093655, WO 2014/093712, WO2014/093701, WO2014/018423, WO 2014/204723, WO 2014/204724, WO 2014/204725, WO 2014/204726, WO 2014/204727, WO 2014/204728, WO 2014/204729 e WO2016/028682.

[00173] Em algumas modalidades, o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cpf. O "sistema CRISPR-Cpf" compreende: (a) pelo menos um elemento de RNA guia ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o elemento de RNA guia, o RNA guia compreendendo um RNA alvo tendo uma sequência de nucleotídeos complementar a uma sequência de nucleotídeos em um locus do ácido nucleico alvo; e (b) um elemento de proteína Cpf ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o elemento de proteína Cpf.

[00174] Um exemplo de um elemento de proteína Cpf inclui nucleases Cpf1, tal como Cpf1 (FnCpf1) de *Francisella* e quaisquer variantes das mesmas. Ver, por exemplo, Zetsche e outros, "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system", *Cell*, 163 (3): páginas 759-71; e Fonfara e outros, "The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA", *Nature* 532 (7600): páginas 517-21. O PAM preferencial de Cpf1 é 5'-TTN, diferente de Cas9 (3'-NGG) tanto na localização genômica quanto no conteúdo de GC. O sistema CRISPR-Cpf pode não empregar um RNA ativador (tracrRNA). Tanto Cpf1 quanto seus RNAs guia são em

geral menores do que suas contrapartes SpCas9. O locus de Cpf1 contém um domínio alfa / beta misto, um RuvC-I seguido por uma região helicoidal, um RuvC-II e um domínio tipo dedo de zinco. A proteína Cpf1 tem um domínio de endonuclease tipo RuvC que é semelhante ao domínio RuvC de Cas9. Além disso, Cpf1 não tem um domínio de endonuclease HNH, e o N-terminal de Cpf1 não tem o lobo alfa-helicoidal de reconhecimento de Cas9. Os loci de Cpf1 codificam proteínas Cas1, Cas2 e Cas4 mais semelhantes aos tipos I e III do que nos sistemas tipo II. As proteínas da família Cpf1 podem ser encontradas em muitas espécies bacterianas.

[00175] Sem estar vinculado a uma teoria específica, o sistema CRISPR-Cpf emprega um complexo Cpf1-crRNA que cliva DNA ou RNA alvo pela identificação de um motivo proto-espaçador adjacente 5'-YTN-3' (onde "Y" é uma pirimidina e "N" é qualquer nucleobase) ou 5'-TTN-3 em contraste com o PAM rico em G dirigido por Cas9. Após a identificação de PAM, o Cpf1 introduz uma quebra em fita dupla de DNA do tipo extremidade pegajosa, com 4 ou 5 protusões de nucleotídeos.

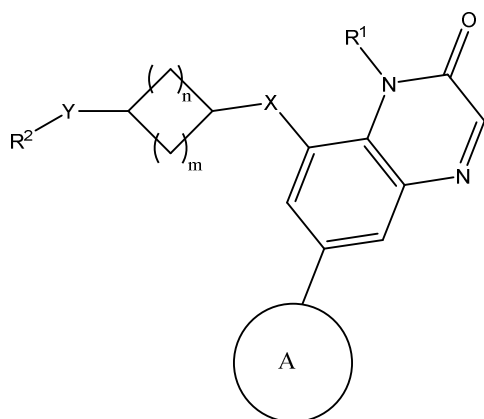
[00176] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em NgAgo. O sistema baseado em NgAgo compreende pelo menos um elemento de DNA guia ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica o elemento de DNA guia; e uma endonuclease guiada por DNA. O sistema baseado em NgAgo emprega DNA como um elemento guia. Seu princípio de trabalho é semelhante ao da tecnologia CRISPR-Cas9, mas seu elemento guia é um segmento de DNA guia (dDNA), em vez de gRNA na tecnologia CRISPR-Cas9. Um exemplo de endonuclease guiada por DNA é uma endonuclease Argonauta (NgAgo) de *Natronobacterium gregoryi*. Ver, por exemplo, Feng Gao e outros "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi*", Nature

Biotechnology, (2016): doi: 10.1038/nbt.3547.

[00177] Por "ligante", "ligante de peptídeo", "ligante peptídico" ou "espaçador peptídico", entende-se uma sequência peptídica que permite a conexão de diferentes monômeros em uma proteína de fusão e a adoção da conformação correta para a dita atividade da proteína de fusão e que não altera a atividade de nenhum dos monômeros. Os ligantes peptídicos podem ter vários tamanhos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 aminoácidos como uma faixa indicativa não limitante ou qualquer valor intermediário dentro dessa faixa.

Inibidores de DNA-PK

[00178] Em algumas modalidades, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I):



(I), ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00179] m e n são independentemente 1 ou 2.

[00180] X é O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila. R também pode ser ²H (D ou deutério). Conforme usado aqui, o termo "deutério", "²H" e "D" são usados de forma intercambiável.

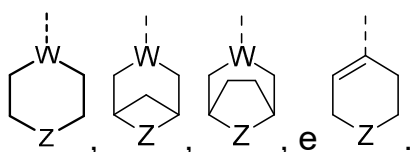
[00181] R¹ é C₁-C₄ alquila.

[00182] R² é:

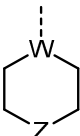
[00183] um anel aromático ou heteroaromático de 5 ou 6 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S, em que o anel aromático ou heteroaromático pode ser substituído por 0, 1 ou 2 substituintes R³ selecionados inde-

pendentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi, C₁-C₄ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₄ alquila; ou em que dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel aromático ou heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

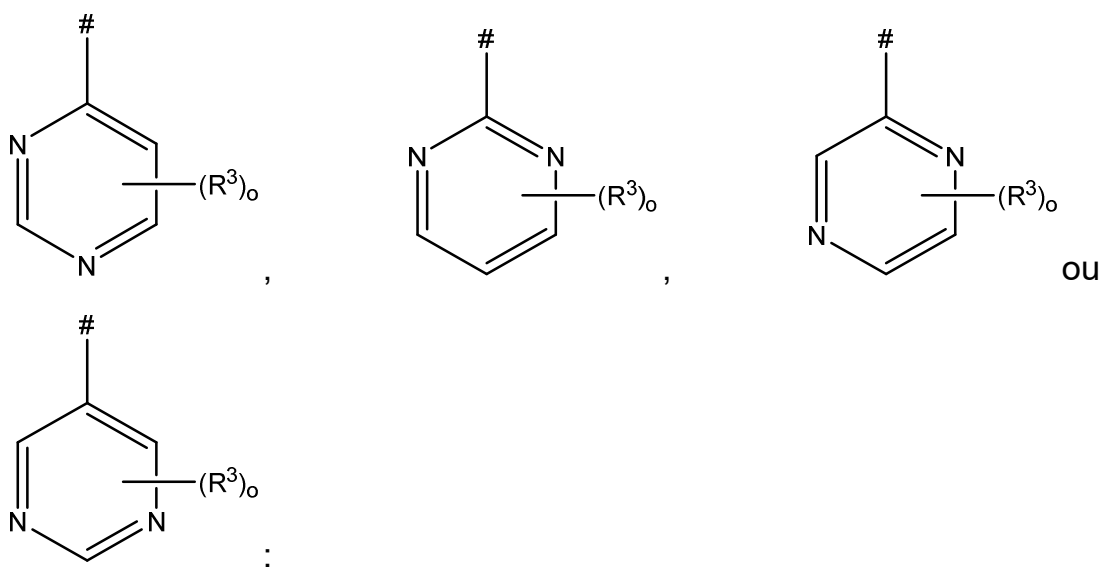
[00184] Alternativamente, R² pode ser COOR⁴, em que R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila. O anel A é selecionado a partir do grupo que consiste em:



[00185] W é N ou CR³; e Z é O ou S; em que R³ é H (ou ²H) ou C₁-C₄ alquila.

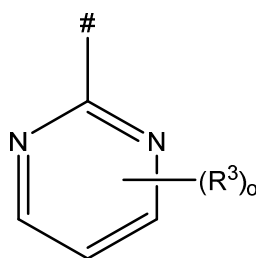
[00186] Nas modalidades, A é . Nas modalidades, R¹ é metila.

[00187] Nas modalidades, R² é:

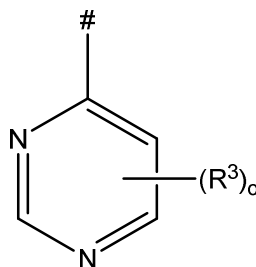


em que # denota onde R² está conectado ao restante do composto de fórmula (I); e o é 0, 1 ou 2.

[00188] Nas modalidades, cada um de m e n é 2.



[00189] Nas modalidades, R² é:



[00190] Nas modalidades, R² é:

[00191] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, R¹ é metila, R² é COOR⁴, e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00192] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

[00193] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00194] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (I) é usado.

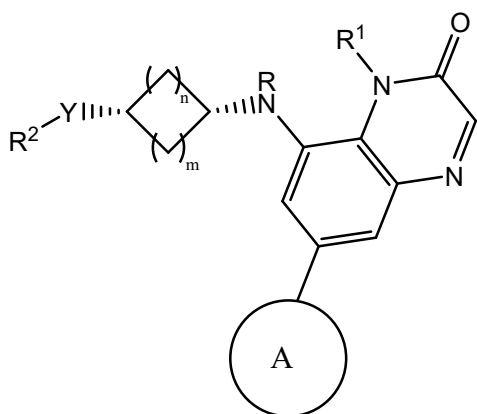
[00195] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (I) é usado.

[00196] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (I) e um formador de co-cristal (CCF) é usado. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

[00197] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para um composto da Fórmula Estrutural (I) é de cerca de 2:1.

Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para um composto da Fórmula Estrutural (I) é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui um composto da Fórmula Estrutural (I) e um CCF em uma relação que é (um composto da Fórmula Estrutural (I))_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é de cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Fórmula (I))_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é de cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

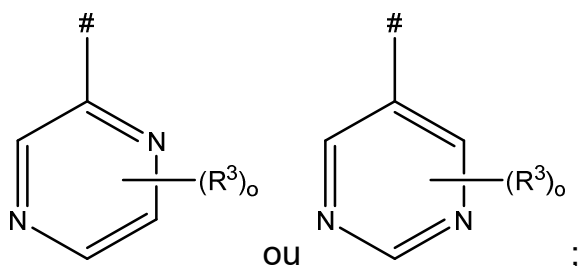
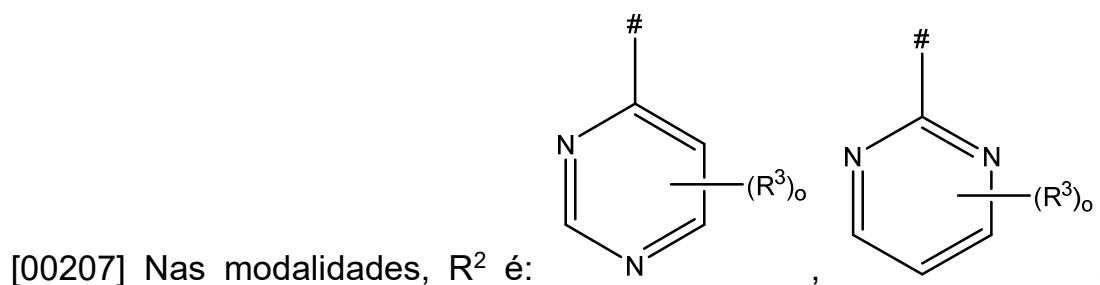
[00198] Nas modalidades, o composto da fórmula (II) é representado pela Fórmula Estrutural (II),



(II), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00199] Nas modalidades, R¹ é metila.

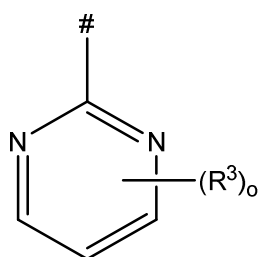
[00200] Nas modalidades, Y é O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila.



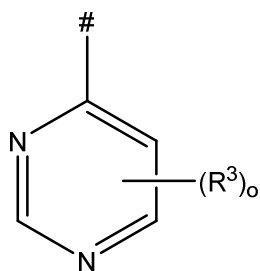
em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (II); e o é 0, 1 ou 2.

[00201] Nas modalidades, cada um de m e n é 2.

[00202] Nas modalidades, cada um de m e n é 2 e R^2 é:



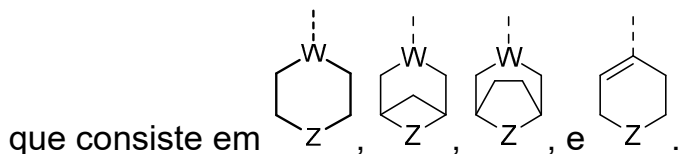
[00203] Nas modalidades, cada um de m e n é 2 e R^2 é:

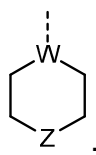


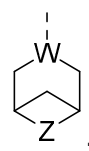
[00204] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, R^1 é metila, R^2 é $COOR^4$, e R^4 é C_1 - C_4 alquila ou benzila.

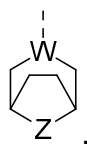
[00205] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R^3 é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO_2 , C_1 - C_2 alquila, C_1 - C_4 haloalquila, C_1 - C_2 alcóxi, C_1 - C_2 haloalcóxi e $C(=O)NHR^{1'}$ em que $R^{1'}$ é C_1 - C_2 alquila.

[00206] Nas modalidades, o Anel A é selecionado a partir do grupo



[00207] Em outras modalidades, o Anel A é .

[00208] Em algumas modalidades, o Anel A é .

[00209] Nas modalidades, o Anel A é .

[00210] Nas modalidades, o Anel A é .

[00211] Nas modalidades, dois grupos R^3 conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00212] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (II) é usado.

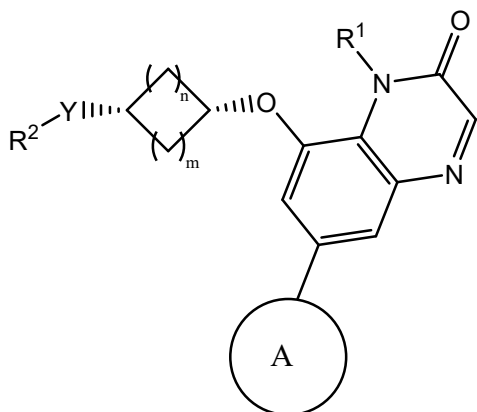
[00213] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (II) é usado.

[00214] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (II) e um formador de co-cristal (CCF) é usado. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

[00215] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para um composto da Fórmula Estrutural (II) é de cerca de 2:1.

Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para um composto de Fórmula Estrutural (II) é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui um composto da Fórmula Estrutural (II) e um CCF em uma relação que é (um composto da Fórmula Estrutural (II))_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

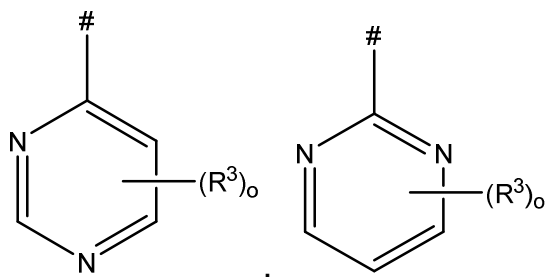
[00216] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (II'),



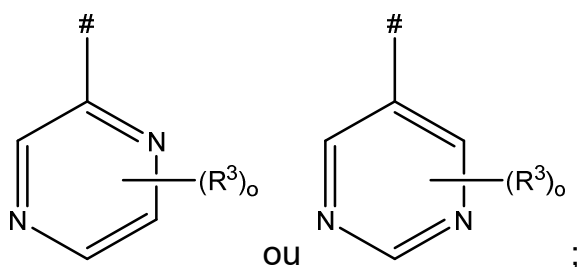
(II'), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00217] Nas modalidades, R¹ é metila.

[00218] Nas modalidades, Y é O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila.



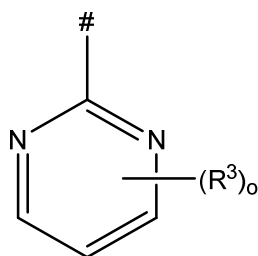
[00227] Nas modalidades, R² é:



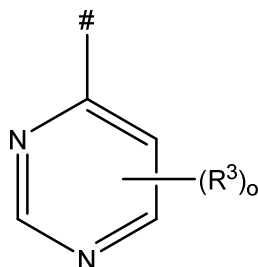
em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (II'); e o é 0, 1 ou 2.

[00219] Nas modalidades, cada um de m e n é 2.

[00220] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R^2 é:



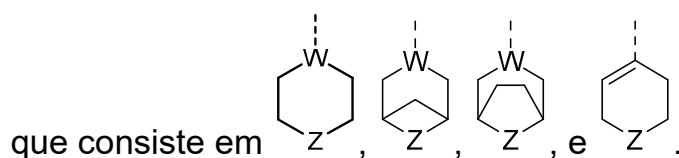
[00221] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R^2 é:

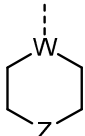


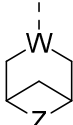
[00222] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, R^1 é metila, R^2 é COOR^4 , e R^4 é $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquila ou benzila.

[00223] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R^3 é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO_2 , $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquila, $\text{C}_1\text{-C}_2$ alcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_2$ haloalcóxi e $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{1'}$ em que $R^{1'}$ é $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila.

[00224] Nas modalidades, o Anel A é selecionado a partir do grupo



[00225] Em outras modalidades, o Anel A é .

[00226] Em algumas modalidades, o Anel A é .

[00227] Nas modalidades, o Anel A é .

[00228] Nas modalidades, o Anel A é .

[00229] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00230] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (II') é usado.

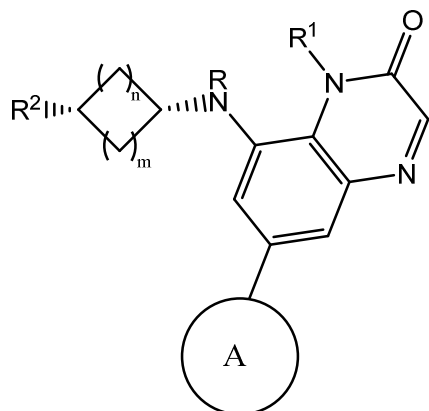
[00231] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (II') é usado.

[00232] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (II') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00233] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto II' é de cerca de 2:1. Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto II' é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui o Composto II' e um CCF em uma relação que é (Composto II')_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico,

ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

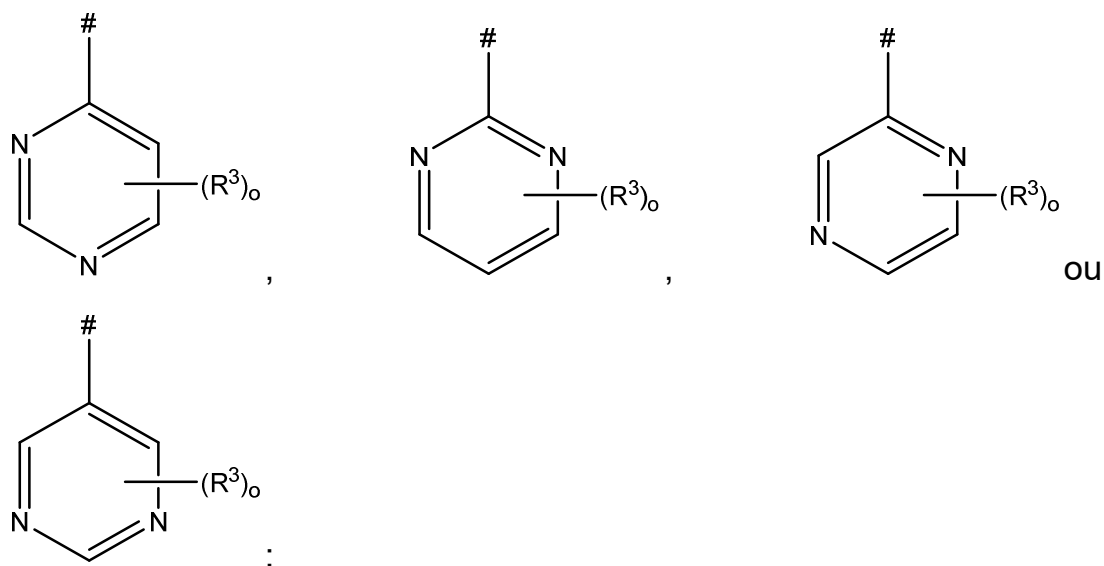
[00234] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (II''),



(II''), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00235] Nas modalidades, R¹ é metila.

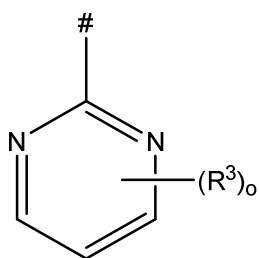
[00236] Nas modalidades, R² é:



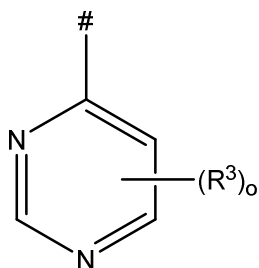
em que # denota onde R² está conectado ao restante do composto de fórmula (II''); e o é 0, 1 ou 2.

[00237] Nas modalidades, cada um de m e n é 2.

[00238] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R² é:



[00239] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R^2 é:

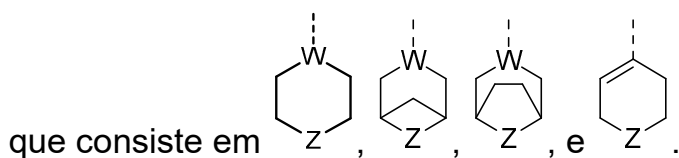


[00240] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, R^1 é metila, R^2 é COOR^4 , e R^4 é $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquila ou benzila.

[00241] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R^3 é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN , halo, NO_2 , $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquila, $\text{C}_1\text{-C}_2$ alcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_2$ haloalcóxi e $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{1'}$ em que $R^{1'}$ é $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila.

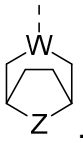
[00242] Nas modalidades, dois grupos R^3 conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

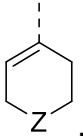
[00243] Nas modalidades, o Anel A é selecionado a partir do grupo



[00244] Em outras modalidades, o Anel A é .

[00245] Em algumas modalidades, o Anel A é .

[00246] Nas modalidades, o Anel A é .

[00247] Nas modalidades, o Anel A é .

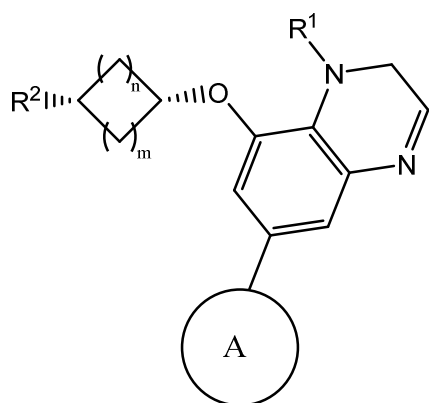
[00248] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (II'') é usado.

[00249] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (II'') é usado.

[00250] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (II'') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00251] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o Composto II'' é de cerca de 2:1. Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o Composto II'' é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui o Composto II'' e um CCF em uma relação que é (um composto da Fórmula Estrutural II'')_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

[00252] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (II'''),

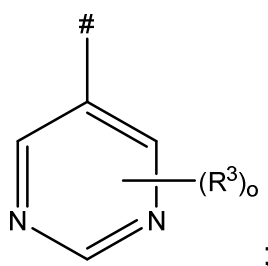
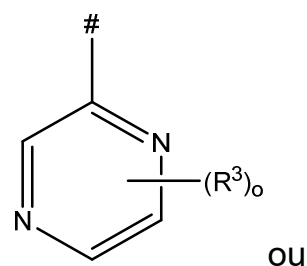
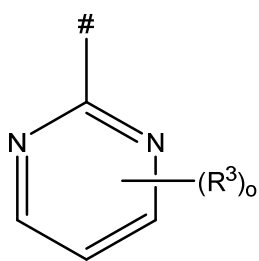
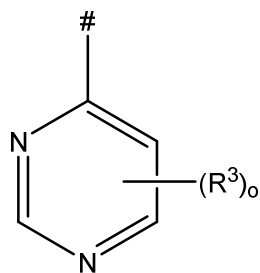


(II'''), ou um sal farmacologicamente aceitável

do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00253] Nas modalidades, R¹ é metila.

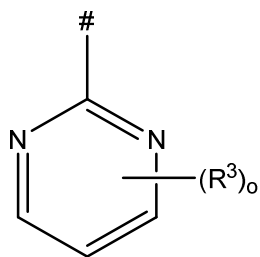
[00254] Nas modalidades, R² é:



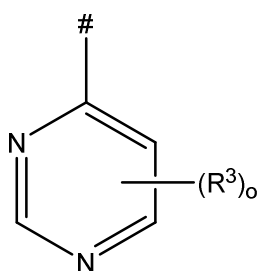
em que # denota onde R² está conectado ao restante do composto de fórmula (II'''); e o é 0, 1 ou 2.

[00255] Nas modalidades, cada um de m e n é 2.

[00256] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R² é:



[00257] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, e R² é:



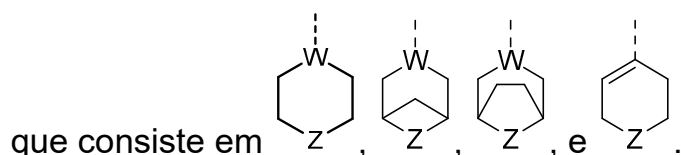
[00258] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, R¹ é metila, R² é COOR⁴, e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00259] Nas modalidades, cada um de m e n é 2, Y é uma ligação, R¹ é metila, R² é COOR⁴, e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00260] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2, e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

[00261] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

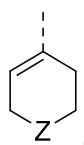
[00262] Nas modalidades, o Anel A é selecionado a partir do grupo



[00263] Em outras modalidades, o Anel A é .

[00264] Em algumas modalidades, o Anel A é .

[00265] Nas modalidades, o Anel A é .



[00266] Nas modalidades, o Anel A é

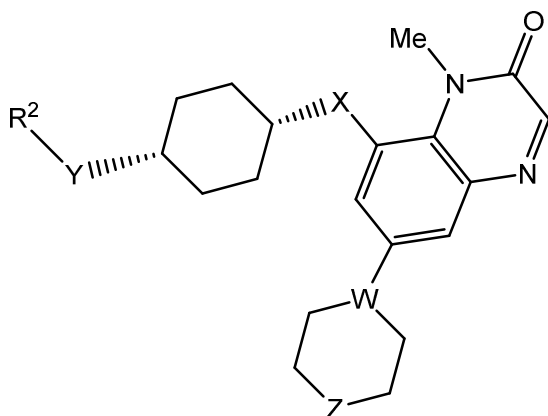
[00267] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (II''') é usado.

[00268] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (II''') é usado.

[00269] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (II''') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00270] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto II''' é de cerca de 2:1. Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto II''' é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui o Composto II''' e um CCF em uma relação que é (Composto II''')_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

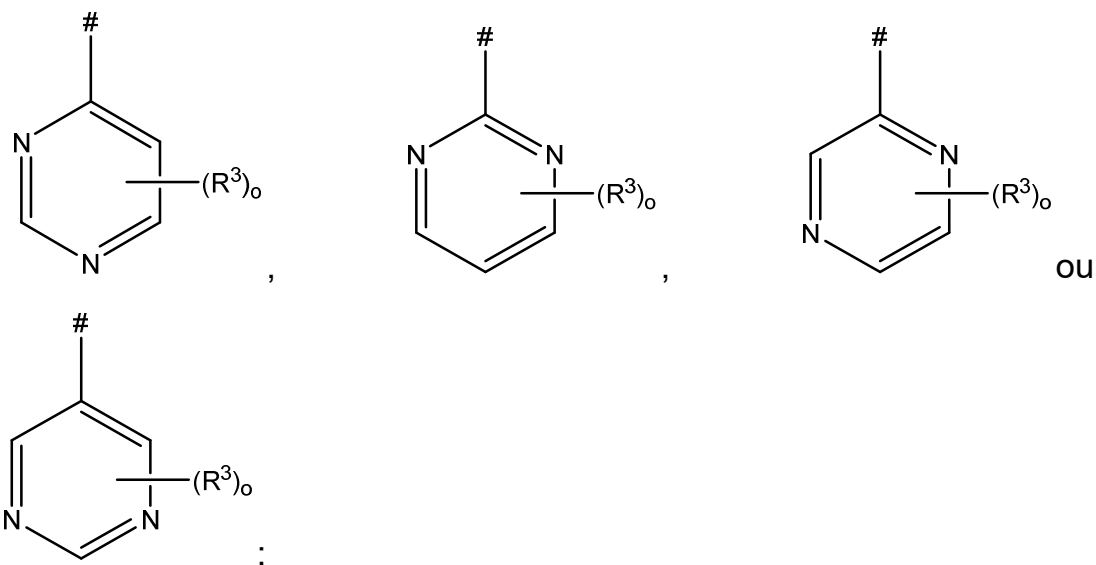
[00271] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (III),



(III), ou um seu sal farmacologicamente-

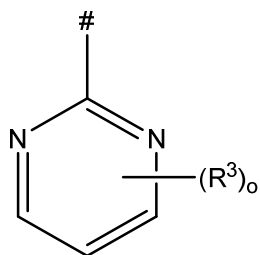
mente aceitável, ou um seu co-cristal é usado.

[00272] Nas modalidades, R^2 é:

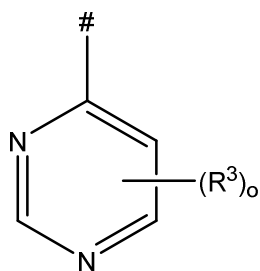


em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (III); e o é 0, 1 ou 2.

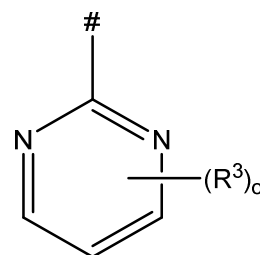
[00273] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:

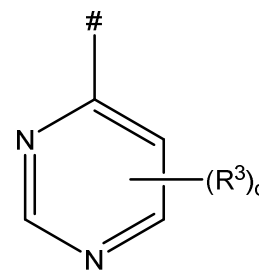


[00274] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:



[00275] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R^2 é:





[00276] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:

[00277] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00278] Nas modalidades, Y é NH, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00279] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

[00280] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00281] Nas modalidades, um sal farmaceuticamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (III) é usado.

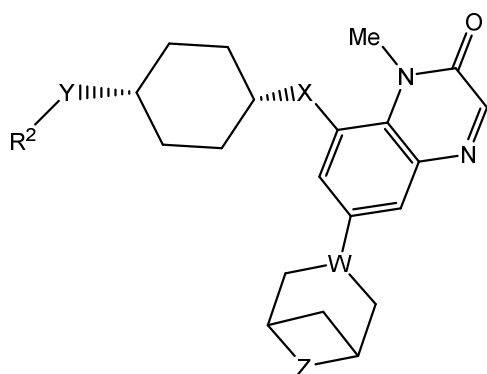
[00282] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III) é usado.

[00283] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III) e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00284] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto III é de cerca de 2: 1. Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto III é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui o Composto III e um CCF em uma relação que é (Composto III)_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas moda-

lidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

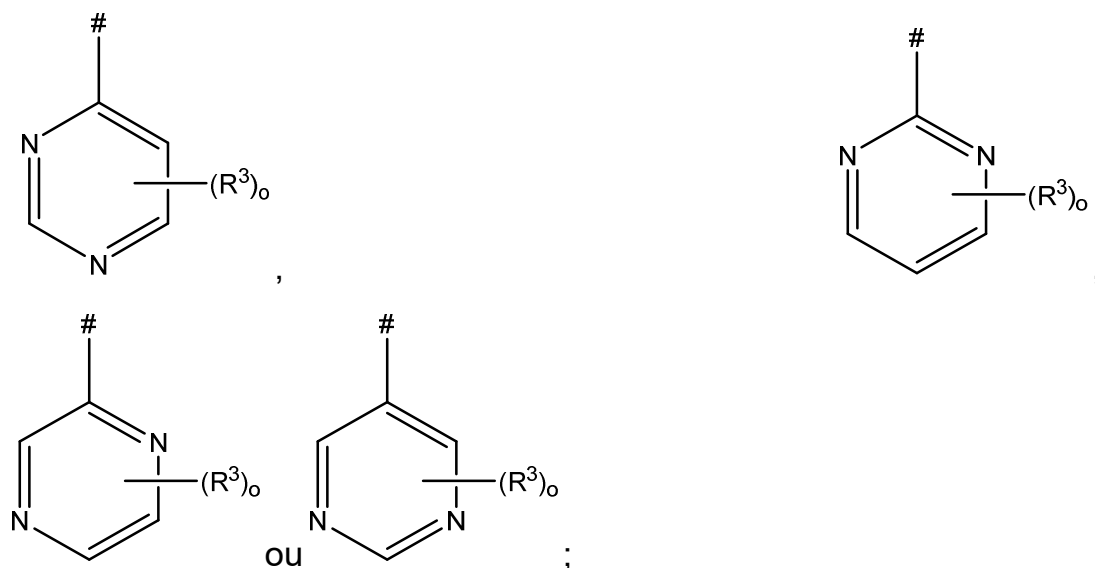
[00285] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (III'),



(III'), ou um sal farmaceuticamente

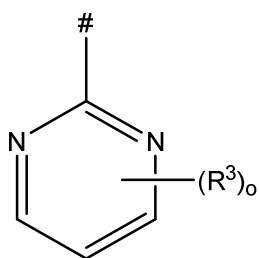
aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00286] Nas modalidades, R² é:

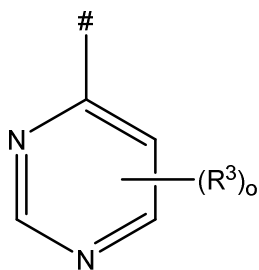


em que # denota onde R² está conectado ao restante do composto de fórmula (III'); e o é 0, 1 ou 2.

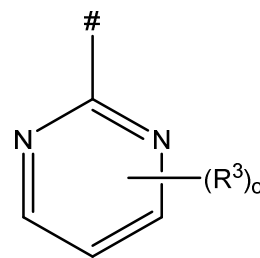
[00287] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R² é:



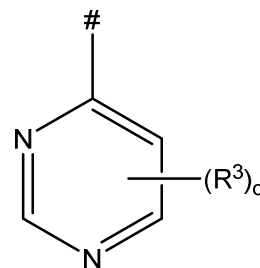
[00288] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R² é:



[00289] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:



[00290] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:



[00291] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00292] Nas modalidades, Y é NH, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00293] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2, e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

[00294] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de

5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

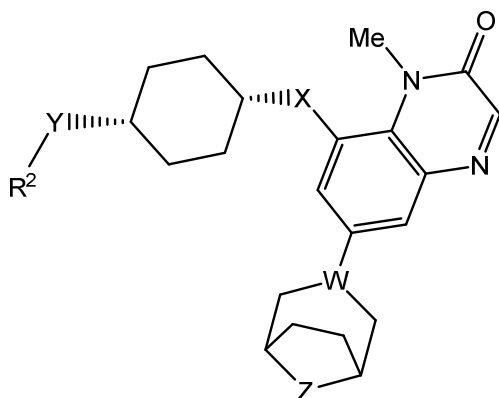
[00295] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (III') é usado.

[00296] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III') é usado.

[00297] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00298] Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto III' é de cerca de 2:1. Nas modalidades, a relação de um formador de co-cristal (CCF) para o composto III' é de cerca de 1:2. Nas modalidades, um co-cristal inclui o Composto III' e um CCF em uma relação que é (Composto III')_p:(CCF)_q. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,4 a cerca de 2,1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é de cerca de 0,9 a cerca de 3,1. Nas modalidades, p é cerca de 2 e q é cerca de 1. Nas modalidades, p é cerca de 1 e q é cerca de 2. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

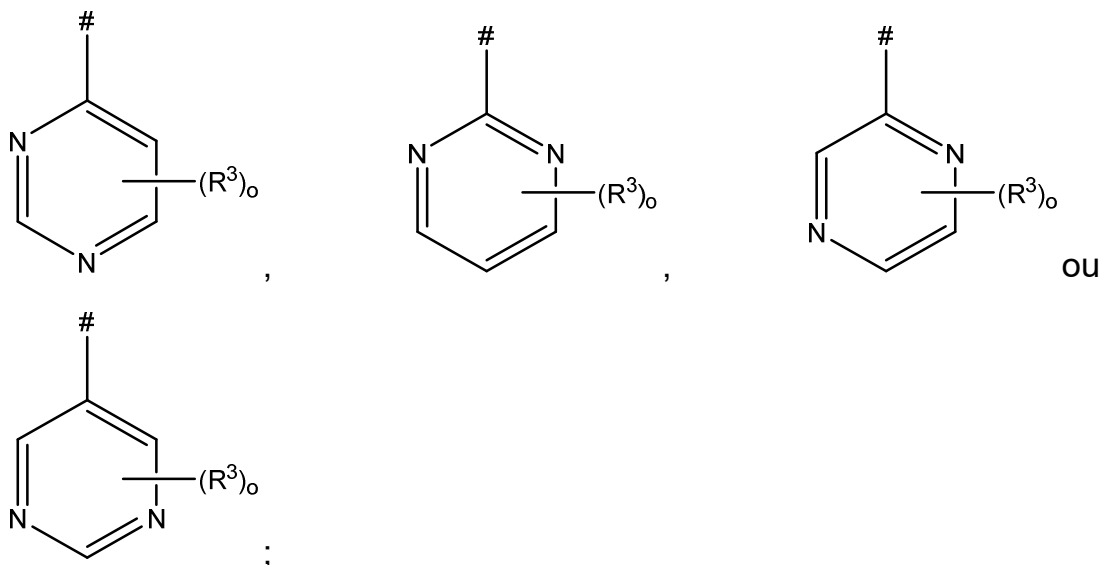
[00299] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (III''),



(III''), ou um sal farmacologicamente

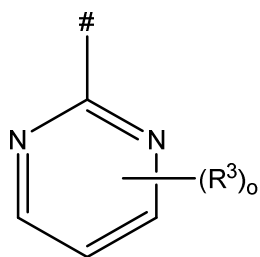
aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00300] Nas modalidades, R^2 é:

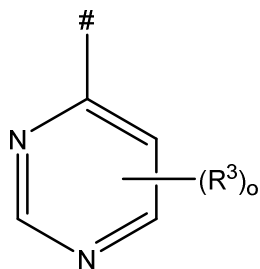


em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (III "); e o é 0, 1 ou 2.

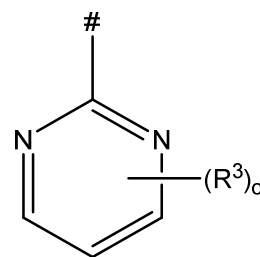
[00301] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:

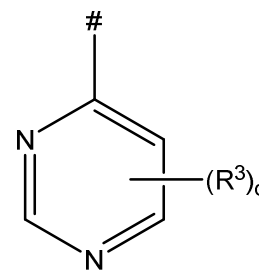


[00302] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:



[00303] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R^2 é:





[00304] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:

[00305] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00306] Nas modalidades, Y é NH, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00307] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

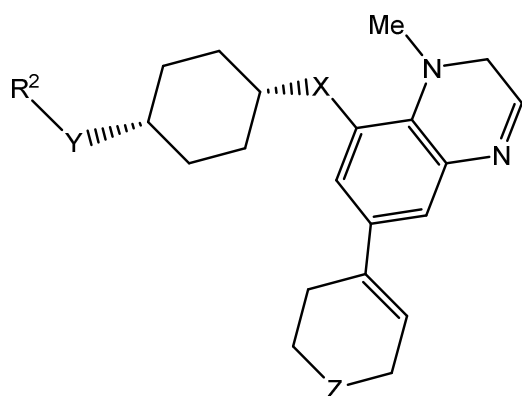
[00308] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00309] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (III'') é usado.

[00310] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III'') é usado.

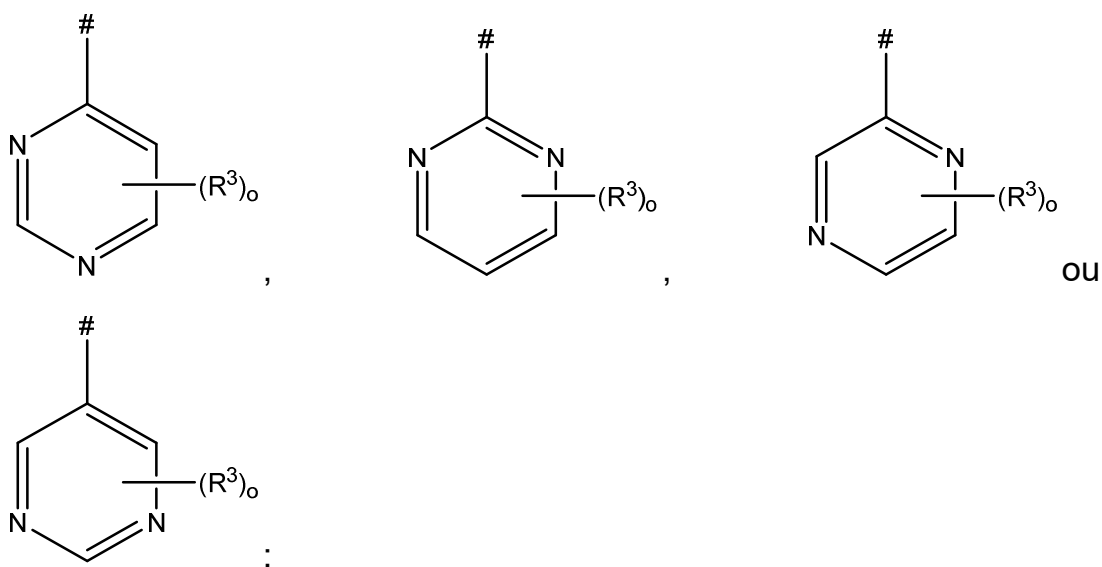
[00311] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto da Fórmula Estrutural (III'') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00312] Nas modalidades, o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (III'''),



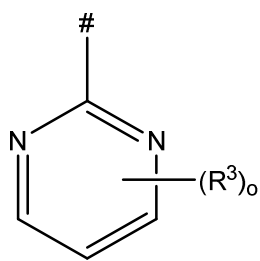
(III'''), ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

[00313] Nas modalidades, R^2 é:

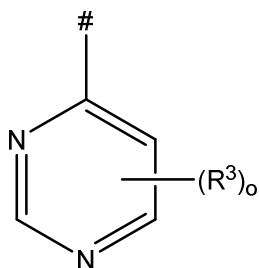


em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (III'''); e o é 0, 1 ou 2.

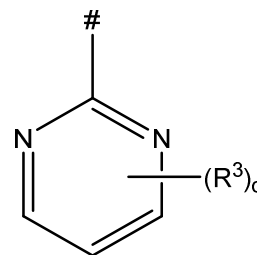
[00314] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:



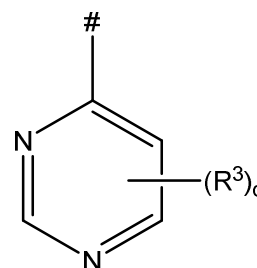
[00315] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, e R^2 é:



[00316] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:



[00317] Nas modalidades, Y é NH, X é O, e R² é:



[00318] Nas modalidades, Y é uma ligação, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00319] Nas modalidades, Y é NH, X é O, R² é COOR⁴ e R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila.

[00320] Nas modalidades, o é zero, 1 ou 2 e cada R³ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO₂, C₁-C₂ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₂ alcóxi, C₁-C₂ haloalcóxi e C(=O)NHR^{1'} em que R^{1'} é C₁-C₂ alquila.

[00321] Nas modalidades, dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel heteroaromático podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

[00322] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula Estrutural (III''') é usado.

[00323] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III''') é usado.

[00324] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto de Fórmula Estrutural (III'') e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

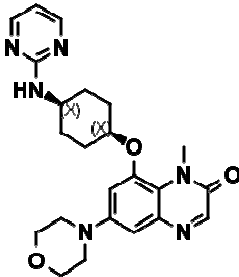
[00325] Nas modalidades, o composto de fórmula (I) é selecionado a partir do composto Nos. 1 a 37 na Tabela 1 (abaixo), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, ou um co-cristal do mesmo é usado.

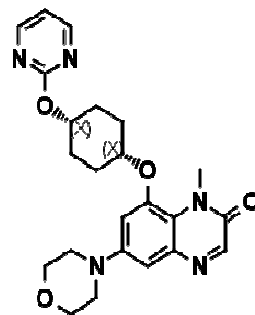
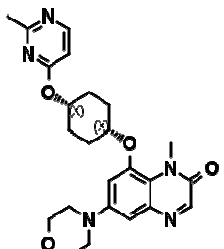
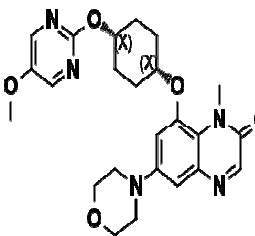
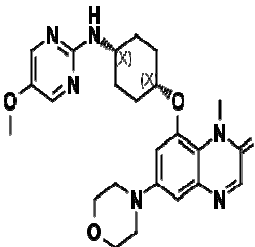
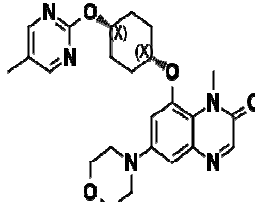
[00326] Nas modalidades, um sal farmacologicamente aceitável de qualquer composto Nos. 1 a 37 é usado.

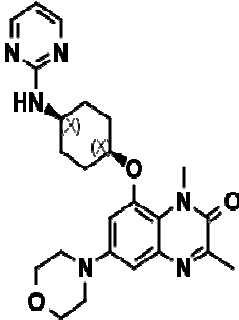
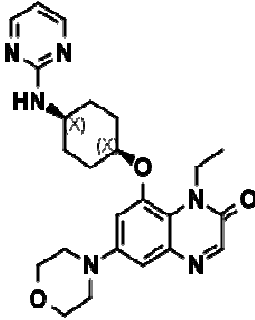
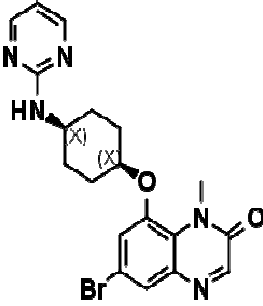
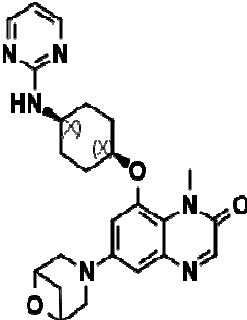
[00327] Nas modalidades, um co-cristal que inclui qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é usado.

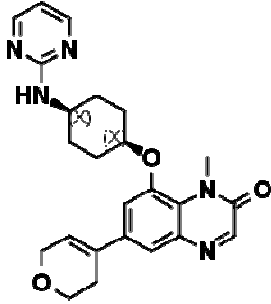
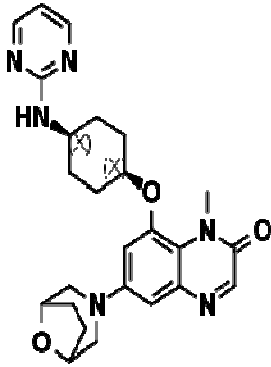
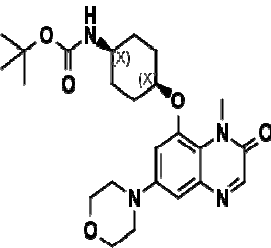
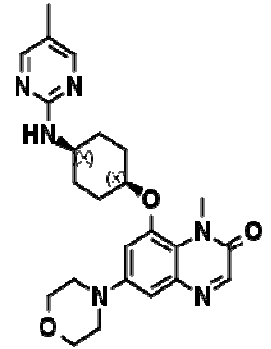
[00328] Nas modalidades, um co-cristal que inclui qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 e um formador de co-cristal (CCF) é usado. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico. Nas modalidades, um CCF é ácido adípico.

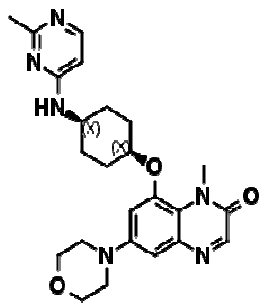
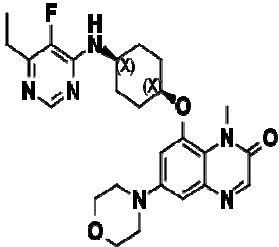
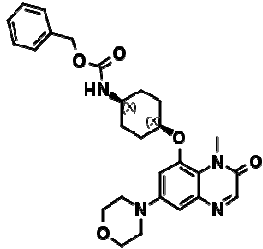
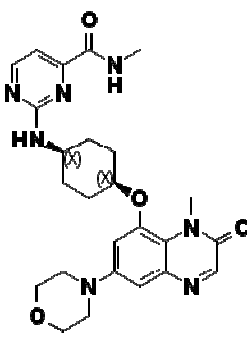
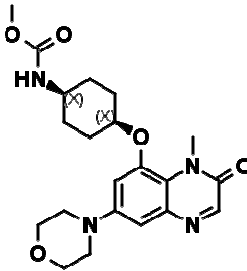
[00329] Em algumas modalidades, o composto é um composto selecionado a partir da Tabela 1, ou um sal ou co-cristal farmacologicamente aceitável do mesmo:

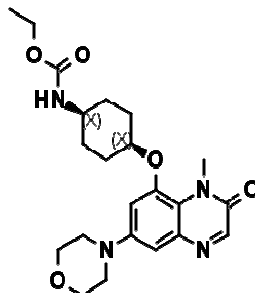
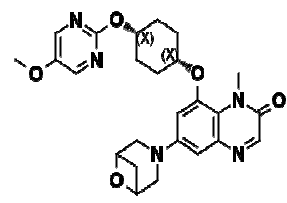
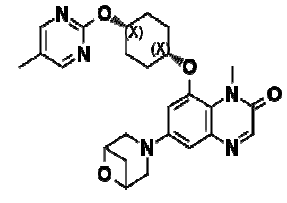
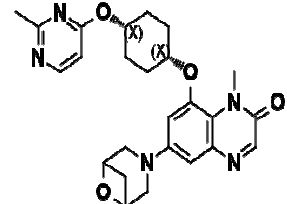
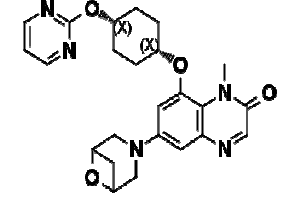
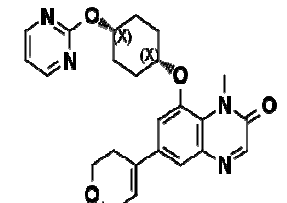
Composto No.	
1	 <p>The chemical structure of compound 1 consists of a central benzimidazole ring system. The benzimidazole has a methyl group on the nitrogen at position 2 and a carbonyl group at position 4. At position 5, there is a morpholine ring attached via its nitrogen atom. At position 6, there is an oxygen atom that is part of a cyclohexane ring. This cyclohexane ring also has a 2-pyridylamino group attached to it.</p>

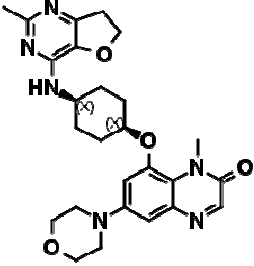
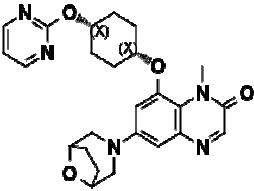
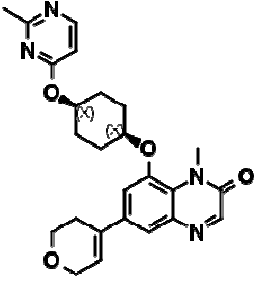
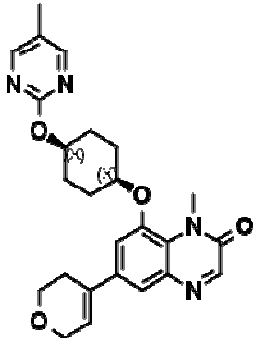
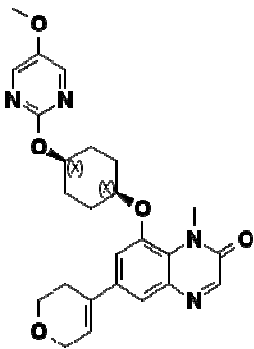
Composto No.	
2	
3	
4	
5	
6	

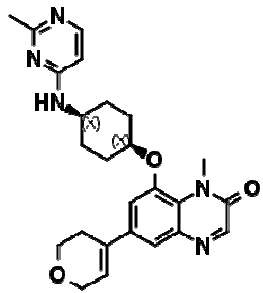
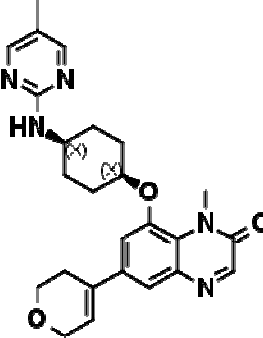
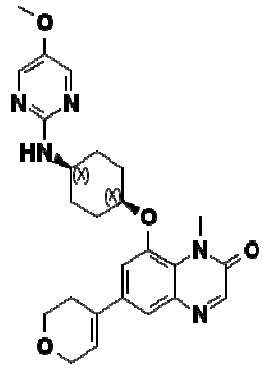
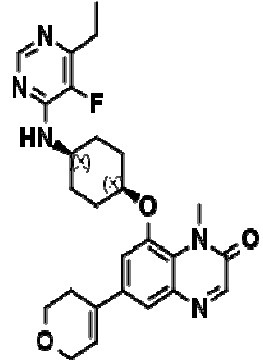
Composto No.	
7	
8	
9	
10	

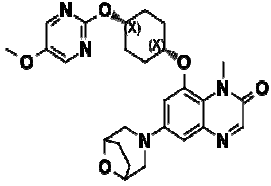
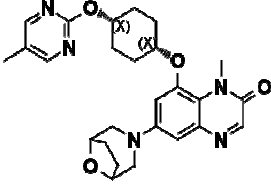
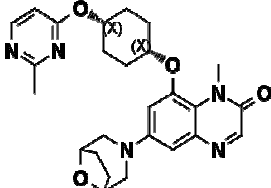
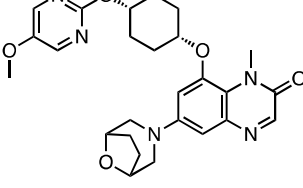
Composto No.	
11	
12	
13	
14	

Composto No.	
15	
16	
19	
20	
21	

Composto No.	
22	
23	
24	
25	
26	
27	

Composto No.	
28	
29	
30	
31	
32	

Composto No.	
33	
34	
35	
36	

Composto No.	
37	
38	
39	
40	

[00330] Como descrito aqui, os compostos aqui descritos podem opcionalmente ser substituídos por um ou mais substituintes, tal como são ilustrados geralmente acima, ou como exemplificados por classes, subclasses e espécies particulares. Será apreciado que a frase "opcionalmente substituído" é usada de forma intercambiável com a frase "substituído ou não substituído". Em geral, o termo "substituído", precedido pelo termo "opcionalmente" ou não, refere-se à substituição de um ou mais radicais hidrogênio em uma determinada estrutura pelo radical de um substituinte especificado. A menos que indicado ao contrário, um grupo opcionalmente substituído pode ter um substituinte em cada posição substituível do grupo. Quando mais de uma posição em uma dada estrutura pode ser substituída por mais de um substituinte selecionado a partir de um grupo especificado, o substituinte pode ser

o mesmo ou diferente em cada posição.

[00331] Onde quimicamente viável ou quimicamente estável, um grupo molecular aqui descrito é não substituído ou substituído (isto é, "opcionalmente substituído"). Conforme descrito aqui, quando o termo "opcionalmente substituído" precede uma lista, o dito termo refere-se a todos os grupos substituíveis subsequentes nessa lista. Por exemplo, se o grupo X é "halogênio; alquila ou fenila opcionalmente substituída;" então X pode ser alquila opcionalmente substituída ou fenila opcionalmente substituída. Da mesma forma, se o termo "opcionalmente substituído" seguir uma lista, o dito termo também se refere a todos os grupos substituíveis na lista anterior, a menos que indicado de outra forma. Por exemplo: se X é halogênio, C₁₋₄ alquila ou fenila, em que X é opcionalmente substituído por J^x, então C₁₋₄ alquila e fenila podem ser opcionalmente substituídos por J^x. Como é evidente para um versado na técnica, grupos tais como H, halogênio, NO₂, CN, NH₂, OH ou OCF₃ não seriam incluídos porque não são grupos substituíveis. Como também está claro para um versado na técnica, um anel heteroarila ou heterocíclico contendo um grupo NH pode ser opcionalmente substituído substituindo-se o átomo de hidrogênio pelo substituinte.

[00332] Nas modalidades, um grupo (por exemplo, um C₁₋₄ alquila; C₃₋₅ cicloalquila; um heterociclila tal como oxetanila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila ou morfolinila; um arila tal como uma fenila; ou uma heteroarila) não é substituído.

[00333] Nas modalidades, um grupo (por exemplo, uma C₁₋₄ alquila; C₃₋₅ cicloalquila; uma heterociclila tal como oxetanila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila ou morfolinila; uma arila tal como uma fenila; ou uma heteroarila) é substituído. Nas modalidades, um grupo compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 substituintes, conforme a valência e a estabilidade química permitem.

[00334] Combinações de substituintes previstos nesta descrição

são preferencialmente aquelas que resultam na formação de compostos estáveis ou quimicamente viáveis. O termo "estável", conforme usado aqui, refere-se a compostos que não são substancialmente alterados quando submetidos a condições para permitir sua produção, detecção e, preferencialmente, sua recuperação, purificação e uso para um ou mais dos objetivos aqui descritos. Nas modalidades, um composto estável ou composto quimicamente viável é aquele que não é substancialmente alterado quando mantido a uma temperatura de 40° C ou menos, na ausência de umidade ou outras condições quimicamente reativas, por pelo menos uma semana.

[00335] O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

[00336] O termo "alquila" ou "grupo alquila", como aqui utilizado, significa uma cadeia de hidrocarboneto de cadeia linear (isto é, não ramificada) ou ramificada, substituída ou não substituída que é completamente saturada. A menos que indicado ao contrário, os grupos alquila têm de 1 a 8 átomos de carbono (representados como "C₁₋₈ alquila"). Nas modalidades, os grupos alquila têm de 1 a 4 átomos de carbono (representados como "C₁₋₄ alquila"). Nas modalidades, uma entidade molecular descrita como uma "C₀₋₄ alquila" inclui uma ligação covalente (por exemplo, um "C₀ alquila") ou uma cadeia C₁₋₄ alquila, conforme descrito aqui. Exemplos de grupos alquila incluem metila, etila, propila, butila, isopropila, isobutila, sec-butila e terc-butila.

[00337] O termo "heterociclo", "heterociclila", "heterocicloalquila" ou "heterocíclico", conforme aqui utilizado, refere-se a um sistema de anéis monocíclicos, bicíclicos ou tricíclicos no qual pelo menos um anel no sistema contém um ou mais heteroátomos, que é igual ou diferente, e que é completamente saturado ou que contém uma ou mais unidades de insaturação, mas que não é aromático, e que tem um único ponto de ligação ao restante da molécula. Em algumas modalida-

des, o grupo "heterociclo", "heterociclila", "heterocicloalquila" ou "heterocíclico" tem três a catorze membros no anel, nos quais um ou mais membros no anel são um heteroátomo selecionado independentemente a partir de oxigênio, enxofre, nitrogênio ou fósforo, e cada anel no sistema contém de 3 a 8 membros. Exemplos de anéis heterocíclicos incluem, entre outros, os seguintes monociclos: 2-tetra-hidrofuranila, 3-tetra-hidrofuranila, 2-tetra-hidrotiofenila, 3-tetra-hidrotiofenila, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tetra-hidrofuranila, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinila, 2-pirrolidinila, 3-pirrolidinila, 1-tetra-hidropiperazinila, 2-tetra-hidropiperazinila, 3-tetra-hidropiperazinila, 1-piperidinila, 2-piperidinila, 3-piperidinila, 1-pirazolinila, 3-pirazolinila, 5-pirazolinila, 1-piperidinila, 2-piperidinila, 3-piperidinila, 4-piperidinila, 2-tiazolidinila, 3-tiazolidinila, 4-tiazolidinila, 1-imidazolidinila, 2-imidazolidinila, 4-imidazolidinila, 5-imidazolidinila; e os seguintes biciclos: 3-1H-benzimidazol-2-ona, 3-(1-alkil)-benzimidazol-2-ona, indolinila, tetra-hidroquinolinila, tetra-hidroisoquinolinila, benzotiolano, benzoditiano e 1,3-di-hidro-imidazol-2-ona.

[00338] O termo "heteroátomo", conforme usado aqui, significa um ou mais de oxigênio, enxofre, nitrogênio ou fósforo, incluindo qualquer forma oxidada de nitrogênio, enxofre ou fósforo; a forma quaternizada de qualquer nitrogênio básico; ou um nitrogênio substituível de um anel heterocíclico, por exemplo, N (como em 3,4-di-hidro-2H-pirrolila), NH (como em pirrolidinila) ou NR^+ (como em pirrolidinila N-substituída).

[00339] O termo "insaturado", como usado aqui, significa que uma porção tem uma ou mais unidades de insaturação.

[00340] O termo "alcóxi" ou "tioalquila", conforme usado aqui, refere-se a um grupo alquila, conforme definido anteriormente, ligado à cadeia principal de carbono através de um átomo de oxigênio ("alcóxi") ou de enxofre ("tioalquila").

[00341] Os termos "haloalquila", "haloalquenila" e "haloalcóxi", co-

mo aqui utilizados, significam alquila, alquenila ou alcóxi, conforme o caso, substituídos por um ou mais átomos de halogênio. O termo "halogênio" significa F, Cl, Br ou I.

[00342] O termo "arila", como usado aqui, usado isoladamente ou como parte de uma porção maior como em "aralquila", "aralcóxi" ou "ariloxialquila", refere-se a um sistema de anel carbocíclico monocíclico, bicíclico ou tricíclico tendo um total de seis a catorze membros de anel, em que o dito sistema de anel tem um único ponto de ligação ao resto da molécula, pelo menos um anel no sistema é aromático e em que cada anel no sistema contém 4 a 7 membros de anel. O termo "arila" pode ser usado de forma intercambiável com o termo "anel arila". Exemplos de anéis arila incluem fenila, naftila e antraceno.

[00343] Como usado aqui, o termo "heteroarila", usado isoladamente ou como parte de uma porção maior como em "heteroaralquila" ou "heteroarilalcóxi", refere-se a um sistema de anel monocíclico, bicíclico e tricíclico com um total de cinco a catorze membros de anel, em que o dito sistema de anel tem um único ponto de ligação ao resto da molécula, pelo menos um anel no sistema é aromático, pelo menos um anel no sistema contém um ou mais heteroátomos selecionados independentemente a partir de nitrogênio, oxigênio, enxofre ou fósforo, e em que cada anel no sistema contém 4 a 7 membros. O termo "heteroarila" pode ser usado de forma intercambiável com o termo "anel heteroarila" ou o termo "heteroaromático". Outros exemplos de anéis heteroarila incluem os seguintes monociclos: 2-furanila, 3-furanila, N-imidazolila, 2-imidazolila, 4-imidazolila, 5-imidazolila, 3-isoxazolila, 4-isoxazolila, 5-isoxazolila, 2-oxazolila, 4-oxazolila, 5-oxazolila, N-pirrolila, 2-pirrolila, 3-pirrolila, 2-piridila, 3-piridila, 4-piridila, 2-pirimidinila, 4-pirimidinila, 5-pirimidinila, piridazinila (por exemplo, 3-piridazinila), 2-tiazolila, 4-tiazolila, 5-tiazolila, tetrazolila (por exemplo, 5-tetrazolila), triazolila (por exemplo, 2-triazolila e 5-triazolila), 2-tienila,

3-tienila, pirazolila (por exemplo, 2-pirazolila), isotiazolila, 1, 2,3-oxadiazolila, 1,2,5-oxadiazolila, 1,2,4-oxadiazolila, 1,2,3-triazolila, 1,2,3-tiadiazolila, 1,3,4-tiadiazolila, 1,2,5-tiadiazolila, pirazinila, 1,3,5-triazinila, e os seguintes biciclos: benzimidazolila, benzofurila, benzotiofenila, indolila (por exemplo, 2-indolila), purinila, quinolinila (por exemplo, 2-quinolinila, 3-quinolinila, 4-quinolinila) e isoquinolinila (por exemplo, 1-isoquinolinila, 3-isoquinolinila ou 4-isoquinolinila).

[00344] A menos que seja descrito ou declarado de outra forma, as estruturas descritas aqui podem incluir todas as formas isoméricas (por exemplo, enantioméricas, diastereoméricas e geométricas (ou conformacionais)) da estrutura; por exemplo, as configurações R e S para cada centro assimétrico, isômeros de ligação dupla (Z) e (E), e isômeros conformacionais (Z) e (E). Portanto, isômeros estereoquímicos únicos, bem como misturas enantioméricas, diastereoméricas e geométricas (ou conformacionais) dos presentes compostos estão dentro do escopo desta descrição. Os compostos que foram desenhados com centros estereoquímicos definidos, geralmente através do uso de uma ligação tracejada ou em negrito, são estereoquimicamente puros, mas com a estereoquímica absoluta ainda indefinida. Tais compostos podem ter a configuração R ou S. Nos casos em que a configuração absoluta foi determinada, o(s) centro(s) quiral(ais) são marcados (R) ou (S) no desenho.

[00345] A menos que indicado de outra forma, todas as formas tautoméricas dos compostos aqui descritos estão dentro do escopo de tal descrição. Além disso, a menos que indicado ao contrário, as estruturas aqui representadas também devem incluir compostos que diferem apenas na presença de um ou mais átomos isotopicamente enriquecidos. Por exemplo, compostos com as presentes estruturas, exceto a substituição de hidrogênio por deutério ou trítio, ou a substituição de um carbono por um carbono enriquecido em ^{13}C ou ^{14}C , estão dentro

do escopo desta descrição. Tais compostos são úteis, por exemplo, como ferramentas analíticas, sondas em ensaios biológicos, ou como inibidores de DNA-PK com um perfil terapêutico melhorado.

Sais Farmaceuticamente Aceitáveis

[00346] Também será apreciado que alguns dos compostos aqui descritos podem existir na forma livre ou, quando apropriado, como um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo. Um derivado farmaceuticamente aceitável inclui, mas não está limitado a, pró-fármacos, sais, ésteres, sais desses ésteres, ou qualquer outro aducto ou derivado que, após administração a um paciente em necessidade de tratamento, seja capaz de fornecer, direta ou indiretamente, um composto como aqui descrito de outra forma, ou um metabólito ou resíduo do mesmo.

[00347] Como aqui utilizado, o termo "sal farmaceuticamente aceitável" refere-se aos sais que são, dentro do escopo de um julgamento médico adequado, adequados para uso em contato com tecidos de seres humanos e animais inferiores sem toxicidade, irritação, resposta alérgica indevida e similares.

[00348] Os sais farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, S. M. Berge e outros descrevem sais farmaceuticamente aceitáveis em detalhes em J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1 a 19, 1977, que é aqui incorporado por referência em relação aos sais farmaceuticamente aceitáveis. Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos aqui descritos incluem aqueles derivados de ácidos e bases inorgânicos e orgânicos adequados. Exemplos de sais de adição de ácido não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis são os sais de um grupo amino formado com ácidos inorgânicos tal como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico e ácido perclórico ou com ácidos orgânicos tal como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico ou

ácido malônico, ou usando outros métodos utilizados na técnica, tal como troca iônica. Outros sais farmacologicamente aceitáveis incluem sais alginato, ascorbato, aspartato, benzenossulfonato, bissulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, formato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, hidriodeto, 2-hidróxi-etanossulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, malonato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, propionato, estearato, sulfato, tartarato, tiocianato, p-toluenossulfonato, undecanoato, valerato e similares. Ainda outros sais exemplares incluem adipato, benzoato, citrato, fumarato, maleato ou succinato. Os sais derivados de bases apropriadas incluem sais de metais alcalinos, metais alcalinoterrosos, amônio e $N^+(C_{1-4} \text{ alquila})_4$.

[00349] Incluída nesta descrição também está a quaternização de qualquer grupo básico contendo nitrogênio dos compostos aqui descritos. Produtos solúveis em água ou dispersáveis em óleo podem ser obtidos por essa quaternização. Os sais de metais alcalinos ou metais alcalinoterrosos representativos incluem sódio, lítio, potássio, cálcio, magnésio e similares. Outros sais farmacologicamente aceitáveis incluem, quando apropriado, cátions amônio não tóxico, amônio quaternário e amina formados usando contraíons tal como haleto, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, C_{1-8} sulfonato aril sulfonato.

Co-cristais

[00350] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto como aqui descrito (por exemplo, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), e um formador de co-cristal (CCF) é usado.

[00351] Nas modalidades, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') e um CCF estão ambos no estado sólido (por exemplo, cristalino). Nas modalidades, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') e um CCF são ligados de forma não covalente (por exemplo, por ligação hidrogênio).

[00352] Nas modalidades, um co-cristal de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') e um CCF (por exemplo, ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico) são sólidos em temperatura ambiente. Nas modalidades, um co-cristal de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') e um CCF (por exemplo, ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico) interagem por ligações não covalentes. Nas modalidades, uma interação de ligação não covalente entre um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') e um CCF (por exemplo, ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico) inclui ligação hidrogênio e / ou interações de van der Waals.

[00353] Nas modalidades, um formador de co-cristal (CCF) é ácido adípico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico ou ácido benzoico.

[00354] Nas modalidades, um co-cristal é um co-cristal que é descrito na Publicação Internacional No. WO 2015/058067, que é aqui in-

corporada por referência em sua totalidade.

[00355] Nas modalidades, um co-cristal inclui (5)-N-metil-8-(1-((2'-metil-[4,5'-bipirimidin]-6-il) amino)propan-2-il) quinolina-4-carboxamida. Nas modalidades, o composto é o enantiômero (+). Nas modalidades, o composto é o enantiômero (-).

[00356] Nas modalidades, um co-cristal inclui (5)-N-metil-8- (1-((2'-metil-4,6'-dideutero- [4,5'-bipirimidin] -6-il) amino) propan-2-il) quinolina-4-carboxamida. Nas modalidades, o composto é o enantiômero (+). Nas modalidades, o composto é o enantiômero (-).

[00357] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido cítrico como um CCF é usado.

[00358] Nas modalidades, a invenção apresenta um co-cristal que inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido fumárico como um CCF.

[00359] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido maleico como um CCF é usado.

[00360] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido succínico como um CCF é usado.

[00361] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto re-

presentado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido benzoico como um CCF é usado.

[00362] Nas modalidades, um co-cristal que inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e ácido adípico como um CCF é usado.

[00363] Em algumas modalidades, um co-cristal é usado em que esse co-cristal inclui um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) e um CCF descrito acima na forma pura isolada, ou em uma mistura como uma composição sólida quando misturado com outros materiais, por exemplo, forma livre de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) ou CCF livre.

[00364] Em algumas modalidades, composições farmacologicamente aceitáveis compreendendo um co-cristal de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37), um primeiro CCF (por exemplo, conforme descrito aqui) e um ou mais CCF livres adicionais, que podem ser iguais ou diferentes do primeiro CCF, são usadas. Em algumas modalidades, uma composição inclui um co-cristal de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fó-

mula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37), um primeiro CCF que é ácido adípico, e ácido adípico adicional. Em algumas modalidades, a relação molar geral de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) para o CCF (por exemplo, CCF total que inclui tanto um primeiro CCF (por exemplo, conforme descrito aqui e um ou mais CCF livres adicionais) em tais composições varia de cerca de 1:0,55 a cerca de 1:100. Em algumas modalidades, a relação molar geral de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) para o CCF em tais composições varia de cerca de 1:0,55 a cerca de 1:50. Em algumas modalidades, a relação molar geral do composto de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) para o CCF em tais composições está em uma faixa de cerca de 1:0,55 a cerca de 1:10. Em algumas modalidades, a relação de peso geral do composto de fórmula I para o CCF em tais composições varia de cerca de 85% em peso:15% em peso a cerca de 60% em peso:40% em peso. Em algumas modalidades, a relação em peso total do composto de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) para o CCF varia de cerca de 70% em peso:30% em peso a cerca de 60% em peso:40% em peso. Em algumas modalidades, a relação em peso total de um composto representado pela Fórmula Es-

trutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') (por exemplo, qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37) para o CCF é de cerca de 65% em peso:35% em peso.

Inibidores de DNA-PK para aumentar a eficiência da edição de genoma

[00365] A eficiência de edição de genoma dirigida pode ser aumentada através da administração a uma célula de um ou mais compostos (por exemplo, inibidores de DNA-PK) aqui descritos e um sistema de edição de genoma. Os sistemas de edição de genoma adequados para uso incluem, por exemplo, um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR ou sistema baseado em NgAgo. Os métodos, composições e kits da descrição fornecem inibidores de DNA-PK e / ou um sistema de edição de genoma para aumentar a eficiência da edição de genoma. Em algumas modalidades, a eficiência da edição de genoma por HDR é aumentada após a administração a uma célula(s) de um inibidor de DNA-PK.

[00366] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema de edição de genoma baseado em CRISPR. O sistema de edição de genoma baseado em CRISPR pode ser um sistema CRISPR-Cas ou variantes do mesmo. O sistema CRISPR-Cas pode usar quaisquer endonucleases Cas, tal como endonucleases Cas 9 e suas variantes. Exemplos de endonucleases Cas 9 incluem endonucleases Cas9 ou variantes das mesmas, tal como SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou CasD10A nickase. A endonuclease Cas pode ser de ocorrência natural, manipulada ou um mutante de nickase, ou qualquer variação das mesmas.

[00367] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma

baseado em CRISPR inclui uma sequência CRISPR, uma sequência de transativação cr (tracr), uma sequência guia e uma endonuclease Cas ou quaisquer combinações das mesmas.

[00368] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma baseado em CRISPR inclui um RNA compreendendo uma sequência CRISPR (crRNA), um RNA compreendendo uma sequência cr de transativação (tracr) (tracrRNA) e uma endonuclease Cas ou qualquer combinação das mesmas.

[00369] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma baseado em CRISPR inclui uma sequência CRISPR, uma sequência guia e uma endonuclease Cas ou uma endonuclease Cpf, ou qualquer combinação das mesmas.

[00370] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cpf. A nuclease Cpf é uma endonuclease do sistema Classe 2 CRISPR-Cas. Cpf é uma endonuclease guiada por RNA único. A nuclease Cpf pode ser de ocorrência natural, modificada ou um mutante de nickase, ou qualquer variação das mesmas. Ver, por exemplo, Zetsche e outros, "CPF1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System", Cell, 163 (3): 759-71. Em algumas modalidades, a nuclease Cpf é uma endonuclease Cpf 1.

[00371] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em meganuclease. A edição de genoma baseada em meganuclease utiliza endonucleases sequência-específicas que reconhecem grandes sítios alvo de DNA (por exemplo, tipicamente cerca de 12 pb). Ver, por exemplo, U.S. 9.365.964. As meganucleases podem clivar sequências cromossômicas únicas sem afetar a integridade geral do genoma. Em algumas modalidades, a meganuclease pode ser uma endonuclease teleguiada. Em algumas modalidades, a meganuclease pode ser uma endonuclease de íntron ou uma endonu-

lease de interina. As endonucleases teleguiadas podem pertencer à família LAGLIDADG. As meganucleases podem ser de ocorrência natural, manipuladas ou mutantes de nickase.

[00372] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genes é um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN). A ZFN é uma enzima de restrição artificial manipulada com base na fusão entre um domínio de ligação DNA - dedo de zinco e um domínio de clivagem do DNA. Ver, por exemplo, US 9.145.565.

[00373] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genes é uma Nuclease baseada em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN). As TALENs são enzimas de restrição manipuladas que são produzidas pela fusão de um domínio de ligação efector TAL - DNA a um domínio de clivagem de DNA. Ver, por exemplo, US 9.181.535.

[00374] Em algumas modalidades, o sistema de edição de genes é um sistema baseado em Argonauta. Os sistemas de edição de genes baseados em argonauta incluem uma endonuclease derivada de Argonauta e um ssDNA 5' fosforilado. Em algumas modalidades, o ssDNA fosforilado pode ter 10 a 40 nucleotídeos, 15 a 30 nucleotídeos ou 18 a 30 nucleotídeos (por exemplo, cerca de 24 nucleotídeos) de comprimento. Em algumas modalidades, a endonuclease Argonauta pode ser qualquer endonuclease. Em algumas modalidades, a endonuclease Argonauta é derivada de *Thermus thermophiles* (*TtAgo*), *Pyrococcus furiosus* (*PfAgo*) ou *Natronobacterium gregoryi* (*NgAgo*). Em algumas modalidades, o *Natronobacterium gregoryi* (*NgAgo*) é a cepa 2 (isto é, *N. gregoryi* SP2). Em algumas modalidades, a endonuclease Argonauta é *NgAgo*. Ver, por exemplo, Gao e outros, "DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute", Nature Biotechnology, maio de 2016.

[00375] Os inibidores de DNA-PK podem ser qualquer inibidor de DNA-PK. O inibidor de DNA-PK pode ser qualquer composto ou subs-

tância que causa a inibição de um DNA-PK. O inibidor de DNA-PK pode ser um composto, molécula pequena, anticorpo ou sequência de nucleotídeos. Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK são compostos representados pela Fórmula Estrutural I ou pela Fórmula Estrutural II. Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK são compostos representados pela Fórmula Estrutural I' ou Fórmula Estrutural II'. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é um co-cristal que inclui qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37, e ácido adípico.

[00376] Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37, ou uma combinação dos mesmos.

[00377] Em algumas modalidades, qualquer inibidor de NHEJ pode ser usado para aumentar a eficiência da edição de genoma por HDR. Em algumas modalidades, o inibidor de NHEJ é qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37, ou uma combinação dos mesmos.

[00378] Em algumas modalidades, o inibidor de NHEJ pode ser qualquer composto ou substância que causa a inibição de uma NHEJ. Exemplos de inibidor de NHEJ incluem inibidores de DNA-PK. O inibidor de NHEJ pode ser um composto, molécula pequena, anticorpo ou sequência de nucleotídeos. Em algumas modalidades, os inibidores de NHEJ são compostos representados pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis ou seus co-cristais. Em algumas modalidades, o inibidor de NHEJ é qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37, ou uma combinação dos mesmos.

Em algumas modalidades, a eficiência de edição de genoma aumentada é em cerca de 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou

100 vezes, em comparação com uma condição na qual um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma não são administrados a uma célula, ou em comparação com uma condição na qual apenas um sistema de edição de genoma é administrado a uma célula(s) e não um inibidor de DNA-PK.

Uso de inibidores de DNA-PK, composições e kits

[00379] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para sensibilizar uma célula a um agente terapêutico ou um estado de doença que induz uma lesão de DNA compreendendo a etapa de colocar em contato a célula com um ou mais inibidores de DNA-PK aqui descritos, como os de Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''), ou seus sais farmacologicamente aceitáveis ou seus co-cristais.

[00380] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para potencializar um regime terapêutico para tratamento de câncer, compreendendo a etapa de administrar a um indivíduo em necessidade de tratamento uma quantidade eficaz de um inibidor de DNA-PK descrito neste documento, como os de Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um co-cristal do mesmo. Em um aspecto, o regime terapêutico para o tratamento de câncer inclui radioterapia.

[00381] Os inibidores de DNA-PK aqui descritos são úteis nos casos em que a radioterapia é indicada para aumentar o benefício terapêutico de tal tratamento. Além disso, a radioterapia é frequentemente indicada como adjuvante à cirurgia no tratamento de câncer. O objetivo da radioterapia no cenário adjuvante é reduzir o risco de recorrência e aumentar a sobrevida livre de doença quando o tumor primário tiver sido controlado. A radioterapia adjuvante é indicada em várias

doenças, incluindo câncer de cólon, de reto, de pulmão, gastroesofágico e de mama, conforme descrito abaixo.

[00382] Outro agente quimioterápico anticâncer pode ser usado com um inibidor de DNA-PK aqui descrito em um regime terapêutico para o tratamento de câncer, com ou sem radioterapia. A combinação de um inibidor de DNA-PK aqui descrito com outros agentes pode potencializar o protocolo quimioterápico. Por exemplo, um inibidor de DNA-PK aqui descrito pode ser administrado com etoposido ou bleomicina, agentes conhecidos por causar quebra da fita de DNA.

[00383] É ainda descrita a radiosensibilização de células tumorais utilizando os inibidores de DNA-PK. Um inibidor de DNA-PK que pode "radiossensibilizar" uma célula, como aqui utilizado, é definido como uma molécula, preferencialmente uma molécula de baixo peso molecular, administrada a animais em quantidade terapeuticamente eficaz para aumentar a sensibilidade das células à radiação eletromagnética e / ou para promover o tratamento de doenças que são tratáveis com radiação eletromagnética (por exemplo, raios X). As doenças tratáveis com radiação eletromagnética incluem doenças neoplásicas, tumores benignos e malignos, e células cancerosas.

[00384] Ainda são aqui fornecidos métodos de tratamento de câncer em um animal que incluem administrar ao animal uma quantidade eficaz de um inibidor de DNA-PK descrito neste documento, como, por exemplo, um composto da invenção. A invenção é ainda direcionada a métodos de inibição do crescimento de células cancerosas, incluindo processos de proliferação celular, invasividade, e metástase em sistemas biológicos. Os métodos incluem o uso de um composto da invenção como um inibidor do crescimento de células cancerosas. De preferência, os métodos são usados para inibir ou reduzir o crescimento de células cancerosas, invasividade, metástase ou incidência de tumores em animais vivos, tal como mamíferos. Os compostos da invenção po-

dem ser utilizados, isoladamente ou em combinação com o uso de IR ou um ou mais agentes quimioterápicos, no tratamento de câncer ou na inibição do crescimento de células cancerosas. Os métodos da invenção também são facilmente adaptáveis para uso em sistemas de ensaio, por exemplo, analisando o crescimento de células cancerosas e suas propriedades, bem como identificando compostos que afetam o crescimento de células cancerosas.

[00385] Tumores ou neoplasias incluem crescimentos de células de tecido nos quais a multiplicação das células é descontrolada e progressiva. Alguns desses crescimentos são benignos, mas outros são denominados "malignos" e podem levar à morte do organismo. Neoplasias malignas ou "cânceres" são diferenciados de crescimentos benignos pelo fato de que, além de exibirem proliferação celular agressiva, podem invadir os tecidos circundantes e causar metástases. Além disso, as neoplasias malignas são caracterizadas por apresentarem uma maior perda de diferenciação (maior "desdiferenciação") e sua organização em relação umas às outras e aos tecidos circundantes. Essa propriedade também é chamada de "anaplasia".

[00386] As neoplasias tratáveis pela presente invenção também incluem tumores sólidos, isto é, carcinomas e sarcomas. Os carcinomas incluem aquelas neoplasias malignas derivadas de células epiteliais que se infiltram (invadem) os tecidos circundantes e dão origem a metástases. Adenocarcinomas são carcinomas derivados de tecido glandular ou de tecidos que formam estruturas glandulares reconhecíveis. Outra categoria ampla de cânceres inclui sarcomas, que são tumores cujas células são incorporadas a uma substância fibrilar ou homogênea como o tecido conjuntivo embrionário. A invenção também permite o tratamento de cânceres dos sistemas mieloide ou linfoide, incluindo leucemias, linfomas e outros tipos de câncer que normalmente não se apresentam como uma massa tumoral, mas são distribuídos nos sis-

temas vascular ou linforreticular.

[00387] A atividade de DNA-PK pode ser associada a várias formas de câncer, por exemplo, em oncologia adulta e pediátrica, crescimento de tumores / malignidades sólidas, carcinoma mixoide e de células redondas, tumores localmente avançados, câncer metastático, sarcomas de tecidos moles humanos, incluindo sarcoma de Ewing, metástases de câncer, incluindo metástases linfáticas, carcinoma de células escamosas, particularmente de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosas do esôfago, carcinoma oral, neoplasias das células sanguíneas, incluindo mieloma múltiplo, leucemias, incluindo leucemia linfocítica aguda, leucemia não linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielocítica crônica, e leucemia de células pilosas, linfomas de efusão (linfomas baseados em cavidades corporais), linfoma tímico, câncer de pulmão incluindo carcinoma de pequenas células do pulmão, linfoma de células T cutâneo, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, câncer do córtex adrenal, tumores produtores de ACTH, câncer de células não pequenas, câncer de mama, incluindo carcinoma de células pequenas e carcinoma ductal, cânceres gastrointestinais, incluindo câncer de estômago, câncer de cólon, câncer colorretal, pólipos associados à neoplasia colorretal, câncer de pâncreas, câncer de fígado, cânceres urológicos, incluindo câncer de bexiga, incluindo tumores primários superficiais da bexiga, carcinoma invasivo de células transicionais da bexiga, e câncer de bexiga músculo-invasivo, câncer de próstata, malignidades do trato genital feminino, incluindo carcinoma ovariano, neoplasias epiteliais peritoneais primárias, carcinoma cervical, cânceres de endométrio uterino, câncer vaginal, câncer da vulva, câncer uterino e tumores sólidos no folículo ovariano, malignidades do trato genital masculino, incluindo câncer testicular e câncer do pênis, câncer renal, incluindo carcinoma de células renais, câncer cerebral, incluindo tumores intrínsecos do cérebro, neuroblastoma, tu-

mores astrocitários do cérebro, gliomas, invasão metastática de células tumorais no sistema nervoso central, cânceres ósseos, incluindo osteomas e osteossarcomas, cânceres de pele, incluindo melanoma maligno, progressão tumoral de queratinócitos da pele humana, câncer de células escamosas, câncer de tireoide, retinoblastoma, neuroblastoma, efusão peritoneal, efusão pleural maligna, mesotelioma, tumores de Wilms, câncer de vesícula biliar, neoplasias trofoblásticas, heman-giopericitoma e sarcoma de Kaposi. Os métodos para potencializar o tratamento destas e de outras formas de câncer são abrangidos pela invenção.

[00388] A invenção fornece um método para inibir a atividade de DNA-PK em uma amostra biológica que inclui colocar em contato a amostra biológica com um composto ou composição da invenção. O termo "amostra biológica", como aqui utilizado, significa uma amostra fora de um organismo vivo e inclui, sem limitação, culturas celulares ou extratos das mesmas; material de biópsia obtido a partir de um mamífero ou de seus extratos; e sangue, saliva, urina, fezes, sêmen, lágrimas ou outros fluidos corporais ou extratos dos mesmos. A inibição da atividade de quinase, particularmente a atividade de DNA-PK, em uma amostra biológica é útil para uma variedade de propósitos conhecidos por um versado na técnica. Exemplos de tais propósitos incluem, mas não estão limitados ao armazenamento de amostras biológicas e ensaios biológicos. Em uma modalidade, o método de inibição da atividade de DNA-PK em uma amostra biológica é limitado a métodos não terapêuticos.

Uso para edição de genoma

[00389] A edição de genoma, em que regiões genômicas particulares são precisamente alteradas, tem um grande potencial terapêutico.

[00390] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para editar uma ou mais regiões genômicas alvo, para reparar uma

quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por uma via HDR, para inibir ou suprimir o reparo mediado por NHEJ de uma quebra de DNA em um ou mais regiões genômicas alvo, e para modificar a expressão de um ou mais genes ou proteínas através da administração a uma célula(s) de um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK.

[00391] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos para modificar a expressão de um ou mais genes ou proteínas, compreendendo administrar a uma ou mais células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK aqui descrito, em que o sistema de edição de genoma interage com um ácido nucleico de uma ou mais regiões genômicas alvo de um ou mais genes alvo, resultando na edição de uma ou mais regiões genômicas alvo, e em que a edição modifica a expressão de um gene(s) a jusante e / ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo(s).

[00392] O sistema de edição de genoma pode ser qualquer sistema de edição de genoma que pode editar uma região genômica alvo em uma célula(s). Sistemas de edição de genoma exemplificativos são descritos em detalhes acima e podem incluir, por exemplo, um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR ou sistema baseado em NgAgo.

[00393] A edição de uma ou mais regiões genômicas alvo inclui qualquer tipo de manipulação genética ou engenharia do genoma de uma célula. A edição de uma ou mais regiões genômicas alvo pode incluir inserções, deleções ou substituições de regiões genômicas em uma célula(s) realizadas por uma ou mais endonucleases. As regiões genômicas compreendem o material genético de uma célula(s), tal

como DNA, RNA, polinucleotídeos e oligonucleotídeos. As regiões genômicas em uma célula(s) também compreendem os genomas das mitocôndrias ou cloroplastos contidos em uma célula(s).

[00394] O inibidor de DNA-PK pode ser qualquer inibidor de DNA-PK. O inibidor de DNA-PK pode ser qualquer composto ou substância que cause inibição de um DNA-PK. O inibidor de DNA-PK pode ser um composto, molécula pequena, anticorpo ou sequência de nucleotídeos. Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK são compostos representados pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''). Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK são compostos representados pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''), Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III'''). Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é um co-cristal que inclui qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37, e ácido adípico. Em algumas modalidades, a razão de ácido adípico para qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é de cerca de 5 a 0,5, ou quaisquer razões entre elas. Em algumas modalidades, a razão de ácido adípico para qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é de cerca de 4 a 0,5, ou quaisquer razões entre elas. Em algumas modalidades, a razão de ácido adípico para qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é de cerca de 3 a 0,5, ou quaisquer razões entre elas. Em algumas modalidades, a razão de ácido adípico para qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é de cerca de 2 a 0,5, ou quaisquer razões entre elas. Em algumas modalidades, a razão de ácido adípico para qualquer um dos compostos Nos. 1 a 37 é de cerca de 2 a 1,0, ou quaisquer razões entre elas. Em algumas modalidades, os inibidores de NHEJ são compostos representados pela Fórmula Estrutural (I), Fórmula (II), Fórmula (II'), Fórmula (II''),

Fórmula (II'''), Fórmula (III), Fórmula (III'), Fórmula (III'') ou Fórmula (III''') ou qualquer combinação das mesmas.

[00395] Em algumas modalidades, são aqui fornecidos métodos de tratamento de um indivíduo com uma doença ou condição em necessidade de tratamento para editar uma ou mais regiões genômicas alvo em uma célula(s) do indivíduo, compreendendo administrar a uma ou mais células um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK.

[00396] Em algumas modalidades, os métodos aqui fornecidos são usados para modificar a expressão de um gene, uma molécula de RNA, uma proteína, um grupo de proteínas ou proteínas a jusante em uma via. Essa modificação pode ser usada para tratar uma doença, uma disfunção, uma homeostase orgânica anormal, adquirida ou hereditária ou devido ao processo de envelhecimento. Como usado aqui, o termo "modificar" ou "modificando" inclui modular, aprimorar, diminuir, aumentar, inserir, deletar, nocautear, "knocking-in" e similares.

[00397] Um versado na técnica entende que doenças, adquiridas ou hereditárias, ou obtidas de outra forma, envolvem uma desregulação dos mecanismos homeostáticos, incluindo o envolvimento da função de genes ou proteínas. Para este fim, um versado na técnica pode usar os métodos aqui fornecidos para modular, modificar, aprimorar, diminuir ou, de outro modo, fornecer uma função gênica em um indivíduo.

[00398] A modificação da expressão do gene e a consequente expressão da proteína em uma célula(s) podem ser alcançadas pelos métodos aqui fornecidos, por exemplo, por edição específica (por exemplo, substituição, inserção ou deleção, qualquer combinação dos mesmos) de uma sequência de ácido nucleico em qualquer de um éxon, um íntron, um sítio de início de transcrição, uma região promotora, uma região potenciadora, uma região silenciadora, uma região iso-

lante, um anti-repressor, um elemento regulador pós-traducional, um sinal de poliadenilação (por exemplo, poli A mínimo), uma região conservada, um sítio de ligação ao fator de transcrição, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00399] Em algumas modalidades, os métodos, kits e composições aqui fornecidos são usados para tratar um indivíduo que tem câncer. O método de tratamento de um indivíduo com um câncer ou condição relacionada ao câncer compreende administrar a uma célula(s) do indivíduo um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma. A administração do inibidor de DNA-PK e do sistema de edição de genoma pode ser *in vivo* ou *ex vivo*.

[00400] O câncer pode ser de qualquer tipo de câncer. O câncer inclui tumores sólidos tal como de mama, ovário, próstata, pulmão, rim, gástrico, cólon, testicular, cabeça e pescoço, pâncreas, cérebro, melanoma e outros tumores de órgãos de tecidos e cânceres das células sanguíneas, tal como linfomas e leucemias, incluindo leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia linfocítica de células T, e linfomas de células B. Os cânceres podem incluir melanoma, leucemia, astrocitoma, glioblastoma, linfoma, glioma, linfoma de Hodgkins, leucemia linfocítica crônica e câncer de pâncreas, de mama, tireoide, ovário, útero, testículo, hipófise, rim, estômago, esôfago e reto.

[00401] Em algumas modalidades, os métodos, kits e composições aqui fornecidos são utilizados para tratar um indivíduo com um ou mais dos seguintes cânceres: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cânceres relacionados à AIDS, linfoma relacionado à AIDS, câncer anal, câncer de apêndice, astrocitoma, cerebelo ou cerebral infantil, carcinoma basocelular, câncer de duto biliar, extra-hepático (ver colangiocarcinoma), câncer de bexiga, tumor ósseo, osteossarcoma / histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco cerebral, câncer de cérebro, tumor cerebral, astrociti-

toma cerebelar, tumor cerebral, astrocitoma cerebral / glioma maligno, tumor cerebral, ependimoma, tumor cerebral, meduloblastoma, tumor cerebral, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais, tumor cerebral, glioma das vias visuais e hipotalâmico, câncer de mama, adenomas / carcinoides brônquicos, linfoma de Burkitt, tumor carcinóide, infância, tumor carcinóide gastrointestinal, carcinoma de sítio primário desconhecido, linfoma do sistema nervoso central, astrocitoma cerebral primário, infância, astrocitoma cerebral / glioma maligno, infância, câncer do colo do útero, cânceres da infância, condrossarcoma, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide crônica, distúrbios mieloproliferativos crônicos, câncer de cólon, linfoma cutâneo de células T, tumor desmoplásico de pequenas células, câncer endometrial, ependimoma, hemangioendotelioma epitelióide (EHE), câncer de esôfago, Sarcoma de Ewing na família de tumores de Ewing, tumor de células germinativas extracranianas, tumor de células germinativas extragonadais, câncer de duto biliar extra-hepático, câncer de olhos, melanoma intraocular, câncer de olhos, retinoblastoma, câncer de vesícula biliar, câncer gástrico (estômago), tumor carcinóide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinativas: extracranianas, extragonadais ou ovarianas, tumor trofoblástico gestacional, glioma do tronco cerebral, glioma, astrocitoma cerebral infantil, glioma, glioma das vias visuais e hipotalâmico, carcinóide gástrico, leucemia de células pilosas, câncer de cabeça e pescoço, câncer cardíaco, câncer hepatocelular (fígado), linfoma de Hodgkin, câncer hipofaríngeo, glioma hipotalâmico e glioma das vias visuais, infância, melanoma intraocular, carcinoma de células das ilhotas (pâncreas endócrino), sarcoma de Kaposi, câncer de rim (câncer de células renais), câncer de laringe, leucemias, leucemia linfoblástica aguda (também chamada leucemia linfocítica aguda), leucemia mieloide aguda (também chamada leucemia mielógena aguda), leucemia, linfocítica crôni-

ca (também chamada leucemia linfocítica crônica), Leucemia, mielógena crônica (também chamada leucemia mieloide crônica), leucemia, de células pilosas, câncer de lábio e cavidade oral, lipossarcoma, câncer de fígado (primário), câncer de pulmão, de células não pequenas, câncer de pulmão, de células pequenas, linfomas, linfoma relacionado à AIDS, linfoma de Burkitt, linfoma cutâneo de células T, linfomas de Hodgkin, Linfoma não Hodgkin (uma classificação antiga de todos os linfomas, exceto Hodgkin), Macroglobulinemia do sistema nervoso central primário, Waldenström, câncer de mama masculino, histiocitoma fibroso maligno de osso / osteossarcoma, meduloblastoma, melanoma infantil, melanoma intraocular (olho), câncer de células de Merkel, mesotelioma, mesotelioma maligno adulto, câncer de pescoço de células escamosas metastáticas infantis com câncer de boca primário oculto, síndrome de neoplasia endócrina múltipla, mieloma múltiplo / neoplasia de células plasmáticas, micose fungoide, síndromes mielodisplásicas, doenças mielodisplásicas / mieloproliferativas, leucemia mielógena, leucemia mieloide crônica, leucemia mieloide aguda adulta, mieloma agudo infantil, múltiplas (câncer da medula óssea), distúrbios mieloproliferativos, mixoma crônico, câncer da cavidade nasal e paranasal, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma não Hodgkin, câncer de pulmão de células não pequenas, oligodendroglioma, câncer oral, câncer orofaríngeo, osteossarcoma / histiocitoma fibroso maligno dos ossos, câncer de ovário, câncer epitelial de ovário (tumor epitelial-estroma de superfície), tumor de células germinativas de ovário, tumor de baixo potencial maligno do ovário, câncer de pâncreas, câncer de células das ilhotas do pâncreas, câncer de seio paranasal e cavidade nasal, câncer de paratireoide, câncer de pênis, câncer de faringe, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, pineoblastoma e tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais, adenoma pituitário, neoplasia das células plasmáticas / mieloma múltiplo,

blastoma pleuropulmonar, linfoma primário do sistema nervoso central, câncer de próstata, câncer retal, carcinoma de células renais (câncer de rim), câncer da pélvis renal e ureter, câncer de células transicionais, retinoblastoma, rabdomyossarcoma, câncer de glândula salivar, sarcoma, família de tumores de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tecidos moles, sarcoma uterino, síndrome de Sézary, câncer de pele (não melanoma), câncer de pele (melanoma), carcinoma de células de Merkel da pele, câncer de pulmão de pequenas células, câncer de intestino delgado, sarcoma de tecidos moles, carcinoma de células escamosas - ver câncer de pele (não melanoma), câncer de células escamosas do pescoço com sítio primário oculto, metastático, câncer de estômago, tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial, linfoma de células T cutâneas (micose fungoide e síndrome de Sézary), câncer testicular, câncer de garganta, timoma, timoma e carcinoma tímico, câncer de tireoide, câncer de células transicionais da pelve renal e ureter, tumor trofoblástico gestacional, carcinoma de sítio primário desconhecido de adulto, câncer de sítio primário desconhecido de, infância, pelve renal e ureter, câncer de células transicionais, câncer de uretra, câncer uterino, câncer endometrial, sarcoma uterino, câncer vaginal, glioma das vias visuais e hipotalâmico, câncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenström, ou tumor de Wilms (câncer de rim).

[00402] Em algumas modalidades, genes alvo exemplificativos associados ao câncer incluem ABL1, ABL2, ACSL3, AF15Q14, AF1Q, AF3p21, AF5q31, AKAP9, A T1, AKT2, ALDH2, AL, AL017, APC, ARHGEF12, ARHH, ARID1A, ARID2, ARNT, ASPSCR1, ASXL1, ATF1, ATIC, ATM, ATRX, AXIN1, BAP1, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL3, BCL5, BCL6, BCL7A, BCL9, BCOR, BCR, BHD, BIRC3, BLM, BMPRIA, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRD3, BRD4, BRIPI, BTG1, BUB1B, C12orf9, C15orf21, C15orf55, C16orf75, C2orf44, CAMTA1, CANT1, CARD11, CARS, CBFA2T1, CBFA2T3, C.BFB, CBL, CBLB,

CBLC, CCDC6, CCNB1IP1, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CD273, CD274, CD74, CD79A, CD79B, CDH1, CDH11, CDK12, CDK4, CDK6, CD N2A, CD N2a(p14), CD N2C, CDX2, CEBPA, CEPI, CHCHD7, CHEK2, CHIC2, CHNI, 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, DNMT2, DNMT3A, DUX4, EBF1, ECT2L, EGFR, E1F4A2, ELF4, ELK4, ELKS, ELL, ELN, EML4, EP300, EPS 15, ERBB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERG, ETVI, ETV4, ETV5, ETV6, EVI1, EWSR1, EXT1, EXT2, EZH2, EZR, FAFL6, FAM22A, FAM22B, FAM46C, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FBXO1, FBXW7, FCGR2B, FEV, FGFR1, FGFRIOP, FGFR2, FGFR3, FTI, FIIT, FIP1L1, FLU, FLJ27352, FLT3, FNBP1, FOXL2, FOXO1A, FOXO3A, FOXP1, FSTL3, FUBP1, FUS, FVT1, GAS7, GATA1, GATA2, GATA3, GMPS, GNA11, GNAQ, GNAS, GOLGA5, GOPC, GPC3, GPHN, GRAF, H3F3A, IICMOGT-1, IIEAB, HERPUD1, IIEY1, IIIPI, HIST1H3B, HIST1H4I, IILF, HLXB9, HMGA1, HMGA2, HNRNPA2B1, HOOK3, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HRAS, IIRPT2, HSPCA, HSPCB, IDH1, IDH2, IGH, IGK, IGL, IKZF1, IL2, IL21R, IL6ST, IL7R, IRF4, IRTA1, ITK, JAK1, JAK2, JAK3, JAZF1, JUN, KCNJ5, KDM5A, KDM5C, KDM6A, KDR, KIAA1549, KIF5B, KIT, KLF4, KLK2, KRAS, KTN1, LAF4, LASPI, LCK, LCP1, LCX, LHFP, LIFR, LMO1, LM02, LPP, LRIG3, LYL1, MADH4, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAX, MDM2, MDM4, MDS1, MDS2, MECT1, MED12, MEN1, MET, MITF, MKL1, MLF1, MLI1, 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, NPML, NR4A3, NRAS, NSDI, NT5C2, NTRK1, NTRK3, EM UMAI, 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, RAPIGDSI, RARA, RBI, RBM15, RECQL4, REL, RET, RNF43, ROS1, RPL10, RPL22, RPL5, RPN1, RUND2A, 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, XPOI, YWHAE, ZNF145, ZNF198, ZNF278, ZNF331, ZNF384, ZNF521, ZNF9, ZRSR2 ou quaisquer combinações dos mesmos.

[00403] Em algumas modalidades, os métodos aqui fornecidos são usados para tratar um indivíduo que tem um distúrbio hereditário. O método de tratamento de um indivíduo com uma doença ou condição genética ou distúrbio hereditário, compreende administrar a uma célula(s) do indivíduo um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma. A administração do inibidor de DNA-PK e do sistema de edi-

ção de genoma pode ser *in vivo* ou *ex vivo*.

[00404] O distúrbio hereditário pode resultar de mutações ou duplicações em regiões cromossômicas (por exemplo, de mutações pontuais, deleções, inserções, deslocamento de quadro, duplicações ou deleções cromossômicas). O distúrbio hereditário pode ser qualquer distúrbio hereditário.

[00405] Em algumas modalidades, o distúrbio hereditário é a síndrome de deleção de 22q11.2, síndrome de Angelman, doença de Canavan, doença de Charcot-Marie-Tooth, daltonismo, Cri du chat, síndrome de Down, distrofia muscular de Duchenne, hemocromatose, hemofilia, síndrome de Klinefelter, neurofibromatose, fenilcetonúria, doença renal policística, síndrome de Prader-Willi, doença das células falciformes, atrofia muscular espinhal, doença de Tay-Sachs, síndrome de Turner, hemoglobinopatia, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00406] Em algumas modalidades, o distúrbio hereditário é síndrome de deleção de 1p36, síndrome de deleção de 18p, deficiência de 21-hidroxilase, 47 XXX (síndrome do triplo X), 47 XXY (síndrome de Klinefelter), porfiria com deficiência de 5-ALA desidratase, deficiência de ALA desidratase, porfiria por deficiência de desidratase 5-aminolevulínica, síndrome de deleção de 5p, Cri du chat (síndrome 5p-AKA), ataxia telangiectasia (AKA AT), deficiência de alfa 1-antitripsina (AAT), aceruloplasminemia, acondrogênese tipo II (ACG2), acondroplasia (ACH), deficiência de beta-glucosidase ácida, doença de Gaucher (qualquer tipo, por exemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3),acrocefalossindactilia (Apert), síndrome de Apert,acrocefalossindactilia (qualquer tipo, por exemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 5), síndrome de Pfeiffer,acrocefalia, doença de Gaucher cerebral aguda, porfiria aguda intermitente (AIP), deficiência de ACY2, doença de Alzheimer (DA), craniosinostose do tipo Adelaide, síndrome de Muenke, Adenomatous Polyposis coli, poliposo adenomatosa familiar, poliposo adenomatosa

do cólon, poliposo adenomatosa familiar (ADP), deficiência de adenosuccinato liase, distúrbios das glândulas adrenais, síndrome adrenogenital, adrenoleucodistrofia, síndrome de insensibilidade aos andrógenos (AIS), alcaptonúria (AKU), porfiria de ALA desidratase, porfiria de ALA-D, porfiria de ALA desidratase, síndrome de Alagille, albinismo, alcaptonúria, doença de Alexander, ocronose alcaptonúrica, alcaptonúria, doença inibidora da alfa-1 proteinase, enfisema relacionado à alfa-1, deficiência de alfa-galactosidase A, doença de Fabry, síndrome de Alström, doença de Alexander (ALX), Amelogênese imperfeita, deficiência de ácido amino-levulínico desidratase, deficiência de aminoacilase 2, doença de Canavan, doença de Anderson-Fabry, síndrome de insensibilidade aos androgênios, anemia, sideroblástica hereditária, anemia sideroblástica ligada ao X, anemia esplênica e / ou anemia familiar, angioqueratoma corporal difuso, angioqueratoma difuso, angiomasose da retina, doença de von Hippel-Lindau, resistência à APC, tipo Leiden, trombofilia de fator V de Leiden, síndrome de Apert, deficiência de AR, síndrome de insensibilidade aos andrógenos, doença de Charcot-Marie-Tooth (qualquer tipo, por exemplo, CMT1, CMTX, CMT2, CMT2, CMT4, CMT de início precoce severo), aracnodactilia, síndrome de Marfan, ARNSHL, surdez não sindrômica (autossômica recessiva, autossômica dominante, ligada ao x, ou mitocôndria), artrooftalmopatia progressiva hereditária, síndrome de Stickler (por exemplo, COL2A1, COL11A1, COL11A2, COL9A1), artrocalasia múltipla congênita, síndrome de Ehlers – Danlos (por exemplo, tipo de hiper-mobilidade, tipo de artrocalasia, tipo clássico, tipo vascular, tipo de cifoscoliose, tipo de dermatosparaxia), deficiência de Asp, deficiência de Aspa, deficiência de aspartoacilase, ataxia – telangiectasia, Austimo – Demência – Ataxia – Perda de Uso Final da Mão, síndrome de Rett, ALS juvenil autossômica dominante, síndrome opitz G / BBB autossômica dominante, forma autossômica recessiva da ALS juvenil tipo 3,

esclerose lateral amiotrófica (qualquer tipo; por exemplo, 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, FTDALS2, FTDALS2, IBMPFD2), perda auditiva não sindrômica autossômica recessiva, comprometimento auditivo neurossensorial autossômico recessivo e bócio, síndrome de Pendred, doença de Alexander (AxD), síndrome de Ayerza, hipertensão arterial pulmonar familiar, variante B do hexosaminidase GM 2 gangliosidose, doença de Sandhoff, distúrbio relacionado ao BANF, neurofibromatose (qualquer tipo, por exemplo, NF1, NF2, schwannomatose), síndrome de Beare-Stevenson cutis gyrata, peritonite paroxística benigna, síndrome de Benjamin, beta-talassemia, deficiência de BH4, deficiência de tetra-hidrobiopterina, neurofibromatose acústica bilateral, deficiência de biotinidase, câncer de bexiga, distúrbios hemorrágicos, trombofilia de fator V de Leiden, síndrome de Bloch-Sulzberger, incontinência pigmentar, síndrome de Bloom, doenças ósseas, doença de Bourneville, esclerose tuberosa, doenças cerebrais, doença causada por príons, câncer de mama, síndrome de Birt-Hogg-Dubé, doença dos ossos quebradiços, osteogênese imperfeita, síndrome de polegar amplo-hálux, síndrome de Rubinstein-Taybi, diabetes de bronze, hemocromatose, cirrose de bronzeamento, atrofia muscular bulboespinal, atrofia muscular espinal e bulbar ligada ao X, síndrome de Burger-Grutz, deficiência de lipoproteína lipase, síndrome familiar de CADASIL, transtorno granulomatoso crônico da CGD, displasia campomélica, síndrome de câncer familiar, câncer colorretal não poliposo hereditário, câncer de mama, câncer de bexiga, deficiência de carboxilase, múltipla deficiência de biotinidase de início tardio, síndrome do choro de gato, síndrome cardiofacial de Caylor, deficiência de ceramida trihexosidase, angiomatose cerebello-retiniana, doença de von Hippel-Lindau familiar, arteriopatia cerebral, síndrome

CADASIL, ateriopatia autossômica dominante cerebral, síndrome CADASIL, hiperamonemia cerebroatrófica, síndrome de Rett, síndrome de lipidose por cerebrosido, condrodistrofia com surdez neurossensorial, displasia otospondilomega-epifisária, condrogênese imperfeita, síndrome de auto-mutilação por coreoatetose, síndrome de Lesch-Nyhan, galactosemia clássica, galactosemia, fenda labial e palato, síndrome de Stickler, síndrome do crânio em folha de trevo com nanismo tanatofórico, displasia tanatofórica (por exemplo, tipo 1 ou tipo 2), síndrome de Coffin-Lowry (CLS), síndrome de Cockayne, síndrome de Coffin-Lowry, colagenopatia tipos II e XI, câncer colorretal não poliposo familiar, câncer colorretal não poliposo hereditário, câncer de cólon familiar, poliposo adenomatosa familiar, câncer colorretal, deficiência de HPRT completa, síndrome de Lesch-Nyhan, deficiência completa de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, neuropatia de compressão, neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão, doença do tecido conjuntivo, síndrome da anomalia conotruncal, anemia de Cooley, beta-talassemia, doença de armazenamento de cobre, doença de Wilson, doença do transporte de cobre, doença de Menkes, coproporfiria, coproporfiria hereditária, deficiência de coproporfirinogênio oxidase, síndrome de Cowden, deficiência de CPX, disartrose craniofacial, síndrome de Crouzon, disostose craniofacial, síndrome de Crouzon, doença de Crohn, fibroestenose, síndrome de Crouzon, síndrome de Crouzon com ancantosis nigricans, síndrome de Crouzon dermoesquelética, síndrome de Cockayne (CS), síndrome de Cowden, síndrome de Curschmann-Batten-Steinert, síndrome de Beare-Stevenson cutis gyrata, deficiência de D-glicerato desidrogenase, hiperocalcúria primária, síndrome de metáfise, displasia espondiloepimetafiseal, Tipo Strudwick, tipo demência de Alzheimer (DAT), hiperocalcúria genética, doença de Dent, distrofia muscular (por exemplo, do tipo de Duchenne e Becker), surdez com bócio, Síndrome de Pendred,

Síndrome de surdez-retinite pigmentosa, síndrome de Usher, doença de deficiência, Fenilalanina hidroxilase, doenças nervosas degenerativas, Síndrome de Grouchy 1, Síndrome de De Grouchy, Síndrome de Dejerine-Sottas, porfiria por deficiência de delta-aminolevulinato desidratase, demência, síndrome CADASIL, leucodistrofia desmielinogênica, doença de Alexander, tipo dermatosparático de síndrome de Ehlers-Danlos, dermatosparaxia, deficiências de desenvolvimento hereditárias, neuropatia motora hereditária distal (dHMN), neuropatia motora hereditária distal (por exemplo, DHMN-V), deficiência de DHTR, síndrome de insensibilidade aos andrógenos, esclerose difusa do corpo globoide, doença de Krabbe, síndrome de Di George, deficiência de receptor de di-hidrotestosterona, síndrome de insensibilidade aos andrógenos, neuropatia motora hereditária distal, distrofia miotônica (tipo 1 ou tipo 2), atrofia muscular espinhal distal (qualquer tipo, incluindo, por exemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, tipo 5, tipo 6), distrofia muscular de Duchenne / Becker, nanismo (qualquer tipo, egocondroplásico, acondroplasia, displasia tanatofórica), síndrome de nanismo-atrofia retiniana-surdez, síndrome de Cockayne, leucodistrofia dismielinogênica, doença de Alexander, distrofia miotônica, distrofia da retina pigmentosa-disostose, síndrome de Usher, doença de Alzheimer familiar de início precoce (EOFAD), doença de Alzheimer (incluindo, por exemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3 ou tipo 4), Doença de Ekman-Lobstein, osteogênese imperfeita, neuropatia por aprisionamento, neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão, protoporfiria eritropoiética (PPE), anemia eritroblástica, beta-talassemia, protoporfiria eritrohepática, deficiência de 5- aminolevulinato sintetase eitroide, anemia sideroblástica ligada ao X, câncer de olho, retinoblastoma FA - ataxia de Friedreich, ataxia de Friedreich, FA, anemia de fanconi, lesões e distúrbios faciais, trombofilia de fator V de Leiden, FALS, esclerose lateral amiotrófica, neuroma acústico familiar, poliposo adenomatosa familiar,

doença de Alzheimer familiar (DAF), esclerose lateral amiotrófica familiar, esclerose lateral amiotrófica, disautonomia familiar, hipertrigliceridemia familiar induzida por gordura, deficiência de lipoproteína lipase, familiar, hemocromatose familiar, hemocromatose, deficiência familiar de LPL, deficiência de lipoproteína lipase, câncer de cólon familiar não poliposo, câncer colorretal não poliposo hereditário, polisserosite paroxística hereditária, PCT familiar, porfiria cutânea tarda, neuropatia familiar com susceptibilidade à pressão, neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão, hipertensão pulmonar primária familiar (FPPH), leucoencefalopatia vascular familiar, síndrome CADASIL, FAP, adenomatosa poliposo familiar, FD, disautonomia familiar, deficiência de ferroquelatase, doença da ferroportina, hemocromatose (qualquer tipo, por exemplo, tipo 1, tipo 2A, tipo 2B, tipo 3, tipo 4, hemocromatose neonatal, aceruloplasminemia, atransferrinaemia congênita, síndrome gracile), síndrome de febre periódica, febre familiar do Mediterrâneo (FMF), síndrome FG, sinostose coronal associada ao FGFR3, degeneração fibrinoide de astrócitos, doença de Alexander, doença fibrocística do pâncreas, doença de Folling, síndrome de fra (X), síndrome do X frágil, Fragilitas ossium, osteogênese imperfeita, síndrome FRAXA, ataxia de Friedreich (FRDA), deficiência de G6PD, doença de deficiência de Galactoquinase, galactosemia, doença de deficiência de galactose-1-fosfato uridil-transferase, galactosemia, doença de deficiência de galactosilceramidase, doença de Krabbe, lipídose da galactosilceramida, doença de Krabbe, deficiência de galactosilcerebrosidase, lipídose da galactosilfosfingosina, deficiência de GALC, deficiência de GALT, galactosemia, doença semelhante a Gaucher, doença pseudo-Gaucher, deficiência de GBA, distúrbios genéticos do cérebro, enfisema genético, hemocromatose genética, hemocromatose genética, hemocromatose, hepatite de células gigantes, neonatal, hemocromatose neonatal, deficiência de GLA, glioblastoma,

retiniano, retinoblastoma, glioma retiniano, retinoblastoma, leucodistrofia de células globoides (GCL, GLD), doença de Krabbe, leucoencefalopatia de células globoides, deficiência de glucocerebrosidase, glucocerebrosidase, lipidose por glucosil cerebrosídeos, deficiência de glucosilceramida, acidúria glicérica, hiperoxalúria primária, encefalopatia por glicina, hiperglicinemia não cetótica, acidúria glicólica, hiperoxalúria primária, gangliosidose GM2, doença de Tay-Sachs, síndrome de bócio-surdez, síndrome de Pendred, síndrome de Grefe-Usher, síndrome de Usher, síndrome de Gronblad-Strandberg, pseudoxantoma elástico, hemocromatose, síndrome de Hallgren, síndrome de Usher, ictiose tipo de Arlequin, doença Hb S, hipocondroplasia (HCH), coproporfiria hereditária (HCP), malformações da cabeça e do cérebro, distúrbios auditivos e surdez, problemas auditivos em crianças, HEF2 HEF2B, hematoporfiria, porfiria, deficiência de heme sintetase, hemocromatoses, doença da hemoglobina M, metemoglobinemia tipo beta-globina, doença da hemoglobina S, hemofilia, porfiria hepatoeritropoiética (HEP), deficiência hepática de AGT, hiperoxalúria, primária, síndrome de degeneração hepatolenticular, doença de Wilson, artrooftalmopatia hereditária, síndrome de Stickler, lipidose distópica hereditária, hemocromatose hereditária (HHC), hemocromatose, telangiectasia hemorrágica hereditária (HHT), miopatia hereditária por corpos de inclusão, regeneração músculo esquelética, anemia hereditária de carga de ferro, anemia sideroblástica ligada ao X, neuromia sensorial e motora hereditária, neuropatia motora hereditária, tipo V, neuropatia motora hereditária distal, exostoses múltiplas hereditárias, câncer colorretal não poliposo hereditário, síndrome da febre periódica hereditária, polipose coli hereditária, polipose adenomatosa familiar, enfisema pulmonar hereditário, resistência hereditária à proteína C ativada, trombofilia de fator V de Leiden, neuropatia sensorial e autonômica hereditária tipo III, disautonomia familiar, paraplegia espástica heredi-

tária, paralisia espástica hereditária ascendente de início na infância, ataxia espinhal hereditária, ataxia de Friedreich, esclerose espinhal hereditária, ataxia de Friedreich, anemia de Herrick, OSMED heterozigoto, síndrome de Weissenbacher-Zweymüller, displasia otoespondilo-megaepifisária, deficiência de HexA, doença de Tay-Sachs, deficiência de hexosaminidase A, doença de Tay-Sachs, deficiência da hexosaminidase subunidade alfa (qualquer variante, por exemplo, variante A, variante B), doença de Tay-Sachs, hemocromatose associada ao HFE, hemocromatose, HGPS, Progeria, doença de Hippel-Lindau, doença de von Hippel-Lindau, hemocromatose (HLAH), neuropatia motora hereditária distal (HMN V), câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC), neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão (HNPP), homocistinúria, deficiência de ácido homogentísico oxidase, alcaptonúria, acidura homogentísica, alcaptonúria, porfiria homozigótica cutânea tarda, porfiria hepatoeritropoiética, hiperoxalúria, primária (HP1), hiperoxalúria (HP2), hiperfenilalaninemia (HPA), HPRT - deficiência de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, síndrome de Lesch-Nyhan, HSAN tipo III, disautonomia familiar, disautonomia familiar (HSAN3), neuropatia sensorial hereditária (qualquer tipo, por exemplo, HSN-1, HSN-II, HSN-III), disautonomia familiar, dermatosparaxia humana, doença de Huntington, síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, progeria, hiperandrogenismo, tipo não clássico devido à deficiência de 21-hidroxilase, hiperquilomicronemia, deficiência de lipoproteína lipase familiar, familiar, hiperglicinemia com cetoacidose e leucopenia, acidemia propiônica, hiperlipoproteinemia tipo I, deficiência de lipoproteína lipase, hiperoxialúria familiar, hiperfenilalaninemia primária, hiperfenilalaninemia, hipocondrodisplasia, hipocondroplasia, hipocondrogênese, anemia hipocrômica, anemia sideroblástica ligada ao X, deficiência de hipoxantina fosforibosiltransferase (HPRT), síndrome de Lesch-Nyhan, paralisia espástica hereditária ascendente de

início na infância (IAHSP), síndrome de CIF, imunodeficiência, instabilidade do centrômero e síndrome das anomalias faciais, hemocromatose idiopática, hemocromatose, tipo 3, hemocromatose neonatal idiopática, hemocromatose, neonatal, hipertensão pulmonar idiopática, distúrbios do sistema imunológico, imunodeficiência combinada severa ligada ao X, incontinência pigmentosa, doença de Gaucher cerebral infantil, doença de Gaucher infantil, paralisia espástica hereditária ascendente de início na infância, infertilidade, enfisema hereditário, tendência hereditária à paralisia por pressão, neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão, síndrome de Insley-Astley, displasia otoespondilo-megaepifisária, síndrome da porfiria aguda intermitente, porfiria aguda intermitente, síndrome da pigmentação cutânea - polipose intestinal, síndrome de pigmentação, síndrome de Peutz-Jeghers, incontinência pigmentar (IP), distúrbio de armazenamento de ferro, hemocromatose, isodicêntrico 15, surdez isolada, surdez não sindrômica, síndrome de Jackson-Weiss, síndrome de Joubert, esclerose lateral primária juvenil (JPLS), esclerose lateral amiotrófica juvenil, coreoatetose, síndrome de retardo mental, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de hiperuricemia juvenil, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Jackson-Weiss (JWS), atrofia muscular espinhal e bulbar, doença de Kennedy, atrofia muscular espinhal e bulbar, atrofia muscular espinhal e bulbar de Kennedy, atrofia muscular espinhal e bulbar, histiocitose por querasina, lipoidose por querasina, tesaurismose por querasina, glicinemia cetótica, acidemia propiônica, hiperglicemia cetótica, acidemia propiônica, doenças renais, hiperoxalúria, primária, displasia de Kniest, doença de Krabbe, doença de Kugelberg – Welander, atrofia muscular espinhal, demência lacunar, síndrome CADASIL, acondrogênese de Langer-Saldino, displasia de Langer-Saldino, doença de Alzheimer de início tardio, doença de Krabbe de início tardio (LOKD), doença de Krabbe, distúrbios de aprendizagem, incapacidade de

aprendizagem, lentiginose perioral, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Lesch-Nyhan, leucodistrofias, leucodistrofia com fibras de Rosenthal, doença de Alexander, leucodistrofia, espongiiforme, síndrome de Li-Fraumeni (LFS), síndrome de Li-Fraumeni, deficiência de lipase D, deficiência de lipoproteína lipase, deficiência de LIPD familiar, deficiência de lipoproteína lipase, lipidose familiar, cerebrosídeo, lipidose, gangliosídeos, infantil, doença de Tay-Sachs, histiocitose lipóide (tipo queratina), deficiência de lipoproteína lipase, doenças hepáticas familiares, galactosemia, doença de Lou Gehrig, síndrome de Louis-Bar, ataxia telangiectasia, síndrome de Lynch, câncer colorretal não poliposo hereditário, deficiência de lisil-hidroxilase, doença de Machado-Joseph, ataxia espinocerebelar (qualquer tipo, por exemplo, SCA1, SCA2, SCA3, SCA 18, SCA20, SCA21, SCA23, SCA26, SCA28, SCA29), câncer de mama masculino, câncer de mama, distúrbios genitais masculinos, neoplasia maligna da mama, câncer de mama, tumor maligno da mama, câncer de mama, tumor maligno da bexiga urinária, câncer de bexiga, câncer mamário, câncer de mama, síndrome de Marfan, síndrome do Marcador X, síndrome do X frágil, síndrome de Martin-Bell, síndrome do X frágil, síndrome de McCune-Albright, síndrome de McLeod, síndrome MEDNIK, anemia mediterrânea, beta-talassemia, nanismo mega-epifisário, displasia otoespondilomegaepifisária, síndrome de Menkes, doença de Menkes, retardo mental com anormalidades osteocartilaginosas, síndrome de Coffin-Lowry, distúrbios metabólicos, nanismo metatrópico, tipo II, displasia de Kniest, displasia metatrópica tipo II, displasia de Kniest, metemoglobinemia (qualquer tipo, por exemplo, congênita, tipo beta-globina, metemoglobinemia congênita tipo II), acidemia metilmalônica, síndrome de Marfan (MFS), MHAM, síndrome de Cowden, micro síndrome, microcefalia, MMA, acidemia metilmalônica, doença de Menkes (AKA MK ou MNK), síndrome de monossomia 1p36, doença dos neu-

rônios motores, esclerose lateral amiotrófica, distúrbios de movimento, síndrome de Mowat-Wilson, mucopolissacaridose (MPS I), mucoviscidose, demência multi-infarto, síndrome CADASIL, deficiência múltipla de carboxilase, início tardio, deficiência de biotinidase, síndrome de hamartoma múltiplo, síndrome de Cowden, neurofibromatose múltipla, distrofia muscular (qualquer tipo, incluindo, por exemplo, tipo de Duchenne e Becker), miotonia atrófica, distrofia miotônica, miotonia distrófica, síndrome de Nance-Insley, displasia oto-espondilomegaepifisária, condrodysplasia de Nance-Sweeney, displasia oto-espondilomegaepifisária, NBIA1, neurodegeneração associada à pantotenato quinase, síndrome de Neill-Dingwall, síndrome de Cockayne, neuroblastoma, retiniano, retinoblastoma, neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro tipo 1, neurodegeneração associada à pantotenato-quinase, doenças neurológicas, distúrbios neuromusculares, neuronopatia motora hereditária distal, Niemann-Pick, doença de Niemann-Pick, síndrome de Noack, hiperglicinemia não cetótica, encefalopatia por glicina, doença de Gaucher não neuronopática, hiperfenilalaninemia não fenilcetonúrica, deficiência de tetra-hidrobiopterina, surdez não sindrômica, síndrome de Noonan, doença de Gaucher tipo Norrbottnian, Ocronose, alcaptonúria, artrite ocrônica, síndrome de Ogden, osteogênese imperfeita (OI), doença de Osler-Weber-Rendu, telangiectasia hemorrágica hereditária, OSMED, displasia oto-espondilomegaepifisária, osteogênese imperfeita, osteopsitose, osteogênese imperfeita, disteoscлерose congênita, displasia oto-espondilomegaepifisária, oxalose, hiperoxalúria, primária, neurodegeneração associada à pantotenato-quinase, síndrome de Patau (Trissomia 13), deficiência de PBGD, porfíria aguda intermitente, deficiência de PCC, acidemia propiônica, porfíria cutânea tarda (PCT), doença PDM, Síndrome de Pendred, doença periódica, febre do Mediterrâneo, peritonite periódica familiar, síndrome de lentiginose periorifical, sín-

drome de Peutz-Jeghers, distúrbios do nervo periférico, disautonomia familiar, neurofibromatose periférica, atrofia muscular peroneal, deficiência de alanina:glioxilato aminotransferase peroxisomal, hiperoxalúria, síndrome de Peutz-Jeghers primária, doença de deficiência de fenilalanina hidroxilase, feocromocitoma, doença de von Hippel-Lindau, síndrome de Pierre Robin com condrodysplasia fetal, síndrome de Weissenbacher-Zweymüller, cirrose pigmentar, hemocromatose, síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), neurodegeneração associada à pantotenato-quinase (PKAN), PKU, fenilcetonúria, plumboporfíria, porfíria com deficiência de AL, PMA, doença renal policística, displasia fibrosa poliostótica, síndrome de McCune – Albright, polipose adenomatosa familiar, polipose intestinal hamartomatosa, síndrome de pólipos e manchas, síndrome de Peutz-Jeghers, deficiência de porfobilinogênio sintase, porfíria por deficiência de ALA, deficiência de PPOX, porfíria variegada, síndrome de Prader-Labhart-Willi, síndrome de Prader-Willi, demência pré-senil e senil, discinesia ciliar primária (PCD), hemocromatose primária, hemocromatose, síndrome de hiperuricemia primária, síndrome de Lesch-Nyhan, demência degenerativa senil primária, procolágeno tipo EDS VII, mutante, progeria, síndrome de progeria de Hutchinson Gilford, síndrome tipo Progeria, síndrome de Cockayne, nanismo progeroide, síndrome de Cockayne, coreia progressiva, hereditária crônica (Huntington), doença de Huntington, osteogênese imperfeita de deformação progressiva com esclera normal, osteogênese imperfeita (qualquer tipo, por exemplo Tipo I, Tipo II, Tipo III,, Tipo IV, Tipo V, Tipo VI, Tipo VII, Tipo VIII), distrofia miotônica proximal (PROMM), acidemia propiônica, deficiência de propionil-CoA carboxilase, deficiência de proteína C, deficiência de proteína S, protoporfíria, deficiência de protoporfirinogênio oxidase, porfíria variegada, distrofia miotônica proximal, distrofia miotônica tipo 2, miopatia miotônica proximal, doença pseudo-Gaucher, pseudoxantoma elástico, psicossina

lipidose, doença de Krabbe, hipertensão arterial pulmonar, hipertensão pulmonar, pseudoxantoma elástico (PXE), pseudoxantoma elástico, retinoblastoma (Rb), doença de Recklinghausen, poliserosite recorrente, distúrbios da retina, síndrome da retinite pigmentosa-surdez, síndrome de Usher, retinoblastoma, síndrome de Rett, RFALS tipo 3, síndrome de Ricker, síndrome de Riley-Day, disautonomia familiar, síndrome de Roussy-Levy, síndrome de Rubinstein-Taybi (RSTS), síndrome de Rett (RTS), síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Sack-Barabas, doença de SADDAN, síndrome de sarcomas familiares de Li e Fraumeni, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome SBLA (síndrome do sarcoma, mama, leucemia e glândula adrenal), síndrome de Li-Fraumeni, atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA), Schwannoma, acústico, bilateral, neurofibromatose tipo II, síndrome de Schwartz-Jampel, imunodeficiência combinada severa ligada ao X (SCIDX1), SED congênita, displasia espondiloepifisária congênita, SED Strudwick, displasia espondiloepimetafisária, SEMD tipo Strudwick, demência senil, acondroplasia severa com retardo de desenvolvimento e acantose nigricans, doença de SADDAN, síndrome de Shprintzen, síndrome de retardo mental ligado ao X tipo Siderius causada por mutações no gene PHF8, síndrome do esqueleto-pele-cérebro, distúrbios de pigmentação da pele, atrofia músculo espinhal (SMA), displasia espondilo-meta-epifisária congênita (SMED) (qualquer tipo, por exemplo Tipo Studwick, tipo 1), síndrome de Smith-Lemli-Opitz, síndrome de Smith Magenis, porfíria genética sul-africana, paralisia espástica ascendente de início na infância, paralisia espástica hereditária ascendente de início na infância, distúrbios da fala e da comunicação, esfingolipidose, Tay-Sachs, Doença de Tay-Sachs, atrofia muscular espinhal e bulbar, atrofia muscular espinhal, tipo V distal, neuropatia motora hereditária distal, atrofia muscular espinhal distal com predominância nos membros superiores, neuropatia motora hereditária distal, ata-

xia espinocerebelar, displasia congênita espondiloefisária, displasia espondiloepifisária, colagenopatia (qualquer tipo, por exemplo, tipos II e XI), displasia espondiloepimetafisária, displasia espondilometafisária (SMD), displasia espondiloepimetafisária, degeneração esponjosa do sistema nervoso central, degeneração esponjosa do cérebro, degeneração esponjosa primária da substância branca na infância, hipertensão pulmonar primária esporádica, síndrome SSB, síndrome do cabelo duro, doença de Menkes, doença de Steinert, distrofia miotônica, síndrome de distrofia miotônica de Steinert, distrofia miotônica, síndrome de Stickler, acidente vascular cerebral, síndrome CADASIL, síndrome de Strudwick, doença de Gaucher neuronopática subaguda, porfiria genética sueca, porfiria aguda intermitente, displasia da cartilagem em queijo suíço, displasia de Kniest, doença de Tay-Sachs, TD - nanismo tanatofórico, displasia tanatofórica, TD com fêmures retos e crânio de trevo, displasia tanatofórica Tipo 2, Telangiectasia, cerebelo-oculocutânea, ataxia telangiectasia, síndrome da feminização testicular, síndrome da insensibilidade aos andrógenos, deficiência de tetra-hidrobiopterina, síndrome da feminização testicular (TFM), síndrome de insensibilidade aos andrógenos, talassemia intermediária, beta-talassemia, talassemia maior, beta-talassemia, displasia tanatofórica, trombofilia devido à deficiência de cofator para a proteína C ativada, tipo de Leiden, trombofilia de fator V de Leiden, doença da tireoide, neuropatia tomaculosa, neuropatia hereditária com risco de paralisia por pressão, deficiência total de HPRT, síndrome de Lesch-Nyhan, deficiência total de hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Treacher Collins, trias fragilitis ossium, síndrome do triplo X, síndrome do Triplo X, trissomia 21, trissomia X, síndrome de Troisier-Hanot-Chauffard, hemocromatose, doença de Tay-Sachs (TSD), complexo da esclerose tuberosa (TSC), esclerose tuberosa, síndrome tipo Turner, síndrome de Noonan, doença de defi-

ciência de UDP-galactose-4-epimerase, doença de deficiência de UDP-galactose-4-epimerase, galactosemia, doença de deficiência de UDP glicose 4-epimerase, galactosemia, deficiência de UDP glicose hexose-1-fosfato uridililtransferase, galactosemia, surdez não diferenciada, surdez não sindrômica, deficiência de UPS, porfiria aguda intermitente, câncer de bexiga urinária, câncer de bexiga, deficiência de UROD, deficiência de uroporfirinogênio, deficiência de uroporfirinogênio sintase, porfiria aguda intermitente, síndrome de Usher, deficiência de UTP hexose-1-fosfato de uridililtransferase, galactosemia, síndrome de Van Bogaert-Bertrand, síndrome de Van der Hoeve, síndrome velocardiofacial, síndrome VHL, doença de von Hippel-Lindau, comprometimento da visão e cegueira, síndrome de Alström, doença de Von Bogaert-Bertrand, doença de von Hippel-Lindau, doença de Von Recklenhausen-Applebaum, hemocromatose, doença de von Recklinghausen, neurofibromatose tipo I, doença de Vrolik, osteogênese imperfeita, síndrome de Waardenburg, síndrome de Warburg Sjo Fledelius Wilson (WD), micro síndrome, doença de Wilson (WD), síndrome de Weissenbacher-Zweymüller, doença de Werdnig – Hoffmann, atrofia muscular espinhal, síndrome de Williams, doença de Wilson, síndrome de Wolf – Hirschhorn, síndrome de Wolff, doença periódica de Wolff, síndrome de Weissenbacher-Zweymüller (WZS), Xeroderma pigmentoso, retardo mental e macro-orquidismo ligados ao X, síndrome do X frágil, hiperuricemia primária ligada ao X, síndrome de Lesch-Nyhan, imunodeficiência combinada grave ligada ao X, anemia sideroblástica ligada ao X, atrofia muscular espinal e bulbar ligada ao X, atrofia muscular espinal e bulbar, defeito da enzima acidúria úrica ligada ao X, síndrome Lesch-Nyhan, X-SCID, imunodeficiência combinada severa ligada ao X, anemia sideroblástica ligada ao X (XLSA), X-SCID, imunodeficiência combinada severa ligada ao X, anemia sideroblástica ligada ao X (XLSA), XSCID, imunodeficiência combinada severa ligada ao X,

síndrome XXX, síndrome triplo X, síndrome XXXX, síndrome XXXXX, XXXXX, síndrome XXY, trissomia XXY, síndrome de Klinefelter, síndrome XYY, distúrbios da repetição tripla, ou quaisquer combinações dos mesmos.

[00407] Nas modalidades, um modulador de controle pós-transcricional específico é dirigido para modulação, modificação, aprimoramento ou diminuição da atividade através da administração de um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma. Por exemplo, moduladores de controle pós-transcricionais podem incluir PARN, PAN, CPSF, CstF, PAP, PABP, PAB2, CFI, CFII, RNA trifosfatase, RNA gluaniltransferase, RNA metiltransferase, SAM sintase, enzima conjugadora de ubiquitina E2R, proteínas SR SFRS1 a SFR11, proteínas hnRNP (por exemplo 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, helicase dead-box, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, GEF, GCN2, PKR, HRI, PERK, eEF1, eEF2, GCN, eRF3, proteínas de ligação específica a ARE, EXRN1, DCP1, DCP2, RCK / p54, CPEB, eIF4E, microRNAs e siRNAs, DICER, proteínas Ago, proteínas de deterioração de mRNA mediadas não senso, UPF3A, UPF3BeIF4A3, MLN51, Y14 / MAGOH, MG-1, SMG-5, SMG-6, SMG-7 ou qualquer combinação dos mesmos.

[00408] Em algumas modalidades, as vias genéticas associadas ao ciclo celular são moduladas, aprimoradas ou diminuídas em atividade pela administração de um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma. Vias e genes exemplificativos associados ao ciclo celular incluem 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, homólogo, TRADD, PML, MutL, homólogo, R1P1, FANCD2, Exonuclease, MyD88, SMC1, DNA, Polimerase, delta, IRAK, BLM1, (POLDI, POLD2, POLD3, NIL, BRCA1 e, POLD4, -genes, IKK, H2AX, codificação, subunidades), NFK β , ATR, Topoisomerase, 1, I κ B α , RPA, Topoisomerase, 2, IAP, ATRIP, RNaseH1, Caspase, 3, RAD9, Ligase, 1, Caspase, 6, RAD1, DNA, polimerase, 1, Caspase, 7, HUS, DNA, polimerase, 3, Caspase, 8, RAD17, Primase, Caspase, 10, RFC, Helicase, HDAC1, CHK1, cadeia simples, ligação, HDAC2, TLK1, proteínas, Citocromo, C, CDC25, Bxl-xL, STAT3, STAT5, DFF45, Vcl-2, ENDO-G, PI3K, Akt, Calpaína, Bad, Bax, proteólise mediada por Ubiquitina, Hipóxia, Proliferação de células, HIF-loc, MAPK, E1, HERC1, TRAF6, HIF- β , MAPKK, E2, UBE2Q, MEKK1, Ref1, MAPKKK, E3, UBE2R, COP1, HSP90, c-Met, UBLE1A, UBE2S, PIFH2, VEGF, HGF, UBLE1B, UBE2U, cIAP, PAS, ER, S1/2, UBLE1C, UBE2W, PIAS, ARNT, ATK, UBE2A, UBE2Z, SYVN, BVS, PKCs, UBE2B, AFC, LLC, N, NHLRC1, HLF, Paxilina, UBE2C, UBE1, AIRE, EPF, FAK, UBE2A, E6AP, MGRN1, VDU2, Adducina, UBE2E, UBE3B, BRCA1, SUMORESUME, PYK1, UBE2F, Smurf, FANCL, SENP1, RB, UBE2G1, Itch, MIDI, Calcineurina, A, RBI, UBE2G2, HERC2, Cdc20, RACK1, Raf-1, UBE2I, HBE2 PTB, A-Raf, UBE2J1, HERC4, Apcl, Hur, B-raf, UBE2J2, UBE4A, Apc2, PHD2, MEK1 / 2, UBE2L3, UBE4B, Apc3, SSAT2, ERK1 / 2, UBE2L6, CHIP, Apc4, SSAT1, Ets, UBE2M, CYC4, Apc5, GSK3, E1k1, UBE2N, PPR¹⁹, Apc6, CBP, SAP1, UBE20, UIP5, Apc7, FOXO4, cPLA2, WWPI, Mdm2, Apc8, FIH-1, WWP2, Parkin, Apc9, TRIP, 12, Trim32, Ape, 10, NEED4, Trim37, Ape, 11, ARF-BP1, SIAH-1, Ape, 12, EDD1, PML, Célula, sobrevivida, Célula, ciclo, parada, SMADI, P21, SMAD5, BAX, SAMD8, MDR, LEF1, DRAIL, IGFBP3, TCF3, GADD45, TCF4, P300, HAT1, PI3, Akt, GF1, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00409] Em algumas modalidades, os genes associados à angiogê-

nese são modulados, aprimorados ou diminuídos em atividade pela administração de um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma a uma célula(s). Genes e vias genéticas exemplificativas associadas à angiogênese e condições relacionadas à angiogênese incluem VEGF, VEGFR2, SHC, E2F7, VEGFB, VEGFR3, PI3, VEGFC, Nrp1, PIP3, EGFDIP3, DAG, GRB2, SOS, Akt, PB, PKC, Ras, RAF1, DAG, eNOS, NO, ERK1, ER2, cPLA2, ME1, MEK2 ou qualquer combinação dos mesmos.

[00410] Em algumas modalidades, as vias genéticas e / ou genes associados à função mitocondrial são modulados, aprimorados ou diminuídos em atividade pela administração de um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genoma em uma célula(s). Genes e vias genéticas exemplificativas associadas à função mitocondrial incluem Malato desidrogenase aminotransferase, Hidratase, Desacilase, Desidrogenase, Carboxilase, Mutase, Distúrbios de isoleucina oxidação de leucina oxidação de ácidos graxos (deficiências da via de oxidação da via enzimática), Aminotransferase aminotransferase, cadeia ramificada OCTN2, FATP1 – 6 aminotransferase 2, aminotransferase 2, CPT-1 mitocondrial mitocondrial, CACT Isobutilil-CoA 2-metilbutilil-CoA, CPT-II desidrogenase desidrogenase, SCAD (cadeia ramificada (cadeia ramificada, MCAD cetoácido cetoácido, VLCAD desidrogenase desidrogenase, ETF-DH Complexo) Complexo), Alfa-ETF Hidratase Hidratase, Beta-ETF HMG-CoA-liase 2-metil-3-OH- SCHAD butiril-CoA, LCHAD desidrogenase, MTP 3-Oxotiolase, LKAT, DECR 1, HMGCS2, HMGCL ou qualquer combinação dos mesmos.

[00411] Em algumas modalidades, as vias genéticas e / ou os genes associados ao dano ao DNA ou à instabilidade genômica são modulados, aumentados ou diminuídos em atividade. Genes e vias genéticas exemplificativas associados às vias e / ou genes relacionados a danos no DNA e instabilidade genômica incluem 53BP1, BLM, MBD2,

DNA, ligase, 4, MDC1, H2AX, XLF, SMC1, 53BP1, Rad50, P53, P53, Artemis, Rad27, TdT, APE1, PMS2, APE2, UvrA, RecA, MLH1, NEIL1, UvrB, SSB, MSH6, NEIL2, UvrC, Mrell, MSH2, NEIL3, XPC, Rad50, RFC, XRCC1, Rad23B, Nbsl, PCNA, PNKP, CEN2, CtIP, MSH3, Tdpl, DDB1, RPA, MutS, APTX, XPE, Rad51, MutL, DNA, polimerase β CSA, Rad52, DNA polimerase δ , CSB, Rad54, Topoisomerase, 1, DNA, TFT1H, BRCA1, Topoisomerase, 2, PCNA, XPB, BRCA2, RNaseHI, FEN1, XPD, Exol, Ligase 1, RFC, XPA, BLM, DNA, polimerase, 1, PAR, 1, RPA, TopIIa, DNA, LigI, XPG, GEN1, Primase, Lig3, ERCC1 YenI Helicase, UNG, XPF, SlxI, SSBs, MUTY DNA polimerase δ , Slx4, SMUG DNA polimerase ϵ , Mus8, MBD4, Emel, Dssl, ASH1L, SETD4, DQT1L, SETD5, EHMT1, SETD6, EHMT2, SETD4, SETD8, EZH2, SETD9, MLL, SETDB1, MLL2, SETDB2, MLL3, SETMAR, MLL4, SMYD, 1, MLL5, SMYD2, NSD, 1, SMYD3, PRDM2, SMYD4, SET, SMYD5, SETBP1, SUV39H1, SETD 1A, SUV39H2, SETD 1B, SUV420H1, SETD2, SUV420 H2, SETD3, ou qualquer combinação dos mesmos.

[00412] Em algumas modalidades, os genes que codificam para os fatores de transcrição de mamíferos são modulados, aprimorados, diminuídos ou fornecidos a uma célula. Os fatores de transcrição humanos exemplificativos incluem 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, CBF3, CAMTA2, CAMTA1, EBF4, EBF3, EBF1, EBF2, NR²F6, NR²F1, NR²F2, GRHL2, TFCEP2L1, GRHL1, TFCEP2, UBP1, GRHL3, YBX2, CSDE1, CSDA, YBX1, LIN28A, CARHSP1, CSDC2, LIN28B, NFIX, NFIC, NFIB, NFIA, CUX2, ONECUT2, CUX1, ONECUT1, SATB1, ONECUT3, SATB2, DMRT3, DMRT1, DMRTC2, DMRTA2, DMRTB1, DMRT2, DMRTA1, E2F2, E2F1, E2F3, TFDP2, E2F8, E2F5, E2F7, E2F6, TFDP3, TFDP1, E2F4, NR1H3, NR1H2, ETV1, ETV7, SPI1, ELF4, ETV2, ERF, ELF2, ELK3, ETV3, ELF1, SPDEF, ELK1, ETS1, EHF, ELF5, ETV6, SPIB, FLI1, GABPA, ERG, ETS2, ELK4, ELF3, FEV, SPIC, ETV4, ETV5, FOXN3, FOXC1, FOXJ2, FOXF1, FOXN1, FOXM1, FOXP1, FOXO3, FOXA2, FOXP2, FOXJ1, FOXP4, FOXF2, FOXN4, FOXK2, FOXO1, FOXH1, FOXQ1, FOXK1, FOXI1, FOXD4, FOXA3, FOXN2, FOXB1, FOXG1, FOXR¹, FOXL1, FOXC2, FOXE1, FOXS1, FOXL2, FOXO4, FOXD4L1, FOXD4L4, FOXD2, FOXI2, FOXE3, FOXD3, FOXD4L3, FOXR2, FOXJ3, FOXO6, FOXB2, FOXD4L5, FOXD4L6, FOXD4L2, KIAA0415, FOXA1, FOXP3, GCM2, GCM1, NR3C1, GTF2IRD1, GTF2I, GTF2IRD2B, GTF2IRD2, SOX8, SOX30, PMS1, CIC, TCF7, TOX4, SOX10, HMGXB4, HBP1, TFAM, UBTF, WHSC1, SOX6, HMGXB3, BBX, TOX2, SOX4, SOX21, SOX9, SOX15, SOX5, SOX3, LEF1, HMG20A, SOX13, TCF7L2, SSRP1, TCF7L1, SOX17, SOX14, PINX1, SOX7, SOX11, SOX12, SOX2, SOX1, SRY, SOX18, UBTFL1, UBTFL2, TOX, HMGB1,

HMGB2, PBRM1, TOX3, SMARCE1, HMG20B, HMGB3, HMGA2, HMGA1, ARX, HOXA11, MEOX1, DLX6, ISL1, HOXC8, BARX2, ALX4, GSC2, DLX3, PITX1, HOXA9, HOXA10, LHX5, LASS4, ZFHX4, SIX4, VSX1, ADNP, RHOXF1, MEIS3, PBX4, DLX5, HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA6, HOXA13, EVX1, NOBOX, MEOX2, LHX2, LHX6, LHX3, TLX1, PITX3, HOXB6, HNF1B, DLX4, SEBOX, VTN, PHOX2B, NKX3-2, DBX1, NANOG, IRX4, CDX1, TLX2, DLX2, VAX2, PRRX1, TGIF2, VSX2, NKX2-3, HOXB8, HOXB5, HOXB7, HOXB3, HOXB1, MSX2, LHX4, HOXA7, HOXC13, HOXC11, HOXC12, ESX1, BARHL1, NKX2-4, NKX2-2, SIX1, HOXD1, HOXD3, HOXD9, HOXD10, HOXD11, HOXD13, MNX1, CDX4, BARX1, RHOXF2, LHX1, GSC, MEIS2, RAX, EMX1, NKX2-8, NKX2-1, HLX, LMX1B, SIX3, LBX1, PDX1, LASS5, ZFHX3, BARHL2, LHX9, LASS2, MEIS1, DLX1, HMBOX1, ZEB1, VAX1, NKX6-2, VENTX, HHEX, TGIF2LX, LASS3, ALX3, HOXB13, IRX6, ISL2, PKNOX1, LHX8, LMX1A, EN1, MSX1, NKX6-1, HESX1, PITX2, TLX3, EN2, UNCX, GBX1, NKX6-3, ZHX1, HDX, PHOX2A, PKNOX2, CDX2, DRGX, NKX3-1, PBX3, PRRX2, GBX2, SHOX2, GSX1, HOXD4, HOXD12, EMX2, IRX1, IRX2, SIX2, HOXB9, HOPX, OTP, LASS6, HOXC5, HOXB2, RAX2, EVX2, ZHX3, PROP1, ISX, HOXD8, TGIF2LY, IRX5, SIX5, TGIF1, IRX3, ZHX2, LBX2, NKX2-6, ALX1, GSX2, HOXC9, HOXC10, HOXB4, NKX2-5, SIX6, MIXL1, DBX2, PBX1, SHOX, ARGFX, HMX3, HMX2, BSX, HOXA4, DMBX1, HOXC6, HOXC4, RHOXF2B, PBX2, DUXA, DPRX, LEUTX,, NOTO, HOMEZ, HMX1, DUX4L5, DUX4L2, DUX4L3, DUX4L6, NKX1-1, HNF1A, HSF4, HSFY2, HSFY1, HSFY2, HSFY1, HSF1, LCORL, LCOR, IRF6, IRF1, IRF3, IRF5, IRF4, IRF8, IRF2, IRF7, IRF9, MBD3, BAZ2B, MBD4, SETDB2, MBD1, MECP2, SETDB1, MBD2, BAZ2A, SMAD7, SMAD5, SMAD9, SMAD6, SMAD4, SMAD3, SMAD1, SMAD2, ZZZ3, RCOR1, CDC5L, MYBL2, DNAJC2, TADA2A, RCOR3, MYB, TERF2, DMTF1, DNAJC1, NCOR1, TERF1,

MIER3, MYSM1, SNAPC4, RCOR2, TADA2B, MYBL1, TERF1P2, NCOR2, CCDC79, SMARCC1, SMARCC2, TTF1, C11orf9, NFYA, NFYC, NFYB, NRF1, NR4A3, NR4A1, NR4A2, ESR1, NR0B2, NR0B1, PREB, EAF2, SPZ1, TP63, TP73, TP53, PAX6, PAX7, PAX2, PAX4, PAX8, PAX1, PAX3, PAX5, PAX9, SUB1, POU2F2, POU1F1, POU4F3, POU6F2, POU2F3, POU2F1, POU4F2, POU4F1, POU6F1, POU3F2, POU3F1, POU3F4, POU3F3, POU5F1, POU5F1B, PPARD, PPARG, PPARA, PGR, PROX1, PROX2, NR2E1, NR5A2, NR2C1, NR5A1, NR6A1, ESRRA, NR2C2, RFX3, RFX2, RFX4, RFX1, RFX5, RFX7, RFX6, RFX8, NFATC3, NFKB2, NFATC4, NFATC2, NFAT5, RELB, NFKB1, NFATC1, REL, RELA, RORA, RORC, NR¹D2, RORB, RUNX3, RUNX1, SP100, SP140, GMEB2, SP110, AIRE, GMEB1, DEAF1, SP140L, LOC729991-MEF2B, MEF2A, SRF, MEF2D, MEF2B, STAT1, STAT5A, STAT4, STAT6, STAT3, STAT2, STAT5B, TBX21, TBX5, TBX15, TBX18, TBX2, TBX4, TBX22, TBX3, TBR¹, TBX19, TBX6, EOMES, T, TBX20, TBX10, MGA, TBX1, TEAD3, TEAD2, TEAD1, TEAD4, CREBL2, NFE2L3, CREB3L3, FOSL2, NFE2L1, CREM, DBP, CREB3, HLF, BACH2, ATF2, NFE2L2, ATF6, CREB1, ATF1, NFE2, FOSB, ATF4, NRL, JUND, JDP2, CREB3L4, BATF, BACH1, CREB3L1, NFIL3, TEF, BATF2, ATF5, FOS, JUNB, DDIT3, FOSL1, JUN, MAF, CREB3L2, MAFA, MAFF, MAFG, MAFK, MAFB, ATF6B, CRX, OTX1, OTX2, THAP3, THAP10, THAP1, PRKRIR, THAP8, THAP9, THAP11, THAP2, THAP6, THAP4, THAP5, THAP7, NR1H4, NR2E3, RARB, HNF4A, VDR, ESRRB, THRA, NR1D1, RARA, ESR2, NR1I3, NR1I2, THRB, NR3C2, HNF4G, RARG, RXRA, ESRRG, RXRB, TSC22D1, TSC22D3, TSC22D4, TSC22D2, TULP3, TULP2, TULP1, TULP4, TUB, ZBTB33, ZBTB32, ZBTB11, MYNN, ZBTB25, PATZ1, ZBTB16, ZBTB24, BCL6, ZBTB47, ZBTB17, ZBTB45, GZF1, ZBTB1, ZBTB46, ZBTB8A, ZBTB7B, BCL6B, ZBTB49, ZBTB43, HIC2, ZBTB26, ZNF131, ZNF295, ZBTB4, ZBTB34, ZBTB38, HIC1, ZBTB41,

ZBTB7A, ZNF238, ZBTB42, ZBTB2, ZBTB20, ZBTB40, ZBTB7C, ZBTB37, ZBTB3, ZBTB6, ZBTB44, ZFP161, ZBTB12, ZBTB48, ZBTB10, ZBED4, ZBED3, ZBED2, C11orf95, ZBED1, IKZF5, ZNF821, ZNF451, ZNF195, ZFX, ZNF263, ZNF200, HIVEP2, WIZ, ZNF582, SNAI2, ZFP64, IKZF2, ZIC2, ZNF800, PRDM1, PRDM6, ZFP112, ZNF275, ZNF76, ZFAT, KLF6, ZFY, ZXDC, GLI2, ZNF532, ZNF37A, ZNF510, ZNF506, ZNF324, ZNF671, ZNF416, ZNF586, ZNF446, ZNF8, ZNF264, REST, MECOM, ZNF213, ZNF343, ZNF302, ZNF268, ZNF10, HIVEP1, ZNF184, MZF1, SALL4, ZNF516, KLF8, KLF5, ZNF629, ZNF423, CTCF, ZNF500, ZNF174, SALL1, MAZ, ZNF419, OVOL3, ZNF175, ZNF14, ZNF574, ZNF85, SP4, ZKSCAN1, GLI3, GLIS3, KLF3, PRDM4, GLI1, PRDM13, ZNF142, PRDM2, ZNF684, ZNF541, KLF7, PLAGL1, ZNF430, KLF12, KLF9, ZNF410, BCL11A, EGR1, ZFP30, TSHZ3, ZNF549, ZSCAN18, ZNF211, ZNF639, ZSCAN20, GTF3A, ZNF205, ZNF644, EGR2, IKZF4, CTCFL, ZNF831, SNAI1, ZNF576, ZNF45, TRERF1, ZNF391, RREB1, ZNF133, OVOL2, ZNF436, PLAGL2, GLIS2, ZNF384, ZNF484, HIVEP3, BCL11B, KLF2, ZNF780B, FEZF1, KLF16, ZSCAN10, ZNF557, ZNF337, PRDM12, ZNF317, ZNF426, ZNF331, ZNF236, ZNF341, ZNF227, ZNF141, ZNF304, ZSCAN5A, ZNF132, ZNF20, EGR4, ZNF670, VEZF1, KLF4, ZFP37, ZNF189, ZNF193, ZNF280D, PRDM5, ZNF740, ZIC5, ZSCAN29, ZNF710, ZNF434, ZNF287, ZIM3, PRDM15, ZFP14, ZNF787, ZNF473, ZNF614, PRDM16, ZNF697, ZNF687, OSR1, ZNF514, ZNF660, ZNF300, RBAK, ZNF92, ZNF157, ZNF182, ZNF41, ZNF711, PRDM14, ZNF7, ZNF214, ZNF215, SALL3, ZNF827, ZNF547, ZNF773, ZNF776, ZNF256, ZSCAN1, ZNF837, PRDM8, ZNF117, ZIC1, FEZF2, ZNF599, ZNF18, KLF10, ZKSCAN2, ZNF689, ZIC3, ZNF19, ZSCAN12, ZNF276, ZNF283, ZNF221, ZNF225, ZNF230, ZNF222, ZNF234, ZNF233, ZNF235, ZNF362, ZNF208, ZNF714, ZNF394, ZNF333, ZNF382, IKZF3, ZNF577, ZNF653,

ZNF75A, GFI1, ZNF281, ZNF496, ZNF2, ZNF513, ZNF148, KLF15, ZNF691, ZNF589, PRDM9, ZNF12, SP8, OSR2, ZNF367, ZNF22, GFI1B, ZNF219, SALL2, ZNF319, ZNF202, ZNF143, ZNF3, ZSCAN21, ZNF606, SP2, ZNF91, ZNF23, ZNF226, ZNF229, ZNF180, ZNF668, ZNF646, ZNF641, ZNF610, ZNF528, ZNF701, ZNF526, ZNF146, ZNF444, ZNF83, ZNF558, ZNF232, E4F1, ZNF597, INSM2, ZNF30, ZNF507, ZNF354A, ZEB2, ZNF32, KLF13, ZFPM2, ZNF764, ZNF768, ZNF35, ZNF778, ZNF212, ZNF282, PRDM10, SP7, SCRT1, ZNF16, ZNF296, ZNF160, ZNF415, ZNF672, ZNF692, ZNF439, ZNF440, ZNF581, ZNF524, ZNF562, ZNF561, ZNF584, ZNF274, ZIK1, ZNF540, ZNF570, KLF17, ZNF217, ZNF57, ZNF556, ZNF554, KLF11, HINFP, ZNF24, ZNF596, OVOL1, SP3, ZNF621, ZNF680, BNC2, ZNF483, ZNF449, INSM1, ZNF417, ZNF791, ZNF80, GLIS1, ZNF497, KLF14, ZNF266, ZIC4, ZNF408, ZNF519, ZNF25, ZNF77, ZNF169, ZNF613, ZNF683, ZNF135, ZSCAN2, ZNF575, ZNF491, ZNF620, ZNF619, ZNF354C, ZNF114, ZNF366, ZNF454, ZNF543, ZNF354B, ZNF223, ZNF713, ZNF852, ZNF552, ZFP42, ZNF664, EGR3, ZFPM1, ZNF784, ZNF648, FIZ1, ZNF771, TSHZ1, ZNF48, ZNF816, ZNF571, ZSCAN4, ZNF594, ZFP3, ZNF443, ZNF792, ZNF572, ZNF707, ZNF746, ZNF322A, ZNF467, ZNF678, ZFP41, HKR1, PLAG1, ZNF329, ZNF101, ZNF716, ZNF708, ZSCAN22, ZNF662, ZNF320, ZNF623, ZNF530, ZNF285, ZFP1, WT1, ZFP90, ZNF479, ZNF445, ZNF74, SP1, SNAI3, ZNF696, IKZF1, ZNF267, ZNF566, ZNF224, ZNF529, ZNF284, ZNF749, ZNF17, ZNF555, ZNF75D, ZNF501, ZNF197, ZNF396, ZFP91, ZNF732, ZNF397, ZSCAN30, ZNF546, ZNF286A, ZKSCAN4, ZNF70, ZNF643, ZNF642, ZSCAN23, ZNF490, ZNF626, ZNF793, ZNF383, ZNF669, ZNF559, ZNF177, ZNF548, MTF1, ZNF322B, ZNF563, ZNF292, ZNF567, SP6, ZNF573, ZNF527, ZNF33A, ZNF600, ZKSCAN3, ZNF676, ZNF699, ZNF250, ZNF79, ZNF681, ZNF766, ZNF107, ZNF471, ZNF836, ZNF493, ZNF167,

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

[00413] Em algumas modalidades, as células são manipuladas (por exemplo, convertidas ou diferenciadas) a partir de um tipo de célula

para outro. Em algumas modalidades, uma célula pancreática é manipulada em uma célula beta de ilhota. Em algumas modalidades, um fibroblasto é manipulado em uma célula iPS. Em algumas modalidades, um pré-adipócito é manipulado em uma célula adiposa marrom. Outras células exemplificativas incluem, por exemplo, células musculares, células neurais, leucócitos, e linfócitos.

[00414] Em algumas modalidades, a célula é uma célula doente ou portadora de mutante. Tais células podem ser manipuladas para tratar a doença, por exemplo, para corrigir uma mutação, ou para alterar o fenótipo da célula, por exemplo, para inibir o crescimento de uma célula cancerosa. Por exemplo, uma célula está associada a uma ou mais doenças ou condições aqui descritas.

[00415] Em algumas modalidades, a célula manipulada é uma célula normal.

[00416] Em algumas modalidades, a célula manipulada é uma célula tronco ou célula progenitora (por exemplo, iPS, embrionária, hematopoiética, adiposa, linhagem germinativa, pulmão, ou células-tronco neurais ou progenitoras). Em algumas modalidades, a célula manipulada pode ser uma célula de qualquer uma das três camadas germinativas (isto é, mesodérmica, endodérmica ou ectodérmica). Em algumas modalidades, a célula manipulada pode ser de um tecido extraembrionário, por exemplo, a partir da placenta.

[00417] Em algumas modalidades, a célula sendo manipulada é selecionada a partir de fibroblastos, precursores monocísticos, células B, células exócrinas, progenitoras pancreáticas, progenitoras endócrinas, hepatoblastos, mioblastos, ou pré-adipócitos. Em algumas modalidades, a célula é manipulada (por exemplo, convertida ou diferenciada) em células musculares, células eritroide-megacariocíticas, eosinófilos, células iPS, macrófagos, células T, células beta das ilhotas, neurônios, cardiomiócitos, células sanguíneas, progenitoras endócrinas, proge-

toras exócrinas, células ductais, células acinares, células alfa, células beta, células delta, células PP, hepatócitos, colangiócitos, angioblasto, mesoangioblasto, ou adipócitos marrons.

[00418] Em algumas modalidades, a célula é uma célula muscular, célula eritroide-megacariocítica, eosinófilo, célula iPS, macrófago, célula T, células beta das ilhotas, neurônio, cardiomiócito, célula sanguínea, progenitora endócrina, progenitora exócrina, célula ductal, célula acinar, célula alfa, célula beta, célula delta, célula PP, hepatócito, colangiócito, ou adipócito branco ou marrom.

[00419] Em algumas modalidades, a célula é uma célula precursora, uma célula pluripotente, uma célula totipotente, uma célula-tronco adulta, uma célula de massa celular interna, uma célula-tronco embrionária, ou uma célula iPS.

[00420] Em algumas modalidades, a célula manipulada é uma célula cancerosa. Em algumas modalidades, a célula cancerosa pode ser uma célula de câncer de pulmão, uma célula de câncer de mama, uma célula de câncer de pele, uma célula de câncer de cérebro, uma célula de câncer de pâncreas, uma célula de câncer hematopoiético, uma célula de câncer de fígado, uma célula de câncer de rim, uma célula de câncer de ovário, uma célula de câncer de próstata, uma célula de câncer de pele.

[00421] Em algumas modalidades, a célula é uma célula muscular, célula eritroide-megacariocítica, eosinófilo, célula iPS, macrófago, célula T, célula beta das ilhotas, neurônio, cardiomiócito, célula sanguínea, progenitora endócrina, progenitora exócrina, célula ductal, célula acinar, célula alfa, célula beta, célula delta, célula PP, hepatócito, colangiócito, ou adipócito branco ou marrom.

Administração de inibidores de DNA-PK e sistema de edição de genes em uma célula(s)

[00422] A administração em uma célula(s) de um sistema de edição

de genoma e um inibidor de DNA-PK pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica. A administração pode ser *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. A administração a uma célula(s) de um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente. Em algumas modalidades, a administração resulta no inibidor de DNA-PK e nos componentes do sistema de edição de genoma a entrar na membrana celular. Em algumas modalidades, a administração resulta no inibidor de DNA-PK e nos componentes do sistema de edição de genoma a entrar no núcleo da célula. Em algumas modalidades, a administração inclui incubar a célula na presença do inibidor de DNA-PK e do sistema de edição de genoma.

[00423] O sistema de edição de genes pode ser administrado a uma célula(s) por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, qualquer método de entrega de ácido nucleico ou proteína conhecido na técnica pode ser usado. O sistema de edição de genes é administrado (por exemplo, entregue) a uma célula por meio de um ácido nucleico codificando os componentes do sistema de edição de genes. O sistema de edição de genes pode ser administrado a uma célula por vetores virais ou vetores não virais. Em algumas modalidades, vetores virais são usados. Os vetores virais podem ser retrovirais (por exemplo, leucemia murina, HIV ou lentivirais) ou vírus de DNA (por exemplo, adenovírus, herpes simplex, e adenoassociado). Em algumas modalidades, métodos de transfecção (por exemplo, métodos de entrega não virais) são usados para introduzir o sistema de edição de genoma em uma célula. Os métodos de transfecção incluem colocar em contato a célula com DEAE-Dextrano, fosfato de cálcio, lipossomas ou eletroporação de um plasmídeo na célula. Métodos adicionais de entrega não viral incluem eletroporação, lipofecção, microinjeção, biolística, virossomas, lipossomas, imunolipossomas, polication ou conjugados de lipídios : ácidos nucleicos, DNA nu, RNA nu, vírions artificiais, e

captação de DNA aprimorada por agente. A sonoporação utilizando, por exemplo, o sistema Sonitron 2000 (Rich-Mar) também pode ser utilizada para a entrega de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, um ou mais ácidos nucleicos são entregues como mRNA. Em algumas modalidades, os mRNAs capeados são usados para aumentar a eficiência da tradução e / ou a estabilidade do mRNA. Em algumas modalidades, são utilizadas capas de ARCA (análogo de capa antirreversa) ou variantes das mesmas. Ver as patentes US7074596 e US8153773.

[00424] Nas modalidades, a endonuclease (por exemplo, Cas, Cpf1 e similares) e o gRNA, são transcritos a partir do DNA.

[00425] Em modalidades, a endonuclease (por exemplo, Cas, Cpf1 e similares) é transcrita a partir do DNA e o gRNA é fornecido como RNA.

[00426] Em modalidades, a endonuclease (por exemplo, Cas, Cpf1 e similares) e o gRNA são fornecidos como RNA.

[00427] Em modalidades, a endonuclease (por exemplo, Cas, Cpf1 e similares) é fornecida como uma proteína e o gRNA é fornecido como DNA.

[00428] Em modalidades, a endonuclease (por exemplo, Cas, Cpf1 e similares) é fornecida como proteína e o gRNA é fornecido como RNA.

[00429] Os sistemas adicionais de entrega de ácido nucleico incluem os fornecidos por Amaxa Biosystems (Colônia, Alemanha), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland), BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) e Copernicus Therapeutics Inc (ver, por exemplo, US6008336). A lipofecção é descrita, por exemplo, nas Patentes US 5.049.386, 4.946.787, e 4.897.355) e os reagentes de lipofecção são vendidos comercialmente (por exemplo, Transfectam™ e Lipofectin™ e Lipofectamine™ RNAiMAX). Lipídios catiônicos e neutros que são

adequados para lipofecção eficiente de reconhecimento de receptor de polinucleotídeos incluem os de Feigner, WO 91/17424, WO 91/16024. A entrega pode ser às células (administração *ex vivo*) ou aos tecidos alvo (administração *in vivo*).

[00430] A preparação de complexos de lipídio : ácido nucleico, incluindo lipossomos dirigidos, tal como complexos de imunolipídios, é bem conhecida por um versado na técnica (ver, por exemplo, Crystal, Science 270: 404 a 410 (1995); Blaese e outros, Cancer Gene Ther. 2: 291 a 297 (1995); Behr e outros, Bioconjugate Chem. 5: 382 a 389 (1994); Remy e outros, Bioconjugate Chem. 5: 647 a 654 (1994); Gao e outros, Gene Therapy 2: 710 a 722 (1995).

[00431] Métodos adicionais de entrega incluem o uso de empacotar os ácidos nucleicos a serem entregues nos veículos de entrega EnGeneIC (EDVs). Estes EDVs são entregues especificamente aos tecidos alvo usando anticorpos biespecíficos, onde um braço do anticorpo tem especificidade para o tecido alvo e o outro tem especificidade para o EDV. O anticorpo leva os EDVs à superfície da célula alvo e, em seguida, o EDV é levado para a célula por endocitose. Uma vez na célula, o conteúdo é liberado (ver MacDiarmid e outros (2009) Nature Biotechnology 27 (7): 643) Ahmad e outros, Cancer Res. 52: 4817 a 4820 (1992); Patentes US. Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 e 4.946.787).

[00432] Em algumas modalidades, a transfecção pode ser transiente, na qual o sistema de edição de genoma transfectado contendo plasmídeo entra no núcleo, mas não se incorpora ao genoma da célula durante a replicação. A transfecção pode ser estável, na qual o plasmídeo transfectado será integrado a uma região genômica da célula.

[00433] Em algumas modalidades em que a expressão transiente é usada, sistemas baseados em adenovirais podem ser usados. Os vetores baseados em adenovirais são capazes de uma eficiência de

transdução muito alta em muitos tipos de células e não exigem divisão celular. Com tais vetores, altas titulações e altos níveis de expressão foram obtidos. Esse vetor pode ser produzido em grandes quantidades em um sistema relativamente simples. Os vetores virais adenoassociados ("AAV") também são usados para transduzir células com ácidos nucleicos alvo, por exemplo, na produção *in vitro* de ácidos nucleicos e peptídeos, e para procedimentos de terapia gênica *in vivo* e *ex vivo* (ver, por exemplo, West e outros, *Virology* 160: 38 a 47 (1987); Patente US No. 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5: 793 a 801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94: 1351 (1994). A construção de vetores AAV recombinantes é descrita em várias publicações, incluindo a Patente US No. 5.173.414; Tratschin e outros, *Mol. Cell. Biol.* 5: 3251 a 3260 (1985); Tratschin e outros *Mol Cell. Biol.* 4: 2072 a 2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81: 6466 a 6470 (1984); e Samulski e outros, *J. Virol* 63: 03822-3828 (1989).

[00434] Em algumas modalidades, a administração a uma célula(s) de um inibidor de DNA-PK é realizada cultivando-se uma célula(s) isolada(s) na presença do inibidor de DNA-PK e qualquer meio adequado que permite que o inibidor de DNA-PK entre na membrana celular e / ou no núcleo celular.

[00435] Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK são administrados a uma célula(s) *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Em alguma modalidade, o inibidor de DNA-PK é colocado em contato com uma célula por cerca de 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 30 horas, 35 horas, 40 horas, 45 horas, 50 horas, 55 horas, 60 horas, 65 horas, 70 horas, 85 horas, 90 horas, 100 horas, 125 horas, 150 horas, 200 horas ou por qualquer período intermediário. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é colocado em contato com uma célula por cerca de 1,5 semanas, 2,0 semanas, 2,5 semanas, 3,0 semanas, 3,5 semanas, 4

semanas ou qualquer período de tempo intermediário. O inibidor de DNA-PK pode ser re-administrado com alterações no meio de cultura de células. O inibidor de DNA-PK pode ser colocado em contato com a célula antes, durante ou após a introdução dos componentes do sistema de edição de genoma.

[00436] Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é administrado a uma célula(s) a uma concentração de cerca de 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 0,75 μM , 1,0 μM , 1,25 μM , 1,50 μM , 1,75 μM , 2,0 μM , 2,5 μM , 3,0 μM , 3,5 μM , 4,0 μM , 4,5 μM , 5,0 μM , 5,5 μM , 6,0 μM , 6,5 μM , 7,0 μM , 7,5 μM , 8,0 μM , 8,5 μM , 9,0 μM , 9,5 μM , 10 μM , 10,5 μM , 11,0 μM , 11,5 μM , 12 μM , ou qualquer concentração intermediária. A concentração de inibidor de DNA-PK pode ser modificada durante o curso de administração.

[00437] Em algumas modalidades, os componentes de edição de genes são entregues às célula(s) por um ou mais vetores ou na forma de RNA, mRNA ou no caso do componente de endonuclease como proteína purificada ou mRNA (por exemplo, proteína Cas9). Os um ou mais vetores podem incluir vetores virais, plasmídeos ou ssDNAs. Os vetores virais podem incluir vetores retrovirais, lentivirais, adenovirais, adenoassociados e herpes simplex, ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, os componentes de edição de genes são entregues via RNA ou RNA sintético.

[00438] Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula, juntamente com um sistema de edição de genes, resulta em quantidades aumentadas de resultado de edição de genes de reparo dirigido por homologia em comparação com uma condição de linha de base na qual a célula não é administrada com um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s) juntamente com um sistema de edição de genes resulta na supressão de indels (de NHEJ) no alvo ou

fora do alvo. Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s) juntamente com um sistema de edição de genes resulta em aumento ou diminuição da expressão de um gene de interesse. A administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s) juntamente com um sistema de edição de genes pode resultar na expressão de um gene não endógeno a uma célula. Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s), juntamente com um sistema de edição de genes, resulta na remoção completa ou parcial ou na modificação de um gene de uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula, juntamente com o(s) sistema(s) de edição de genes, resulta na remoção completa ou parcial ou na modificação de um íntron e / ou éxon em uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s) juntamente com o sistema de edição de genes resulta na remoção completa ou parcial ou uma modificação de uma região não codificante em uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula, juntamente com o sistema de edição de genes, resulta em remoção simultânea ou sequencial, completa ou parcial, ou uma modificação de uma região genética codificante e / ou não codificante em uma célula(s). Em algumas modalidades, a administração dos inibidores de DNA-PK a uma célula(s), juntamente com o sistema de edição de genes, resulta na remoção simultânea ou sequencial, completa ou parcial, ou uma modificação de uma região genética codificante e / ou não codificante em uma célula(s), incluindo RNA ou DNA extracromossômico. O DNA extracromossômico pode ser DNA mitocondrial, DNA de cloroplasto, DNA circular extracromossômico ou DNA extracromossômico viral.

[00439] Em algumas modalidades, a administração de inibidores de DNA-PK a uma célula juntamente com o sistema de edição de genoma

resulta em aumento da expressão ou diminuição da expressão de um gene de interesse. Em algumas modalidades, o aumento ou diminuição na expressão de um gene de interesse pode estar entre 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou entre, 90% em comparação com uma condição de linha de base na qual a célula não recebe um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, o aumento ou diminuição de um gene de interesse pode ser aproximadamente ou estar entre 0,5 vez, 1,0 vez, 1,5 vezes, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 2,5 vezes, 3,0 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com o nível de expressão da linha de base em que a célula não recebe um inibidor de DNA-PK.

[00440] Em algumas modalidades, a administração de inibidores de DNA-PK a uma célula juntamente com um sistema de edição de genoma resulta em um aumento na edição de genoma. Em algumas modalidades, o aumento na edição do genoma pode ser de cerca de 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% em comparação com uma condição de linha de base na qual a célula não recebe um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, o aumento na edição do genoma pode ser de cerca de 0,5 vez, 1,0 vez, 1,5 vezes, 2,0 vezes, 2,5 vezes, 2,5 vezes, 3,0 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com o nível de expressão de linha de base em que a célula não recebe um inibidor de DNA-PK.

[00441] Em algumas modalidades, a administração de um inibidor de DNA-PK e um sistema de edição de genes a uma população de células resulta em maior sobrevivência celular em comparação com uma condição de linha de base na qual uma população de células é somente administrada com um sistema de edição de genes e não é administrada com um inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK que resulta em maior sobrevivência celular é um composto

de Fórmula Estrutural I, Fórmula Estrutural II ou Fórmula Estrutural II''.

[00442] Em algumas modalidades, a célula é sincronizada na fase do ciclo celular S ou G2, antes, depois ou durante a administração do inibidor de DNA-PK. Em algumas modalidades, a célula é sincronizada na fase do ciclo celular S ou G2, antes, depois ou durante a introdução dos componentes de edição de genes. A sincronização da célula na fase do ciclo celular S ou G2 pode ser conseguida por qualquer método conhecido na técnica. Como um exemplo não limitante, os agentes que podem ser usados para sincronizar uma célula na fase do ciclo celular S ou G2 incluem afidicolina, hidroxíureia, lovastatina, mimosina, nocodazol, timidina ou qualquer combinação dos mesmos. (Ver Lin e outros *Elife*. 15 de dezembro de 2014; 32014). Em algumas modalidades, os agentes para sincronização celular podem ser administrados a qualquer momento durante o processo de edição de genes.

[00443] Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK e / ou o sistema de edição de genoma podem ser incluídos em um recipiente, embalagem ou dispensador, juntamente com as instruções de uso. Em algumas modalidades, o agente inibidor de DNA-PK e / ou o sistema de edição de genoma incluído em um recipiente, embalagem ou dispensador, juntamente com instruções de uso, é um kit.

[00444] Em algumas modalidades, os inibidores de DNA-PK e / ou o sistema de edição de genoma são incluídos em um kit com instruções de uso. O kit pode conter qualquer sistema de edição de genoma e / ou inibidor de DNA-PK e instruções de uso. Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK é qualquer um dos compostos representados pela Fórmula Estrutural I, I', II, II', II'', II''', III, III' ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o sistema de edição de genoma é um selecionado a partir de um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de trans-

criação (TALEN), um sistema baseado em CRISPR ou um sistema baseado em NgAgo. O sistema de edição de genoma pode ser fornecido no kit em qualquer forma, por exemplo, como um plasmídeo, vetor, DNA ou RNA.

[00445] Em algumas modalidades, o inibidor de DNA-PK e / ou um sistema de edição de genoma é administrado *in vivo*. O inibidor de DNA-PK e o sistema de edição de genes são formulados para serem compatíveis com a via de administração pretendida. Exemplos de vias de administração incluem administração parentérica, por exemplo, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (isto é, tópica), transmucosa e retal. As soluções ou suspensões usadas para aplicação parentérica, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); tampões tal como acetatos, citratos ou fosfatos; e agentes para o ajuste de tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos para múltiplas doses feitos de vidro ou plástico.

[00446] Para uso injetável, carreadores adequados incluem soluções aquosas estéreis (onde solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa (IV), carreadores adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou solução salina tampoadada com fosfato (PBS). Em tais administrações injetáveis e IV, a

composição é estéril e fluida na medida em que exista facilidade de seringabilidade. Eles são estáveis nas condições de fabricação e armazenamento e preservados contra a ação contaminante de micro-organismos tal como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido, e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e através do uso de tensoativos. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e similares. Em algumas modalidades, agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tal como manitol, sorbitol, cloreto de sódio, são incluídos na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo-se na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00447] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando-se o agente ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando-se o agente ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação são a secagem a vácuo e a liofilização que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução filtrada anteriormente esterilizada do mesmo.

[00448] As composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um carreador comestível. Eles podem ser acondicionados em cápsulas de gelatina ou compactados em comprimidos. Para fins de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. As composições orais também podem ser preparadas usando-se um carreador fluido para uso como um enxaguatório bucal, em que o composto no carreador fluido é aplicado oralmente e agitado e expectorado ou engolido. Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis e / ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e similares podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou compostos de natureza semelhante: um ligante tal como celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um glidante tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente flavorizante tal como menta, metil salicilato ou flavorizante de laranja.

[00449] Para administração por inalação, os agentes são entregues na forma de uma aspensão em aerossol a partir de um recipiente ou dispensador pressurizado que contém um propelente adequado, por exemplo, um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador.

[00450] A administração sistêmica também pode ser por meio transmucosa ou transdérmica. Para administração transmucosa ou transdérmica, são utilizados na formulação penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosa, detergentes, sais biliares e derivados de ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser realizada através do uso de

aspersões nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em unguentos, pomadas, géis ou cremes, como geralmente conhecido na técnica.

[00451] Os agentes também podem ser preparados na forma de supositórios (por exemplo, com bases de supositórios convencionais, tal como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para entrega retal.

[00452] Em algumas modalidades, os agentes são preparados com carreadores que protegerão o composto contra a eliminação rápida do corpo, tal como uma formulação de liberação sustentada / controlada, incluindo implantes e sistemas de entrega microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser utilizados, tal como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliolefinas e ácido polilático. Os métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes para os versados na técnica.

[00453] Por exemplo, os agentes ativos podem ser colocados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetil celulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões.

[00454] As preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o agente, matrizes que estão na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato) ou poli(vinil álcool)), polilactídeos (Patente US No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato,

etileno - vinil acetato não degradável, copolímeros de ácido lático – ácido glicólico degradáveis tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas por copolímero de ácido lático – ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Enquanto polímeros tal como etileno vinil acetato e ácido lático – ácido glicólico permitem a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos mais curtos.

[00455] Em algumas modalidades, a formulação também pode conter mais de um composto ativo conforme necessário para a indicação específica a ser tratada, por exemplo, aqueles com atividades complementares que não se afetam adversamente um ao outro. Alternativamente, ou em adição, a composição pode compreender um agente que melhora sua função, tal como, por exemplo, um agente citotóxico, citocina, agente quimioterápico ou agente inibidor de crescimento. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade pretendida.

[00456] Em algumas modalidades, o agente inibidor de DNA-PK e / ou o sistema de edição de genoma são administrados em terapia de combinação, isto é, combinados com outros agentes, por exemplo, agentes terapêuticos, que são úteis no tratamento de condições ou distúrbios patológicos, tal como várias formas de câncer e doenças inflamatórias. O termo "em combinação", neste contexto, significa que os agentes são administrados substancialmente contemporaneamente, simultaneamente ou sequencialmente. Se administrados sequencialmente, no início da administração do segundo composto, o primeiro dos dois compostos ainda é preferencialmente detectável em concentrações efetivas no sítio de tratamento.

Métodos de seleção de edição de genoma

[00457] Qualquer método conhecido na técnica pode ser usado para selecionar células quanto à eficiência de edição do genoma, incluín-

do a eficiência de NHEJ e / ou HDR. Por exemplo, os métodos de seleção podem incluir amplificação baseada em PCR de regiões alvo seguida por sequenciamento ou sequenciamento profundo das regiões amplificadas para confirmar a edição do genoma. A genotipagem por PCR permite a quantificação e classificação de compostos na estimulação de HDR. Outros métodos de seleção podem incluir sequenciamento de próxima geração. Ver, por exemplo, Bell e outros, "A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing", *BMC Genomics*, 15: 1002 (2014).

[00458] Iniciadores de PCR podem ser projetados para amplificar seletivamente as regiões genéticas não modificadas e modificadas, resultando em amplicons de diferentes comprimentos, dependendo do estado de modificação genética. Os amplicons podem então ser dissolvidos em um gel, e a eficiência de HDR estimada por densitometria usando um Bio-Imager. Alternativamente, uma nova tecnologia de PCR, PCR digital rápida em gotas (DDPCR), pode ser usada para medir simultaneamente eventos de HDR e NHEJ em amostras de genoma editado. Ver, por exemplo, Miyaoka e outros, "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing", *Scientific Reports*, 6, 2016. Outros métodos podem ser usados para selecionar células quanto a modificações genômicas, incluindo sequenciamento de Sanger, sequenciamento profundo, e RT-PCR.

[00459] Em algumas modalidades, um construto "traffic light repórter" (TLR) é usado para selecionar as células. A seleção de TLR inclui uma célula repórter que é manipulada para expressar um marcador fluorescente mediante a edição de genoma dirigida. Após o direcionamento apropriado, o marcador fluorescente é expresso pela célula. A quantificação das células alvo apropriadamente pode ser realizada por

qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, análise citométrica de fluxo. Ver, por exemplo, Certo e outros 2011, "Tracking genome engineering result in individual DNA breakpoints", Nature Methods, 8, páginas 671 a 676 (2011).

[00460] As partes relevantes de todas as publicações e documentos de patentes citados aqui são incorporadas aqui por referência, como se cada publicação ou documento fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado aqui por referência. A citação de publicações e documentos de patentes não é destinada a admitir que alguma é pertinente ao estado da técnica, nem a admitir o conteúdo ou a data da mesma. A presente descrição, agora tendo sido descrita por meio de descrição escrita, os versados na técnica reconhecerão que uma variedade de modalidades pode ser praticada e que a descrição anterior e exemplos abaixo são para fins de ilustração e não limitação das reivindicações a seguir.

Uso de inibidores de DNA-PK em condições de tratamento / prevenção

[00461] Em outra modalidade, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto de qualquer uma das fórmulas aqui descritas e um excipiente farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade adicional, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto da Tabela 1. Em uma modalidade adicional, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um composto da Tabela 2. Em uma modalidade adicional, as composições compreendem adicionalmente um agente terapêutico adicional.

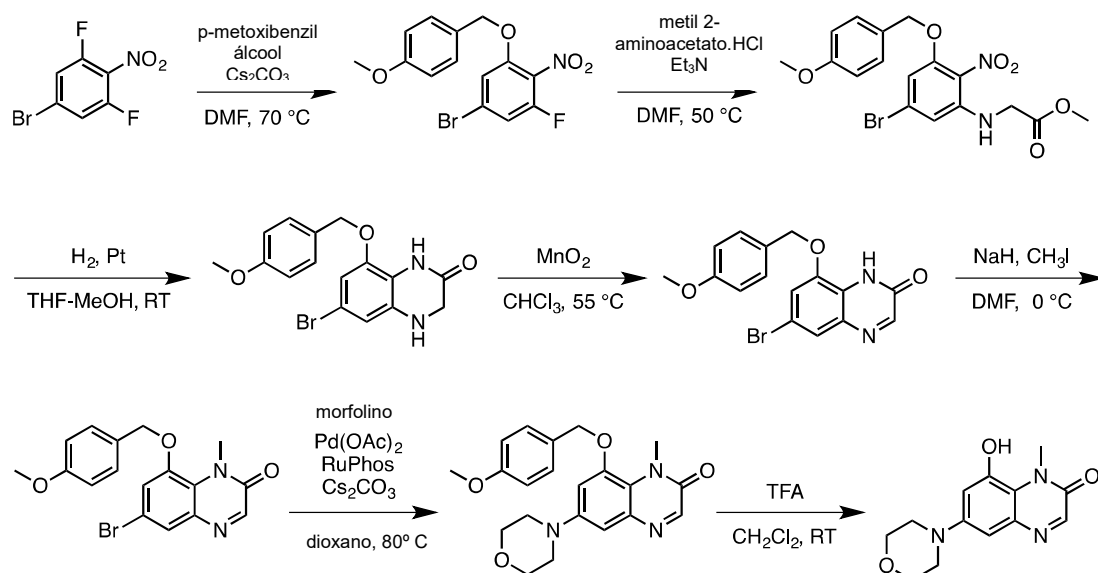
[00462] De acordo com outra modalidade, a invenção fornece uma composição compreendendo um composto desta invenção ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo e um carreador, adjuvante ou veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade, a

quantidade de composto em uma composição desta invenção é tal que é eficaz para inibir de forma mensurável um DNA-PK em uma amostra biológica ou em um paciente. Em outra modalidade, a quantidade de composto nas composições desta invenção é tal que é eficaz para inibir de forma mensurável o DNA-PK. Em uma modalidade, a composição desta invenção é formulada para administração a um paciente em necessidade dessa composição. Em uma outra modalidade, a composição desta invenção é formulada para administração oral a um paciente.

Preparação de Compostos da Invenção

Seção I: Preparação de Intermediários de Hidróxi Quinoxalinona

[00463] São descritos na Seção I procedimentos sintéticos para a preparação de intermediários funcionalizados de 8-hidróxi-1-metilquinoxalin-2(1H)-ona. Esses intermediários foram utilizados, juntamente com a seleção apropriada do intermediário mesilato descrito na Seção II, para preparar compostos na Tabela A.



Síntese de 8-hidróxi-1,3-dimetil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H) -ona:

Etapa 1: 5-Bromo-1-fluoro-3-((4-metoxibenzil)óxi)-2-nitrobenzeno

[00464] 5-bromo-1,3-difluoro-2-nitro-benzeno (300 g, 1,261 mol) e p-metoxibenzil álcool (190 g, 1,375 mol) foram dissolvidos em N,N-dimetilformamida (1,8 L). À solução resultante foi adicionado carbonato

de césio (611 g, 1,875 mol), e a mistura foi aquecida a 70° C e agitada durante 16 h. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente e vertida em água fria (2 L), resultando na precipitação de um sólido amarelo. O precipitado foi coletado em um funil de Buchner e lavado com água (2 × 500 mL). O precipitado foi dissolvido em diclorometano (5 L), lavado com água (2 x 1 L) e salmoura (1 L), seco (Na₂SO₄), e filtrado através de um tampão de sílica gel (500 g). O leito de sílica gel foi lavado com diclorometano (500 mL), e os filtrados combinados foram concentrados sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com heptano (2 L) e seco em um vácuo a 50° C por 14 h para fornecer 5-bromo-1-fluoro-3 -((4-metoxibenzil)óxi)-2-nitrobenzeno (350 g, 72% de rendimento) como um sólido amarelo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7,35 - 7,27 (m, 2H), 7,08 - 6,99 (m, 2H), 6,97 - 6,87 (m, 2H), 5,11 (s, 2H), 3,82 (s, 3H). ¹⁹F RMN (282 MHz, CDCl₃) δ -120,36.

Etapla 2: Metil (5-bromo-3 -((4-metoxibenzil)óxi) -2-nitrofenil) glicinato

[00465] A uma mistura de 5-bromo-1-fluoro-3 -[(4-metoxifenil) metóxi] -2-nitro-benzeno (350 g, 0,914 mol) e metil 2-aminoacetato (sal cloridrato, 173 g, 1,364 mol) em N,N-dimetilformamida (2 L) foi adicionada trietilamina (350 mL, 2,511 mol). A mistura reacional resultante foi aquecida a 50° C, agitada a esta temperatura durante 54 h. A mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente e vertida em água fria (3 L), resultando na formação de um material marrom claro semelhante a uma cola. A água foi decantada, e a cola marrom clara foi dissolvida em diclorometano (5 L), lavada com água (1 L) e salmoura (1 L), e seca (Na₂SO₄). A solução foi filtrada através de um leito de sílica gel, e o leito foi lavado com diclorometano (2 x 500 mL). O filtrado combinado foi concentrado sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com metil terc-butil éter (2 L) e seco em vácuo a 50° C por 12 h para fornecer metil (5-bromo-3-((4-metoxibenzil)óxi)-2-nitrofenil) glicinato (5 L)

(252 g, 62%) como um sólido amarelo.

[00466] ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7,40 - 7,30 (m, 2H), 6,96 - 6,86 (m, 2H), 6,63 (t, $J = 4,9$ Hz, 1H), 6,58 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 6,40 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 3,96 (d, $J = 5,2$ Hz, 2H), 3,82 (s, 6H).

Etapa 3: 6-Bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)-3,4-di-hidroquinoxalin-2(1H)-ona

[00467] A uma solução de metil (5-bromo-3-((4-metoxibenzil)óxi)-2-nitrofenil) glicinato (52 g, 112,5 mmol) em tetra-hidrofurano (700 mL) e metanol (400 mL) foi adicionada platina [7 g de 3% em peso em carvão vegetal ativado, pasta úmida com água a 70%, reduzida (ESCAT 2931), 1,076 mmol]. A mistura reacional foi evacuada por 5 minutos e depois colocada sob atmosfera de hidrogênio (balão) por 16 h. A mistura reacional foi filtrada através de Celite, e o leito foi lavado com metanol (2 \times 200 mL). Os filtrados combinados foram concentrados sob pressão reduzida. O resíduo assim obtido foi azeotropado com diclorometano (400 mL) e triturado com metil terc-butil éter para fornecer 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)-3,4-di-hidroquinoxalin-2(1H)-ona (39 g, 93%) como um sólido castanho. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9,42 (s, 1H), 7,56 - 7,29 (m, 2H), 7,02 - 6,81 (m, 2H), 6,60 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 6,49 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 6,19 (s, 1H), 5,05 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,70 (s, 2H).

Etapa 4: 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00468] 6-bromo-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-3,4-di-hidro-1H-quinoxalin-2-ona (178 g, 0,485 mmol) foi dissolvida em clorofórmio (6,0 L). À solução resultante foi adicionado dióxido de manganês (IV) (400 g, 4,601 mol). A mistura reacional resultante foi aquecida a 55° C e agitada por 4 h. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e filtrada através de um leito de sílica gel. O leito foi lavado com etil acetato a 40% em diclorometano (4 \times 500 mL). Os filtrados combinados foram concentrados sob pressão reduzida. O resíduo re-

sultante foi triturado com etil acetato / metil terc-butil éter (relação 1:2, 3 L) e seco em vácuo a 50° C por 14 h para fornecer 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona (125 g, 71%) como um sólido castanho. 1H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,06 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,67 - 7,33 (m, 4H), 7,03 - 6,85 (m, 2H), 5,26 (s, 2H), 3,75 (s, 3H).

Etapla 5: 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)-1-metilquinoxalin-2 (1H)-ona

[00469] A uma solução de 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona (125 g, 0,343 mmol) em N,N-dimetilformamida (4,0 L) foi adicionado metil iodeto (110 mL 1,776 mol). A mistura resultante foi resfriada a 0° C com um banho gelado, e foi adicionado hidreto de sódio (35 g de 60% em peso, 0,875 mmol) em porções durante 20 minutos. A mistura reacional resultante foi agitada ≤ 3° C durante 30 minutos, momento em que a análise por HPLC revelou uma relação aproximada de 85:15 de produtos de N-metilação e O-metilação. A mistura reacional foi vertida em água fria (4,0 L), resultando na formação de um precipitado amarelo. O sólido foi coletado em um funil de Buchner, lavado com água (2 x 1,0 L) e seco em estufa de convecção a 50° C por 4 h. O precipitado (relação 85:15) foi suspenso em etil acetato a 20% em metil terc-butil éter (3,0 L), submetido a refluxo durante 1 h, e resfriado até a temperatura ambiente. A mistura foi filtrada através de funil de porosidade de média e seca em vácuo a 50° C por 5 h para fornecer o produto N-metilado desejado (120 g) com 96% de pureza. O produto foi ressuspenso novamente em etil acetato a 20% em metil terc-butil éter (3,0 L), submetido a refluxo por 1 h, filtrado e seco a vácuo, conforme descrito acima, para fornecer 6-bromo-8-((4-metoxibenzil)óxi)-1-metilquinoxalin-2(1H)-ona (90 g) com 99% de pureza como um sólido amarelo. Adicionalmente, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel (coluna de ouro Isco de 330 g, gradiente line-

ar, 0% → 60% de etil acetato / diclorometano) para fornecer uma colheita adicional do produto desejado 3 (13 g, 99% de pureza). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,26 (s, 1H), 7,63 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,40 - 7,29 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 7,05 - 6,83 (m, 2H), 5,05 (s, 2H), 3,84 (d, J = 1,7 Hz, 6H). ESI-MS m / z calc. 374,03, encontrado 375,05 (M + 1).

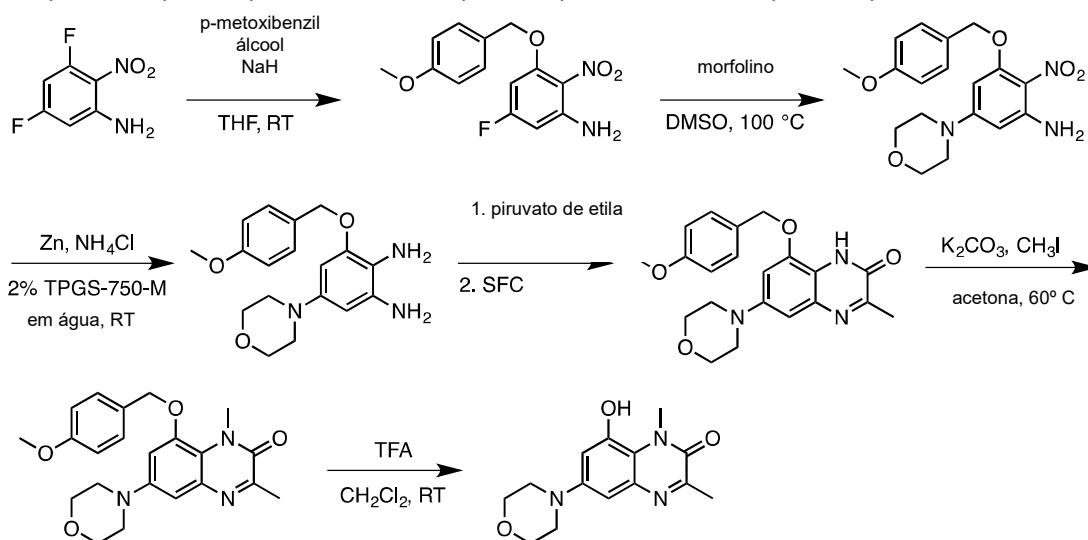
Etapa 6: 8-((4-metoxibenzil)óxi)-1-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona

[00470] Uma mistura de 6-bromo-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-1-metilquinoxalin-2-ona (103 g, 270,9 mmol) e morfolino (36 mL, 412,8 mmol) em dioxano (2,0 L) foi desoxigenada borbulhando um fluxo de gás nitrogênio através da solução por 10 minutos. Foram adicionados sequencialmente acetato de paládio (II) (1,3 g, 5,790 mmol), RuPhos (5,5 g, 11,79 mmol) e carbonato de céσιο (200 g, 613,8 mmol). A mistura reacional foi desoxigenada com um fluxo de gás nitrogênio por mais 10 minutos. A mistura reacional resultante foi aquecida a 80° C e agitada por 14 h. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e concentrada sob pressão reduzida para remover o dioxano. Água fria (2,5 L) foi adicionada, e um precipitado amarelo foi formado. O precipitado foi coletado em um funil de Buchner, lavado com água (500 mL), e seco em uma estufa de convecção. O resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel (coluna 4 x 330 g, gradiente linear, 0% → 10% de metanol / diclorometano) para fornecer 8-((4-metoxibenzil)óxi)-1-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona (68 g, 66%) como um sólido amarelo. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (s, 1H), 7,41 - 7,28 (m, 2H), 7,03 - 6,89 (m, 3H), 6,82 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,05 (s, 2H), 3,93 - 3,87 (m, 4H), 3,86 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,46 - 2,82 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 381,17, encontrado 382,21 (M + 1).

Etapa 7: 8-hidróxi-1-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona

[00471] 8-((4-metoxibenzil)óxi)-1-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona (13,90 g, 36,44 mmol) foi dissolvida em diclorometano (250 mL).

Foi adicionado ácido trifluoroacético (31,0 mL, 402 mmol), e a solução marrom escura resultante foi agitada em temperatura ambiente por 3 h. O solvente foi evaporado in vácuo, e o resíduo restante foi dissolvido em diclorometano e filtrado sobre um tampão de sílica gel. O tampão foi eluído primeiro com diclorometano para eluir altas impurezas de R_f, que foram descartadas. O eluente foi trocado para acetona, resultando na eluição de uma banda amarelo-laranja. Esta banda foi recolhida e concentrada até a secura para fornecer 8-hidróxi-1-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona (8,89 g, 50% de rendimento). ¹H RMN (300 MHz DMSO-d₆) δ 10,23 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 6,77 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,81 - 3,70 (m, 4H), 3,19 - 2,99 (m, 4H).



Síntese de 8-hidróxi-1,3-dimetil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona:

Etapa 1: 5-fluoro-3-[(4-metoxifenil) metóxi]-2-nitro-anilina

[00472] A uma solução de (4-metoxifenil)metanol (4,17 g, 30,18 mmol) em tetra-hidrofurano (52,4 mL) foi adicionado hidreto de sódio (dispersão a 60% em óleo mineral; 1,28 g, 32,00 mmol). A mistura resultante foi agitada por 10 minutos, tratada com 3,5-difluoro-2-nitroanilina (5 g, 28,72 mmol) e agitada por mais 1 h. A mistura foi cuidadosamente particionada entre etil acetato e água, e ácido clorídrico a 1 N foi adicionado por gotejamento até a cor vermelha se dissipar para amarelo / laranja. Os orgânicos foram coletados, secos (Na₂SO₄), fil-

trados e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (coluna ISCO de 330 g, gradiente linear de 0-25% de etil acetato / heptano) para fornecer 5-fluoro-3-[(4-metoxifenil)metóxi]-2-nitro-anilina como um sólido amarelo-laranja.

Etapa 2: 3-[(4-metoxifenil)metóxi]-5-morfolino-2-nitroanilina

[00473] Uma solução de 5-fluoro-3-[(4-metoxifenil)metóxi]-2-nitroanilina (4,64 g, 15,88 mmol) e morfolino (7,0 mL, 80,27 mmol) em dimetil sulfóxido (13,6 mL) foi aquecida a 100° C durante 2,5 h. A mistura foi particionada entre etil acetato e água. As fases foram separadas, e a fase aquosa extraída com etil acetato. Os orgânicos combinados foram secos (Na₂SO₄), filtrados e concentrados para fornecer 3-[(4-metoxifenil) metóxi]-5-morfolino-2-nitroanilina (5,70 g, rendimento 100%) como um sólido laranja que foi usado sem manipulação adicional. ESI-MS m / z calc. 359,15, encontrado 360,17 (M + 1).

Etapa 3: 3-[(4-metoxifenil) metóxi]-5-morfolino-benzeno-1,2-diamina

[00474] Uma mistura de 3-[(4-metoxifenil) metóxi]-5-morfolino-2-nitroanilina (5,66 g, 15,75 mmol), cloreto de amônio (1,53 g, 28,60 mmol), zinco (5,59 g, 85,46 mmol) e TPGS-750-M a 2% em água (31 mL) foi agitada durante a noite. Celite foi adicionado para absorver a água, seguida por etil acetato. A mistura foi filtrada, e o tampão de celite foi lavado com mais etil acetato. O filtrado combinado foi concentrado, e o resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 330 g de sílica gel; gradiente linear de 0-5% de metanol / diclorometano) para fornecer 3-[(4-metoxifenil)metóxi]-5-morfolino-benzeno-1,2-diamina (3,41 g, 66% de rendimento) como um sólido vermelho. ESI-MS m / z calc. 329,17, encontrado 330,19 (M + 1).

Etapa 4: 8-[(4-metoxifenil)metóxi]-3-metil-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona

[00475] Uma mistura de 3-[(4-metoxifenil)metóxi]-5-morfolino-

benzeno-1,2-diamina (315 mg, 0,956 mmol), etil piruvato (212 μ L, 1,908 mmol), e metanol (3,0 mL) foi aquecido em um frasco selado a 65° C por 2 horas. Um sólido se precipitou a partir da mistura reacional. A reação foi resfriada em temperatura ambiente, água foi adicionada, e a mistura foi agitada durante 30 minutos. O sólido foi coletado por filtração, lavado com água e seco sob vácuo durante a noite para fornecer uma mistura regioisomérica de produtos (365 mg, relação de 1,7:1 favorecendo o composto desejado mostrado no esquema acima). A mistura resultante foi purificada por SFC para fornecer o isômero desejado 8-((4-metoxifenil)metóxi)-3-metil-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona (110 mg) e o isômero indesejado 5-((4-metoxibenzil)óxi)-3-metil-7-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona (64 mg).

[00476] Dados para 8-((4-metoxibenzil)óxi)-3-metil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona:

[00477] ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,56 (s, 1H), 7,55 - 7,46 (m, 2H), 6,98 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 6,95 - 6,89 (m, 2H), 6,72 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 5,21 (s, 2H), 3,74 (m, 7H), 3,10 (m, 4H), 2,78 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,23 - 1,14 (t, 3H) ESI-MS m/z calc. 381,17, encontrado 382,17 ($M + 1$).

[00478] Dados para 5-((4-metoxibenzil)óxi)-3-metil-7-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona:

[00479] ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,96 (s, 1H), 7,49 - 7,38 (m, 2H), 7,00 - 6,90 (m, 2H), 6,60 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 6,21 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 5,17 (s, 2H), 3,75 (m, 7H), 3,18 (m, 4H), 2,69 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,17 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 381,17, encontrado 382,17 ($M + 1$).

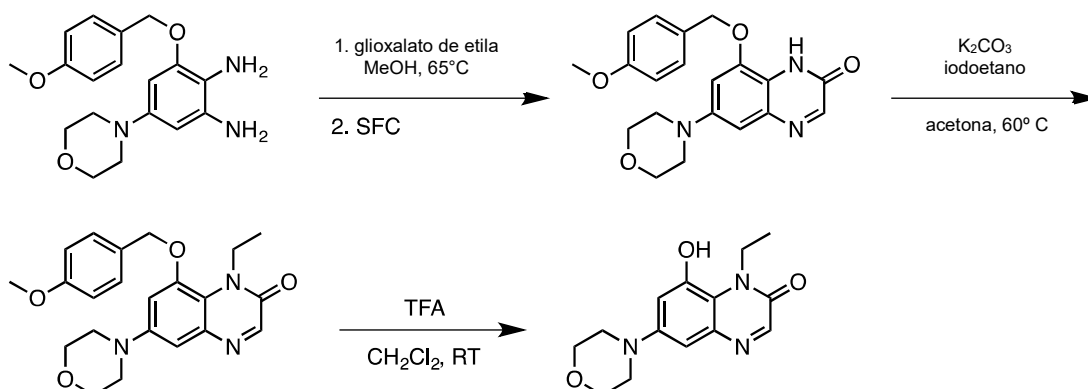
Etapa 5: 8-((4-metoxibenzil)óxi)-1,3-dimetil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona

[00480] Uma mistura de 8-[(4-metoxifenil)metóxi]-3-metil-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona (110 mg, 0,274 mmol), carbonato de

potássio (183 mg, 1,324 mmol), e acetona (3,0 mL) foi tratada com metil iodeto (21 μ L, 0,337 mmol). A mistura reacional resultante foi selada e agitada a 60° C durante a noite. A mistura foi particionada entre etil acetato e água. As fases foram separadas, e a fase aquosa extraída com etil acetato. Os orgânicos combinados foram secos (Na_2SO_4), filtrados, e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 4 g de sílica gel; gradiente linear de 0-10% de metanol / diclorometano) para fornecer 8-((4-metoxibenzil)óxi)-1,3-dimetil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona (94 mg, 82%) ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,48 - 7,41 (m, 2H), 7,04 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 6,99 - 6,94 (m, 2H), 6,79 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 5,15 (s, 2H), 3,76 (m, 10H), 3,16 (m, 4H), 2,38 (s, 3H). ESI-MS m/z calc. 395,18, encontrado 396,26 ($M + 1$).

Etapa 6: 8-hidróxi-1,3-dimetil-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona

[00481] Uma solução de 8-[(4-metoxifenil) metóxi] -1,3-dimetil-6-morfolino-quinoxalin-2-ona (88 mg, 0,177 mmol) agitada em diclorometano (5,0 mL) foi tratada com ácido trifluoroacético. A solução resultante foi agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. A mistura reacional foi concentrada, e o resíduo bruto foi usado sem purificação adicional. ESI-MS m/z calc. 275,13, encontrado 276,14 ($M + 1$).



Síntese de 1-etil-8-hidróxi-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona:

Etapa 1: 8-((4-metoxibenzil)óxi)-6-morfolinoquinoxalin-2(1H)-ona

[00482] A uma solução de 3-[(4-metoxifenil) metóxi]-5-morfolino-benzeno-1,2-diamina (7,51 g, 22,80 mmol) em metanol (877 mL) foi

adicionado etil glioxalato (9,3 mL de 50% peso / volume em tolueno, 45,55 mmol). A solução resultante foi selada e aquecida a 65° C durante 2 horas. Um sólido se precipitou a partir da mistura reacional. A reação foi resfriada até a temperatura ambiente, e água foi adicionada. O sólido foi coletado por filtração, lavado com água, triturado com isopropanol, e seco sob vácuo para fornecer uma mistura regioisomérica de produtos (6,34 g). A mistura resultante foi purificada por SFC [coluna preparatória IB usando etanol a 40% (amônia a 5 mM)] para fornecer tanto o regioisômero desejado, 8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona (3,48 g), quanto o indesejável, 5-[(4-metoxifenil)metóxi]-7-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona (2,35 g).

[00483] Dados para 8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,80 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,55 - 7,47 (m, 2H), 7,06 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,96 - 6,89 (m, 2H), 6,76 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 5,23 (s, 2H), 3,76 (m, 7H), 3,12 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 367,15, encontrado 368,09 (M + 1).

[00484] Dados para 5 - [(4-metoxifenil)metóxi]-7-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona:

[00485] ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,08 (s, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,46 - 7,37 (m, 2H), 7,02 - 6,92 (m, 2H), 6,63 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,19 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 5,14 (s, 2H), 3,77 (m, 7H), 3,24 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 367,15, encontrado 368,09 (M + 1).

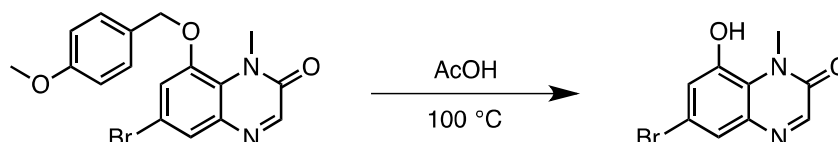
Etapa 2: 1-etil-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-quinoxalin-2-ona

[00486] A uma solução de 8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-1H-quinoxalin-2-ona (150 mg, 0,408 mmol) em acetona (4,3 mL) foi adicionado carbonato de potássio (273 mg, 1,975 mmol) e iodoetano (40 µL, 0,500 mmol). A mistura reacional resultante foi selada e agitada a 60° C em um frasco durante a noite. A mistura foi particionada entre

etil acetato e água. As fases foram separadas, e a fase aquosa extraída com etil acetato. Os orgânicos combinados foram secos (Na_2SO_4), filtrados e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 4 g de sílica gel; gradiente linear de 0-10% de metanol / diclorometano) para fornecer 1-etil-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-quinoxalin-2-ona (55 mg, 32% de rendimento). ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7,46 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,16 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 6,99 - 6,93 (m, 2H), 6,86 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 5,26 (s, 2H), 4,43 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,78 (m, 4H), 3,76 (s, 3H), 3,23 (m, 4H), 1,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H). ESI-MS m/z calc. 395,18, encontrado 396,23 ($M + 1$).

Etapa 3: 1-etil-8-hidróxi-6-morfolino-quinoxalin-2-ona

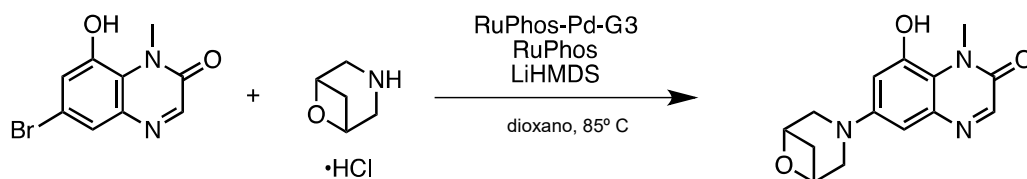
[00487] A uma solução de 1-etil-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-6-morfolino-quinoxalin-2-ona (50 mg, 0,1264 mmol) em diclorometano (aproximadamente 1,0 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético. A solução reacional vermelha resultante foi concentrada e usada como está sem manipulação adicional. ESI-MS m/z calc. 275,13, encontrado 276,14 ($M + 1$).



6-bromo-8-hidróxi-1-metilquinoxalin-2(1H)-ona

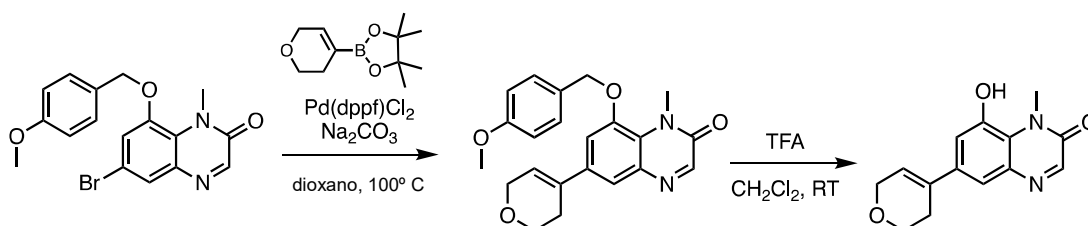
[00488] Uma solução de 6-bromo-8-[(4-metoxifenil)metóxi]-1-metilquinoxalin-2-ona (4 g, 10,66 mmol) em ácido acético (56 mL) foi aquecida a 100°C por 5 horas. A reação foi resfriada até a temperatura ambiente e deixada repousar durante a noite, resultando na formação de um precipitado amarelo. O sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com dietil éter e seco sob vácuo para fornecer 6-bromo-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona (1,92 g, 69% de rendimento). ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8,21 (s, 1H), 7,44 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 7,19 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 3,86 (s, 3H). ESI-MS m/z calc. 253,97, encontrado

254,97 (M + 1).



8-hidróxi-1-metil-6-(6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan-3-il) quinoxalin-2-ona

[00489] 6-bromo-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona (312 mg, 1,223 mmol), 6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptano (sal cloridrato; 201 mg, 1.482 mmol), RuPhos -G3-palladaciclo (52 mg, 0,062 mmol) e RuPhos (29 mg, 0,062 mmol) foram combinados em um frasco selado sob nitrogênio. Lítio bis(trimetilsilil)amida (3 mL de solução a 1,0 M em tetra-hidrofurano, 3.000 mmol) foi adicionado e o frasco foi aquecido a 65° C durante a noite. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente, diluída com etil acetato e filtrada. O filtrado foi concentrado, e o resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel com funcionalidade amino (cartucho de 12 g, gradiente linear de 0-10% de metanol / diclorometano) para fornecer 8-hidróxi-1-metil-6-(6-oxa-3-azabicyclo[3.1.1]heptan-3-il) quinoxalin-2-ona (214 mg, 64% de rendimento). ESI-MS m / z calc. 273,11, encontrado 274,24 (M + 1).



Síntese de 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona:

Etapa 1: 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-((4-metoxibenzil) óxi) -1-metilquinoxalin-2(1H)-ona

[00490] Uma mistura de 6-bromo-8-[(4-metoxifenil) metóxi]-1-metil-quinoxalin-2-ona (4,0 g, 10,66 mmol), 2-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (2,72 g, 12,95 mmol), carbonato

de sódio (8 mL de uma solução aquosa a 2,0 M, 16,00 mmol), e dioxano (40 mL) foi desgaseificado borbulhando gás nitrogênio através da mistura por 10 min. Foi adicionado [1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno]-dicloropaládio (II) (complexo de diclorometano; 881 mg, 1,079 mmol). A mistura reacional resultante foi desgaseificada por mais 5 minutos, e depois aquecida a 85° C por 4 horas. A mistura foi resfriada até a temperatura ambiente e particionada entre água e etil acetato. As camadas foram separadas, e a fase aquosa foi ainda extraída com etil acetato. Os orgânicos foram combinados com salmoura, secos (MgSO₄), filtrados e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 330 g de sílica gel, gradiente linear de 0-50% de etil acetato / heptano) para fornecer 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-[(4-metoxifenil) metóxi]-1-metil-quinoxalin-2-ona (2,81 g, 69% de rendimento) como um sólido amarelo. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,21 (s, 1H), 7,52 - 7,42 (m, 4H), 7,02 - 6,94 (m, 2H), 6,48 - 6,42 (m, 1H), 5,22 (s, 2H), 4,27 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 3,85 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 3,78 (s, 3H), 3,77 (s, 3H). ESI-MS m / z calc. 378,16, encontrado 379,17 (M + 1).

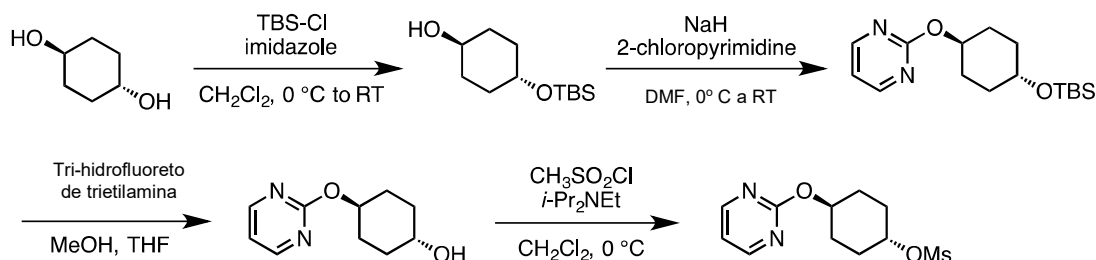
Etapa 2: 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona

[00491] A uma solução de 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-[(4-metoxifenil) metóxi]-1-metil-quinoxalin-2-ona (1,81 g, 4,783 mmol) em diclorometano (20 mL) foi adicionado ácido trifluoroacético (5,0 mL, 64,90 mmol). A solução reacional resultante foi agitada durante 2 horas e concentrada. O resíduo bruto foi particionado entre etil acetato e bicarbonato de sódio aquoso saturado. As camadas foram separadas, e a fase aquosa extraída com etil acetato. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução salina, secos (MgSO₄), filtrados e concentrados. Diclorometano foi adicionado, resultando na formação de um precipitado marrom, que foi coletado por filtração a vácuo para

fornecer 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona (1,10 g, 82% de rendimento). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,40 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,32 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 6,26 (dp, $J = 3,1, 1,5$ Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,24 (q, $J = 2,8$ Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,83 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H), 2,48 - 2,40 (m, 2H). ESI-MS m/z calc. 258,10, encontrado 259,16 ($M + 1$).

Seção II: Preparação dos Intermediários Mesilato

[00492] São descritos na Seção II os procedimentos sintéticos para a preparação de intermediários mesilato. Esses intermediários são utilizados, juntamente com a seleção apropriada do intermediário 8-hidróxi-1-metil-2-(2-cloropirimidin-2-ilóxi)ciclo-hexano-1-ona (Seção I), para preparar compostos na Tabela A, utilizando os métodos descritos na Seção III.



(1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilóxi)ciclo-hexil metanossulfonato

Etapa 1: (1,4-trans)-4-((terc-butildimetilsilil)óxi)ciclo-hexan-1-ol

[00493] A uma solução de (1,4-trans)-ciclo-hexano-1,4-diol (70 g, 602,6 mmol) e imidazol (130 g, 1,910 mol) em diclorometano (1,5 L) foi adicionado terc-butil-cloro-dimetil-silano (100 g, 663,5 mmol) em uma porção. A mistura reacional resultante foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada durante 24 h, momento em que a análise por TLC revelou mistura de material de partida, produto desejado, e produto de bis-adição. A mistura reacional foi vertida em água (300 mL). A camada orgânica foi separada, e a camada aquosa foi extraída com diclorometano (100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com água (100 mL) e salmoura (100 mL), secos (Na_2SO_4), filtrados e concentrados sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi puri-

ficado por cromatografia em sílica gel (coluna de 800 g de sílica gel, gradiente linear de 0-50% de etil acetato em heptano) para fornecer (1,4-trans)-4-[terc-butil(dimetil)silil]oxiciclo-hexanol (58 g, 41%) como um sólido branco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4,44 (d, J = 4,1 Hz, 1H), 3,69 - 3,50 (m, 1H), 3,48 - 3,35 (m, 1H), 1,84 - 1,60 (m, 4H), 1,37 - 1,09 (m, 4H), 0,84 (s, 9H), 0,02 (s, 6H).

Etapa 2: 2-(((1,4-trans)-4-((terc-butildimetilsilil)óxi)ciclo-hexil) óxi) pirimidina

[00494] A uma solução a 2° C de (1,4-trans)-4-[terc-butil(dimetil)silil]oxiciclo-hexanol (13,7 g, 58,86 mmol) e 2-cloropirimidina (9 g, 74,65 mmol) em N,N-dimetilformamida (100 mL) foi adicionado hidreto de sódio (5 g de suspensão a 60% em peso em óleo mineral, 125,0 mmol) em uma porção. A mistura reacional resultante foi deixada aquecer até a temperatura ambiente durante 30 minutos, e a agitação foi continuada por mais 10 horas. A mistura reacional foi vertida em água gelada (400 mL), resultando em precipitação de um sólido castanho. O sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água (3 × 100 mL) e seco em vácuo a 50° C por 16 h para fornecer (1,4-trans)-terc-butil-dimetil-(4-pirimidina)-2-iloxiciclo-hexóxi)silano (18,8 g, 95% de pureza, 98% de rendimento), que foi utilizado sem purificação adicional. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,57 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 7,08 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,04 - 4,80 (m, 1H), 3,90 - 3,68 (m, 1H), 2,11 - 1,95 (m, 2H), 1,93 - 1,76 (m, 2H), 1,64 - 1,47 (m, 2H), 1,46 - 1,30 (m, 2H), 0,87 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

Etapa 3: (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilóxi)ciclo-hexan-1-ol

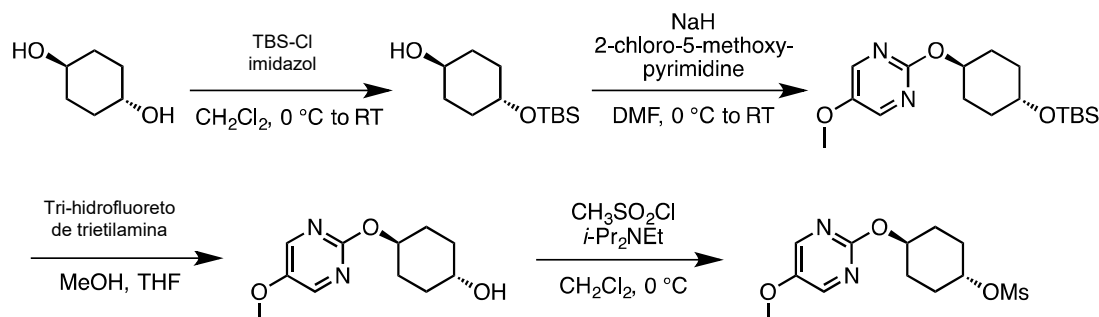
[00495] A uma solução de (1,4-trans)-terc-butil-dimetil-(4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexóxi)silano (26 g, 83,44 mmol) em uma mistura de tetra-hidrofurano (150 mL) e metanol (6 mL) foi adicionado tri-hidrofluoreto de trietilamina (40 g, 248,1 mmol). A mistura reacional resultante foi agitada em temperatura ambiente por 24 horas. A mistura reacional foi

resfriada a 0° C com um banho de gelo, e solução aquosa de hidróxido de amônio (30 g de 30% em peso, 256,8 mmol) foi adicionada, seguida de água (100 mL) e etil acetato (200 mL). A camada orgânica foi separada, e a camada aquosa foi adicionalmente extraída com etil acetato (100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com água (100 mL) e salmoura (100 mL), secos (Na₂SO₄), filtrados e concentrados sob pressão reduzida para fornecer (1,4-trans)-4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexanol (16,2 g, 99%) como um óleo viscoso amarelo pálido. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,48 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 6,89 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,09 - 4,87 (m, 1H), 3,91 - 3,62 (m, 1H), 2,29 - 2,10 (m, 2H), 2,10 - 1,95 (m, 2H), 1,68 - 1,36 (m, 4H).

Etapa 4: (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilóxi)ciclo-hexil metanossulfonato

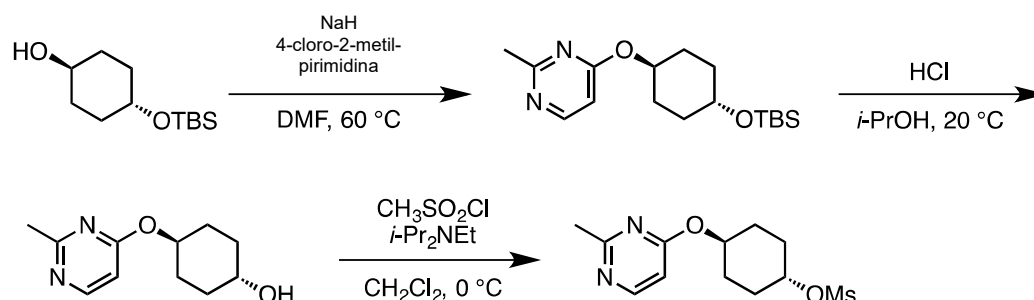
[00496] A uma solução a 0° C de (1,4-trans)-4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexanol (16,2 g, 82,6 mmol) e diisopropiletilamina (40 mL, 229,6 mmol) em diclorometano foi adicionada uma solução de metanossulfonil cloreto (8 mL, 103,4 mmol) em diclorometano (50 mL) por gotejamento ao longo de 25 minutos. A mistura reacional resultante foi agitada durante 30 minutos a 0° C. A mistura reacional foi resfriada através da adição de bicarbonato de sódio aquoso saturado (100 mL). A camada orgânica foi separada, e a camada aquosa foi adicionalmente extraída com diclorometano (100 mL). Os orgânicos combinados foram lavados com bicarbonato de sódio aquoso saturado, secos (Na₂SO₄), filtrados e concentrados sob pressão reduzida. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (coluna de ouro Isco de 330 g, gradiente linear de 0-50% de etil acetato / diclorometano) para fornecer (1,4-trans)-(4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexil) metanossulfonato (19,4 g, 85% de rendimento) como um sólido branco. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,49 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 6,91 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,25 - 5,02 (m, 1H), 4,98 - 4,77 (m, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,33 - 2,04 (m, 4H), 1,95 - 1,72 (m, 4H).

ESI-MS m/z calc. 272,32, encontrado 273,07 ($M + 1$).



(1,4-trans)-4-((5-metoxipirimidin-2-il)óxi)ciclo-hexil metanossulfonato

[00497] Preparado pela mesma sequência sintética de quatro etapas descrita acima para (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilóxi) ciclo-hexil metanossulfonato. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,17 (s, 2H), 5,13 - 4,95 (m, 1H), 4,94 - 4,73 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,02 (s, 3H), 2,37 - 1,99 (m, 4H), 1,94 - 1,68 (m, 4H).



(1,4-trans)-4-((2-metilpirimidin-4-il)óxi)ciclo-hexil metanossulfonato

Etapas 1: 4-(((1,4-trans)-4-((terc-butildimetilsilil)óxi)ciclo-hexil) óxi)-2-metilpirimidina

[00498] A uma solução a 2° C de (1,4-trans) -ciclo-hexano-1,4-diol (2 g, 17,05 mmol) e 4-cloro-2-metil-pirimidina (1,5 g, 11,67 mmol) em N,N -dimetilformamida (10 mL) foi adicionado hidreto de sódio (950 mg de suspensão a 60% em peso em óleo mineral, 23,75 mmol) em uma porção. O banho de resfriamento foi removido, e a mistura reacional foi aquecida a 60° C por 2 horas. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e vertida em água gelada (60 mL), resultando

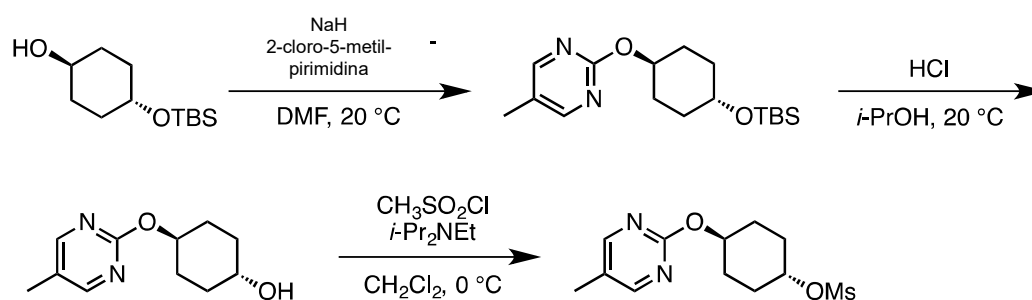
na formação de um precipitado castanho. O sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água (2 x 10 mL) e seco em vácuo a 60° C por 14 h para fornecer o bis-aducto indesejado, 2-metil-4-[4-(2-metilpirimidin-4-il) oxíciclo-hexóxi] pirimidina (1,1 g, 31%). O filtrado a partir da filtração a vácuo foi extraído com 2-metil-tetra-hidrofurano (4 x 60 mL) e os filtrados combinados foram secos (Na₂SO₄), filtrados e concentrados sob pressão reduzida para fornecer um óleo amarelo que foi purificado por cromatografia em sílica gel (gradiente linear de 0-100% de etil acetato / heptano) para fornecer o produto desejado, (1,4-trans)-4-(2-metilpirimidin-4-il) oxíciclo-hexanol (1,23 g, 95% de pureza, 48% de rendimento), como um sólido branco. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 8,39 - 8,18 (m, 1H), 6,76 - 6,38 (m, 1H), 5,24 - 5,02 (m, 1H), 3,81 - 3,62 (m, 1H), 3,54 (s, 1H), 2,66 - 2,39 (m, 3H), 2,26 - 1,80 (m, 4H), 1,69 - 1,15 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 208,26, encontrado 209,13 (M + 1).

Etapas 2:

[00499] Uma solução de terc-butil-dimetil- [4-(2-metilpirimidin-4-il) oxíciclo-hexóxi] silano (17,82 g, 54,70 mmol) em isopropil álcool (225 mL) foi tratada com ácido clorídrico concentrado (16 mL de solução a 12 M, 192,0 mmol). A mistura reacional resultante foi agitada durante 2 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi azeotropado com etil acetato (2 x 200 mL) para fornecer um sólido castanho-amarelado. O resíduo bruto foi ainda purificado por trituração com metil terc-butil éter (100 mL) e seco em vácuo a 50° C por 14 h para fornecer (1,4-trans)-4-(2-metilpirimidin-4-il)oxíciclohexanol (11,57 g, 98%) como um sólido castanho, que foi utilizado sem purificação adicional. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,62 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 7,07 (d, J = 6,6 Hz, 1H), 5,30 - 4,95 (m, 1H), 3,64 - 3,42 (m, 1H), 2,66 (s, 3H), 2,17 - 1,95 (m, 2H), 1,95 - 1,75 (m, 2H), 1,65 - 1,43 (m, 2H), 1,43 - 1,22 (m, 2H).

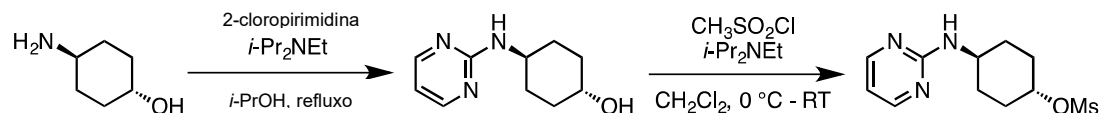
Etapa 3: (1,4-trans)-4-((2-metilpirimidin-4-il)óxi)ciclo-hexil metanossulfonato

[00500] A formação de mesilato foi realizada de acordo com o procedimento descrito acima para a preparação de (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilóxi) ciclo-hexil metanossulfonato. (1,4-trans)-4-(2-metilpirimidin-4-il) oxíciclohexanol foi usado como material de partida para fornecer (1,4-trans)-4-((2-metilpirimidin-4-il)óxi)ciclohexil metanossulfonato (85% de rendimento) como um sólido castanho. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 6,47 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 5,35 - 5,13 (m, 1H), 5,00 - 4,75 (m, 1H), 3,04 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 2,28 - 2,03 (m, 4H), 1,96 - 1,64 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 286,35, encontrado 287,07 (M + 1).



(1,4-trans)-4-((5-metilpirimidin-2-il) óxi) ciclo-hexil metanossulfonato

[00501] Preparado através do esquema sintético mostrado acima, usando as condições de reação descritas anteriormente nesta seção. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (s, 2H), 5,17 - 4,99 (m, 1H), 4,97 - 4,74 (m, 1H), 3,02 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 2,20 - 2,01 (m, 4H), 1,94 - 1,71 (m, 4H). ESI-MS m / z calc. 286,35, encontrado 287,16 (M + 1).



(1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil metanossulfonato

Etapa 1: (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexan-1-ol

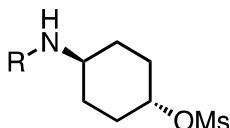
[00502] 2-cloropirimidina (70,30 g, 613,8 mmol) e trans-1,4-aminociclo-hexanol (71,77 g, 604,5 mmol) foram dissolvidos em iso-

propanol (400 mL). N,N-diisopropiletilamina foi adicionado (120 mL, 689 mmol), e a solução resultante foi aquecida ao refluxo durante a noite. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e o sólido que permaneceu foi suspenso em diclorometano e filtrado através de um tampão de sílica gel. O tampão de sílica foi eluído primeiro com diclorometano para eluir o material de partida residual, depois com etil acetato para eluir o produto desejado. O filtrado a partir da eluição de etil acetato foi evaporado sob pressão reduzida para fornecer (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexan-1-ol como um sólido branco. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 6,50 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,16 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 3,95 - 3,54 (m, 2H), 2,25 - 1,91 (m, 5H), 1,60 - 1,13 (m, 4H).

Etapa 2: (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil metanossulfonato

[00503] A uma suspensão a 0° C de (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexan-1-ol (52 g, 55,53 mmol) em diclorometano (727 mL) foi adicionada diisopropiletilamina (90 mL, 516,7 mmol). Cloreto de metanossulfonil (35 mL, 452,2 mmol) foi adicionado via seringa a uma taxa que permitiu que a temperatura interna permanecesse em 20° C ou abaixo. A reação foi agitada por mais 1 hora, diluída com diclorometano e lavada com bicarbonato de sódio aquoso saturado. A camada orgânica foi seca (MgSO₄) e filtrada através de um pequeno tampão de sílica gel. O tampão foi eluído com 20% de etil acetato / diclorometano e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para fornecer um sólido castanho. O sólido foi dissolvido em uma quantidade mínima de diclorometano. Foi adicionado pentano até o produto começar a cristalizar. A mistura foi resfriada em um banho de gelo seco / acetona, e o sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com pentano e seco sob vácuo para fornecer (1,4-trans)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil metanossulfonato (59,72 g, 82% de rendimento)

como um sólido castanho claro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8,27 (d, J = 2H), 6,54 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 5,13 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,69 (tt, J = 10,5, 4,0 Hz, 1H), 3,98 - 3,73 (m, 1H), 3,03 (s, 3H), 2,21 (dd, J = 9,3, 4,2 Hz, 4H), 1,91 - 1,67 (m, 2H), 1,51 - 1,25 (m, 2H).

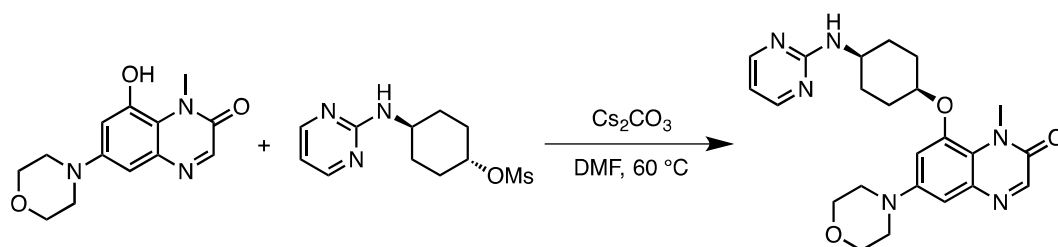


[00504] As vias sintéticas para acessar outros mesilatos do tipo mostrado acima, em que R é igual a um anel aromático substituído ou não substituído, um anel heteroaromático substituído ou não substituído, ou um carbamato, foram relatadas anteriormente (US 20140275059 A1) e, portanto, não serão descritas aqui.

Seção III: Compostos Preparados Usando o Deslocamento de Mesilato como Etapa Final

[00505] Os compostos descritos na Seção III foram preparados a partir da seleção apropriada de 8-hidróxi-quinoxalinona (descrita na Seção I) e intermediário mesilato (descrito na Seção II) usando os métodos abaixo. Os dados analíticos para os compostos preparados pelos métodos na Seção III são fornecidos na Tabela A.

Método A-A

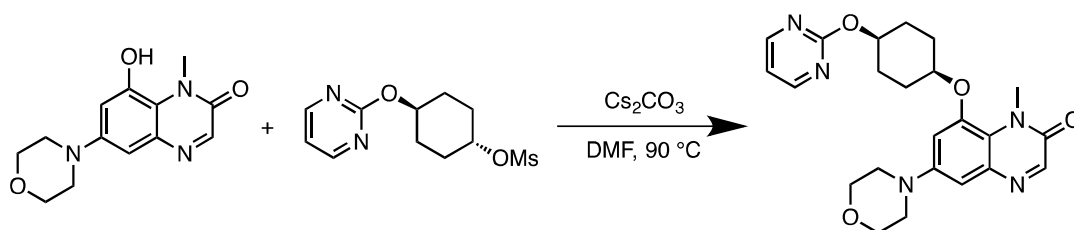


1-metil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00506] A uma solução de 8-hidróxi-1-metil-6-morfolino-quinoxalin-2(1H)-ona (7,65 g, 15,63 mmol) em N, N-dimetilformamida (100 mL) foi adicionado trans-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil metanossulfonato (30,34 g, 111,8 mmol) e carbonato de céσιο (35,64 g, 109,4 mmol). A

mistura foi aquecida a 60° C durante a noite. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e filtrada sobre Celite. O tampão de Celite foi lavado com N,N-dimetilformamida, e o filtrado foi evaporado in vácuo para fornecer um óleo de cor escura que se solidificou sob alto vácuo. O sólido foi dissolvido em diclorometano, filtrado sobre um tampão de sílica gel e eluído com 5% de metanol / etil acetato. O filtrado foi evaporado para fornecer um sólido amarelo acastanhado. O sólido foi dissolvido em diclorometano e purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 330 g de sílica gel; isocrático 3% metanol / etil acetato) para fornecer um sólido amarelo brilhante. O sólido foi lavado com uma pequena quantidade de etil acetato que foi pré-resfriada em um banho de gelo seco / acetona, seguido de heptano. Finalmente, o material foi seco sob alto vácuo a 60° C para fornecer 1-metil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino) ciclohexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona.

Método A-B



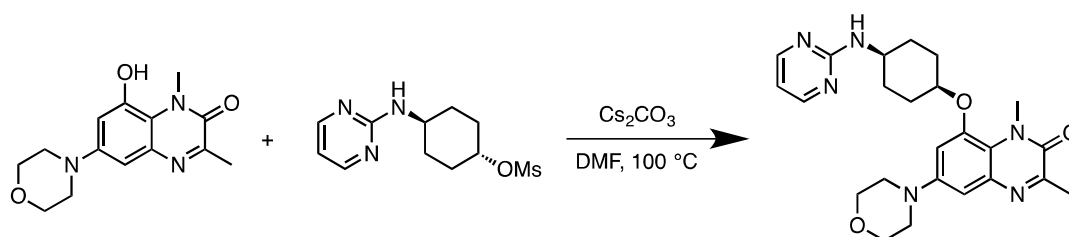
1-metil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilóxi)ciclohexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00507] A uma solução de 8-hidróxi-1-metil-6-morfolino-quinoxalin-2-ona (34,5 mg, 0,132 mmol) em N, N-dimetilformamida (690 µL) foi adicionado trans-(4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexil) metanossulfonato (68,0 mg, 0,247 mmol) e carbonato de céσιο (215 mg, 0,660 mmol). A mistura foi aquecida a 90° C durante 5 horas. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e particionada entre diclorometano e água. A fase orgânica foi coletada e evaporada. O resíduo bruto foi dissolvido em DMSO mínimo e purificado por HPLC preparatória em

C18 (acetonitrilo / água com modificador ácido trifluoroacético), e as frações relevantes foram combinadas e concentradas até a secura. O material assim obtido foi dissolvido em diclorometano e lavado com bicarbonato de sódio aquoso saturado. A fase orgânica foi coletada, seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada para fornecer 1-metil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilóxi)ciclo-hexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona (16,1 mg, 25% de rendimento).

[00508] Nota: As moléculas preparadas por este método também foram purificadas por cromatografia em sílica gel (metanol / diclorometano).

Método A-C



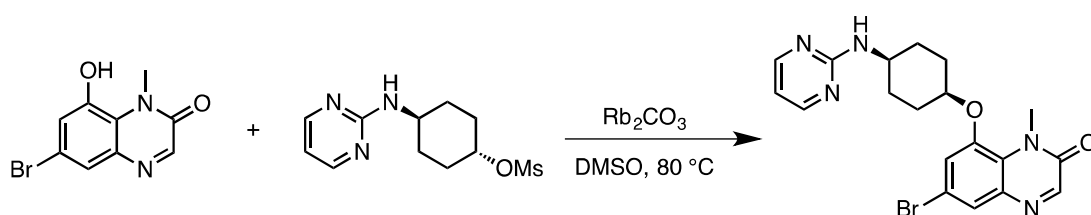
1,3-dimetil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00509] A uma mistura de 8-hidróxi-1,3-dimetil-6-morfolino-quinoxalin-2-ona (48,7 mg, 0,177 mmol) e carbonato de céσιο (572 mg, 1,756 mmol) em N, N-dimetilformamida (1,1 mL) foi adicionado (trans)-[4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil] metanossulfonato (147 mg, 0,542 mmol). A mistura resultante foi agitada a 100°C durante a noite. A reação foi resfriada até a temperatura ambiente e particionada entre metil terc-butil éter e água. As fases foram separadas, e a fase aquosa foi extraída com metil terc-butil éter. Os orgânicos combinados foram lavados com solução salina, secos (Na_2SO_4), filtrados e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 4 g de sílica gel usando gradiente linear de 0-10% de metanol / diclorometano; seguido de uma segunda purificação com sílica gel usando gradiente linear de 0-100% de etil acetato / heptano) para for-

necer 1,3-dimetil-6-morfolino-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil)óxi)-quinoxalin-2(1H)-ona (17,3 mg, 21% de rendimento).

[00510] Nota: As moléculas preparadas por esse método também foram purificadas por HPLC preparatória em fase reversa C18 (acetonitrilo / água com modificador ácido trifluoroacético ou hidróxido de amônio) ou cromatografia em sílica gel derivada de C18 em fase reversa (acetonitrilo / água com modificador ácido trifluoroacético).

Método A-D

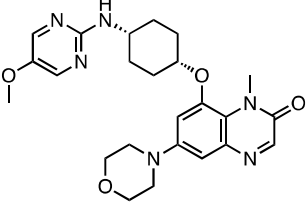
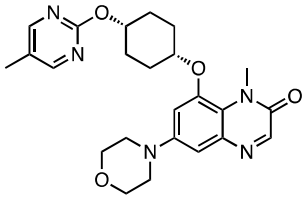
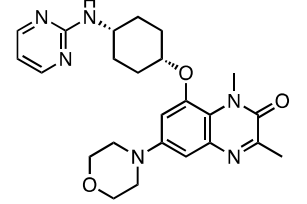
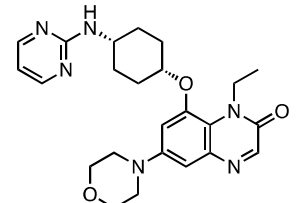


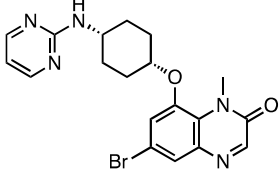
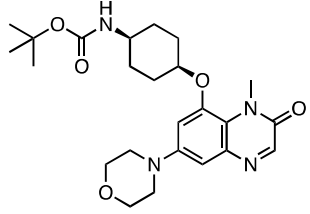
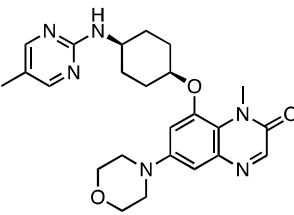
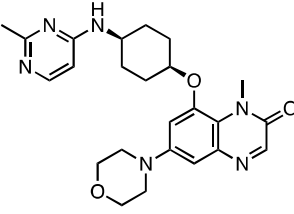
6-bromo-1-metil-8-[(1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil]quinoxalin-2-ona

[00511] A uma solução de 6-bromo-8-hidroxi-1-metil-quinoxalin-2-ona (954 mg, 3,740 mmol) e [4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil] metanossulfonato (3,1 g, 11,42 mmol) em dimetil sulfóxido (7,0 mL) foi adicionado carbonato de rubídio (2,49 g, 10,78 mmol). A mistura resultante foi agitada a 80°C durante a noite. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e particionada entre diclorometano e água. As fases foram separadas, e a fase aquosa extraída com diclorometano. Os orgânicos foram concentrados e secos durante a noite sob vácuo. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 80 g de sílica gel, gradiente linear de 0-5% de metanol / diclorometano) para fornecer 6-bromo-1-metil-8-[4-(pirimidin-2-ilamino)ciclohexil] quinoxalin-2-ona (700 mg, 42% de rendimento).

Tabela A. Compostos preparados usando deslocamento de mesilato como etapa final.

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
1		A-A	0,003	0,055	437,39	¹ H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,25 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 8,17 (s, 1H), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,53 (t, J = 4,7 Hz, 1H), 5,77 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,89 (s, 1H), 3,80 - 3,70 (m, 4H), 3,19 - 3,10 (m, 4H), 2,03 (dd, J = 12,2, 6,3 Hz, 2H), 1,81 - 1,55 (m, 6H), 1,18 (t, J = 7,1 Hz, 1H).
2		A-B	0,002	0,075	438,29	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,60 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,16 (s, 1H), 7,11 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 5,15 (m, 1H), 4,76 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,80 - 3,72 (m, 4H), 3,20 - 3,12 (m, 4H), 1,98 - 1,83 (m, 8H).
3		A-B	0,005	0,074	452,35	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,37 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,01 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,74 (dd, J = 5,9, 0,7 Hz, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,20 - 3,11 (m, 4H), 2,50 (s, 3H), 1,89 (m, 8H).
4		A-B	0,003	0,068	468,22	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,36 (s, 2H), 8,16 (s, 1H), 7,01 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 5,04 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,77 (m, 4H), 3,16 (m, 4H), 1,91 (m, 8H).

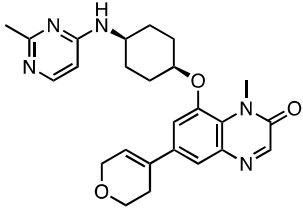
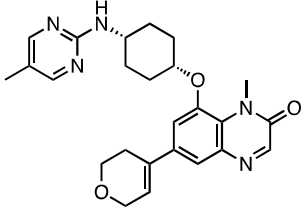
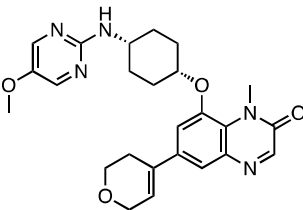
Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
5		A-B	< 0,001	0,028	467,28	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,16 (s, 1H), 8,10 (s, 2H), 6,96 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,87 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,82 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,73 (s, 3H), 3,17 - 3,11 (m, 4H), 2,02 (m, 2H), 1,68 (m, 6H).
6		A-B	0,003	0,075	452,28	1H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,43 (d, J = 0,5 Hz, 2H), 8,16 (s, 1H), 7,01 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 5,10 (s, 1H), 4,75 (s, 1H), 4,03 (dd, J = 14,2, 7,1 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,83 - 3,68 (m, 4H), 3,25 - 3,08 (m, 4H), 1,18 (s, 1H).
7		A-C	0,008	0,330	451,3	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,25 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,89 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,52 (t, J = 4,7 Hz, 1H), 4,81 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,87 (m, 1H), 3,76 (m, 4H), 3,14 (m, 4H), 2,40 (s, 3H), 2,01 (m, 2H), 1,68 (m, 6H).
8		A-C	0,015	> 1	451,29	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,26 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 7,17 - 7,10 (m, 2H), 6,91 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,54 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 4,87 (m, 1H), 4,48 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 3,79 (m, 5H), 3,23 (m, 4H), 2,03 (m, 2H), 1,73 (m, 6H), 1,41 (t, J = 7,0 Hz, 3H).

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
9		A-D	> 4	> 1	430,19	1H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,29 - 8,22 (m, 3H), 7,56 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,21 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,52 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 4,83 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,89 (m, 1H), 2,02 (m, 2H), 1,81 - 1,55 (m, 6H).
13		A-C	0,015	0,550	459,27	1H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,16 (s, 1H), 6,95 (m 2H), 6,81 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,40 (m, 1H), 3,14 (m, 4H), 1,95 (m, 2H), 1,72 - 1,47 (m, 6H), 1,38 (s, 9H).
14		A-A	< 0,001	0,097	450,29	1H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,13 (d, J = 14,1 Hz, 2H), 8,11 (s, 1H), 6,96 (d, J = 7,0 Hz, 2H), 6,81 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 4,81 (br s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,85 (br s, 1H), 3,80 - 3,68 (m, 4H), 3,23 - 3,06 (m, 4H), 1,69 (dt, J = 20,2, 10,1 Hz, 6H).
15		A-B	< 0,001	0,061	451,39	1H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,17 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,27 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 6,28 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,76 (m, 4H), 3,16 (m, 4H), 2,31 (s, 3H), 1,99 (m, 2H), 1,66 (m, 6H).

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
16		A-B	< 0,001	0,036	483,46	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,18 (s, 1H), 8,17 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 4,88 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,80 - 3,72 (m, 4H), 3,16 (m, 4H), 2,60 (qd, J = 7,5, 2,3 Hz, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,71 (m, 6H), 1,16 (t, J = 7,6 Hz, 3H).
19		A-B	0,004	0,175	493,41	
20		A-B	0,003		494,40	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,84 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,81 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,58 (d, J = 4,9 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 5,33 (m, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,88 (s, 3H), 3,81 - 3,72 (m, 4H), 3,21 - 3,12 (m, 4H), 2,82 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 2,02 - 1,84 (m, 8H).
21		A-B	0,006	0,760	417,33	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,16 (s, 1H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,77 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,79 - 3,72 (m, 4H), 3,52 (s, 3H), 3,47 (m, 1H), 3,18 - 3,11 (m, 4H), 2,02 - 1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 6H).

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
22		A-B	0,008	0,160	431,33	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,16 (s, 1H), 7,20 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 4,77 (m, 1H), 3,97 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,75 (m, 4H), 3,46 (m, 1H), 3,18 - 3,11 (m, 4H), 1,97 (m, 2H), 1,74 - 1,44 (m, 6H), 1,16 (t, J = 7,1 Hz, 3H).
23		A-C	0,003	0,097	480,31	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,35 (s, 2H), 8,15 (s, 1H), 6,76 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,69 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,10 - 4,99 (m, 1H), 4,87 - 4,67 (m, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,63 (d, J = 11,4 Hz, 2H), 3,45 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,30 (s, 20H), 2,11 - 1,82 (m, 8H).
24		A-C	0,003	0,074	464,33	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,43 (d, J = 0,9 Hz, 2H), 8,15 (s, 1H), 6,76 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,68 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,17 - 5,04 (m, 1H), 4,84 - 4,68 (m, 3H), 3,63 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,45 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,23 - 3,09 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,08 - 1,82 (m, 8H).
25		A-C	0,005	0,160	464,37	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,38 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,80 - 6,73 (m, 2H), 6,69 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 5,33 - 5,18 (m, 1H), 4,81 - 4,68 (m, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,63 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,45 (d, J = 11,5 Hz, 2H), 3,19 - 3,07 (m, 1H), 2,01 - 1,85 (m, 8H).

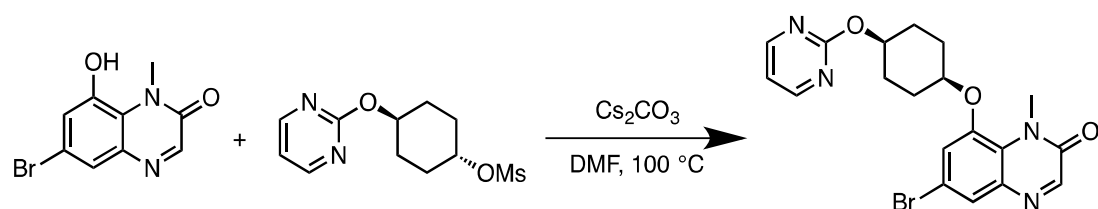
Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
28		A-B	0,002	0,028	493,32	¹ H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,17 (s, 1H), 6,94 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,85 - 6,78 (m, 2H), 4,84 (m, 1H), 4,52 (t, J = 9,1 Hz, 2H), 4,10 - 4,01 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,81 - 3,71 (m, 4H), 3,15 (m, 4H), 3,06 (t, J = 9,0 Hz, 2H), 2,30 (s, 3H), 2,05 (m, 2H), 1,71 (m, 6H).
30		A-C	0,004	0,187	449,34	¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,33 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,47 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,54 (d, J = 5,9, 0,6 Hz, 1H), 6,22 - 6,17 (m, 1H), 5,39 - 5,32 (m, 1H), 4,61 - 4,50 (m, 1H), 4,36 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,97 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,62 - 2,52 (m, 4H), 2,18 - 1,82 (m, 4H).
31		A-C	0,005	0,114	449,33	¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,36 (s, 2H), 8,30 (s, 1H), 7,48 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 6,26 - 6,16 (m, 1H), 5,28 - 5,12 (m, 1H), 4,63 - 4,49 (m, 1H), 4,39 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,99 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,64 - 2,54 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,25 - 2,08 (m, 3H), 2,08 - 1,85 (m, 3H).
32		A-C	0,005	0,52	465,36	¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,30 (s, 1H), 8,23 (s, 2H), 7,48 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,18 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 6,24 - 6,17 (m, 1H), 5,18 - 5,10 (m, 1H), 4,60 - 4,51 (m, 1H), 4,38 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,99 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 3,89 (s, 3H), 2,63 - 2,55 (m, 1H), 2,25 - 2,09 (m, 3H), 2,06 - 1,85 (m, 2H).

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
33		A-C	< 0,001	0,054	448,39	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,31 (s, 1H), 8,14 (d, J = 5,9 Hz, 1H), 7,49 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,24 - 6,17 (m, 2H), 5,01 - 4,83 (m, 1H), 4,73 - 4,64 (m, 1H), 4,38 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,05 (s, 3H), 3,99 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,63 - 2,55 (m, 1H), 2,52 (s, 3H), 2,22 - 2,09 (m, 1H), 2,07 - 1,87 (m, 3H), 1,84 - 1,67 (m, 1H).
34		A-C	< 0,001	0,028	448,39	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,31 (s, 1H), 8,16 (d, J = 0,8 Hz, 2H), 7,47 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,25 - 6,18 (m, 1H), 5,01 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 4,71 - 4,61 (m, 1H), 4,38 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,06 (s, 3H), 3,99 (t, J = 5,4 Hz, 3H), 2,63 - 2,54 (m, 2H), 2,20 - 2,07 (m, 4H), 2,07 - 1,87 (m, 3H), 1,84 - 1,66 (m, 2H).
35		A-C	< 0,001	0,031	464,29	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,31 (s, 1H), 8,09 (s, 2H), 7,47 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,25 - 6,17 (m, 1H), 4,94 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,38 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,06 (s, 3H), 4,03 - 3,89 (m, 3H), 3,83 (s, 3H), 2,63 - 2,54 (m, 1H), 2,20 - 2,07 (m, 1H), 2,07 - 1,83 (m, 3H), 1,81 - 1,69 (m, 1H).

Composto No.	Estrutura do Composto	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
36		A-C	< 0,001	0,073	480,31	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,34 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 8,32 (s, 1H), 7,49 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,26 - 6,18 (m, 1H), 5,00 - 4,87 (m, 1H), 4,38 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 4,08 (s, 3H), 3,99 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 2,74 (qd, J = 7,6, 2,3 Hz, 2H), 2,65 - 2,54 (m, 2H), 2,27 - 2,15 (m, 2H), 2,13 - 2,01 (m, 2H), 2,01 - 1,87 (m, 2H), 1,81 - 1,65 (m, 2H), 1,29 (t, J = 7,6 Hz, 3H).

Seção IV: Preparação dos Intermediários Bromo-Quinoxalinona

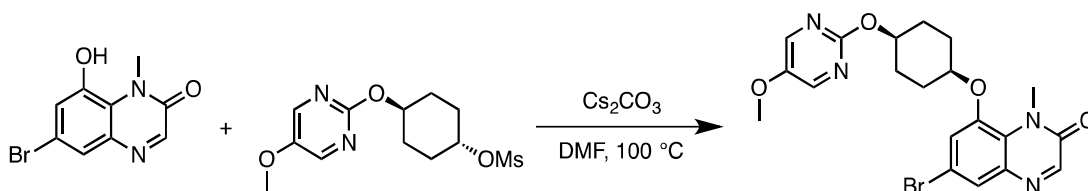
[00512] A Seção IV contém procedimentos sintéticos para a preparação de intermediários funcionalizados 6-bromo-1-metilquinoxalin-2(1H)-ona que não são descritos em outras partes desta patente. Esses intermediários foram utilizados, juntamente com a seleção apropriada do parceiro de acoplamento amina ou éster borônico, para preparar os compostos na Tabela B.



6-bromo-1-metil-8-(4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexóxi) quinoxalin-2-ona

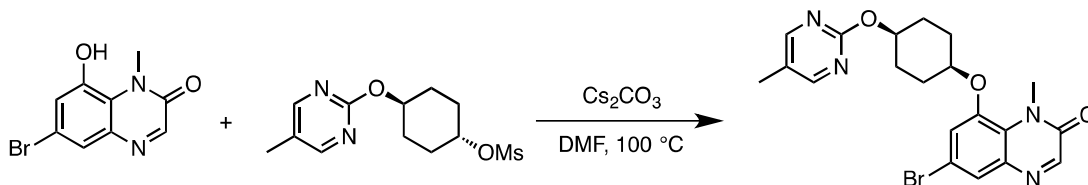
[00513] Uma mistura de 6-bromo-8-hidróxi-1-metil-quinoxalin-2-ona (299 mg, 1,172 mmol), (4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexil) metanossulfonato (517 mg, 1,899 mmol), carbonato de céσιο (501 mg, 1,538 mmol) e N,N-dimetilformamida (6,0 mL) foi aquecida a 100° C por 4 horas. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e filtrada. O filtrado foi purificado por cromatografia de fase reversa (cartucho de sílica gel derivado de Isco RediSep Rf C18 de 100 g; gradiente linear

de 25-60% de acetonitrilo / água com modificador de ácido trifluoroacético). As frações contendo produto foram particionadas entre etil acetato e bicarbonato de sódio saturado. As fases foram separadas, e a fase aquosa extraída com etil acetato. Os orgânicos combinados foram lavados com solução salina, secos (MgSO_4), filtrados e concentrados para fornecer 6-bromo-1-metil-8-(4-pirimidin-2-iloxiciclohexóxi)quinoxalin-2-ona (320,6 mg, rendimento de 63%) ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8,60 (d, $J = 4,8$ Hz, 2H), 8,25 (s, 1H), 7,58 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 2,2$ Hz), 1H), 7,12 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,22 - 5,09 (m, 2H), 4,85 - 4,72 (m, 2H), 3,88 (s, 3H), 2,03 - 1,85 (m, 8H). ESI-MS m/z calc. 430,06, encontrado 431,16 ($M + 1$).



6-bromo-8-(((1,4-cis)-4-((5-metoxipirimidin-2-il)óxi)ciclo-hexil)óxi)-1-metilquinox-alin-2(1H)-ona

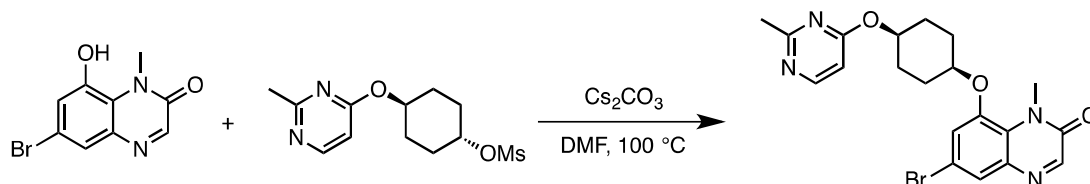
[00514] Preparado por procedimentos análogos ao descrito acima para 6-bromo-1-metil-8-((1,4-cis)-4-pirimidin-2-iloxiciclohexóxi)quinoxalin-2-ona. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,30 (s, 1H), 8,22 (s, 2H), 7,63 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,19 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 5,20 - 5,10 (m, 1H), 4,58 - 4,47 (m, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 2,26 - 1,85 (m, 8H). ESI-MS m/z calc. 460,07, encontrado 461,13 ($M + 1$).



6-bromo-1-metil-8-(((1,4-cis)-4-((5-metilpirimidin-2-il) óxi)ciclo-hexil)óxi)quinox-alin-2(1H)-ona

[00515] Preparado através de um procedimento análogo ao descrito acima para 6-bromo-1-metil-8-((1,4-cis)-4-pirimidin-2-iloxiciclohexóxi)

quinoxalin-2-ona. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,21 (d, $J = 0,9$ Hz, 2H), 8,14 (s, 1H), 7,48 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 5,13 - 4,99 (m, 1H), 4,43 - 4,30 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,09 - 1,93 (m, 4H), 1,93 - 1,71 (m, 4H)) ESI-MS m/z calc. 444,08, encontrado 445,11 ($M + 1$).



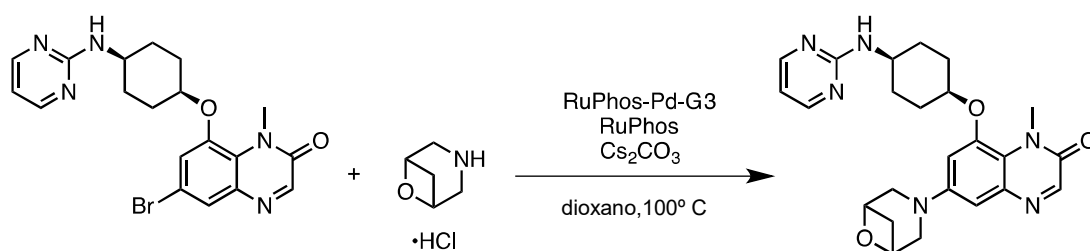
6-bromo-1-metil-8-(((1,4-cis)-4-((2-metilpirimidin-4-il)óxi)ciclohexil) óxi)quinox-alin-2(1H)-ona

[00516] Preparado por um procedimento análogo ao descrito acima para 6-bromo-1-metil-8-((1,4-cis)-4-pirimidin-2-iloxiciclohexóxi)quinoxalin-2-ona. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,36 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 8,31 (s, 1H), 7,65 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,29 (s, 8H), 6,57 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 5,43 - 5,35 (m, 1H), 4,61 - 4,51 (m, 1H), 4,03 (s, 3H), 2,62 (s, 3H), 2,18 - 1,86 (m, 8H). ESI-MS m/z calc. 444,08, encontrado 445,11 ($M + 1$).

Seção V: Compostos Preparados Usando o Acoplamento de Buchwald ou o Acoplamento de Suzuki como Etapa Final

[00517] Os compostos descritos nesta seção foram preparados a partir da escolha apropriada de 6-bromo-1-metilquinoxalin-2(1H)-ona funcionalizada (descrita na Seção IV) e amina (no caso de acoplamentos de Buchwald) ou éster borônico (no caso de Acoplamentos de Suzuki) usando os métodos descritos abaixo. Os dados analíticos para os compostos nesta seção são fornecidos na Tabela B.

Método B-A

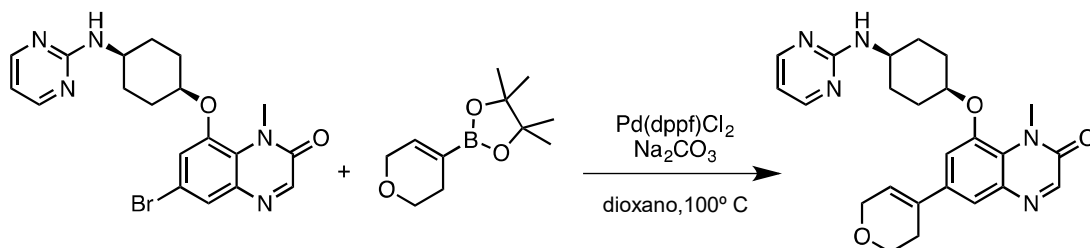


6-(6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptan-3-yl)-1-metil-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)-ciclo-hexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00518] Uma mistura de 6-bromo-1-metil-8-[4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexilóxi] quinoxalin-2-ona (74 mg, 0,167 mmol), 6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptano (sal cloridrato; 61 mg, 0,450 mmol), carbonato de céσιο (263 mg, 0,807 mmol), RuPhos-G3-Palladaciclo (30 mg, 0,036 mmol), RuPhos (17 mg, 0,036 mmol) e dioxano (700 μ L) foi agitada a 100° C durante a noite. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e particionada entre etil acetato e água. As fases foram separadas, e a camada aquosa foi ainda extraída com etil acetato. Os orgânicos combinados foram secos (Na_2SO_4), filtrados e concentrados. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 12 g de sílica gel, gradiente linear de 0-5% de metanol / diclorometano) para fornecer 6-(6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptan-3-yl)-1-metil-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona (17,0 mg, 22% de rendimento).

[00519] Nota: As moléculas preparadas por esse método também foram purificadas por HPLC preparatória em C18 (acetonitrilo / água com modificador ácido trifluoroacético ou hidróxido de amônio).

Método B-B

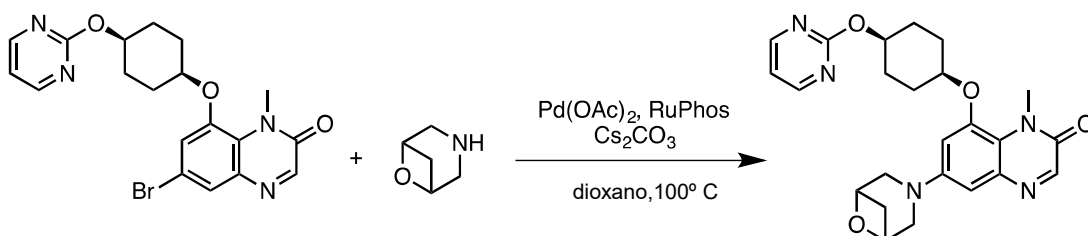


6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-yl)-1-metil-8-((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-

ilamino)ciclo-hexil)-óxi)quinoxalin-2(1H)-ona

[00520] A uma mistura de 6-bromo-1-metil-8- [4-(pirimidin-2-ilamino) ciclo-hexóxi] quinoxalin-2-ona (62 mg, 0,140 mmol), 2-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (44 mg, 0,209 mmol), carbonato de sódio (207 µL de solução aquosa a 2M, 0,414 mmol) e dioxano (1,1 mL) foi adicionado [1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno] - dicloropaládio (II) (complexo de diclorometano; 10 mg, 0,014 mmol). A mistura reacional resultante foi agitada a 100° C por 2 horas. A mistura reacional foi filtrada, e o filtrado foi diretamente purificado por HPLC preparatória em C18 (acetonitrilo / água com modificador ácido trifluoroacético), e as frações relevantes foram combinadas e concentradas até a secura. O material assim obtido foi dissolvido em diclorometano e lavado com bicarbonato de sódio aquoso saturado. A fase orgânica foi coletada, seca (Na₂SO₄), filtrada e concentrada e evaporada para fornecer 6-(3,6-di-hidro-2H-piran-4-il)-1-metil-8-(((1,4-cis)-4-(pirimidin-2-ilamino)ciclo-hexil)óxi)quinoxalin-2(1H)-ona (30 mg, 47% de rendimento).

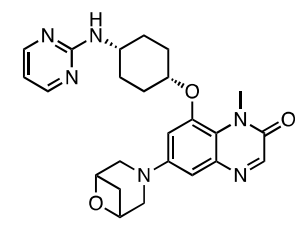
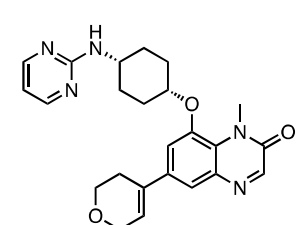
[00521] Nota: As moléculas preparadas por este método também foram purificadas por cromatografia em sílica gel (etil acetato / diclorometano).

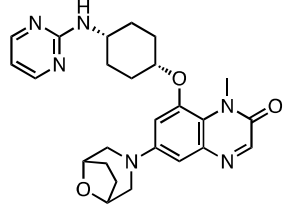
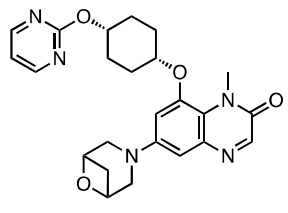
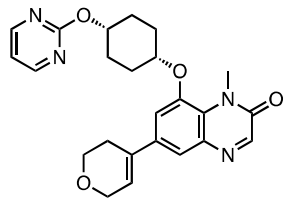
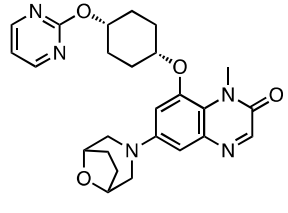
[00522] Método B-C**1-metil-6-(6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptan-3-il)-8-((1,4-cis)-4-pirimidin-2-ilóxi-ciclo-hexóxi)-quinoxalin-2-ona**

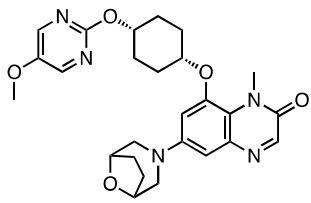
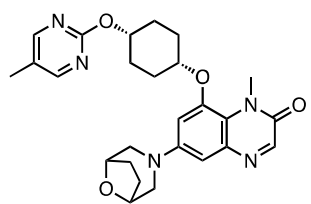
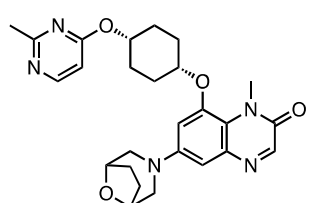
[00523] Uma suspensão de 6-bromo-1-metil-8-(4-pirimidin-2-iloxi)ciclo-hexóxi) quinoxalin-2-ona (80 mg, 0,186 mmol) e carbonato de céσιο (195 mg, 0,599 mmol) em dioxano (1,0 mL) foi desgaseificada

borbulhando-se gás nitrogênio através da mistura por 5 minutos. Foram adicionados RuPhos (9 mg, 0,019 mmol) e acetato de paládio (II) (2 mg, 0,009 mmol) e a reação foi desgaseificada por mais 5 minutos. Finalmente, foi adicionado 6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptano (31 mg, 0,313 mmol), e o frasco foi selado e aquecido a 100° C por 3 horas. A mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente, filtrada e concentrada. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (cartucho de 12 g de sílica gel usando etil acetato isocrático) para fornecer 1-metil-6- (6-oxa-3-azabicyclo [3.1.1] heptan-3-il)-8-((1,4-cis)-4-pirimidin-2-iloxiciclo-hexóxi) quinoxalin-2-ona (36,5 mg, 43% de rendimento).

Tabela B. Compostos preparados usando o acoplamento de Buchwald como etapa final.

Composto No.	Compostos	Método	DNA-PK Ki	pDNA-PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
10		B-A	< 0,001	0,510	449,39	¹ H RMN (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,25 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 8,16 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,72 (m, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,52 (t, J = 4,7 Hz, 1H), 4,83 (m, 1H), 4,73 (d, J = 6,3 Hz, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,88 (m, 1H), 3,62 (m, 2H), 3,45 (m, 2H), 3,13 (m, 1H), 2,08 (m, 2H), 1,94 (m, 1H), 1,69 (m, 6H).
11		B-B	< 0,001		434,29	¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) δ 8,31 - 8,27 (m, 3H), 7,45 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,14 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,55 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 6,20 (m, 1H), 5,19 (m, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 4,04 (s, 3H), 3,97 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,18 - 2,05 (m, 2H), 2,05 - 1,86 (m, 4H), 1,77 (m, 2H).

Compos- to No.	Compostos	Método	DNA- PK Ki	pDNA- PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
12		B-A	< 0,001	0,250	463,37	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,25 (d, J = 4,7 Hz, 2H), 8,15 (s, 1H), 7,25 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,53 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,44 (m, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,88 (m, 1H), 3,47 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,08 - 2,00 (m, 2H), 1,85 (m, 4H), 1,78 - 1,60 (m, 6H).
26		B-C	0,002	0,120	450,37	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,60 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,15 (s, 1H), 7,11 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,69 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,20 - 5,11 (m, 1H), 4,84 - 4,70 (m, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,63 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,46 (d, J = 11,3 Hz, 2H), 3,21 - 3,07 (m, 1H), 2,23 - 1,67 (m, 8H).
27		B-B	< 0,001	0,085	435,38	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,60 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,21 (s, 1H), 7,44 - 7,37 (m, 2H), 7,11 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 6,47 - 6,40 (m, 1H), 5,20 - 5,10 (m, 1H), 4,86 - 4,76 (m, 1H), 4,26 (q, J = 2,8 Hz, 2H), 3,85 (t, J = 5,5 Hz, 2H), 2,08 - 1,82 (m, 9H).
29		B-C	0,002	0,056	464,29	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,54 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 8,26 (s, 1H), 6,96 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 6,85 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,68 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 5,31 - 5,20 (m, 1H), 4,61 - 4,52 (m, 2H), 4,52 - 4,40 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,34 (d, J = 11,4 Hz, 1H), 3,08 (dd, J = 11,3, 2,6 Hz, 2H), 2,27 - 2,11 (m, 4H), 2,11 - 1,85 (m, 6H).

Compos- to No.	Compostos	Método	DNA- PK Ki	pDNA- PK IC ₅₀ (A459)	ESMS (M+H)	¹ H RMN
40		B-C	0,004	0,050	494,31	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,26 (s, 1H), 8,22 (s, 2H), 6,85 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,14 - 5,07 (m, 1H), 4,60 - 4,52 (m, 2H), 4,51 - 4,53 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,38 - 3,30 (m, 2H), 3,08 (dd, J = 11,3, 2,6 Hz, 2H), 2,25 - 1,82 (m, 8H).
38		B-C	0,002	0,065	478,24	1H RMN (400 MHz, CDCl ₃) δ 8,36 (d, J = 0,8 Hz, 2H), 8,26 (s, 1H), 6,87 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,74 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 5,25 - 5,12 (m, 1H), 4,62 - 4,52 (m, 2H), 4,52 - 4,41 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,35 (d, J = 11,1 Hz, 2H), 3,10 (dd, J = 11,3, 2,6 Hz, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,24 - 1,85 (m, 8H).
39		B-C	0,003	0,058	478,24	1H RMN (400 MHz, DMSO-d ₆) δ 8,38 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 6,89 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,79 - 6,71 (m, 2H), 5,31 - 5,22 (m, 1H), 4,80 - 4,68 (m, 1H), 4,51 - 4,40 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,49 (d, J = 11,4 Hz, 2H), 3,31 (s, 3H), 2,50 (s, 12H), 1,96 - 1,78 (m, 12H).

Exemplos de Edição de Genes

[00524] Os exemplos a seguir, incluindo os experimentos realizados e os resultados alcançados, são fornecidos apenas para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como limitantes da presente descrição.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Métodos:

Células e Cultura

[00525] As células epiteliais brônquicas (BECs) foram derivadas de doadores humanos diagnosticados com fibrose cística com um genótipo CFTR $\Delta F508 / \Delta F508$.

[00526] As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) foram derivadas de fibroblastos dérmicos humanos após transdução viral com os fatores de reprogramação de Yamanaka, Oct4, Sox2, KLF4 e c-Myc. As iPSCs derivadas foram capazes de se diferenciar em 3 camadas germinativas e continham um cariótipo normal com 23 pares de cromossomos.

[00527] As células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) $CD34^+$ de sangue periférico mobilizado humano primário (mPB) foram adquiridas a partir de Hemacare ou AllCells. As células foram descongeladas, lavadas e ressuspensas em meio completo composto de meio livre de soro CellGro SCGM (CellGenix) e suplementadas com mistura de citocinas (300 ng / mL de SCF, 300 ng / mL de Flt3L, 100 ng / mL de Flt3L, 100 ng / mL de TPO, 60 ng / mL de IL-3) a uma densidade de 1 a 3×10^5 células por mL e incubadas a 37° C / incubadora de CO₂ a 5% por 48 horas antes da eletroporação.

Inibidores de DNA-PK:

[00528] O composto 1 inibidor de DNA-PK foi usado para os exemplos de edição de genes. As soluções estoque de 10 mM foram preparadas usando DMSO anidro e armazenadas a -80° C.

Eletroporação:

[00529] Os sgRNAs sintéticos utilizados foram adquiridos por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) purificados a partir de Synthego e continham nucleotídeos quimicamente modificados (2'-O-metil 3'-fosforotioato) nas três posições terminais nas posições 5' e 3'. As sequências dos sgRNAs com os nucleotídeos modificados estão sublinhadas da seguinte forma:

sAVN1 de AAVS1:

5'ACCCCACAGUGGGGCCACUAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA
GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC
GAGUCGGUGCUUUU 3' (SEQ ID NO: 3).

sgRNA de NAV1.7:

5'GGCUGAGCGUCCAUCAACCAGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAA
GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACC
GAGUCGGUGCUUUU 3' (SEQ ID NO: 4)

[00530] O mRNA de Cas9 foi adquirido a partir de TriLink Biotechnologies (L-7206). O mRNA de Cas9 expressa uma versão da proteína Cas3 de *Streptococcus pyogenes* SF370 (proteína associada ao CRISPR 9) com sinais de localização nuclear. O mRNA de spCas9 também contém uma estrutura CAP1, um sinal poliadenilado e uridinas modificadas para fornecer níveis ótimos de expressão em células de mamíferos.

[00531] Os ssODNs doadores foram adquiridos a partir de IDT. Os ssODNs contêm uma sequência de inserção de 10 nucleotídeos, para medir os eventos de HDR pelo ensaio TIDE, flanqueados por braços de homologia de 40 nucleotídeos. Os ssODNs contêm 90 nucleotídeos no total e nucleotídeos modificados com fosforotioato nas três posições terminais nas extremidades 5' e 3'. As sequências de ssODNs doadores com os nucleotídeos modificados com fosforotioato sublinhados são indicadas a seguir:

AAVS1 PAM:

5'GGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCACAGTGGGGCCAGAAT
TCTCAGCTAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAG
G3' (SEQ ID NO: 5)

AAVS1 não PAM:

5'CCTAAGGATGGGGCTTTTCTGTCACCAATCCTGTCCCTAGCTGA
GAATTCTGGCCCCACTGTGGGGTGGAGGGGACAGATAAAAGTAC
CC3' (SEQ ID NO: 6)

NAV1.7 PAM:

5'AGCTGTCCATTGGGGAGCATGAGGGCTGAGCGTCCATCAACTG
AGAATTCCCAGGGAGACCACACCGTTGCAGTCCACAGCACTGTG
CAT3' (SEQ ID NO: 7)

NAV1.7 não PAM:

5'ATGCACAGTGCTGTGGACTGCAACGGTGTGGTCTCCCTGGGAA
TTCTCAGTTGATGGACGCTCAGCCCTCATGCTCCCCAATGGACAG
CT3' (SEQ ID NO: 8)

[00532] Todas as eletroporações foram realizadas no sistema Lonza 4D-Nucleofector™.

[00533] Para BECs, as seguintes condições foram usadas para eletroporação: 1,8xE5 células, 250 ng de mRNA de CAS9, 500 ng de sgRNA, e 0,66 µM de ssODN em 20 µl de tampão de eletroporação P4 usando o programa CM-138. As células eletroporadas foram transferidas para uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultura BEC suplementado com inibidores de DNA-PK ou deixadas sem tratamento. As células foram incubadas a 37° C em uma incubadora de CO₂ a 5%.

[00534] Para iPSCs, foram utilizadas as seguintes condições: 2,0xE5 células, 250 ng de mRNA de CAS9, 500 ng de sgRNA, e 0,66 µM de ssODN em 20 µl de tampão de eletroporação P3 usando o programa CA-137. As células eletroporadas foram transferidas para uma placa de 96 poços contendo 100 µl de meio mTEsR1 (Stem Cell Technologies) suplementado com 10 µM de inibidor ROCK Y-27632 (Stem Cell Technologies) com ou sem inibidores de DNA-PK e depois incubadas a 37° C em uma incubadora de CO₂ a 5%.

[00535] As células CD34⁺ foram eletroporadas dois dias após o descongelamento. As seguintes condições foram usadas para eletroporação: 2,0xE6 células, 15 µg de proteína Cas9 (Feldan), 15 µg de sgRNA, 1 µM de ssODN em 100 µl de tampão de eletroporação P3

usando o programa CA-137. As células eletroporadas foram transferidas dividindo-as igualmente em oito poços de uma placa de 24 poços, cada poço contendo várias concentrações de inibidores de DNA-PK. As células foram incubadas a 37° C em uma incubadora de CO₂ a 5% por dois dias e avaliadas quanto à viabilidade celular e edição de genes.

Transfecção de células mediada por lipídios:

[00536] Um dia antes da transfecção, as BECs foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade celular de 1 × E4 células por poço em meio de cultura de BECs. Primeiro, 0,15 µl de MessengerMax (ThermoFisher, LMRNA 003) foram diluídos em 5 µl de Opti-MEM e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Enquanto isso, 80 ng de mRNA Cas9 (Trilink, L-7206), 20 ng de sgRNA (Synthego) e 1 picomol de ssODN foram adicionados a 5 µl de Opti-MEM e depois misturados com a solução MessengerMax. A mistura foi incubada por 5 min antes da adição às células. A solução inteira foi adicionada às células em um poço de placa de 96 poços com 100 µl de meio de cultura com ou sem inibidores de DNA-PK. As células foram incubadas a 37° C em uma incubadora de CO₂ a 5%.

Medição das taxas de sobrevivência celular:

[00537] As células foram incubadas com 5 µg / ml de Hoechst 33342 (Life Technologies: H3570) e 0,5 µg / ml de iodeto de propídio (PI; Life Technologies: P3566) em meio de cultura por 1h a 37 graus. As células foram fotografadas para medir eventos positivos de Hoescht (células vivas e mortas) e eventos positivos de PI (células mortas) usando um sistema de imagem de alto conteúdo (dispositivos moleculares). A taxa de sobrevivência relativa das células foi calculada da seguinte forma: [(eventos de Hoescht⁺ - eventos PI⁺) da amostra] / (eventos de Hoescht⁺ - eventos PI⁺) do controle] * 100. O controle foi de células Mock transfectadas e sua taxa de sobrevivência celular foi arbitrariamente

definida como 100%.

[00538] A sobrevivência celular de CD34+ HSPCs foi medida usando o reagente Cell Titer Glo (CTG) (Promega). 100 µL de suspensão de células foram misturados com 100 µL de reagente CTG completo. O sinal quimioluminescente foi medido usando um luminômetro e a % de células viáveis foi calculada em comparação com as células de controle (células não tratadas com os inibidores de DNA-PK).

Medição das taxas de edição de genes:

[00539] O DNA genômico foi isolado incubando-se células com 50 µl de solução de DNA Quicextract (Epicenter) por poço de placa de 96 poços por 30 minutos a 37° C. O extrato celular foi misturado e transferido para uma placa de PCR e depois incubado por 6 min a 65° C e 2 min a 98° C. As reações de PCR foram realizadas com 1 µl de solução contendo DNA genômico usando DNA polimerase AccuPrime™ Pfx (ThermoFisher, 12344024). As condições de PCR foram de 4 min a 94° C (1 ×), seguidas de 15 s a 94° C, 15 s a 60° C, e 1 min a 60° C (40 ×). Os produtos de PCR foram purificados e depois sequenciados por Sanger por GENEWIZ. Os seguintes pares de iniciadores abrangendo o sítio alvo foram utilizados para PCR (FW, direto; RV, reverso). Os iniciadores usados pelo Sequenciamento de Sanger são indicados por um asterisco (*):

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

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

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

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

[00540] Cada cromatograma de sequência foi analisado usando o software TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) (<http://tide.nki.nl>) (Veja também Brinkman e outros, Nucleic Acids Research, Volume 42, Edição 42, Edição 22, 16 de dezembro de 2014, Páginas e168). Amos-

tras Mock-eletroporadas foram usadas como sequência de referência, e os parâmetros foram ajustados para um tamanho de indel de 30 nt, e a janela de decomposição foi ajustada para cobrir a maior janela possível com traços de alta qualidade. As taxas totais de indel (inserção e deleções) foram obtidas diretamente a partir de gráficos de TIDE. As taxas de HDR foram a porcentagem de eventos com a inserção de 10 nucleotídeos. As taxas de NHEJ foram calculadas como taxa Total de Indel - taxa de HDR. O software GraphPad Prism 7 foi utilizado para fazer gráficos e calcular todas as informações estatísticas.

Exemplo 2: Inibidores de DNA-PK melhoram as taxas de edição de genes por HDR em BECs

[00541] A Figura 1 ilustra o modelo dos ensaios de edição de genes usados nos exemplos abaixo. Para investigar o efeito dos inibidores de DNA-PK nas taxas de edição de genes por HDR, as BECs foram eletroporadas com mRNA de spCAS9, sgRNA de NAV1.7 e ssODN não PAM NAV1.7 e então incubadas com diferentes concentrações do composto 1 ou não tratadas (controle). As taxas de edição de genes foram determinadas usando o teste TIDE 72 horas após a eletroporação. As taxas de edição de genes foram expressas em porcentagens e classificadas como HDR e NHEJ. As taxas de sobrevivência celular são mostradas em porcentagens em que as células de controle foram definidas como 100%.

[00542] Como mostrado na Figura 2, o inibidor de DNA-PK do composto 1 melhora as taxas de edição de genes em BECs. Para o Composto 1, o NHEJ IC50 foi de 0,4450 μM , o HDR EC50 foi de 0,4448 μM e o HDR TOP% foi de 69,37.

Exemplo 3: Inibidores de DNA-PK melhoram as taxas de edição de genes por HDR em células CD34⁺

[00543] Para investigar o efeito dos inibidores de DNA-PK nas taxas de edição de genes por HDR, as células mPB CD34⁺ foram eletropo-

radas com RNP (proteína spCAS9 + sgRNA de NAV1.7) e NAV1.7 não PAM ssODN. As células foram então incubadas com várias concentrações do Composto 1. As taxas de edição de genes foram determinadas usando o ensaio TIDE 48 horas após a eletroporação. As taxas de edição de genes foram expressas em porcentagens e classificadas como HDR e NHEJ, como mostrado na Figura 3A (doador B) e Figura 3B (Doador C). As taxas de sobrevivência celular são mostradas em porcentagens em que as células de controle foram definidas como 100%.

[00544] Como mostrado nas Figuras 3A e 3B, o inibidor de DNA-PK do Composto 1 melhora as taxas de edição de genes nas células CD34⁺. Os valores de EC50 de HDR e formação de Indel para o doador B foram de 0,29 μ M e 0,35 μ M, respectivamente.

Exemplo 4: Inibidores de DNA-PK melhoram as taxas de edição de genes por HDR em iPSCs

[00545] Para investigar o efeito dos inibidores de DNA-PK nas taxas de edição de genes por HDR, as iPSCs foram eletroporadas com mRNA de spCAS9, sgRNA de AAVS1 e AAVS1 PAM ssODN e depois incubadas com diferentes concentrações do composto 1 ou deixadas sem tratamento (controle). As taxas de edição de genes foram determinadas usando o teste TIDE 72 horas após a eletroporação. As taxas de edição de genes foram expressas em porcentagens e classificadas em HDR e NHEJ. As taxas de sobrevivência celular são mostradas em porcentagens em que as células de controle foram definidas como 100%.

[00546] Como mostrado na Figura 4, o inibidor de DNA-PK do composto 1 melhora as taxas de edição de genes em iPSCs. Para o Composto 1, o NHEJ IC50 foi de 0,474 μ M, o HDR EC50 foi de 0,3253 μ M e o HDR TOP% foi de 24,41.

Exemplo 5: Determinação da cinética de edição de genes em ECmax

[00547] Para investigar a cinética de edição de genes em EC max, as BECs foram eletroporadas com mRNA de spCAS9, sgRNA de AAVS1 e AAVS1 PAM ssODN e depois incubadas em momentos diferentes com 10 μ M de Composto 1 ou não tratadas (Controle). As taxas de edição de genes foram determinadas usando o teste TIDE, e expressas em porcentagens de HDR e NHEJ. 10 μ M é a Concentração de Melhora Máxima (ECmax) do Composto 1.

[00548] A Figura 5 mostra que existe uma forte correlação inversa entre os eventos HDR e NHEJ.

Exemplo 6: Determinação da cinética de edição de genes em EC50

[00549] As BECs foram eletroporadas com mRNA de spCAS9, sgRNA de AAVS1 e AAVS1 PAM ssODN, e depois incubadas em momentos diferentes com 0,7 μ M de Composto 1 ou deixadas sem tratamento (Controle). As taxas de edição de genes foram determinadas usando o teste TIDE e expressas em porcentagens de HDR e NHEJ. 0,7 μ M é a Concentração de Melhora 50 (EC50) do Composto 1. A Figura 6 ilustra o tempo decorrido da inibição de DNA-PK em HDR e NHEJ em BECs.

Exemplo 7: Inibidores de DNA-PK melhoram as taxas de HDR quando componentes de edição de genes foram entregues por transfecção mediada por lipídios em BECs

[00550] Para investigar os efeitos da transfecção mediada por lipídios, as BECs foram transfectadas com mRNA de spCAS9, sAVR de AAVS1 e sAVN de AAVS1 PAM ssODN e depois incubadas com diferentes concentrações do composto 1 ou deixadas sem tratamento (controle). As taxas de edição de genes foram determinadas usando o teste TIDE 72 horas após a transfecção. A Figura 7 mostra o aumento das taxas de eficiência de HDR com concentrações crescentes de Composto 1 entregues por transfecção baseada em lipídios.

Sumário:

[00551] Os resultados da adição de inibidores de DNA-PK a diferentes tipos de células e lóci mostram aumento significativo de HDR entre os tipos e lóci de células. A melhora da edição de genes por HDR foi mostrada em vários tipos de células, incluindo BECs, iPSCs, CD34⁺ HPSCs (3 doadores separados). A melhora da edição de genes por HDR foi mostrada em vários lóci, incluindo AAVS1.1, NaV1.7. Resultados experimentais também mostraram que a entrega baseada em lipídios e eletroporação é eficaz. Exemplos de eletroporação incluem BECs, iPSCs, CD34⁺ HPSCs e entrega de efeito usando um sistema de entrega baseado em lipídios em BECs. Uma forte correlação inversa entre os eventos HDR e NHEJ foi observada nos lóci, condições experimentais e tipos de células.

Tabela de resumo: Inibidores de DNA-PK melhoram a edição de genes acionada por HDR

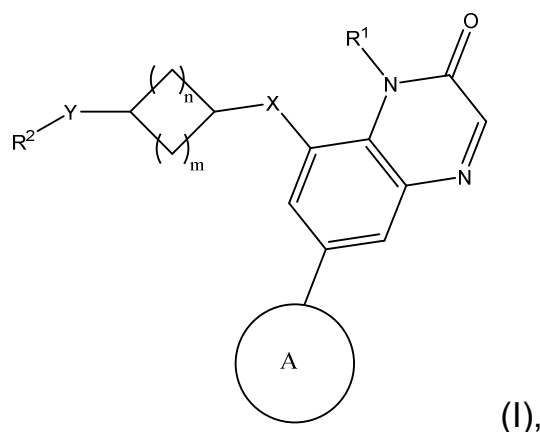
	Composto 1	
	AAVS1	NaV1.7
<u>Células</u>	<u>HDR EC50 (µM) e Max %</u>	
BECs	0,72 µM	0,72 µM
	66 %	69 %
iPSCs*	0,33 µM	N.D.
	24 %	N.D.
CD34 ⁺ s		
Doador A	0,12 µM	0,39 µM
	76 %	82 %
Doador B	N.D	0,29 µM
	N.D.	86 %
Doador C	0,18 µM	0,11 µM
	88 %	67 %

Equivalentes

[00552] Embora esta descrição tenha sido particularmente mostrada e descrita com referências às modalidades preferenciais da mesma, será entendido pelos versados na técnica que várias alterações na forma e nos detalhes podem ser feitas sem abandonar o espírito e o escopo da descrição conforme definido pelas reivindicações em anexo. Os versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de determinar, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da descrição aqui descritas especificamente. Tais equivalentes devem ser incluídos no escopo das reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula (I)



em que m e n são independentemente 1 ou 2;

X é O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila;

Y é uma ligação, O ou NR; em que R é H ou C₁-C₄ alquila;

R¹ é C₁-C₄ alquila;

R² é

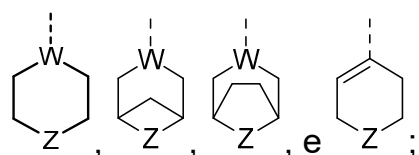
a) um anel arila ou heteroarila de 5 ou 6 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S, em que o anel arila e heteroarila pode ser substituído por 0, 1, 2 ou 3 substituintes R³ selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, C₁-C₄ alquila, C₃-C₆ cicloalquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi, C₁-C₄ haloalcóxi, C(=O)NHR¹, e um anel heterocicloalquila ou heteroarila de 5 ou 6 membros em que cada anel contém 1, 2 ou 3 heteroátomos selecionados a partir de N, O e S; em que R¹ é C₁-C₄ alquila; ou em que dois grupos R³ conectados a átomos de carbono adjacentes do anel arila ou heteroarila podem formar um anel de 5 ou 6 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S; ou

b) COOR⁴ em que R⁴ é C₁-C₄ alquila ou benzila;

em que cada C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ haloalquila, C₁-C₄ alcóxi e C₁-C₄ haloalcóxi pode ainda ser substituído por OR⁵ ou NR⁶R⁷, em que

cada um de R^5 , R^6 e R^7 é independentemente H, C_1 - C_4 alquila ou C_3 - C_6 cicloalquila; ou em que R^6 e R^7 e o átomo de nitrogênio ao qual estão ligados formam um anel saturado de 5 ou 6 membros que pode conter 0 ou 1 heteroátomo adicional selecionado a partir de N, O e S, e em que o anel pode ser adicionalmente substituído por C_1 - C_4 alquila;

o anel A é selecionado a partir do grupo que consiste em:

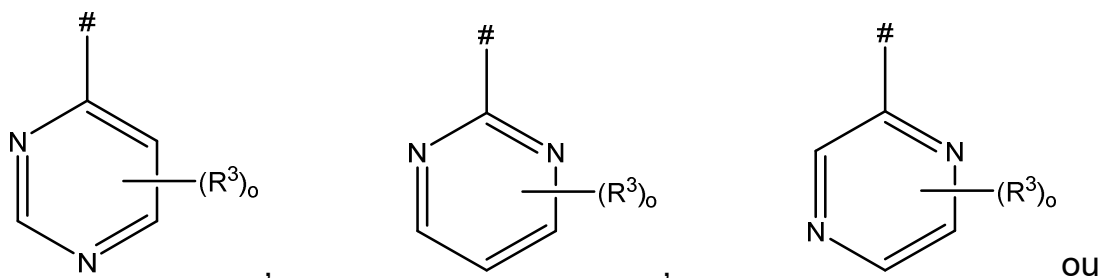


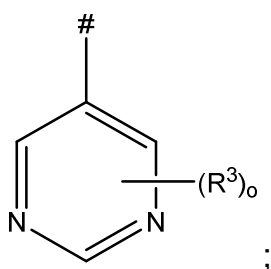
em que W é N ou CR^3 ; e Z é O ou S; em que R^3 é H ou C_1 - C_4 alquila.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que

R^2 é um anel arila ou heteroarila de 5 ou 6 membros contendo um ou dois heteroátomos selecionados a partir do grupo que consiste em N, O e S, em que o anel arila e heteroarila pode ser substituído por 0, 1 ou 2 substituintes R^3 selecionados independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, C_1 - C_4 alquila ou C_3 - C_6 cicloalquila, C_1 - C_4 haloalquila, C_1 - C_4 alcóxi, C_1 - C_4 haloalcóxi e $C(=O)NHR^1$ em que R^1 é C_1 - C_4 alquila; ou em que dois grupos R^3 conectados a átomos de carbono adjacentes do anel arila ou heteroarila podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S;

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que R^2 é:

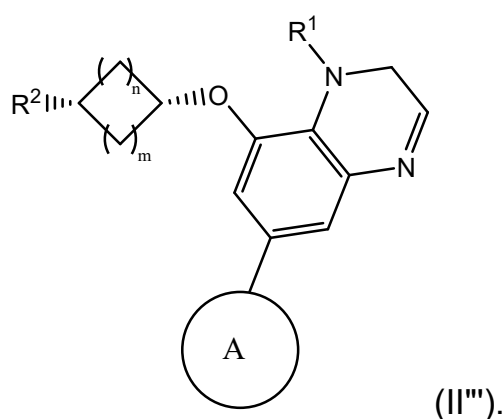
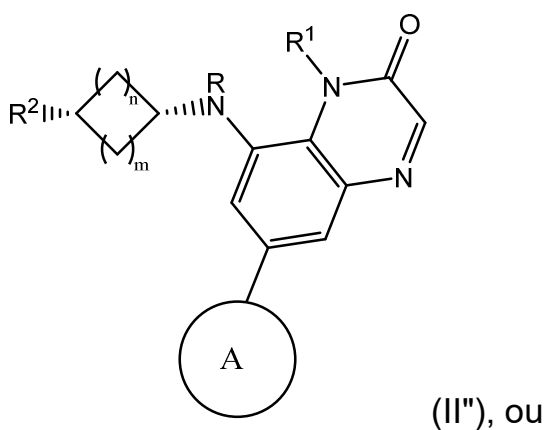
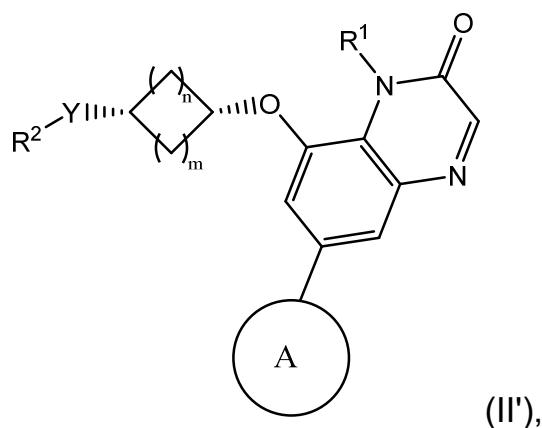
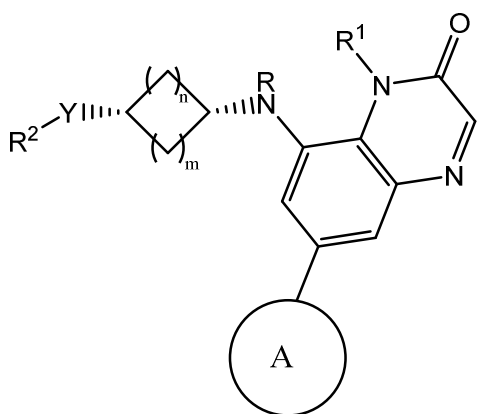




em que # denota onde R^2 está conectado ao restante do composto de fórmula (I); e

o é 0, 1 ou 2.

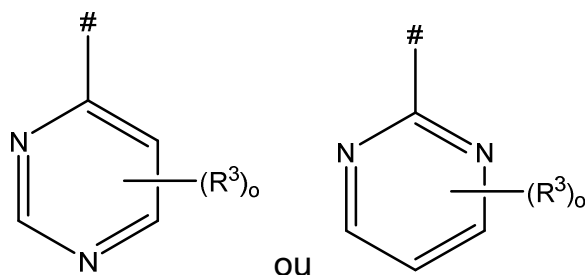
4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (II), Fórmula Estrutural (II'), Fórmula Estrutural (II'') ou Fórmula Estrutural (II'''):



5. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que cada um de m e n é 2.

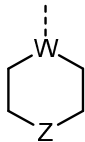
6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que R^1 é metila.

7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que R^2 é:

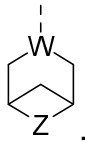


8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que cada um de m e n é 2, Y é uma ligação, R^1 é metila, R^2 é COOR^4 , e R^4 é $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquila ou benzila.

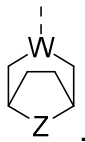
9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 8, caracterizado pelo fato de que A é .

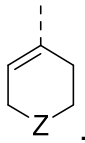
10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 8, caracterizado pelo fato de que A é .

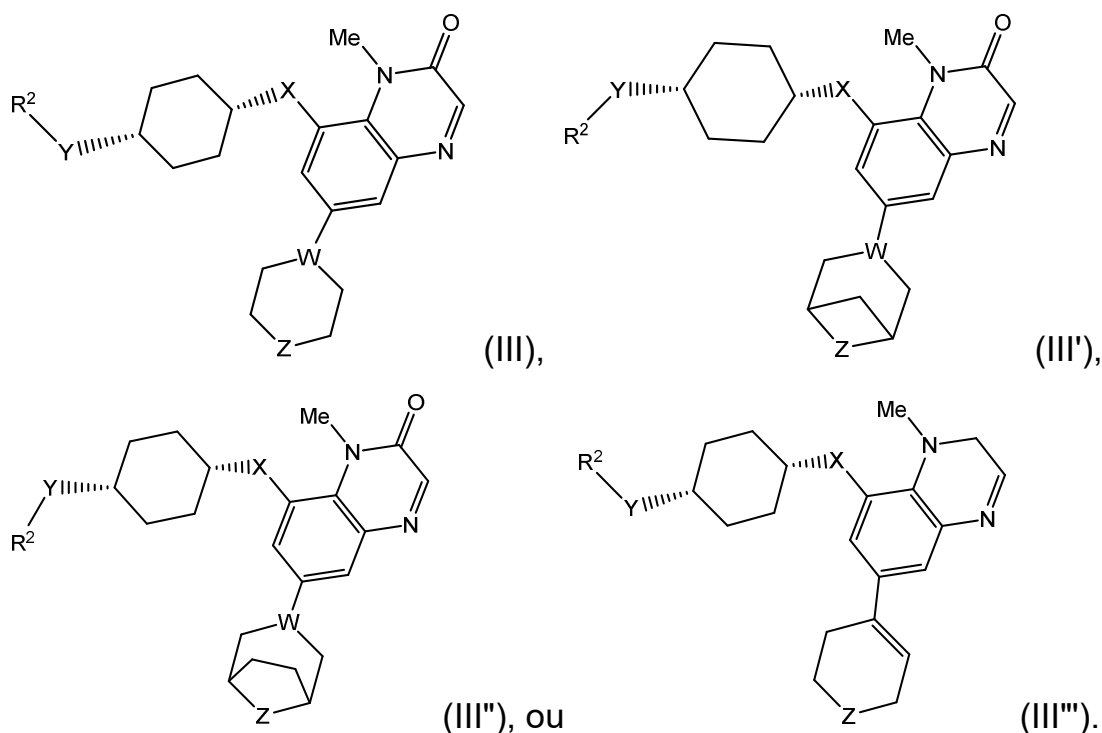
11. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 8, caracterizado pelo fato de que A é .

12. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 8, caracterizado pelo fato de que A é .

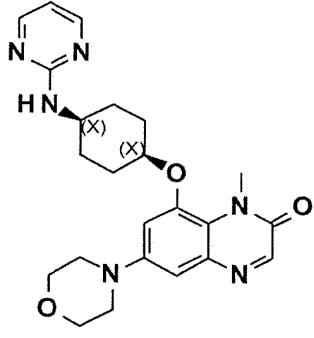
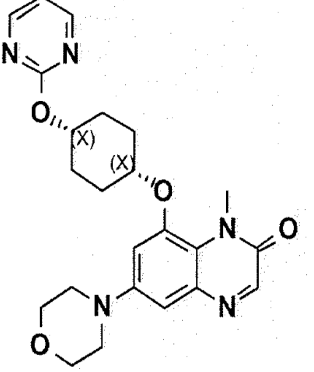
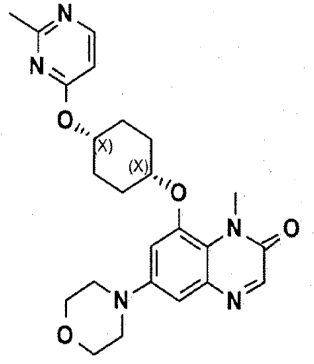
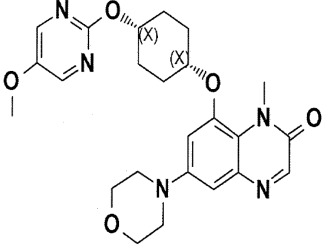
13. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o composto da fórmula (I) é representado pela Fórmula Estrutural (III), Fórmula Estrutural (III'), Fórmula Estrutural (III'') ou Fórmula Estrutural (III'''):

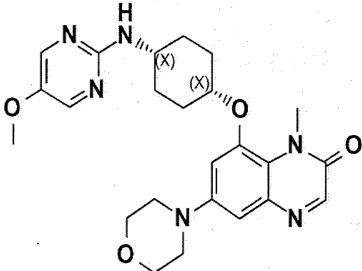
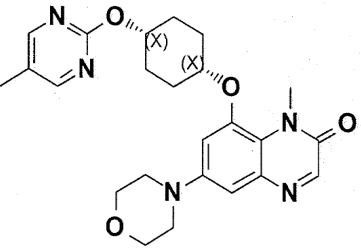
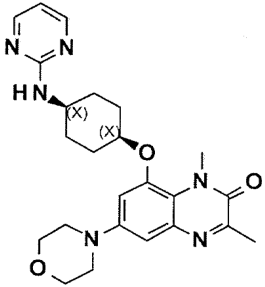
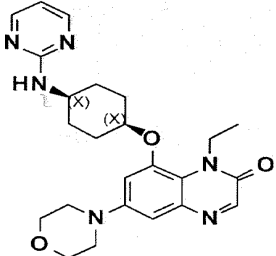
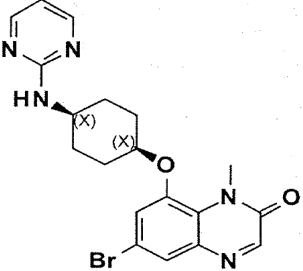


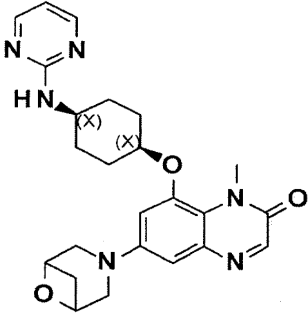
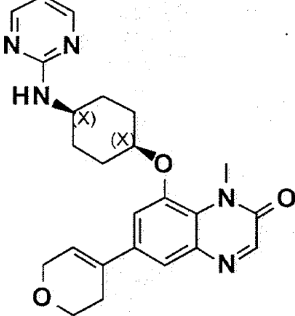
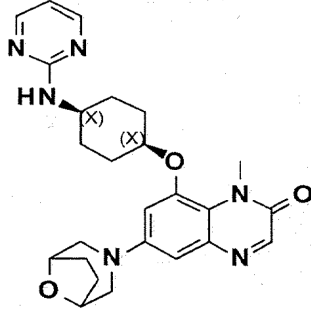
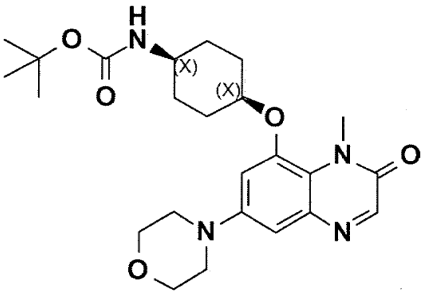
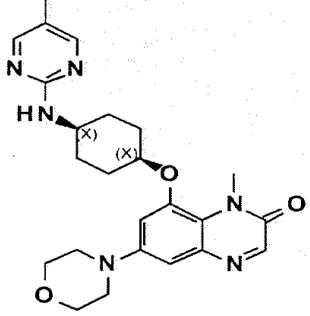
14. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que α é zero, 1 ou 2, e cada R^3 é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em CN, halo, NO_2 , $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquila, $\text{C}_1\text{-C}_2$ alcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_2$ haloalcóxi e $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^{1'}$ em que $\text{R}^{1'}$ é $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquila.

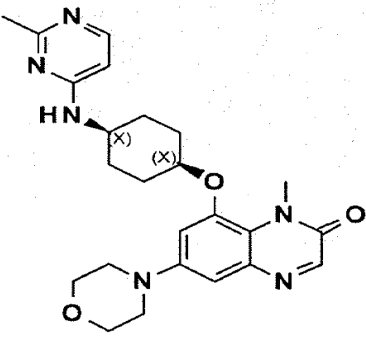
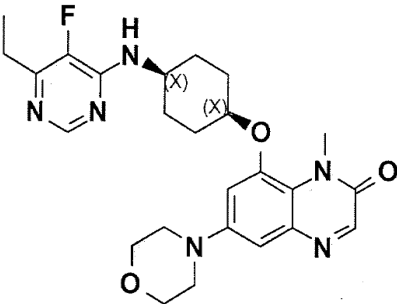
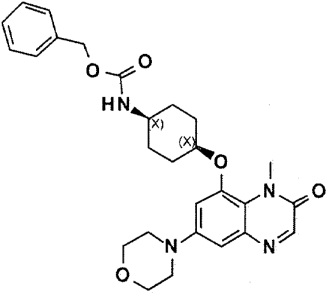
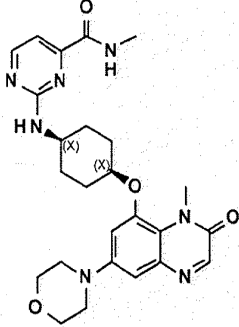
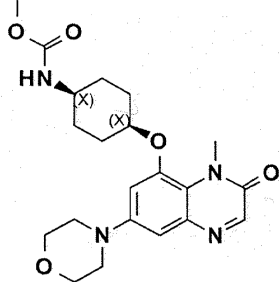
15. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que dois grupos R^3 conectados a átomos de carbono adjacentes do anel arila ou heteroarila podem formar um anel de 5 membros fusionado que pode conter um heteroátomo selecionado a partir de O, N e S.

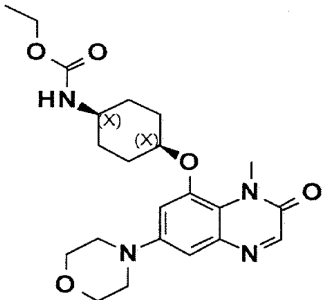
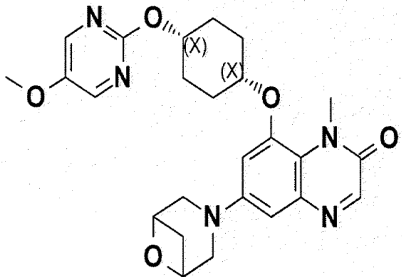
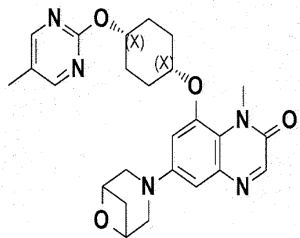
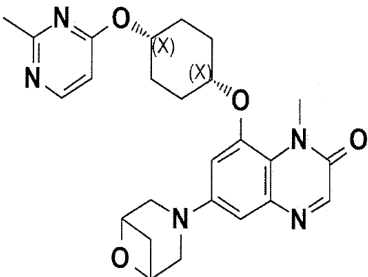
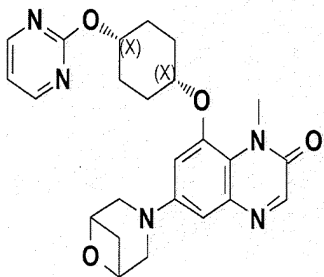
16. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir dos seguintes compostos:

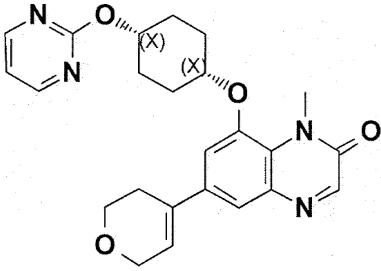
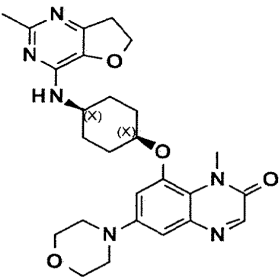
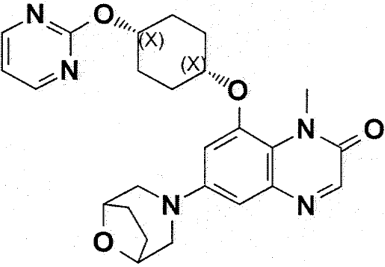
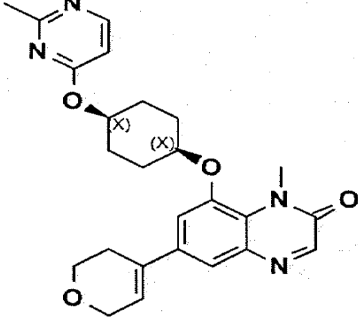
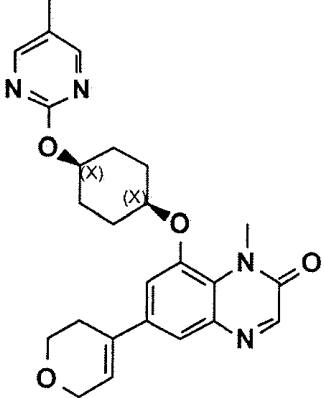
Composto No.	Composto
1	
2	
3	
4	

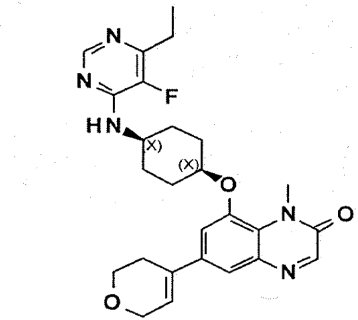
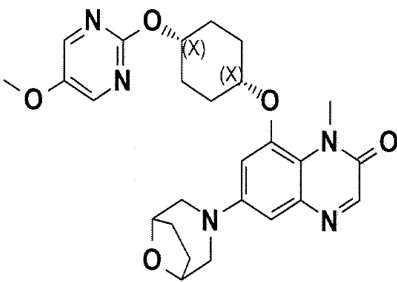
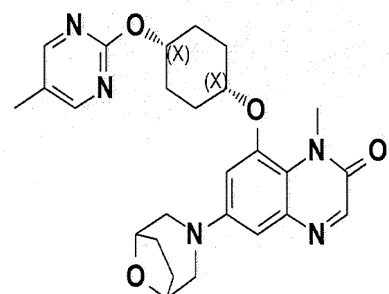
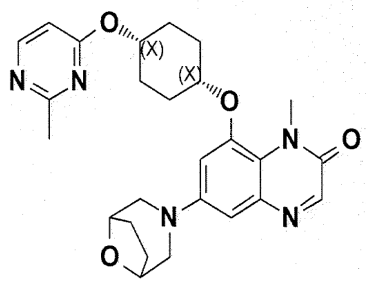
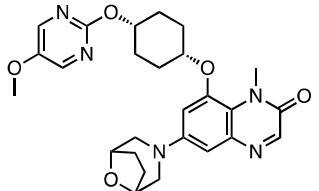
Composto No.	Composto
5	
6	
7	
8	
9	

Composto No.	Composto
10	
11	
12	
13	
14	

Composto No.	Composto
15	
16	
19	
20	
21	

Composto No.	Composto
22	
23	
24	
25	
26	

Composto No.	Composto
27	
28	
29	
30	
31	

Composto No.	Composto
36	
36	
38	
39	
40	

17. Método para editar uma ou mais regiões genômicas alvo, caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar às, uma ou mais, células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de geno-

ma e um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo; e

em que as uma ou mais regiões genômicas alvo são editadas.

18. Método para reparar uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por meio de uma via de reparo dirigido por homologia (HDR), caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar às, uma ou mais, células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo;

em que o sistema de edição de genoma interage com um ácido nucleico das regiões genômicas alvo, resultando em uma quebra de DNA, e em que a quebra de DNA é reparada pelo menos em parte por uma via HDR.

19. Método para inibir ou suprimir o reparo de uma quebra de DNA em uma ou mais regiões genômicas alvo por meio de uma via de junção de extremidades não homólogas (NHEJ), caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar às, uma ou mais, células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo;

em que o sistema de edição de genoma interage com um ácido nucleico de uma ou mais regiões genômicas alvo, resultando em uma quebra de DNA, e em que o reparo da quebra de DNA por uma via NHEJ é inibido ou suprimido.

20. Método para modificar a expressão de um ou mais genes ou proteínas, caracterizado pelo fato de que compreende:

administrar às, uma ou mais, células que compreendem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou um co-cristal do mesmo;

em que o sistema de edição de genoma interage com um ácido nucleico de uma ou mais regiões genômicas alvo de um ou mais genes alvo, resultando na edição de uma ou mais regiões genômicas alvo, e em que a edição modifica a expressão de um gene(s) a jusante e / ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo.

21. Método, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que a quebra de DNA compreende uma quebra de DNA em fita dupla (DSB).

22. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a eficiência de editar as regiões genômicas alvo em uma ou mais células é aumentada em comparação com a de outra célula ou células idênticas, mas sem o composto.

23. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a eficiência do reparo da quebra de DNA nas regiões genômicas alvo nas uma ou mais células por uma via HDR é aumentada em comparação com a célula ou células idênticas, mas sem o composto.

24. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a eficiência de inibir ou suprimir o reparo da quebra de DNA nas regiões genômicas alvo nas uma ou mais células por uma via NHEJ é aumentada em comparação com a célula ou células idênticas, mas sem o composto.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 22 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita eficiência é aumentada em pelo menos 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 25 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes ou 100 vezes em comparação com a célula ou células idênticas, mas sem o composto.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita eficiência é medida pela frequência da integração de polinucleotídeos dirigida.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita eficiência é medida pela frequência da mutagênese dirigida.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a mutagênese dirigida compreende mutações pontuais, deleções e / ou inserções.

29. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a expressão de um gene(s) a jusante e / ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo é aumentada em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a dita expressão é aumentada em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1 vez, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes ou 10 vezes em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração.

31. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a expressão de um gene(s) a jusante e / ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo é reduzida em comparação com o nível de expressão de linha de base nas uma ou mais células antes da administração.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a expressão gênica é reduzida em pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% em comparação com o nível de expressão de linha de base em uma ou mais células antes da administração.

33. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a expressão de um gene(s) a jusante e/ou proteína(s) associada(s) ao(s) gene(s) alvo é substancialmente eliminada em uma ou mais células.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 33, caracterizado pelo fato de que a célula é sincronizada na fase do ciclo celular S ou G2.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 34, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais células que são administradas ou colocadas em contato com o dito composto têm sobrevida aumentada em comparação com uma ou mais células que não foram administradas ou colocadas em contato com o dito composto.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 35, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma e o composto são administrados às, uma ou mais, células simultaneamente.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 36, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma e o composto são administrados às, uma ou mais, células sequencialmente.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é administrado às, uma ou mais, células antes do composto.

39. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracteriza-

do pelo fato de que o composto é administrado às, uma ou mais, células antes do sistema de edição de genoma.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 39, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais células são células cultivadas.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 39, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais células são células *in vivo* dentro de um organismo.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 39, caracterizado pelo fato de que as uma ou mais células são células *ex vivo* a partir de um organismo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que o organismo é um mamífero.

44. Método, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que o organismo é um ser humano.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 44, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma e o composto são administrados pela mesma via.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 44, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma e o composto são administrados por vias diferentes.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é administrado por via intravenosa e o composto é administrado por via oral.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 47, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é selecionado a partir de um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR, ou um sistema baseado

em NgAgo.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em CRISPR.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas ou um sistema CRISPR-Cpf.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas e em que o sistema CRISPR-Cas compreende: (a) pelo menos um elemento de RNA guia compreendendo: (i) um RNA alvo compreendendo uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos em uma ou mais regiões genômicas alvo ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; (ii) e um RNA ativador compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar com o RNA alvo ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA ativador; e (b) um elemento de proteína Cas compreendendo uma proteína Cas ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cas.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o dito RNA alvo e RNA ativador são fusionados como uma molécula única.

53. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a proteína Cas é uma proteína Cas9 do Tipo II.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a proteína Cas9 é uma SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou D10A nickase, ou qualquer combinação das mesmas.

55. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cpf, e em que o sistema CRISPR-Cpf compreende: (a) pelo menos um elemento de RNA guia ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando o elemento de RNA guia, o RNA guia compreendendo um RNA alvo que compreende uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos nas uma ou mais regiões genômicas alvo; e (b) um elemento de proteína Cpf compreendendo uma proteína Cpf ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cpf.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 55, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é entregue por um ou mais vetores.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que um ou mais vetores são selecionados a partir de vetores virais, plasmídeos ou ssDNAs.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que os vetores virais são selecionados a partir do grupo que consiste em vetores retrovirais, lentivirais, adenovirais, adeno-associados e vetores virais herpes simplex.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 58, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é entregue por RNA sintético.

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 58, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é entregue por uma nanoformulação.

61. Kit ou composição para editar uma ou mais regiões genômicas alvo, caracterizado pelo fato de que compreende:

um sistema de edição de genoma; e um composto como

definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 ou um sal farmacologicamente aceitável ou um co-cristal do mesmo.

62. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 61, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em meganuclease, um sistema baseado em nuclease dedo de zinco (ZFN), um sistema Nuclease baseado em efetores do tipo ativador de transcrição (TALEN), um sistema baseado em CRISPR, ou sistema baseado em NgAgo.

63. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é um sistema baseado em CRISPR.

64. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas ou um sistema CRISPR-Cpf.

65. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cas, e em que o sistema CRISPR-Cas compreende: (a) pelo menos um elemento de RNA guia compreendendo: (i) um RNA alvo compreendendo uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos nas uma ou mais regiões genômicas alvo ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; (ii) e um RNA ativador compreendendo uma sequência de nucleotídeos que é capaz de hibridizar com o RNA alvo, ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA ativador; e (b) um elemento de proteína Cas compreendendo uma proteína Cas ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cas.

66. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que a proteína Cas é uma proteína Cas9

Tipo II.

67. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a proteína Cas9 é uma SaCas9, SpCas9, SpCas9n, Cas9-HF, Cas9-H840A, FokI-dCas9 ou D10A nickase, ou qualquer combinação das mesmas.

68. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o sistema baseado em CRISPR é um sistema CRISPR-Cpf, e em que o sistema CRISPR-Cpf compreende: (a) um RNA alvo compreendendo uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar a uma sequência de nucleotídeos nas uma ou mais regiões genômicas alvo, ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica o RNA alvo; e (b) um elemento de proteína Cpf compreendendo uma proteína Cpf ou um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína Cpf.

69. Kit ou composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 61 a 68, caracterizado pelo fato de que o sistema de edição de genoma é incluído ou empacotado em um ou mais vetores.

70. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que os um ou mais vetores são selecionados a partir de vetores virais, plasmídeos ou ssDNAs.

71. Kit ou composição, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que os vetores virais são selecionados a partir do grupo que consiste em vetores retrovirais, lentivirais, adenovirais, adenoassociados e vetores virais herpes simplex.

72. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

73. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de ser na prepara-

ção de uma composição farmacêutica ou medicamento ou kit para sensibilizar uma célula a um agente terapêutico ou um estado de doença que induz uma lesão de DNA, em que o uso compreende a etapa de colocar em contato a célula com o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou uma composição farmacêutica compreendendo o dito composto.

74. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica ou medicamento ou kit para o tratamento de câncer em um paciente.

75. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica ou medicamento ou kit para tratar câncer ou inibir o crescimento de células cancerosas em um paciente.

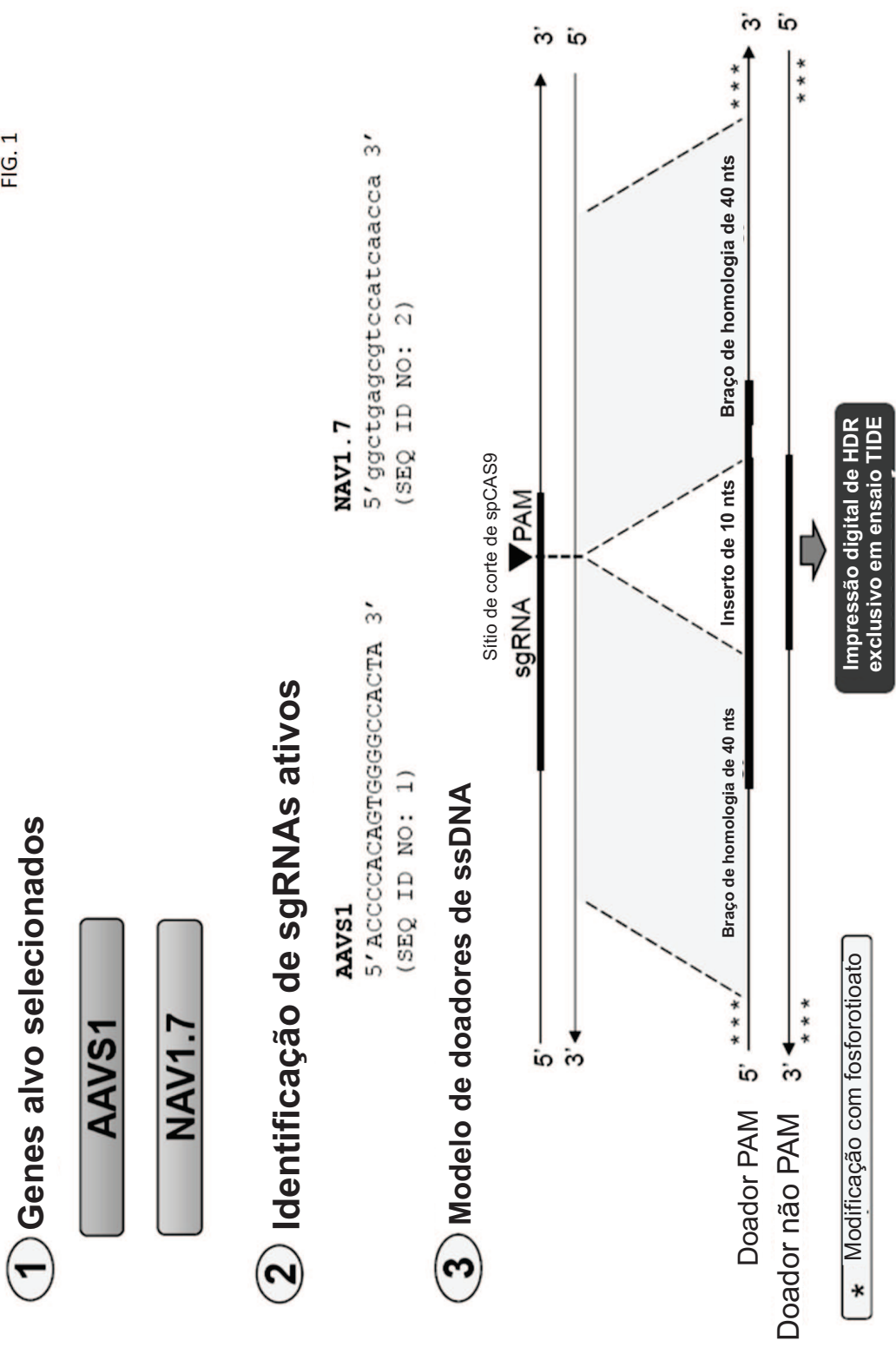
76. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, ou uma composição farmacêutica compreendendo o dito composto, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado(a) por ser para uso:

para sensibilizar uma célula a um agente terapêutico ou um estado de doença que induz uma lesão de DNA, e/ou

para tratar câncer ou inibir o crescimento de células cancerosas em um paciente.

77. Invenção, caracterizada pelo fato de que está sob qualquer forma das suas concretizações ou em qualquer categoria de reivindicação que se possa reivindicar, por exemplo, produto, ou processo, ou uso abrangido pelo objeto inicialmente descrito, revelado, ou ilustrado no pedido de patente.

FIG. 1



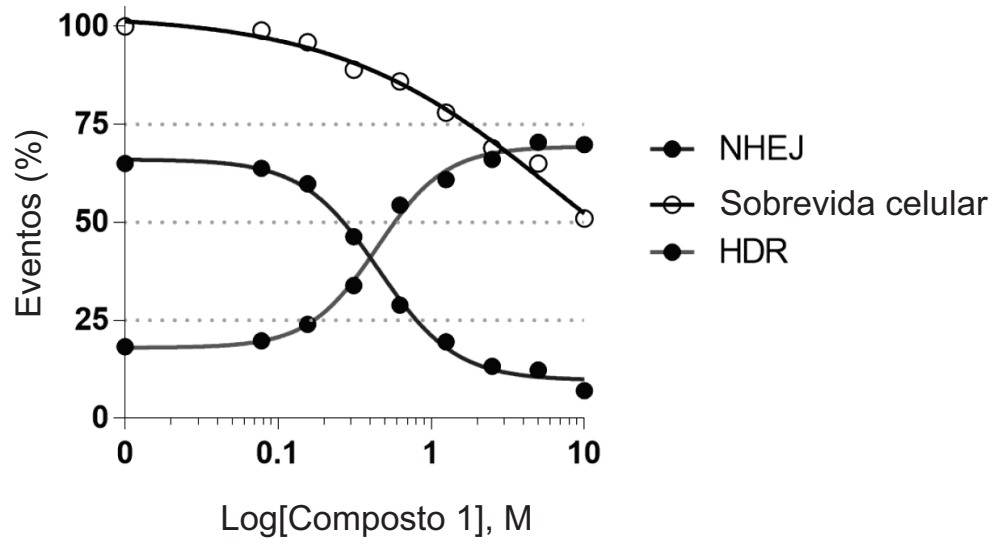


FIG. 2

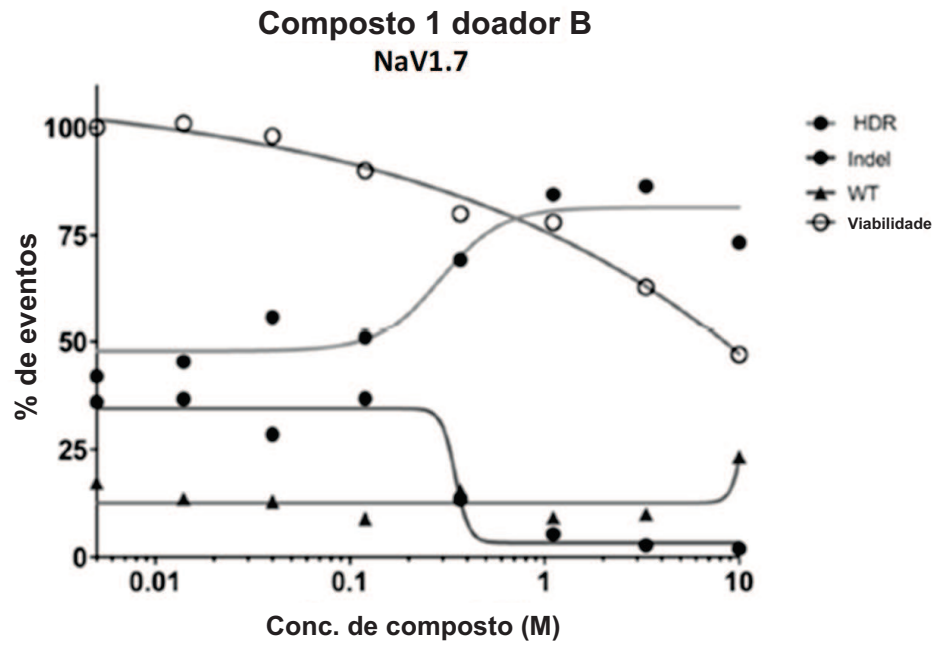


FIG. 3A

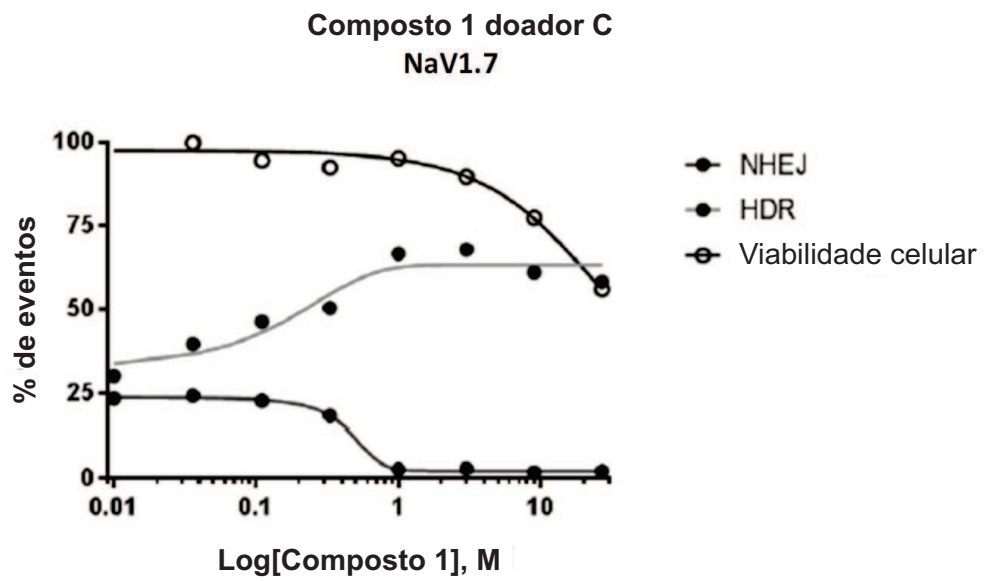


FIG. 3B

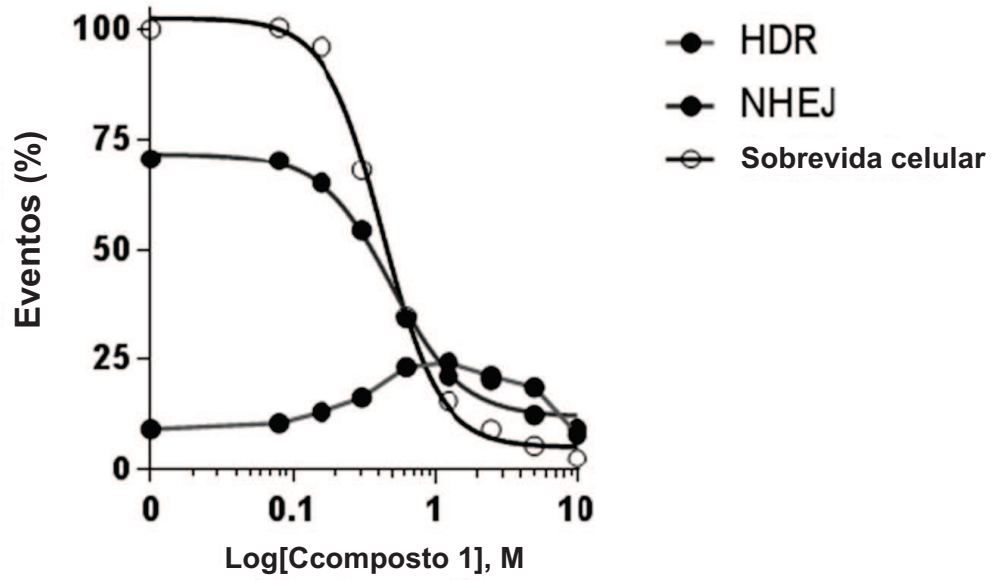


FIG. 4

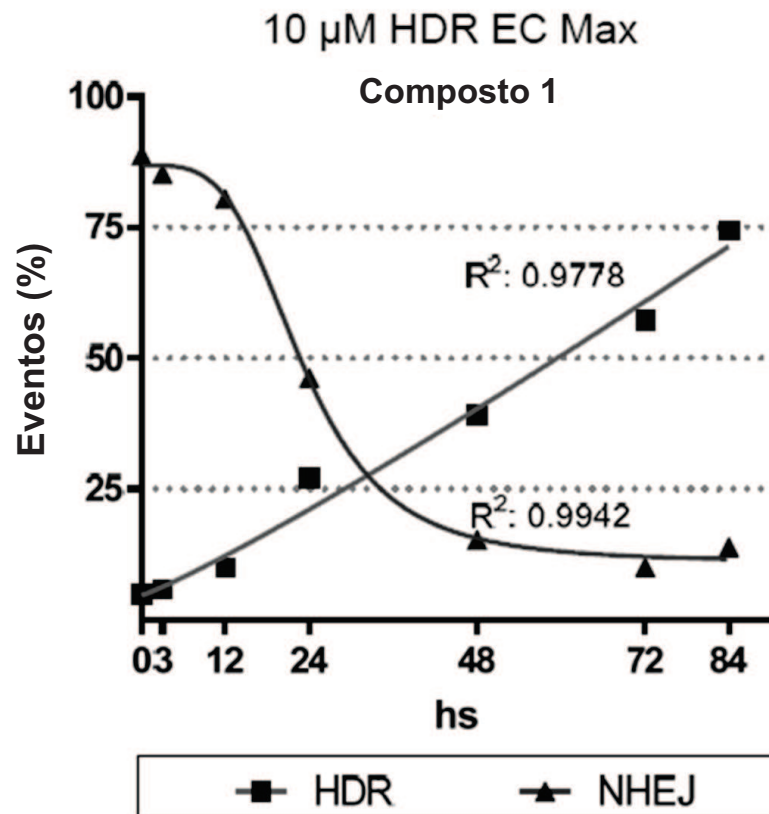


FIG. 5

Composto 1

0.7 μ M HDR EC₅₀

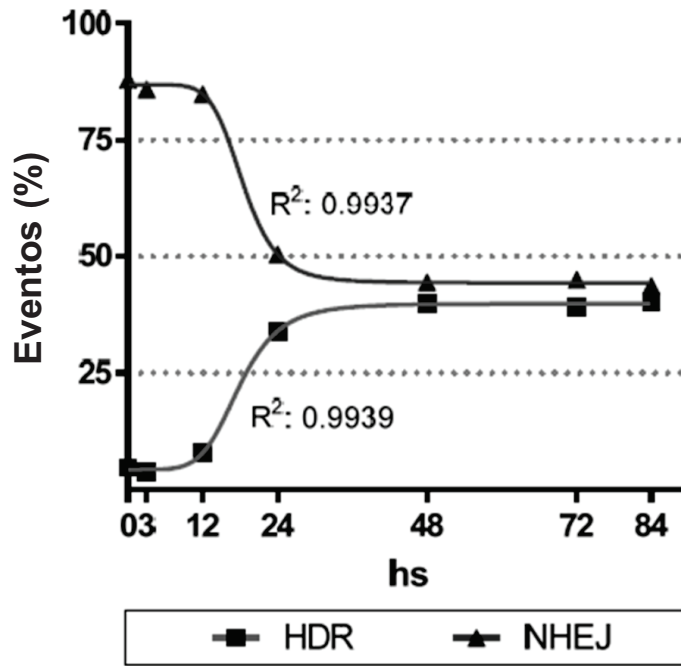


FIG. 6

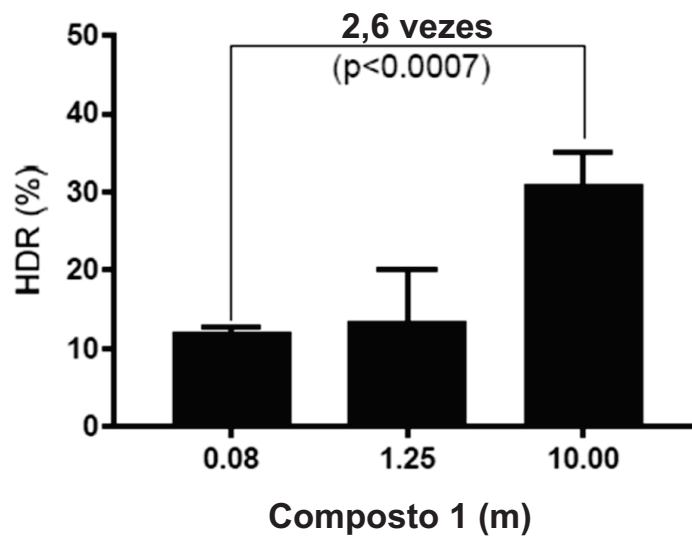


FIG. 7

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSTOS DE QUINOXALINONA, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E KITS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DE EDIÇÃO DE GENOMA"**.

A presente invenção refere-se a compostos, métodos para editar uma região(ões) genômica(s) alvo, métodos para reparar uma quebra de DNA por uma via HDR, métodos para inibir ou suprimir o reparo de uma quebra de DNA por uma via NHEJ, e métodos para modificar a expressão de um gene(s) ou proteína(s) que compreendem administrar a uma ou mais células que incluem uma ou mais regiões genômicas alvo, um sistema de edição de genoma e um inibidor de Proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) descrito neste documento. Kits e composições para editar um gene alvo compreendem um sistema de edição de genoma e um inibidor de DNA-PK aqui descritos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P247954 ListSeq.txt
- Data de Geração do Código: 02/07/2020
- Hora de Geração do Código: 16:08:31
- Código de Controle:
 - Campo 1: 33020B1A40C46FAE
 - Campo 2: A88DD72D68CACBF7