

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046088

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.06

(21) Номер заявки
202290480

(22) Дата подачи заявки
2020.08.05

(51) Int. Cl. C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) РНК-НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/883,370; 63/031,944

(32) 2019.08.06; 2020.05.29

(33) US

(43) 2022.07.07

(86) PCT/US2020/045022

(87) WO 2021/026245 2021.02.11

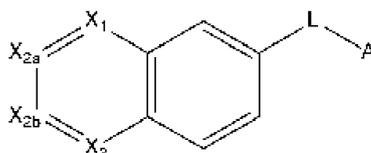
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОРЗ
КАРОЛИНА ЭТ ЧАПЕЛ ХИЛЛ (US)

(72) Изобретатель:
Уикс Кевин, Об Джеффри, Ли Кэлин,
Зеллер Мередит (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016180536
WO-A1-2013148228
WO-A1-2011103557
US-A1-20050032805
WO-A1-2011078143

(57) Изобретение относится к соединениям со структурой формулы (II):



или их фармацевтически приемлемым солям, которые связываются с молекулой РНК-мишени, такой как рибопереключател ТРР, и применению указанных соединений. Соединения содержат два структурно различных фрагмента, которые позволяют связываться с РНК-мишенью в двух разных сайтах связывания, тем самым продуцируя лиганд связывания с более высокой аффинностью по сравнению с соединениями, которые связываются только с одним сайтом связывания РНК.

B1

046088

046088

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к соединениям, которые связываются с молекулой РНК-мишени, такой как рибопереключател ТРР, и применению указанных соединений. Соединения содержат два структурно различных фрагмента, которые позволяют связываться с РНК-мишенью в двух разных сайтах связывания, тем самым продуцируя лиганд связывания с более высокой аффинностью по сравнению с соединениями, которые связываются только с одним сайтом связывания РНК.

Включение перечня последовательностей посредством ссылки

Материал в прилагаемом перечне последовательностей настоящим полностью включен посредством ссылки в настоящее изобретение. Сопроводительный файл с именем Sequence Listing 39397600002_ST25 был создан 5 августа 2020 г. и имеет размер 4 КБ.

Государственная поддержка

Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке в рамках грантов № GM098662 и AI068462, присужденных Национальным институтом здравоохранения (НИИ). Правительство имеет определенные права на изобретение.

Уровень техники

Подавляющее большинство низкомолекулярных лигандов в первую очередь разработаны для манипулирования биологическими системами посредством нацеливания на белки. Белки имеют очень сложные трехмерные структуры, которые имеют решающее значение для их правильного функционирования и включают щели и карманы, в которых могут связываться низкомолекулярные лиганды^{1,2}. Транскриптом - совокупность всех молекул РНК, образующихся в организме, - также включает перспективные мишени для изучения биологических систем и манипулирования ими. Например, РНК-транскриптомы не только играют важную роль в системах млекопитающих, но также присутствуют как в бактериях, так и в вирусах и, таким образом, представляют собой мишени для небольших молекул для модуляции экспрессии генов.

Следует отметить, что РНК может принимать трехмерные структуры по сложности, не уступающие структурам белков³, что является ключевым свойством, необходимым для разработки высокоселективных лигандов⁴, и РНК играют доминирующую роль в управлении поведением биологических систем⁵. Первоначально рассматриваемая как просто носитель генетической информации, который существует исключительно для передачи сообщения о кодировании белка и управлении процессом биосинтеза белка, современный взгляд на РНК эволюционировал, чтобы охватить расширенную роль, где в настоящее время известно, что широкий спектр молекул РНК играет широкую и далеко идущую роль в модуляции экспрессии генов и других биологических процессов с помощью различных механизмов. Было обнаружено, что даже большое количество недавно открытых некодирующих РНК связано с такими заболеваниями, как рак и неканцерогенные заболевания. Таким образом, осознание того, что РНК вносят свой вклад в болезненные состояния помимо кодирования патогенных белков, обеспечивает множество ранее неизвестных терапевтических мишеней.

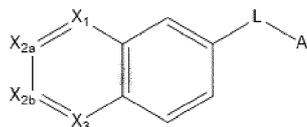
Однако, несмотря на то, что было показано, что низкомолекулярные лиганды могут связываться с мРНК и потенциально могут повышать или понижать эффективность трансляции, тем самым регулируя экспрессию белка в клетках^{6,7}, существуют проблемы, связанные с идентификацией низкомолекулярных РНК-лигандов, с которыми не сталкиваются при нацеливании на белки^{4,11,12}. Это также включает в себя разработку небольших молекул, нацеленных на некодирующие РНК, которые также представляют собой богатый набор мишеней⁸⁻¹⁰. К сожалению, несмотря на развитие различных методик анализа структуры РНК и открытие новых функций, возможности эффективно и быстро идентифицировать или разработать ингибиторы, которые связываются с РНК и нарушают ее функцию, сильно отстают. Таким образом, в данной области техники существует большая потребность в разработке новых способов и технологий, позволяющих быстро и эффективно идентифицировать низкомолекулярные лиганды, нацеленные на молекулы РНК.

Сущность изобретения

Как уже упоминалось выше, транскриптом представляет собой перспективный, но малоиспользуемый набор мишеней для низкомолекулярных лигандов. Низкомолекулярные лиганды (и, в конечном счете, лекарственные средства), нацеленные на матричные РНК и некодирующие РНК, обладают потенциалом модулировать состояние клеток и болезни. В настоящем изобретении стратегии скрининга на основе фрагментов с использованием селективного 2'-гидроксилацилирования, анализируемого с помощью удлинения праймера (SHAPE), и SHAPE-мутационного профилирования (MaP) для исследования структуры РНК использовались для обнаружения низкомолекулярных фрагментов, которые связываются со структурой РНК-мишени. В частности, были идентифицированы фрагменты и пары кооперативно связывающихся фрагментов, которые связываются с рибопереключателем ТРР с аффинностью от миллимольной до микромолярной. Были проведены исследования взаимосвязи структура-активность (SAR) с целью получения информации для эффективного конструирования связанного фрагмента лиганда, который связывается с рибопереключателем ТРР с высокой наномольной аффинностью. Принципы из настоящего описания не предназначены для ограничения рибопереключател ТРР, но также могут быть широко применимы к другим структурам РНК-мишени, используя кооперативность и мультисайтовое

связывание для разработки высококачественных лигандов для различных РНК-мишеней.

Таким образом, одним аспектом описанного в настоящем документе объекта изобретения является соединение со структурой формулы (II):

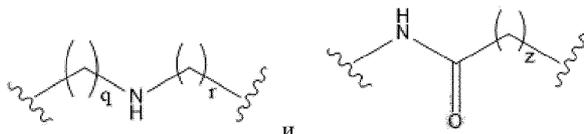


Формула (II)

где X_{2a} и X_{2b} представляют собой CR₁;

X₁ и X₃ представляют собой N;

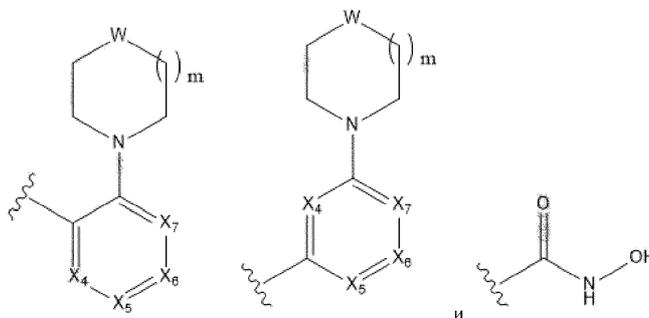
L выбран из



где q и r независимо выбраны из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

z независимо выбран из целых чисел 1, 2, 3, 4 и 5; и

A выбран из



где X₄ и X₇ представляют собой CR₃, и X₅ и X₆ независимо выбраны из CR₃ и N;

где R₁ и R₃ представляют собой -H;

m представляет собой 1;

W представляет собой -O или -NR₄, где R₄ представляет собой -H; или его фармацевтически приемлемая соль.

Еще один аспект описанного в настоящем документе объекта изобретения включает применение соединения, описанного в настоящем документе, в качестве агента, связывающегося с участком кодирующей молекулы РНК, где указанная кодирующая молекула РНК представляет собой мРНК, и участок мРНК представляет собой рибопереключател TPP.

Ниже будут представлены дополнительные аспекты описанного в настоящем документе объекта изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны схемы рабочего процесса скрининга конструкции и фрагментов РНК. Мотивы РНК 1 и 2, штрих-код спирали; показаны спирали кассетной структуры. РНК исследуют с помощью SHAPE в присутствии или отсутствии низкомолекулярного фрагмента, и химические модификации, соответствующие лиганд-зависимой структурной информации, считывают с помощью мультиплексного секвенирования MaP.

На фиг. 2 показаны репрезентативные сравнения коэффициентов мутаций для фрагментов хитов и не фрагментов не хитов. Нормализованные частоты мутаций для образцов, подвергшихся воздействию фрагментов, помечены как +лиганд, +2 или +4 и сравниваются со следами без лиганда, помеченными как без лиганда. Статистически значимые изменения частоты мутаций обозначены треугольниками (см. фиг. 8 для данных подтверждения SHAPE). (верх) Сравнение коэффициентов мутаций для репрезентативного фрагмента, который не связывается с тестовой конструкцией. (середина) Фрагмент хит в участке рибопереключател TPP РНК. (низ) Неспецифический хит, вызывающий изменения реактивности во всей тестовой конструкции. Ориентиры мотивов 1 и 2 показаны под профилями SHAPE.

На фиг. 3А и 3В показано сравнение структур рибопереключател TPP, связанного фрагментом 17 (фиг. 3А), и (фиг. 3В) нативного лиганда TPP (2HOJ²⁸). Структуры РНК показаны в одинаковой ориентации на каждом изображении. Водородные связи между лигандами и РНК показаны пунктирными линиями.

На фиг. 4А и 4В показаны термодинамический цикл и ступенчатая аффинность связывания лиганда для фрагментов 2 и 31. На фиг. 4А показана сводка связывания фрагментов соединением 2 (темно-серый,

K_1) и соединением 31 (светло-серый, K_2). Значения K_D определяются ИТС. На фиг. 4В показаны данные ИТС, показывающие однокомпонентное и совместное связывание фрагментами 2 и 31. Соединение двух фрагментов показывает аддитивный эффект в энергиях связывания, что приводит к субмикромольному лиганду, соединению 37 (K_L). Следы ИТС показаны фоновыми следами (лиганд титруется в буфере) светло-серым цветом, экспериментальные следы показаны темно-серым цветом. Аппроксимация кривых показана с доверительными интервалами 95% серым цветом.

На фиг. 5 показано ковалентное связывание фрагментов 17 и 31 в зависимости от типа и длины линкера, хемотипа концевой группы и ориентации концевой группы. Модификации, повышающие аффинность связывания РНК, присутствуют в соединениях 36 и 37 (светло-серый); отрицательная модификация присутствует в соединениях 35, 39 и 40 (светло-серый), и нейтральная модификация присутствует в соединении 38 (светло-серый). Константы диссоциации определяют по ИТС.

На фиг. 6 показано сравнение лигандов фрагмент-линкер-фрагмент, полученных способами на основе фрагментов, упорядоченных по их коэффициенту связывания (E). Значения показаны на логарифмической оси. Кооперативное связывание соответствует более низким значениям E (верхняя часть вертикальной оси). Фрагмент 37 имеет значение E, равное 2,5, и значение LE, равное 0,34 Константы диссоциации для отдельных фрагментов (слева, посередине) и связанного лиганда (справа) обозначены ниже составных фрагментов; показаны значение E (вверху) и эффективность лиганда (внизу). Ковалентная связь, введенная между фрагментами, выделена светло-серым цветом. Структуры фрагментов компонентов подробно описаны в табл. 7.

На фиг. 7А и 7В показаны дизайн конструкции скрининга. На фиг. 7А показана последовательность РНК (SEQ ID NO: 6) со следующими компонентами: GGUCGCGAGUAAUCGCGACC (SEQ ID NO: 7) представляет собой структурную кассету; GCUGCAAGAGAUUGUAGC (SEQ ID NO: 8) представляет собой штрих-код РНК (штрих-код NT подчеркнут); GUGGGCACUUCGGUGUCCAC (SEQ ID NO: 9) представляет собой структурную кассету; ACGCGAAGGAAACCGCGUGUCAACUGUGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCU (SEQ ID NO: 10) представляет собой псевдоузел DENV (мутации выделены жирным шрифтом); AAAACU представляет собой линкер;

CAGUACUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGAAGGCUGAGAAUACCCGUAUACCCUGAUCACCUGAUCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUG (SEQ ID NO: 11) представляет собой рибопереключитель TPP (мутации выделены жирным шрифтом); и GAUCCGGUUCGCCGAUCAUUCGGGCUUCGGUCCGGUUC (SEQ ID NO: 12) представляет собой структурную кассету. На фиг. 7В показана вторичная структура штрих-кода последовательности РНК в контексте его само-складывающейся шпильки.

На фиг. 8 показаны профили SHAPE для хитов, не хитов и неспецифических хитов фрагментов. Кривые коэффициента мутации, соответствующие контрольным кривым с фрагментом и без лиганда, выделены сплошным серым цветом и обведены черным контуром, соответственно. Нуклеотиды, статистически значимо отличающиеся в образцах с фрагментами и без фрагментов, обозначены треугольниками. Кривые коэффициентов мутаций для тех же фрагментов схематически показаны на фиг. 2.

Подробное описание

Описанный в настоящем документе объект изобретения теперь будет описан более полно в дальнейшем. Однако специалисту в данной области техники, к которой относится описанный в настоящем документе объект изобретения, придут на ум многие модификации и другие варианты реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения, изложенного в настоящем документе, с учетом принципов, представленных в предшествующих описаниях. Следовательно, следует понимать, что описанный в настоящем документе объект изобретения не должен ограничиваться конкретными описанными вариантами реализации и что модификации и другие варианты реализации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения. Другими словами, объект изобретения, описанный в настоящем документе, охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты. В случае, если одно или несколько из включенной литературы, патентов и подобных материалов отличаются или противостоят этому изобретению, включая, помимо прочего, определенные термины, использование терминов, описанные методики и т.п., настоящее изобретение имеет преимущественную силу. Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки.

Определения.

Используемый в настоящем документе термин "алкильная группа" относится к насыщенному углеводородному радикалу, содержащему от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 4 или от 5 до 8 атомов углерода. В некоторых вариантах реализации насыщенный радикал содержит более 8 атомов углерода. Алкильная группа структурно подобна соединению нециклического алкана, модифицированному удалением одного водорода из нециклического алкана и, следовательно, замещением неводородной группы или радикала.

Радикалы алкильной группы могут быть разветвленными или неразветвленными. Радикалы низших алкильных групп имеют от 1 до 4 атомов углерода. Радикалы высших алкильных групп имеют от 5 до 8 атомов углерода. Примеры алкильных, низших алкильных и высших алкильных радикалов включают, без ограничения, метильный, этильный, н-пропильный, изопропильный, н-бутильный, втор-бутильный, трет-бутильный, амильный, тамильный, н-пентильный, н-гексильный, изооктильный и подобные радикалы.

Используемые в настоящем документе обозначения "(CO)" и "C(O)" используются для обозначения карбонильной группы. Примеры подходящих карбонильных групп включают, без ограничения, кетонные и альдегидные группы.

Термин "циклоалкил" относится к углеводороду с 3-8 членами, или 3-7 членами, или 3-6 членами, или 3-5 членами, или 3-4 членами, и может быть моноциклическим или бициклическим. Кольцо может быть насыщенным или может иметь некоторую степень ненасыщенности. Циклоалкильные группы могут быть необязательно замещены одним или несколькими заместителями. В одном варианте реализации 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца циклоалкильной группы могут быть замещены заместителем. Репрезентативные примеры циклоалкильной группы включают циклопропил, циклопентил, циклогексил, циклобутил, циклогептил, циклопентенил, циклопентадиенил, циклогексенил, циклогексадиенил и т.п.

Термин "арил" относится к углеводородной моноциклической, бициклической или трициклической ароматической кольцевой системе. Арильные группы могут быть необязательно замещены одним или несколькими заместителями. В одном варианте реализации 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атома каждого кольца арильной группы могут быть замещены заместителем. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил, антраценил, флуоренил, инденил, азуленил и т.п.

Термин "гетероарил" относится к ароматическим 5-10-членным кольцевым системам, где гетероатомы выбирают из O, N или S, и остальные кольцевые атомы представляют собой углерод (с соответствующими атомами водорода, если не указано иное). Гетероарильные группы могут быть необязательно замещены одним или несколькими заместителями. В одном варианте реализации 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца гетероарильной группы могут быть замещены заместителем. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, фуранил, тиенил, пирролил, оксазолил, оксадиазолил, имидазолил, тиазолил, изоксазолил, хинолинил, пиразолил, изотиазолил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, триазинил, изохинолинил, индазолил и т.п.

Используемый в настоящем документе термин "замещенный" относится к группе (такой как гетероарильная, арильная, алкильная и/или алкенильная), где группа связана с одним или несколькими дополнительными органическими или неорганическими радикалами-заместителями. В некоторых вариантах реализации замещенная группа содержит 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных замещающих групп или радикалов. Подходящие органические и неорганические радикалы-заместители включают, без ограничения, гидроксил, циклоалкил, арил, замещенный арил, гетероарил, гетероциклическое кольцо, замещенное гетероциклическое кольцо, амино, монозамещенный амино, дизамещенный амино, ацилокси, нитро, циано, карбокси, карбоалкокси, алкилкарбоксамид, замещенный алкилкарбоксамид, диалкилкарбоксамид, замещенный диалкилкарбоксамид, алкилсульфонил, алкилсульфинил, тиоалкил, алкокси, замещенный алкокси или галоалкокси радикалы, где термины определены в настоящем документе. Если в настоящем документе не указано иное, органические заместители могут содержать от 1 до 4 или от 5 до 8 атомов углерода. Когда замещенная группа связана с более чем одним радикалом-заместителем, тогда радикалы-заместители могут быть одинаковыми или разными.

Используемый в настоящем документе термин "незамещенный" относится к группе (такой как гетероарильная, арильная, алкенильная и/или алкильная), которая не связана с одним или несколькими дополнительными органическими или неорганическими радикалами-заместителями, как описано выше, что означает, что такая группа замещена только водородом.

Следует понимать, что представленные в настоящем документе структуры и любое перечисление "замещения" или "замещенного" включает неявное условие, что такие структуры и замещение соответствуют разрешенной валентности замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к стабильному соединению, например, которое самопроизвольно не подвергается трансформации, такой как перегруппировка, циклизация, отщепление и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "РНК" относится к рибонуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимерную молекулу, необходимую для выполнения различных биологических ролей в кодировании, декодировании, регуляции и экспрессии генов. РНК и ДНК представляют собой нуклеиновые кислоты и вместе с липидами, белками и углеводами составляют четыре основные макромолекулы, необходимые для всех известных форм жизни. Подобно ДНК, РНК собрана в виде цепочки нуклеотидов, но, в отличие от ДНК, РНК встречается в природе в виде одиночной нити, свернутой сама на себя, а не в виде парной двойной нити. Клеточные организмы используют матричную РНК (мРНК) для передачи генетической информации (с использованием азотистых оснований гуанина, урацила, аденина и цитозина, обозначаемых буквами G, U, A и C), которая управляет синтезом определенных белков. Многие вирусы кодируют свою генетическую информацию с помощью геномной РНК. Некоторые молекулы РНК играют активную роль внутри клеток, катализируя биологические реакции, контролируя экс-

прессию генов или воспринимая и передавая ответы на клеточные сигналы. Одним из таких активных процессов является синтез белка, универсальная функция, при которой молекулы РНК направляют синтез белков на рибосомах. В этом процессе используются молекулы транспортной РНК (тРНК) для доставки аминокислот к рибосоме, где рибосомная РНК (рРНК) затем связывает аминокислоты вместе с образованием закодированных белков.

Используемый в настоящем документе термин "некодирующая РНК (нкРНК)" относится к молекуле РНК, которая не транслируется в белок. Последовательность ДНК, с которой транскрибируется функциональная некодирующая РНК, часто называют геном РНК. Обильные и функционально важные типы некодирующих РНК включают транспортные РНК (тРНК) и рибосомные РНК (рРНК), а также малые РНК, такие как микроРНК, киРНК, пиРНК, мякРНК, мяРНК, вкРНК, мткРНК и длинные нкРНК, такие как Xist и HOTAIR.

Используемый в настоящем документе термин "кодирующая РНК" относится к РНК, которая кодирует белок, т.е. матричной РНК (мРНК). Такие РНК содержат транскриптом.

Используемый в настоящем документе термин "рибопереключитель" относится к регуляторному сегменту молекулы матричной РНК, который связывает небольшую молекулу, что приводит к изменению продукции белка, кодируемого мРНК. Таким образом, мРНК, содержащая рибопереключитель, непосредственно участвует в регуляции собственной активности в ответ на концентрацию ее эффекторной молекулы.

Используемый в настоящем документе термин "рибопереключитель TRP", также известный как элемент THI и рибопереключитель Thi-box, относится к высококонсервативной вторичной структуре РНК. Он служит рибопереклюстителем, который напрямую связывается с тиаминпирофосфатом (TRP), чтобы регулировать экспрессию генов с помощью различных механизмов у архей, бактерий и эукариот. TRP представляет собой активную форму тиамин (витамина B1), незаменимого кофермента, синтезируемого путем связывания пиримидиновых и тиазольных групп в бактериях.

Используемый в настоящем документе термин "псевдоузел" относится к вторичной структуре нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере две структуры стебель-петля, в которых половина одного стебля вставлена между двумя половинами другого стебля. Псевдоузел был впервые обнаружен у вируса желтой мозаики репы в 1982 году. Псевдоузлы складываются в трехмерные конформации в форме узлов, но не являются настоящими топологическими узлами.

"Аптамер" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна связываться с конкретной интересующей молекулой с высокой аффинностью и специфичностью (Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990), и может быть либо сконструирована человеком, либо получена естественным путем. Связывание лиганда с аптамером, которым обычно является РНК, изменяет конформацию аптамера и нуклеиновой кислоты, внутри которой расположен аптамер. В некоторых случаях изменение конформации ингибирует трансляцию мРНК, в которой расположен аптамер, например, или иным образом препятствует нормальной активности нуклеиновой кислоты. Аптамеры также могут состоять из ДНК или могут содержать ненатуральные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Чаще всего аптамер получают путем селекции *in vitro* на связывание молекулы-мишени. Однако возможна и селекция аптамера *in vivo*. Аптамер также является лиганд-связывающим доменом рибопереключителя. Длина аптамера обычно составляет от около 10 до около 300 нуклеотидов. Чаще всего длина аптамера составляет от около 30 до около 100 нуклеотидов. См., например, патент US6949379, включенный в настоящий документ посредством ссылки. Примеры аптамеров, которые можно использовать для настоящего изобретения, включают, без ограничения, аптамер PSMA (McNamara et al., 2006), аптамер CTLA4 (Santulli-Marotto et al., 2003) и аптамер 4-1BB (McNamara et al., 2007).

Используемый в настоящем документе термин "ПЦР" означает полимеразную цепную реакцию и относится к способу, широко используемому в молекулярной биологии для быстрого создания от миллионов до миллиардов копий конкретного образца ДНК, что позволяет ученым брать очень маленький образец ДНК и амплифицировать его до достаточно большого количества для детального изучения.

Фраза "фармацевтически приемлемый" указывает на то, что вещество или композиция химически и/или токсикологически совместимы с другими ингредиентами, входящими в состав, и/или с субъектом, которого они лечат.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль", используемая в настоящем документе, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Примеры солей включают, без ограничения, сульфатную, цитратную, ацетатную, оксалатную, хлоридную, бромидную, йодидную, нитратную, бисульфатную, фосфатную, гидрофосфатную, изоникотинатную, лактатную, салицилатную, гидроцитратную, тартратную, олеатную, таннатную, пантотенатную, битартратную, аскорбатную, сукцинатную, малеатную, гентизинатную, fumarатную, глюконатную, глюкуроонатную, сахаратную, формиатную, бензоатную, глутаматную, метансульфонатную "месилатную", этансульфонатную, бензолсульфонатную, п-толуолсульфонатную, памоатную (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатную)) соль, соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противо-

ион может быть любой органической или неорганической частью, которая стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более одного заряженного атома. В случаях, когда частью фармацевтически приемлемой соли являются несколько заряженных атомов, соль может иметь несколько противоионов.

Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Используемый в настоящем документе термин "носители" включает фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с pH-буфером. Неограничивающие примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый носитель представляет собой ненатуральный фармацевтически приемлемый носитель.

Термины "лечить" и "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие или распространение рака. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение распространенности заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссии (частичной или полной), обнаруживаемой или неопределяемой. "Лечение" также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто склонен к состоянию или расстройству, или тех, у кого это состояние или расстройство необходимо предотвратить.

Термин "введение" или "назначение" включает пути введения соединения(й) субъекту для выполнения их предполагаемой функции. Примеры путей введения, которые можно использовать, включают инъекцию (включая, без ограничения, подкожную, внутривенную, парентеральную, внутрибрюшинную, подбололочечную), местную, пероральную, ингаляционную, ректальную и трансдермальную.

Термин "эффективное количество" включает количество, эффективное в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Эффективное количество соединения может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст и вес субъекта, а также способность соединения вызывать желаемый ответ у субъекта. Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа.

Фразы "системное введение", "вводимый системно", "периферическое введение" и "вводимый периферически", используемые в настоящем документе, означают введение соединения(ий), лекарственного средства или другого материала таким образом, что оно попадает в организм пациента и, таким образом, подвергается метаболизму и другим подобным процессам.

Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество соединения по настоящему изобретению, которое (i) лечит или предотвращает конкретное заболевание, состояние или расстройство, (ii) ослабляет, облегчает или устраняет один или несколько симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства, или (iii) предотвращает или задерживает появление одного или нескольких симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства, описанных в настоящем документе. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчить до некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком. В той мере, в какой лекарственное средство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака эффективность можно измерить, например, путем оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или определения частоты ответа (RR).

Термин "субъект" относится к животным, таким как млекопитающие, включая, без ограничения, приматов (например, людей), коров, овец, коз, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей и т.п. В некоторых вариантах реализации субъектом является человек.

Настоящее описание направлено на стратегию обнаружения лигандов на основе фрагментов, под-

ходящую для идентификации малых молекул, которые связываются со специфическими участками РНК с высокой аффинностью. Как правило, обнаружение лигандов на основе фрагментов позволяет идентифицировать один или несколько низко-молекулярных "фрагментов" с низкой или средней аффинностью, которые связываются с интересующей мишенью. Затем эти фрагменты либо дорабатываются, либо связываются для создания более мощных лигандов^{13,14}. Как правило, эти фрагменты имеют молекулярную массу менее 300 Да, и для того, чтобы их можно было обнаружить, они обеспечивают существенные высококачественные контакты с интересующей мишенью.

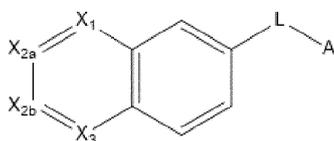
Обнаружение лиганда на основе фрагментов до сих пор успешно применялось только для идентификации первоначальных хитовых соединений, которые представляют собой хиты одиночного фрагмента, связывающиеся с данной РНК¹⁵⁻¹⁹. Идентификация множественных фрагментов, которые связывают одну и ту же РНК, делает возможным использование потенциальных аддитивных и кооперативных взаимодействий между фрагментами внутри связывающего кармана^{20,21}. Однако недавно было показано, что многие РНК связывают свои лиганды через несколько "субсайтов", которые представляют собой участки кармана связывания, которые контактируют с лигандом независимым или кооперативным образом²². Кроме того, было показано, что связывание РНК с высокой аффинностью может происходить даже тогда, когда связывание субсайтов показывает лишь скромные кооперативные эффекты. Эти признаки являются хорошим знаком для эффективности обнаружения лигандов на основе фрагментов когда применяются к РНК-мишеням.

Таким образом, исходя из вышеизложенного, настоящее описание направлено на способы идентификации фрагментов, которые связываются с представляющей интерес РНК, такой как, например, рибопереключател ТРР. Во-вторых, описанные способы направлены на установление позиционирования связывания фрагмента в РНК с разрешением примерного нуклеотида. В-третьих, описанные способы направлены на идентификацию фрагментов второго сайта, которые связываются рядом с местом хита исходного фрагмента. Описанный способ объединяет подход к обнаружению лиганда на основе фрагментов с зондированием структуры РНК SHAPE-MaP^{23,24}, которое использовали как для идентификации РНК-связывающих фрагментов, так и для установления отдельных сайтов связывания фрагментов. Лиганд, в конечном итоге созданный путем связывания двух фрагментов, не имеет сходства с лигандом нативного рибопереключател и связывает структурно сложную РНК рибопереключател ТРР с высокой аффинностью.

Описанные способы и идентификация лигандов будут описаны более подробно ниже.

А. Соединения.

Первый аспект описанного в настоящем документе объекта изобретения представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (II):

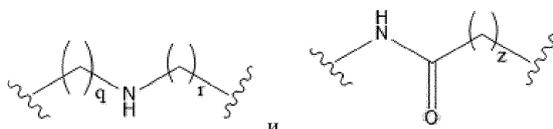


Формула (II)

где X_{2a} и X_{2b} представляют собой CR₁;

X₁ и X₃ представляют собой N;

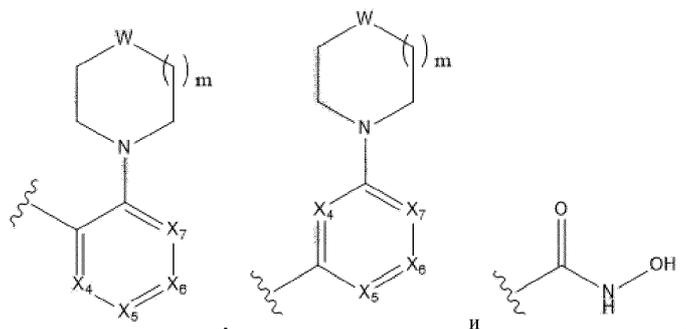
L выбран из



где q и r независимо выбраны из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4 и 5;

z независимо выбран из целых чисел 1, 2, 3, 4 и 5; и

A выбран из



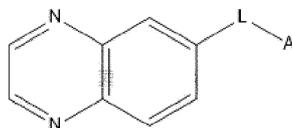
где X_4 и X_7 представляют собой CR_3 , и X_5 и X_6 независимо выбраны из CR_3 и N ;

где R_1 и R_3 представляют собой $-H$;

m представляет собой 1;

W представляет собой $-O$ или $-NR_4$, где R_4 представляет собой $-H$; или его фармацевтически приемлемая соль.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации, соединение, имеющее структуру формулы (III):

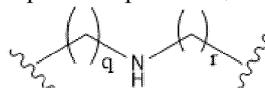


Формула (III)

где L и A такие же, как для формулы (II).

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где q и r независимо выбирают из целых чисел 0, 1, 2 и 3.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где L представляет собой



Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где q и r представляют собой 0 или 1.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где q представляет собой 1.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где r представляет собой 1.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где r представляет собой 0.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где q и r представляют собой 1.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где q представляет собой 1 и r представляет собой 0.

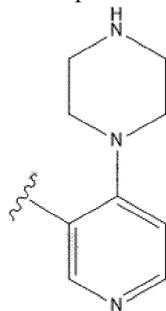
Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где W представляет собой $-NH$.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где X_5 представляет собой N .

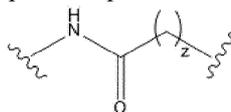
Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где X_6 представляет собой N .

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где X_5 или X_6 представляют собой N , и оба X_4 и X_7 независимо представляют собой CR_3 .

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где A представляет собой

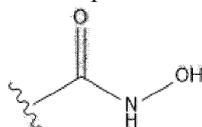


Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где L представляет собой

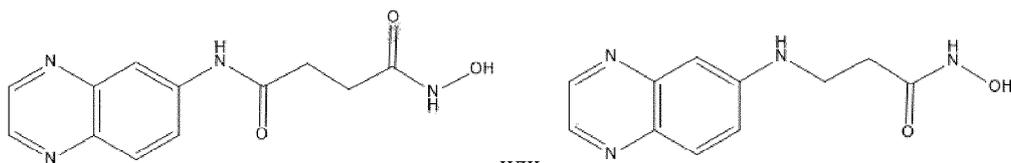


Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где z представляет собой 2.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где A представляет собой

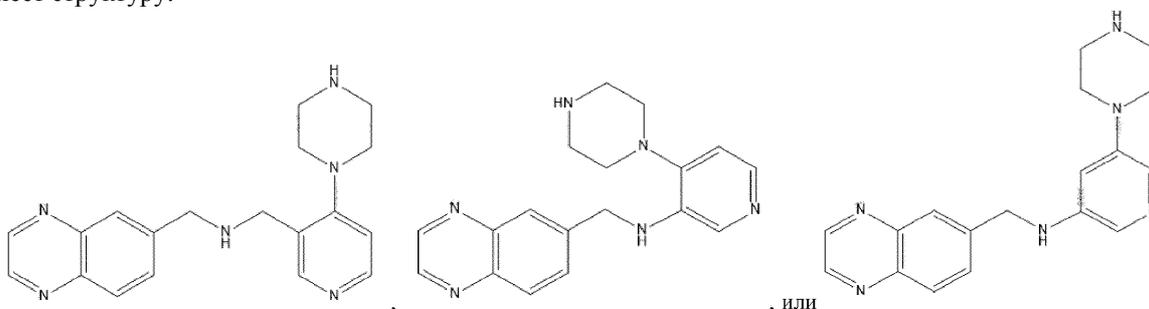


Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где указанное соединение имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

Как и в любом из указанных выше вариантов реализации соединения, где указанное соединение имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

Б. Способы скрининга.

Настоящее описание направлено на разработку и проверку гибкого селективного 2'-гидроксилацилирования, анализируемого способом скрининга фрагментов на основе удлинения праймера (SHAPE). Обнаружение лигандов на основе фрагментов оказалось эффективным подходом для идентификации соединений, которые образуют существенные тесные контакты с макромолекулами, включая РНК^{13,14,17}. Необходимым условием успеха этой стратегии открытия является адаптируемый, высококачественный, биофизический анализ для обнаружения связывания лиганда. Таким образом, в некоторых вариантах реализации для обнаружения связывания лиганда²³⁻²⁵ использовали исследование структуры SHAPE РНК, которое измеряет локальную гибкость нуклеотидов как относительную реакционную способность 2'-гидроксильной группы рибозы по отношению к электрофильным реагентам. SHAPE может использоваться для любой РНК и предоставляет данные практически обо всех нуклеотидах в РНК в одном эксперименте, предоставляя информацию о структуре каждого нуклеотида в дополнение к простому обнаружению связывания, и более подробно описан ниже. Кроме того, настоящее описание также направлено на применение SHAPE-мутационного профилирования (MaP)^{23,24}, которое объединяет SHAPE со считыванием с помощью высокопроизводительного секвенирования, обеспечивая мультиплексирование и эффективный высокопроизводительный анализ многих тысяч образцов.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящее описание относится к способу скрининга с использованием SHAPE и/или SHAPE-MaP для идентификации низкомолекулярных фрагментов и/или соединений, которые связываются и/или ассоциируются с представляющей интерес молекулой РНК. Способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают использование SHAPE и/или SHAPE-MaP для идентификации низкомолекулярных фрагментов (например, фрагмент 2), которые связываются и/или ассоциируются с молекулой РНК, которая уже предварительно инкубирована с другим низкомолекулярным фрагментом (например, фрагмент 1). Не ограничиваясь теорией, но считается, что фрагмент 1 связывается с первым сайтом связывания, и фрагмент 2 связывается со вторым сайтом связывания (например, подсайтом) в одной и той же молекуле РНК. Таким образом, считается, что объединение структурных признаков фрагмента 1 и фрагмента 2 (например, соединение двух фрагментов линкером L) для создания соединений, как описано в настоящем документе, придает лигандам связанных фрагментов повышенную аффинность связывания РНК по сравнению с фрагментом 1 и/или фрагментом 2 в одиночку.

Способы скрининга SHAPE и SHAPE-MaP более подробно описаны ниже.

I. Химия SHAPE.

Химия SHAPE основана, по меньшей мере частично, на наблюдении, что нуклеофильность рибозы в 2'-положении РНК чувствительна к электронному влиянию соседней 3'-фосфодиэфирной группы. Неограниченные нуклеотиды пробуют больше конформаций, которые повышают нуклеофильность 2'-гидроксильной группы, чем нуклеотиды с парами оснований или иным образом ограниченные. Следовательно, гидроксил-селективные электрофилы, такие как, без ограничения, N-метилизатоевый ангидрид (NMIA), быстрее образуют стабильные 2'-О-аддукты с гибкими нуклеотидами РНК. Локальную гибкость нуклеотидов можно исследовать одновременно во всех положениях молекулы РНК в одном эксперименте, поскольку все нуклеотиды РНК (за исключением нескольких клеточных РНК, несущих посттранскрипционные модификации) имеют 2'-гидроксильную группу. Абсолютную реактивность SHAPE можно сравнивать по всем положениям в РНК, поскольку реактивность 2'-гидроксила нечувствительна к идентичности оснований. Также возможно, что нуклеотид может быть реактивным, потому что он находится

в конформации, которая увеличивает нуклеофильность конкретного 2'-гидроксила. Ожидается, что этот класс нуклеотидов будет редким, будет включать неканоническую локальную геометрию и будет правильно оценен как неспаренное положение.

В настоящее время описанный объект изобретения обеспечивает в некоторых вариантах реализации способы обнаружения структурных данных в молекуле РНК исследуя структурные ограничения в молекуле РНК произвольной длины и структурной сложности. В некоторых вариантах реализации способы включают отжиг молекулы РНК, содержащей 2'-О-аддукты, с (меченым) праймером; отжиг молекулы РНК, не содержащей 2'-О-аддуктов, с (меченым) праймером в качестве отрицательного контроля; расширение праймеров для получения библиотеки кДНК; анализ кДНК; и создание выходных файлов, содержащих структурные данные для РНК.

Молекула РНК может присутствовать в биологическом образце. В некоторых вариантах реализации молекула РНК может быть модифицирована в присутствии белка или других малых и больших биологических лигандов и/или соединений. Праймеры необязательно могут быть помечены радиоизотопами, флуоресцентными метками, тяжелыми атомами, ферментативными метками, хемилюминесцентной группой, биотинильной группой, заданным полипептидным эпитопом, распознаваемым вторичным репортером, или их комбинациями. Анализ может включать разделение, количественную оценку, определение размера или их комбинацию. Анализ может включать извлечение данных о флуоресценции или количестве красителя в зависимости от данных о времени элюирования, которые называются следами. Например, кДНК можно анализировать в одной колонке прибора капиллярного электрофореза или в микрофлюидном устройстве.

В некоторых вариантах реализации можно рассчитать площадь пика в кривых для молекулы РНК, содержащей 2'-О-аддукты, и для молекулы РНК, не содержащей 2'-О-аддуктов, по сравнению с последовательностью нуклеотидов. Кривые можно сравнить и выровнять с последовательностями РНК. Кривые, наблюдаемые и учитывающие те кДНК, генерируемые секвенированием, на один нуклеотид длиннее, чем соответствующие положения в следах для РНК, содержащей 2'-О-аддукты, и для молекулы РНК, не содержащей 2'-О-аддуктов. Площади под каждым пиком можно определить, выполнив интегрирование всей кривой по Гауссу.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации в настоящем документе предусмотрены способы образования ковалентных 2'-О-аддуктов рибозы с молекулой РНК в сложных биологических растворах. В некоторых вариантах реализации способ включает приведение в контакт электрофила с молекулой РНК, где электрофил селективно модифицирует свободные нуклеотиды в молекуле РНК с образованием ковалентного 1'-О-аддукта рибозы.

В некоторых вариантах реализации электрофил, такой как, без ограничения, N-метилизотоевый ангидрид (NMIА), растворяют в безводном полярном апротонном растворителе, таком как DMSO. Раствор реагент-растворитель добавляют к сложному биологическому раствору, содержащему молекулу РНК. Раствор может содержать различные концентрации и количества белков, клеток, вирусов, липидов, моно- и полисахаридов, аминокислот, нуклеотидов, ДНК, и различных солей, и метаболитов. Концентрацию электрофила можно регулировать для достижения желаемой степени модификации молекулы РНК. Электрофил может реагировать со всеми свободными гидроксильными группами в растворе, образуя 2'-О-аддукты рибозы на молекуле РНК. Кроме того, электрофил может селективно модифицировать неспаренные или иным образом не ограниченные нуклеотиды в молекуле РНК.

Молекула РНК может подвергаться воздействию электрофила в концентрации, которая приводит к редкой модификации РНК с образованием 2'-О-аддуктов, что можно обнаружить по способности ингибировать удлинение праймера обратной транскриптазой. Все сайты РНК могут быть исследованы в одном эксперименте, потому что химия нацелена на общую реакционную способность 2'-гидроксильной группы. В некоторых вариантах реализации, параллельно можно проводить контрольную реакцию удлинения, исключаящую электрофил для оценки фона, а также удлинение дидезокси-секвенирования для определения положений нуклеотидов. Эти комбинированные стадии называются селективным 2'-гидроксилацилизацией, анализируемым с помощью удлинения праймера, или SHAPE.

В некоторых вариантах реализации, способ дополнительно включает приведение в контакт молекулы РНК, содержащей 1'-О-аддукт, с (меченым) праймером, приведение в контакт РНК, не содержащей 2'-О-аддукта, с (меченым) праймером в качестве отрицательного контроля; удлинение праймеров с получением линейного массива кДНК, анализ кДНК и создание выходных файлов, содержащих структурные данные РНК.

Количество нуклеотидов, исследуемых в одном эксперименте SHAPE, зависит не только от обнаружения и разрешения используемой технологии разделения, но и от характера модификации РНК. Учитывая условия реакции, существует длина, при которой почти все молекулы РНК имеют по меньшей мере одну модификацию. Когда удлинение праймера достигает этих длин, количество удлиняющихся кДНК уменьшается, что ослабляет экспериментальный сигнал. Регулировка условий для уменьшения выхода модификации может увеличить длину считывания. Однако снижение выхода реагента может также уменьшить измеренный сигнал для каждой длины кДНК. С учетом этих соображений предпочтительная максимальная длина одного считывания SHAPE, вероятно, составляет, без ограничения, около 1

килобазы РНК.

II. SHAPE-Map.

В SHAPE-Map, аддукты SHAPE обнаруживаются с помощью мутационного профилирования (MaP), в котором используется способность ферментов обратной транскриптазы включать некоплементарные нуклеотиды или создавать делеции в сайтах химических аддуктов SHAPE. В некоторых вариантах реализации SHAPE-Map можно использовать для создания библиотеки и секвенирования. В некоторых вариантах реализации в SHAPE-Map можно использовать методики мультиплексирования.

Обычно РНК обрабатывают реагентом SHAPE, который реагирует на конформационно-динамические нуклеотиды. Во время обратной транскрипции полимеразы считывает химические аддукты в РНК и включает в кДНК нуклеотид, не комплементарный исходной последовательности. Полученная кДНК секвенируется с использованием любого массивно-параллельного подхода для создания мутационных профилей (MaP). Считывание секвенирования выравнивают с эталонной последовательностью, и рассчитывают коэффициенты мутаций с нуклеотидным разрешением, корректируют по фону и нормализуют, получая стандартный профиль реактивности SHAPE. Затем реактивность SHAPE можно использовать для моделирования вторичных структур, визуализации конкурирующих и альтернативных структур или количественной оценки любого процесса или функции, которые модулируют локальную динамику нуклеотидной РНК. После SHAPE-модификации молекулы РНК, для создания мутационного профиля используется обратная транскриптаза. На данной стадии кодируется положение и относительная частота аддуктов SHAPE как мутаций в кДНК. кДНК преобразуют в дцДНК с использованием известных в данной области способов (например, реакции ПЦР), и дцДНК дополнительно амплифицируют во второй реакции ПЦР, тем самым добавляя секвенирование для мультиплексирования. После очистки, библиотеки секвенирования имеют одинаковый размер, и каждая молекула ДНК содержит всю интересующую последовательность.

Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения предусмотрены способы обнаружения одной или нескольких химических модификаций в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации способ включает получение нуклеиновой кислоты, предположительно имеющей химическую модификацию; синтез нуклеиновой кислоты с использованием полимеразы и полученной нуклеиновой кислоты в качестве матрицы, где синтез происходит в условиях, когда полимеразы считывает химическую модификацию в полученной нуклеиновой кислоте, чтобы тем самым произвести неправильный нуклеотид в полученной нуклеиновой кислоте в сайте химической модификации; и обнаружение неправильного нуклеотида.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения предусмотрены способы обнаружения структурных данных в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации способ включает получение нуклеиновой кислоты, предположительно имеющей химическую модификацию; синтез нуклеиновой кислоты с использованием полимеразы и полученной нуклеиновой кислоты в качестве матрицы, где синтез происходит в условиях, когда полимеразы считывает химическую модификацию в полученной нуклеиновой кислоте, чтобы тем самым произвести неправильный нуклеотид в полученной нуклеиновой кислоте в сайте химической модификации; обнаружение неправильного нуклеотида; и создание выходных файлов, содержащих структурные данные для полученной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения полученная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК (например, кодирующую РНК и/или некодирующую молекулу РНК). В некоторых вариантах реализации способы включают обнаружение двух или более химических модификаций. В некоторых вариантах реализации полимеразы считывает множество химических модификаций для получения множества неправильных нуклеотидов, и способы включают обнаружение каждого неправильного нуклеотида.

В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота (например, молекула РНК) подвергалась воздействию реагента, который обеспечивает химическую модификацию, или химическая модификация уже существует в нуклеиновой кислоте (например, молекуле РНК). В некоторых вариантах реализации ранее существовавшая модификация представляет собой 2'-О-метильную группу и/или представляет собой созданную клеткой, из которой получена нуклеиновая кислота, например, без ограничения, эпигенетическую модификацию и/или модификацию 1-метиладенозин, 3-метилцитозин, 6-метиладенозин, 3-метилуридин и/или 2-метилгуанозин. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты, такие как молекула РНК, могут быть модифицированы в присутствии белка или других малых и больших биологических лигандов и/или соединений.

В некоторых вариантах реализации реагент содержит электрофил. В некоторых вариантах реализации электрофил селективно модифицирует свободные нуклеотиды в молекуле РНК с образованием ковалентного 2'-О-аддукта рибозы. В некоторых вариантах реализации реагент представляет собой 1 M7, 1 M6, NMIA, DMS или их комбинации. В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота присутствует в биологическом образце или получена из него.

В некоторых вариантах реализации полимеразы представляет собой обратную транскриптазу. В некоторых вариантах реализации полимеразы представляет собой нативную полимеразу или мутантную

полимеразу. В некоторых вариантах реализации синтезированная нуклеиновая кислота представляет собой кДНК.

В некоторых вариантах реализации обнаружение неправильного нуклеотида включает секвенирование нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации информация о последовательности соответствует последовательности полученной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации обнаружение неправильного нуклеотида включает использование массового параллельного секвенирования нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способ включает амплификацию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способ включает амплификацию нуклеиновой кислоты с использованием сайт-нацеленного подхода с использованием специфических праймеров, полного генома с использованием случайного праймирования, всего транскриптома с использованием случайного праймирования или их комбинации.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения обеспечиваются компьютерные программные продукты, содержащие исполняемые компьютером инструкции, реализованные в машиночитаемом носителе, при выполнении стадий, включающих любую стадию способа любого варианта реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения, обеспечены библиотеки нуклеиновых кислот, полученные любым способом в соответствии с описанным в настоящем документе объектом изобретения.

III. Электрофилы SHAPE.

Как описано выше, химия SHAPE использует преимущество открытия того, что нуклеофильная реакционная способность 2'-гидроксильной группы рибозы регулируется локальной гибкостью нуклеотида. В нуклеотидах, ограниченных спариванием оснований или третичными взаимодействиями, анион 3'-фосфодиэфира и другие взаимодействия снижают реакционную способность 2'-гидроксила. Напротив, гибкие положения предпочтительно принимают конформации, которые реагируют с электрофилом, включая, без ограничения, NMIA, с образованием 2'-O-аддукта. Например, NMIA обычно реагирует со всеми четырьмя нуклеотидами, и реагент подвергается параллельной самоинактивирующей реакции гидролиза. Действительно, описанный в настоящем документе объект изобретения предусматривает, что любая молекула, которая может реагировать с нуклеиновой кислотой, как описано в настоящем документе, может быть использована в соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в настоящем документе объекта изобретения. В некоторых вариантах реализации, электрофил (также называемый реагентом SHAPE) может быть выбран, без ограничения, из производного изатоевого ангидрида, производного бензоилцианида, производного бензоилхлорида, производного фталевого ангидрида, производного бензилоцианата и их комбинации. Производное изатоевого ангидрида может включать 1-метил-7-нитроизатоевый ангидрид (1M7). Производное бензоилцианида может быть выбрано из группы, включающей, без ограничения, бензоилцианид (BC), 3-карбоксобензоилцианид (3-CBC), 4-карбоксобензоилцианид (4-CBC), 3-аминометилбензоилцианид (3-AMBC), 4-аминометилбензоилцианид и их комбинации. Производное бензоилхлорида может включать бензоилхлорид (BCI). Производное фталевого ангидрида может включать 4-нитрофталевый ангидрид (4NPA). Производное бензилоцианата может включать бензилоцианат (BIC).

IV. Молекулярный дизайн РНК.

Поскольку реактивность SHAPE можно оценить в одной или нескольких реакциях удлинения праймера, информация может быть потеряна как на 5'-конце, так и вблизи сайта связывания праймера молекулы РНК. Как правило, образование аддукта на 10-20 нуклеотидах, прилегающих к сайту связывания праймера, трудно поддается количественной оценке из-за присутствия фрагментов кДНК, которые отражают паузу или нематричное удлинение ферментом обратной транскриптазы (RT) во время фазы инициации удлинения праймера. Позиции 8-10 на 5'-конце РНК трудно визуализировать из-за присутствия избытка продукта удлинения полной длины.

Для мониторинга реактивности SHAPE на 5'- и 3'-концах интересующей последовательности молекула РНК может быть встроена в более крупный фрагмент нативной последовательности или помещена между последовательностями РНК с сильной укладкой, которые содержат уникальный сайт связывания праймера. В некоторых вариантах реализации можно сконструировать структурную кассету, содержащую 5'- и 3'-фланкирующие последовательности нуклеотидов, чтобы можно было оценить все положения внутри интересующей молекулы РНК с помощью любого способа разделения, обеспечивающего разрешение нуклеотидов, такого как, без ограничения, гель для секвенирования, капиллярный электрофорез и т.п. В некоторых вариантах реализации как 5', так и 3' удлинения могут складываться в стабильные шпильчатые структуры, которые не мешают сворачиванию различных внутренних РНК. Сайт связывания праймера кассеты может эффективно связываться с праймером кДНК. Последовательность любых 5' и 3' структурных кассетных элементов можно проверить, чтобы убедиться, что они не склонны к образованию взаимодействий стабильного спаривания оснований с внутренней последовательностью.

В некоторых вариантах реализации интересующая молекула РНК содержит два разных мотива-мишени, которые связаны нуклеотидным линкером. Мотивом-мишенью может быть любая интересующая нуклеотидная последовательность. Типичные мотивы-мишени включают, без ограничения, рибопе-

реключатели, вирусные регуляторные элементы, структурированные участки в мРНК, многоспиральные соединения, псевдоузлы и/или аптамеры. В некоторых вариантах реализации первый мотив-мишень представляет собой псевдоузел, такой как псевдоузел из 5'UTR генома вируса денге. В некоторых вариантах реализации второй мотив-мишень представляет собой аптамерный домен, такой как аптамерный домен рибопереклювателя ТРР. Для нуклеотидного линкера количество нуклеотидов может варьироваться. Например, в некоторых вариантах реализации количество нуклеотидов в линкере составляет от около 1 до около 20 нуклеотидов, от около 1 до около 15 нуклеотидов, от около 1 до около 10 нуклеотидов или от около 5 до около 10 нуклеотидов (или составляет около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 нуклеотидов).

В некоторых вариантах реализации молекула РНК дополнительно содержит участок штрих-кода РНК. Участок штрих-кода РНК представляет собой уникальный штрих-код, который позволяет идентифицировать конкретную молекулу РНК в смеси молекул РНК (например, во время мультиплексирования). Расположение участка штрих-кода РНК может варьироваться, но обычно она находится рядом с одной из кассет, присутствующих в молекуле РНК. В некоторых вариантах реализации штрих-код РНК предназначен для складывания в автономную структуру, которая не взаимодействует ни с какой другой частью молекулы РНК. Структура участка штрих-кода РНК может варьироваться. В некоторых вариантах реализации структура участка штрих-кода РНК содержит спираль пары оснований, содержащую от около 1 до около 10 пар оснований (или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 пар оснований). В некоторых вариантах реализации участок штрих-кода РНК содержит 7 пар оснований. В некоторых вариантах реализации пары оснований закрыты тетраплетей, прикрепленной к концевой паре оснований спирали пары оснований. Закрытие спирали пары оснований поддерживает общую стабильность шпильки участка штрих-кода РНК. В некоторых вариантах реализации, тетраплетя содержит нуклеотидную последовательность GNRA, но не означает, что она ограничена этим. В некоторых вариантах реализации участок штрих-кода РНК сконструирован таким образом, что любой отдельный штрих-код претерпевает по меньшей мере две мутации, которые могут быть неправильно истолкованы как другой штрих-код.

V. Складывание молекулы РНК.

Описанный в настоящем документе объект изобретения может быть осуществлен с использованием молекул РНК, генерируемых способами, включая, без ограничения, транскрипцию *in vitro* и молекулы РНК, генерируемые в клетках и вирусах. В некоторых вариантах реализации молекулы РНК можно очищать путем денатурирующего гель-электрофореза и денатурировать до достижения биологически релевантной конформации. Кроме того, можно заменить любую процедуру, которая складывает молекулы РНК в желаемую конформацию при желаемом рН (например, около рН 8). Молекулы РНК можно сначала нагреть, а затем резко охладить в буфере с низкой ионной силой для устранения мультимерных форм. Затем можно добавить раствор для укладки, чтобы позволить молекулам РНК достичь соответствующей конформации и подготовить ее для структурно-чувствительного зондирования с помощью электрофила. В некоторых вариантах реализации РНК может быть сложена в ходе одной реакции, и затем разделена на (+) и (-) электрофильные реакции. В некоторых вариантах реализации молекула РНК представляет собой не нативно уложенную перед модификацией. Модификация может иметь место, когда молекула РНК денатурируется под воздействием тепла и/или в условиях низкого содержания солей.

VI. Модификация молекулы РНК.

Электрофил можно добавить к РНК, чтобы получить 2'-О-аддукты в гибких положениях нуклеотидов. Затем реакцию можно инкубировать до тех пор, пока практически весь электрофил либо не прореагирует с РНК, либо не разложится из-за гидролиза водой. Никакой специальной стадии гашения не требуется. Модификация может происходить в присутствии сложных лигандов и биомолекул, а также в присутствии различных солей. РНК также может быть модифицирована внутри клеток и вирусов. Эти соли и сложные лиганды могут включать соли магния, натрия, марганца, железа и/или кобальта. Сложные лиганды могут включать, помимо прочего, белки, липиды, другие молекулы РНК, ДНК или небольшие органические молекулы. В некоторых вариантах реализации сложный лиганд представляет собой низкомолекулярный фрагмент, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации сложный лиганд представляет собой соединение, как описано в настоящем документе. Модифицированную РНК можно очистить от продуктов реакции и компонентов буфера, которые могут нарушать реакцию удлинения праймера, например, осаждением этанолом.

VII. Удлинение праймера и полимеризация.

Анализ аддуктов РНК путем удлинения праймера в соответствии с описанным в настоящем документе объектом изобретения может включать в различных вариантах реализации использование оптимизированного сайта связывания праймера, термостабильного фермента обратной транскриптазы, низкой концентрации $MgCl_2$, повышенной температуры, короткого времени удлинения и комбинаций любого из упомянутого выше. Интактная, неразложившаяся РНК, свободная от побочных продуктов реакции и других низкомолекулярных загрязнителей, также может использоваться в качестве матрицы для обратной транскрипции. РНК-компонент полученных гибридов РНК-кДНК может быть разложен обработкой основанием. Фрагменты кДНК затем могут быть разделены с использованием, например, полиакриламидного геля для секвенирования, капиллярного электрофореза или другой методики разделения, которая будет очевидна специалисту в данной области техники после ознакомления с настоящим описанием.

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты dATP, dCTP, dGTP и dTTP и/или дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dNTP) могут быть добавлены к смеси для синтеза отдельно или вместе с праймерами в адекватных количествах, и полученный раствор может быть нагрет до около 50-100°C от около 1 до 10 мин. После периода нагрева раствор можно охладить. В некоторых вариантах реализации к охлажденной смеси можно добавить подходящий агент для осуществления реакции удлинения праймера, и реакция может протекать в условиях, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации агент для полимеризации можно добавлять вместе с другими реагентами, если он термостабилен. В некоторых вариантах реализации, реакция синтеза (или амплификации) может происходить при комнатной температуре. В некоторых вариантах реализации, реакция синтеза (или амплификации) может происходить до температуры, выше которой агент для полимеризации больше не действует.

Агент для полимеризации может быть любым соединением или системой, функционирующей для осуществления синтеза продуктов удлинения праймера, включая, например, ферменты. Подходящие ферменты для этой цели включают, без ограничения, ДНК-полимеразу I *E. Coli*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, мутеины полимеразы, обратную транскриптазу и другие ферменты, включая термостабильные ферменты (т.е. которые выполняют удлинение праймера после воздействия температур, достаточно повышенных, чтобы вызвать денатурацию), таких как ферменты обратной транскриптазы мыши или птицы. Подходящие ферменты могут облегчить комбинирование нуклеотидов надлежащим образом с образованием продуктов удлинения праймера, которые комплементарны каждой цепи нуклеиновой кислоты полиморфного локуса. В некоторых вариантах реализации синтез может быть иницирован на 5' конце каждого праймера и продолжаться в 3' направлении до тех пор, пока синтез не завершится на конце матрицы путем включения дидезоксинуклеотидтрифосфата или на 2'-О-аддукте, образуя молекулы разной длины.

Вновь синтезированная цепь и комплементарная ей цепь нуклеиновой кислоты могут образовывать двухцепочечную молекулу в условиях гибридизации, описанных в настоящем документе, и данный гибрид используют на последующих стадиях, так как описано в способах, описанных в патенте US 10240188 и патенте US 8318424, которые включены в настоящий документ во всей их полноте. В некоторых вариантах реализации вновь синтезированная двухцепочечная молекула также может быть подвергнута денатурации с использованием любой из процедур, известных в данной области техники, для получения одноцепочечных молекул.

VIII. Обработка исходных данных.

Объект, описанный в настоящем документе для нуклеиновой кислоты, такой как молекулы РНК, анализа химической модификации и/или анализа структуры нуклеиновой кислоты, может быть реализован с использованием компьютерного программного продукта, содержащего исполняемые компьютером инструкции, воплощенные в машиночитаемом носителе. Примеры машиночитаемых носителей, пригодных для реализации объекта изобретения, описанного в настоящем документе, включают устройства памяти на микросхемах, устройства памяти на дисках, программируемые логические устройства и интегральные схемы для конкретных приложений. Кроме того, компьютерный программный продукт, который реализует объект изобретения, описанный в настоящем документе, может быть расположен на одном устройстве или вычислительной платформе или может быть распределен по нескольким устройствам или вычислительным платформам. Таким образом, объект, описанный в настоящем документе, может включать в себя набор компьютерных инструкций, которые при выполнении компьютером выполняют определенную функцию для нуклеиновой кислоты, такую как анализ структуры РНК.

Принимая во внимание пункты I-VII, упомянутые выше, была разработана модульная конструкция для скрининга РНК для реализации SHAPE в качестве высокопроизводительного анализа для считывания связывания лиганда (фиг. 1, сверху).

Конструкция была разработана так, чтобы содержать два мотива-мишени, такие как псевдоузел из 5'UTR генома вируса денге, который снижает приспособленность вируса при нарушении его структуры²⁶, и аптамерный домен рибопереклювателя TRP²⁷⁻²⁹. Включение двух различных структурных мотивов в единую конструкцию позволило каждому служить внутренним контролем специфичности для другого. Фрагменты, которые связывались с обеими структурами РНК, легко идентифицировались как неспецифические связыватели. Эти две структуры были соединены шестинуклеотидным линкером, разработанным как одноцепочечный, чтобы позволить двум структурам РНК оставаться структурно независимыми. По бокам структурного ядра конструкции находятся структурные кассеты²⁵; эти участки, образующие стебель-петлю, используются в качестве сайтов связывания праймеров для стадий, необходимых в рабочем процессе скрининга, и были разработаны так, чтобы не взаимодействовать с другими структурами в конструкции (фиг. 7).

Другим компонентом скрининговой конструкции является штрих-код РНК; штриховое кодирование позволяет мультиплексировать, что существенно снижает рабочую нагрузку на нисходящем направлении. Каждая лунка 96-луночного планшета, используемого для скрининга библиотеки фрагментов, содержит РНК с уникальным штрих-кодом в контексте идентичной конструкции; последовательность штрих-кода, таким образом, идентифицирует положение лунки и фрагмент (или фрагменты), присутствующие после мультиплексирования (фиг. 1). Участок штрих-кода РНК был спроектирован таким обра-

зом, чтобы складываться в автономную структуру, которая не взаимодействует с какой-либо другой частью конструкции. Структура штрих-кода представляет собой спираль из семи пар оснований, закрытую тетраплетей GNRA и прикрепленной парой оснований G-C для поддержания стабильности шпильки (фиг. 7). Каждый набор из 96 штрих-кодов был разработан таким образом, что любой отдельный штрих-код претерпевает две или более мутации, чтобы его можно было ошибочно принять за другой штрих-код.

Эта конструкция обеспечивает гибкость в выборе структур РНК для скрининга связывания лиганда и поддерживает простой, прямой эксперимент скрининга (фиг. 1). Каждую лунку 96-луночного планшета, содержащую в остальном идентичную конструкцию РНК с уникальным штрих-кодом РНК, инкубируют с одним или несколькими низкомолекулярными фрагментами или контролем без фрагментов (растворитель), и затем обрабатывают реагентом SHAPE. Полученные в результате аддукты SHAPE химически кодируют структурную информацию о каждом нуклеотиде. После SHAPE-исследования информация, необходимая для определения идентичности фрагмента (штрих-код РНК) и связывания фрагмента (паттерн аддукта SHAPE), постоянно закодирована в каждой цепи РНК, поэтому РНК из 96 лунок планшета можно объединить в один образец. Эксперимент по скринингу фрагментов очень похож на стандартный рабочий процесс исследования структуры MaP²⁴. Например, в некоторых вариантах реализации используется специализированная реакция обратной транскрипции с ослабленной точностью для получения кДНК, которые содержат изменения последовательности, не кодируемые матрицей, в положениях любых аддуктов SHAPE на РНК³⁰. Эти кДНК затем используются для получения библиотеки ДНК для высокопроизводительного секвенирования. Несколько планшетов с экспериментами могут быть штрих-кодированы на уровне библиотеки ДНК²⁴, что позволяет собирать данные о тысячах соединений в одном цикле секвенирования (фиг. 1). Полученные данные секвенирования содержат миллионы отдельных чтений, каждое из которых соответствует определенным цепям РНК. Эти чтения сортируются по штрих-коду, чтобы можно было анализировать данные для каждого низкомолекулярного фрагмента или комбинации фрагментов. Определение и идентификация низкомолекулярных фрагментов (например, фрагмента 1 и/или фрагмента 2) с использованием описанных выше способов, таких как SHAPE и/или SHAPE-MaP, более подробно описаны в следующем разделе.

В. Идентификация и выбор лиганда.

Как упоминалось выше, SHAPE и SHAPE-MaP использовались для идентификации низкомолекулярных фрагментов, которые связываются с интересующей молекулой РНК или ассоциированы с ней. В частности, при тестировании низкомолекулярных фрагментов с использованием SHAPE-MaP обнаружение сигнатур связанных фрагментов по коэффициенту мутаций SHAPE-MaP для каждого нуклеотида включает несколько стадий для нормализации данных на большом экспериментальном экране и для обеспечения статистической строгости. Ключевые признаки стратегии анализа хитов на основе SHAPE включают в себя: (i) сравнение каждого экспонированного фрагмента РНК или "экспериментального образца" с пятью отрицательными, не экспонированными фрагментами, контрольными образцами для учета вариативности от планшета к планшету и от лунки к лунке; (ii) обнаружение хитов, выполненное независимо для каждого из двух структурных мотивов в конструкции, в данном описании, псевдоузла и рибопереключателя TRP; (iii) маскирование отдельных нуклеотидов с низкой реакционной способностью во всех образцах, поскольку маловероятно, что эти нуклеотиды будут демонстрировать изменения, вызванные фрагментами; и (iv) расчет различий на нуклеотид в частоте мутаций между экспонированным фрагментом экспериментального образца, и не экспонированным фрагментом образца отрицательного контроля. Нуклеотиды с разницей в коэффициенте мутаций в 20% или более между одним из мотивов и контролями без фрагментов были выбраны для анализа Z-показателя. Тем не менее, специалист в данной области техники сможет соответствующим образом скорректировать разницу в коэффициенте мутаций, признав, что она может изменяться. Например, в некоторых вариантах реализации, разница в коэффициенте мутаций может составлять 25, 30, 35, 45 или 50% или более. В некоторых вариантах реализации, разница в коэффициенте мутаций может составлять 15%, 10% или 5% или более. Было определено, что фрагмент значительно изменил паттерн реактивности SHAPE, если три или более нуклеотидов в одном из двух мотивов имели Z-значения больше 2,7 (как определено путем сравнения числа Пуассона для двух мотивов³¹, см. Пример 2). Однако значения Z могут варьироваться, и специалист в данной области техники сможет соответствующим образом скорректировать их. Например, в некоторых вариантах реализации значения Z превышают 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 или 3,9. В некоторых вариантах реализации значения Z превышают 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 или 2,6.

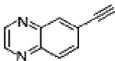
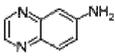
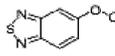
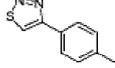
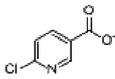
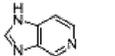
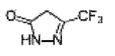
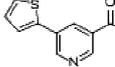
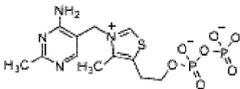
Чтобы идентифицировать низкомолекулярные фрагменты с помощью SHAPE и/или SHAPE-MaP, которые впоследствии соединяются вместе для получения соединений, как описано в настоящем документе, выполняется ряд стадий. Во-первых, проводится первичный скрининг, в ходе которого проверяется большое количество соединений, например, по меньшей мере, 100 соединений, для идентификации любых исходных ведущих или целевых соединений, которые проявляют подходящую связывающую активность по отношению к молекуле РНК-мишени. На стадии 2 эти целевые соединения затем дополнительно исследуются в исследованиях взаимосвязи структура-активность (SAR), где определяются изменения в аффинности связывания РНК-мишени по мере модификации структуры целевых соединений.

Когда несколько низкомолекулярных фрагментов идентифицированы как подходящие связывающие лиганды для молекулы РНК-мишени, могут быть проведены дополнительные исследования связывания для дальнейшего изучения сайта связывания для каждого низкомолекулярного фрагмента (т.е. стадия 3). Например, в некоторых вариантах реализации РНК-мишень может быть предварительно инкубирована с первым фрагментом (идентифицированным как лиганд, связывающий РНК-мишень в соответствии с исследованиями SAR на стадии 2) перед воздействием на РНК-мишень второго фрагмента (также идентифицированного в качестве лиганда связывающего РНК в исследованиях SAR на стадии 2), чтобы определить, может ли второй фрагмент связываться с РНК-мишенью, когда первый фрагмент уже связан. Как только будет идентифицирован второй фрагмент с подходящей активностью связывания с интересующей РНК, его можно связать с первым фрагментом с помощью линкера для получения соединения, описанного в настоящем документе (т.е. стадия 4). Каждая из упомянутых выше стадий более подробно описана ниже.

Стадия 1. Первичный скрининг.

При первичном скрининге было протестировано 1500 фрагментов, и 41 фрагмент был обнаружен как хит, при начальной частоте хитов 2,7%. Подтверждение хитов выполняли с помощью трехкратного анализа SHAPE (фиг. 2, фиг. 8), и соединение считалось истинным хитом только в том случае, если оно было обнаружено в качестве связывающего вещества во всех трех повторениях. Затем эти повторенные соединения хита анализировали с помощью изотермической титрационной калориметрии (ИТС) для определения аффинности связывания с РНК, соответствующей только целевому мотиву (исключая фланкирующие последовательности в скрининговой конструкции). Из этих первоначальных хитов, восемь хитов были подтверждены повторным анализом и ИТС (табл. 1). Семь из хитов связывались с рибопереключателем TPP на основании их мутационных сигнатур, локализованных в основном или полностью в участке рибопереклювателя TPP тестируемой конструкции. Оставшийся хит был неспецифическим, так как этот фрагмент воздействовал на нуклеотиды во всех частях конструкции РНК. Не было обнаружено соединений, которые специфически связывались бы с участком псевдоузла денге тестируемой конструкции.

Таблица 1
Фрагменты, которые связывают рибопереключитель TPP,
обнаруженные с помощью исследования SHAPE

Структура	ID	K_d (мкМ)
	1	11 ± 0.2
	2	$25 \pm 6^{\dagger}$
	3	95 ± 3
	4	220 ± 10
	5	$265 \pm 80^{\dagger}$
	6	650 ± 100
	7	нерастворимый
	8	нерастворимый
	9	0.028 ± 0.002

Хиты были обнаружены с помощью исследования структуры SHAPE и подтверждены повторным

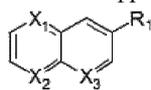
анализом и ИТС. Константу диссоциации определяли по ИТС; значения ошибки, отмеченные знаком ‡, обозначают стандартную ошибку, полученную из ≥ 3 повторов, другие оценки ошибки рассчитывают на основе 95% доверительного интервала для регрессии методом наименьших квадратов кривой связывания. Нативный лиганд TRP включен для сравнения.

Семь фрагментов, которые связывают рибопереклюатель TRP, как подтверждено ИТС, имеют разные хемотипы; большинство из них имеют небольшое сходство или не имеют сходства с нативным лигандом TRP (табл. 1). В целом преобладают гетероароматические азотсодержащие кольца; они, вероятно, участвуют во взаимодействиях водородных связей. Три соединения имеют пиридиновые кольца, и два имеют пиразиновые кольца. Азольный кольцевой фрагмент присутствует в трех соединениях: два тиадиазола и имидазол. В нативном лиганде TRP имеется тиазольное кольцо, но этот фрагмент не участвует в связывающих взаимодействиях с РНК^{28,29,33}. Кроме того, ряд идентифицированных фрагментов содержит первичные амины, сложные и простые эфиры, а также группы фтора, которые могут служить акцепторами или донорами водородных связей.

Стадия 2. Отношения структура-активность (SAR) фрагментов, связывающих рибопереклюатель.

Затем были исследованы аналоги некоторых исходных хитов с целью увеличения аффинности связывания и идентификации положений, в которых хиты фрагментов можно модифицировать с помощью линкера, не препятствуя связыванию. В частности, рассматривались аналоги соединений 2 и 5, так как эти два фрагмента различаются по структуре и аналоги коммерчески доступны. Связывание аналога РНК оценивали с помощью ИТС. Было испытано шестнадцать аналогов 2. Изменение основной хиноксалиновой структуры соединения 2 путем удаления одного или обоих атомов азота в кольце приводило к изменению связывающей активности (табл. 2А).

Таблица 2А
SAR для аналогов фрагмента 2

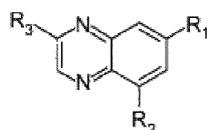


Молекула	R ₁	X ₁ , X ₂ , X ₃	K _d (мкМ)
2		N, N, C	25
10		N, C, C	3500
11		C, N, C	2100
12		C, C, C	нет связывания
13	H	N, N, N	354
14	H	N, N, C	120

Были изучены модификации хиноксалинового ядра, и с помощью ИТС были получены константы диссоциации.

Улучшение аффинности связывания было результатом введения донора или акцептора водородной связи, связанного метиленом (табл. 2В, соединения 16 и 17). Различные заместители в других положениях ядра хиноксалинового кольца приводили к снижению активности связывания. Соединение 2 было хорошим кандидатом для дальнейшей разработки на основании высокой степени гибкости и даже улучшения связывания, наблюдаемого при модификации заместителя в положении С-6.

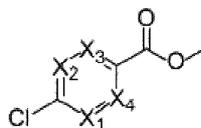
Таблица 2В
 Зависимости структура-активность для аналогов фрагмента 2,
 связывающихся с РНК рибопереклювателя ТРР.
 Модификации боковых групп хиноксалинового ядра.
 Константы диссоциации были получены методом ИТС



Молекула	R ₁	R ₂	R ₃	K _d (мкМ)
15		H	H	18
16		H	H	12
17		H	H	50
18		H	H	35
19		H	H	58
20		H	H	33
21	H		H	75
22	H		H	286
23	H		H	220
24	H	H		379
25	H	H		600

Затем исследование 18 аналогов фрагмента 5 показало, что основная пиридиновая функциональность молекулы, по-видимому, важна для связывания, поскольку изменение положения азота в кольце, добавление или удаление азота в кольце снижает или подавляет связывание (табл. 3).

Таблица 3
 Зависимости структура-активность для аналогов фрагмента 5,
 связывающихся с РНК рибопереклювателя ТРР.
 Модификации пиридинового ядра и константы
 диссоциации были получены с помощью ИТС



Молекула	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	K _d (мкМ)
6	N, C, C, C	265
S1	C, C, C, N	490
S2	N, N, C, C	420
S3	N, C, N, C	1200
S4	C, C, C, C	нет связывания

Модификации кольцевых заместителей обычно приводили к значительной потере связывающей активности (табл. 4). Единственный аналог, увеличивающий аффинность, содержал хлор в положении С-4, S12, в результате чего соединение имело примерно в три раза более высокую аффинность к рибоперек-

лучателью TPP, чем фрагмент 5.

Таблица 4
Зависимости структура-активность для аналогов фрагмента 5,
связывающихся с РНК рибопереклювателя TPP.
Модификации боковых групп пиридинового ядра.
Константы диссоциации были получены методом ИТС

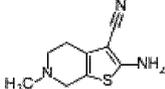
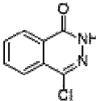
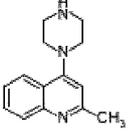
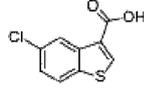
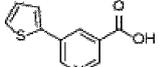
Молекула	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	K _d (мкМ)
S5		H	H		440
S6		H	H		390
S7		H	H		1800
S8		H	H		1100
S9		H	H		НЕТ СВЯЗЫВАНИЯ
S10		H	H		НЕТ СВЯЗЫВАНИЯ
S11			H		820
S12		H			93
S13		H	H		600
S14		H	H		1300
S15		H	H		1800
S16		H	H		1300
S17		H	H		НЕТ СВЯЗЫВАНИЯ
S18		H	H		НЕТ СВЯЗЫВАНИЯ

Стадия 3. Идентификация фрагментов, которые связываются со вторым сайтом на рибопереклювателе TPP.

Скрининг второго круга использовали для идентификации фрагментов, которые связывались с участком рибопереклювателя TPP скрининговой конструкции, предварительно связанной с соединениями 2 или S12. Этот скрининг идентифицировал фрагменты, которые предпочтительно взаимодействуют с рибопереклювателем TPP, когда 2 или S12 уже связаны, либо из-за кооперативных эффектов, либо из-за того, что новые способы связывания становятся доступными из-за структурных изменений, которые происходят при связывании первичного лиганда (фиг. 3). Было подтверждено, что из 1500 проверенных фрагментов пять одновременно связываются либо с 2, либо с S12 (табл. 5).

Таблица 5

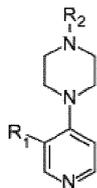
Фрагменты, которые связываются с рибопереключателем TRP в присутствии предварительно связанного фрагмента-партнера, обнаруженного с помощью SHAPE. Хиты были подтверждены повторным анализом SHAPE. Первичные партнеры по связыванию (2, 6) показаны в табл. 1

Первичные партнеры	ID	Структура
2	26	
2	27	
2	28	
6, 2	29	
6	30	

Один хит второго скрининга, 29, индуцировал очень сильные изменения в сигнале реактивности SHAPE и, по-видимому, вызывал значительное изменение структуры РНК, включая разворачивание спирали P1. Этот фрагмент вызывал изменения в других участках РНК, согласующиеся с неспецифическими взаимодействиями, поэтому в дальнейшем этот фрагмент не рассматривался как кандидат на связывание фрагментов. Фрагмент 28 был нерастворим в концентрациях, необходимых для анализа ИТС; поэтому родственные аналоги, содержащие пиридиновое кольцо вместо хинолинового кольца, исследовали с помощью ИТС (табл. 6). Данные соединения, связанные со слабой аффинностью, тем не менее, 31 и 32 показали четкую, но умеренную кооперативность связывания с 2.

Таблица 6

Отношения структура-активность для аналогов фрагмента 28, связывающихся с РНК рибопереключателем TRP, в присутствии и в отсутствие предварительно связанного фрагмента 2. *



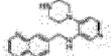
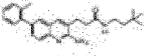
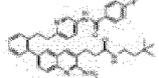
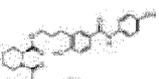
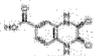
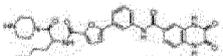
Молекула	R ₁	R ₂	K _d (мМ)	
			5 предварительно связанный	Лиганд не связан
31	H	H	3	>10
32		H	4	>10
33	H		не опред.	>10
34		H	не опред.	>10
28		H	нерастворимый	нерастворимый

*не опред. (не определено) из-за невозможности подобрать кривую связывания ИТС; нерастворимый, соединение, нерастворимое в концентрациях, необходимых для ИТС.

Таблица 7

Подробное сравнение репрезентативных белков и лигандов фрагмент-линкер-фрагмент РНК, разработанных способами на основе фрагментов

Фрагмент 1 K _d (мкМ)	Фрагмент 2 K _d (мкМ)	Связанное соединение K _d (нМ)	LE	E.	Ref
 6.2 мМ	 1.5 мМ	 20 нМ	0.62	0.0021	[N]
 17 мМ	 20 мкМ	 25 нМ	0.49	0.06	[N]
 330 мкМ	 12 мкМ	 1.4 нМ	0.30	0.35	[N]
 11 мкМ	 3 мМ	 19 нМ	0.40	0.60	[N] *
 1.5 мМ	 1 мМ	 1.5 мкМ	0.31	1.0	[N]
 240 мкМ	 9.0 мкМ	 3 нМ	0.40	1.4	[N]
 1 мМ	 1.1 мМ	 1.8 мкМ	0.26	1.6	[N]

 25 мкМ	 >10 мМ	 625 нМ	0.34	2.5	[N] *
 114 мкМ	 140 нМ	 400 нМ	0.28	25	[N]
 40 мкМ	 41 мкМ	 64 нМ	0.32	39	[N]
 2 мкМ	 100 мкМ	 49 нМ	0.22	250	[N]
 150 мкМ	 580 мкМ	 26 мкМ	0.17	300	[N]
 13 мкМ	 13 мкМ	 54 нМ	0.25	330	[N]
 >100 мкМ	 >100 мкМ	 6.5 мкМ	0.17	650	[N] *

Примеры РНК выделены звездочкой. Каждая запись подробно описывает два фрагмента компонента и их индивидуальные значения K_d , связанное соединение и соответствующее ему значение K_d , а также эффективность лиганда (LE) и коэффициент связывания (E) для связанного соединения^{22,38,53,54,45-52}.

Стадия 4. Кооперативность и связывание фрагментов.

Взаимодействия кооперативного связывания между 2 и 31 количественно определяли с помощью ИТС. Индивидуально, 2 связан с K_d 25 мкМ и 31 с гораздо более высоким K_d 10 мМ. Как и при вторичном скрининге, аффинность фрагмента 31 также исследовали, когда 2 был предварительно связан с РНК рибопереклочателя TPP, образуя комплекс 2-РНК. В этих условиях фрагмент 31 связывался с комплексом РНК 2-TTP с K_d около 3 мМ (фиг. 4). Этот эксперимент также показал, что, когда связывание 2 насыщено, 31 связывается с РНК TPP, подразумевая, что эти два фрагмента не связываются в одном и том же месте. Поскольку 2 и 31 связывались с превосходной и приемлемой аффинностью, соответственно, с различными участками РНК TPP, два фрагмента были связаны с целью создания лиганда с высокой аффинностью.

На основании SAR-анализа хитов фрагмента 2 (табл. 2B) и 28 (табл. 4) были получены связанные аналоги наиболее перспективных SAR-фрагментов с упором на аминотильную позицию 17 и два сайта в пиридиновом кольце фрагмента 31 (фиг. 5).

Сначала сравнивали аффинность фрагментов, конъюгированных с амидным или аминным линкером. Соединение с гибким аминным линкером (соединение 36) имело в пять раз более высокую аффинность связывания, чем версия с амидным линкером (соединение 35, фиг. 5). Эти связи были введены с гидроксамовой кислотой, которая может хелатировать ион магния³⁵, как это происходит с пирофосфатным фрагментом нативного лиганда TPP^{27,28}. Однако соединенное аминное соединение гидроксамовой кислоты 36 связывается с аффинностью, аналогичной аффинности исходного фрагмента 17, что свидетельствует о том, что фрагмент гидроксамовой кислоты не придает дополнительной аффинности связывания за счет хелатирования иона. Связанное соединение 37 связывается с аффинностью 625 нМ, показывая, что при правильном приближении, связывание двух фрагментов с умеренной аффинностью может привести к получению высоконанолярного связующего. Замена фрагмента 31 третичным амином (соединение 38) снижает аффинность по сравнению с соединением 37, что позволяет предположить, что взаимодействие фрагмента 31 с РНК опосредовано не только эффектами, основанными на заряде. Наконец, изменение связи между фрагментами 17 и 31 по длине (соединение 39) или сайту связывания пиридинового кольца (соединение 40) снижает аффинность по сравнению с соединением 37 (фиг. 5). В конечном итоге путем соединения соединений, которые связывались индивидуально с рибопереклочателем TPP с аффинностью 5,0 мкМ (соединение 19) и ≥ 10 мМ (соединение 31), было создано соединение (37), которое связывает РНК с K_d 625 нМ.

Специалист в данной области техники поймет, что описанные выше стадии I-IV не предназначены для ограничения, а просто служат примерным вариантом реализации. Понятно, что специалист в данной области техники сможет применить описанные выше стадии I-IV для идентификации альтернативных фрагментов, которые могут быть связаны друг с другом с образованием соединений, описанных в на-

стоящем документе, с подходящей аффинностью связывания с рибопереключателем TRP. Кроме того, должно быть хорошо понятно, что специалист в данной области техники сможет применить описанные выше стадии I-IV для идентификации фрагментов, которые могут быть связаны друг с другом с получением описанных в настоящем документе соединений, которые связываются с другими представляющими интерес молекулами РНК.

Г. Вывод и дополнительные соображения.

Поскольку как кодирующими (мРНК), так и не кодирующими РНК потенциально можно манипулировать, чтобы изменить ход клеточной регуляции и заболевания, была предпринята попытка разработать эффективную стратегию для идентификации низкомолекулярных лигандов для структурированных РНК. Исследование, описанное в настоящем документе, демонстрирует перспективность использования скринингового считывания SHAPE, обнаруживающего связывание лиганда с РНК, объединенного со стратегией на основе фрагментов. В настоящем документе эту стратегию использовали для получения лиганда, который связывается с K_d 625 нМ с рибопереключателем TRP, который не связан по структуре с нативным лигандом. Объединенный подход SHAPE и скрининга на основе фрагментов является общим в отношении как структуры РНК, которая может быть целевой, так и хемотипов лигандов, которые могут быть разработаны. Данная стратегия особенно хорошо подходит для поиска лигандов РНК со сложной структурой, что может быть важно для идентификации мотивов РНК, которые связываются в трехмерных карманах⁴. Кроме того, из-за использования подхода MaP и применения мультиплексирования с помощью штрих-кодирования РНК и ДНК усилия, необходимые для скрининга библиотеки фрагментов из тысячи с лишним членов, являются скромными, что позволяет эффективный скрининг многих структурно различных мишеней.

Многие из полученных лигандов были аналогичны лигандам, о которых сообщалось ранее для однокругового скрининга, также выполненного для рибопереключатателя TRP^{15,17}. Хиты в первичном скрининге, по-видимому, были умеренно смещены в сторону более высокой аффинности, так что большинство лигандов, обнаруженных с помощью SHAPE, связывались в диапазоне 10-300 мкМ. Используемый анализ обнаружения хитов, вероятно, смещен в сторону обнаружения наиболее прочных связывающих фрагментов и тех связывающих веществ, которые вызывают наиболее существенные изменения в реактивности SHAPE. Фрагменты с более низкой аффинностью, вероятно, были пропущены. Считается, что это смещение в сторону прочно связывающихся фрагментов в целом является преимуществом. Не было идентифицировано ни одного фрагмента, который связывался с псевдоузлом денге и достигал аффинности и специфичности, необходимых для соответствия вышеуказанным критериям скрининга. РНК псевдоузла денге имеет сложную структуру, и вероятность того, что фрагмент может нарушить эту структуру, может быть низкой. Другая возможность заключается в том, что эта конкретная структура псевдоузла может не содержать лигандируемого кармана.

Стратегия идентификации пары фрагментов, в которой фрагмент хита в первичном скрининге, был предварительно связан с РНК и подвергался скринингу на наличие дополнительных партнеров по связыванию фрагментов, специально использовал информацию о каждом нуклеотиде, полученную с помощью SHAPE, и был успешно использован в настоящем документе для обнаружения пар фрагментов индуцированного соответствия (фиг. 4). Основным принципом разработки лиганда на основе фрагментов заключается в том, что кооперативность между двумя фрагментами может быть достигнута за счет проксимального связывания и что это аддитивное связывание может быть использовано путем связывания кооперативных фрагментов вместе с минимально инвазивной ковалентной связью^{20,21,36,37}. Разработка связанного соединения 37 из первичных и вторичных хитов фрагментов показывает, что обнаружение лиганда на основе фрагментов может быть эффективно применено к РНК-мишеням. Существует умеренная степень кооперативности между 2 и 31: связывание соединения 31 было сильнее в 3-10 раз, когда 2 было предварительно связано с РНК. При связывании этих двух фрагментов наблюдалась умеренная аддитивность их энергий связи: 37 имеет аффинность 625 нМ. Никакого супераддитивного эффекта при связывании фрагментов 2 и 31 не наблюдалось³⁶, вероятно, потому, что не было достигнуто идеальное позиционирование фрагментов. Небольшие изменения в длине или геометрии линкера привели к большим изменениям в аффинности связанного лиганда (фиг. 5), подразумевая, что точная ориентация линкера важна для оптимальной ориентации двух фрагментов. Успешная разработка соединения 37 показывает, что оно не является необходимым для достижения совершенства ни в степени кооперативности между фрагментами, ни в конструкции ковалентного линкера, соединяющего их, для эффективной разработки субмикромольного лиганда.

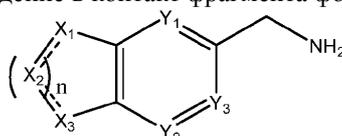
Хотя было предпринято большое количество попыток использовать кооперативность между фрагментами для получения прочно связывающихся лигандов, нацеленных на белки, нацеливание на РНК находится в зачаточном состоянии. Было изучено, насколько хорошо описанная стратегия скрининга на основе SHAPE в сочетании со связыванием фрагментов по сравнению с предыдущими (сфокусированными на белках) усилиями. Соединения, обнаруженные ранее с использованием стратегий на основе фрагментов, в соответствии с их коэффициентами связывания (E) были ранжированы, что является мерой того, насколько хорошо вся система функционирует вместе при связывании^{21,38} (фиг. 6; расширено в табл. 7). В отсутствие положительных или отрицательных способствующих факторов, энергии связи

двух фрагментов точно аддитивны, линкер инертен, и E равно 1,0. Кооперативные эффекты или выгодные взаимодействия линкеров уменьшают E , а антикооперативные эффекты или негативные взаимодействия линкеров увеличивают E . Критически важно, что значения E могут варьироваться на порядки в белковых системах.

Коэффициент связывания для 37 составляет 2,5, что немного выше среднего для связанных (нацеленных на белок) лигандов в академической литературе. 37 имеет эффективность лиганда (LE), свободную энергию связывания, деленную на количество неводородных атомов, что выгодно отличается от примеров лигандов связанных фрагментов, нацеленных на белки (фиг. 6). По этим показателям 37 действует почти так же хорошо, как TRPc, лиганд, тесно связанный с нативным лигандом рибопереклювателя TRP²². Таким образом, обнаружение лигандов на основе фрагментов, особенно эффективно реализованное с помощью мультиплексного скрининга с поддержкой SHAPE, имеет значительные перспективы для обеспечения быстрой разработки уникальных лигандов, нацеленных на огромный мир структур РНК.

Д. Способы получения.

Настоящее описание также относится к любым способам получения соединений, описанных в настоящем документе. Специалисту в данной области техники должно быть известно, что такие способы получения могут варьироваться. Например, в некоторых вариантах реализации способы получения описанных соединений включают: приведение в контакт фрагмента формулы IV:



Формула (IV)

где X_1 и X_3 представляют собой N;

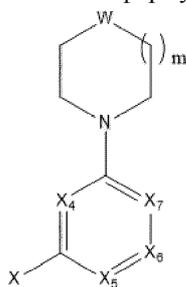
X_2 представляет собой CR_1 ;

пунктирные линии представляют собой двойные связи;

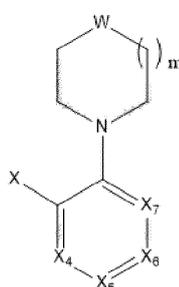
Y_1 , Y_2 и Y_3 , представляют собой CR_2 ;

R_1 и R_2 представляют собой -H; и

n представляет собой 2; с фрагментом формулы V-1 или V-2:



Формула V-1



Формула V-2

где X представляет собой галоген, выбранный из F, Br, Cl и I;

X_4 и X_7 представляют собой CR_3 , и X_5 и X_6 независимо выбраны из CR_3 и N;

R_3 представляет собой -H;

m представляет собой 1; и

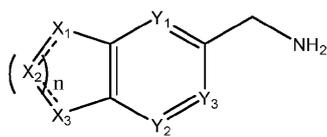
W представляет собой -O или $-NR_4$, где R_4 выбирают из $-CO(C_1-C_6\text{-алкила})$, замещенного или незамещенного $C_1-C_6\text{-алкила}$, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного циклоалкила, $-CO(\text{арила})$, $-CO(\text{гетероарила})$ и $-CO(\text{циклоалкила})$,

в присутствии Pd катализатора.

В некоторых вариантах реализации, Pd катализатор выбран из $(DPPF)PdCl_2$, $Pd_2(dba)_3$, $PdCl_2[P(\text{o-толил})_3]_2$, $Pd(dba)_2$ и $Pd(OAc)_2$. В некоторых вариантах реализации, стадия приведения в контакт дополнительно включает фосфиновый лиганд. В некоторых вариантах реализации, фосфиновый лиганд является моодентатным. В некоторых вариантах реализации, фосфиновый лиганд является бидентатным. Примеры фосфиновых лигандов включают, без ограничения, DPPF, BINAP и гас-BINAP. В некоторых вариантах реализации, стадия реагирования дополнительно включает основание. В некоторых вариантах реализации, основание является неорганическим. В некоторых вариантах реализации, основание представляет собой NaOtBu. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в чистом виде (т.е. без растворителя). В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в присутствии растворителя. В некоторых вариантах реализации, растворитель представляет собой неполярный растворитель. Примеры растворителей включают, без ограничения, толуол, бензол, диоксан и тетрагидрофуран. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют при повышенных температурах. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в

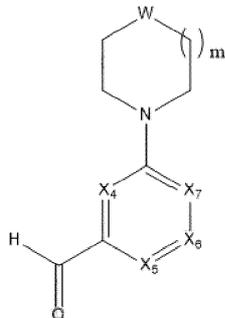
контакт осуществляют при 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 100°C.

В некоторых вариантах реализации, способы получения описанных соединений включают: приведение в контакт фрагмента формулы IV:

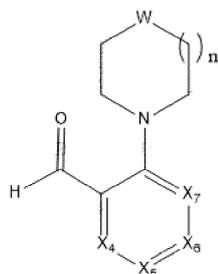


Формула (IV)

с фрагментом формулы VI-1 или VI-2:



Формула VI-1

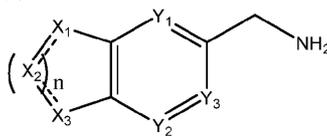


Формула VI-2

где $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, Y_1, Y_2, Y_3, n, m$ и W такие, как определено выше, в присутствии восстановителя.

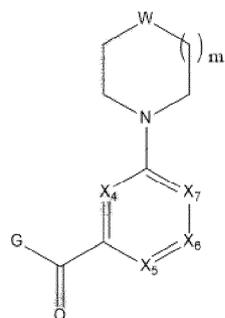
В некоторых вариантах реализации, восстановитель может быть любым восстановителем, применимым в химии восстановительного аминирования. Примеры восстановителей включают, без ограничения, боргидрид и/или гидриды алюминия. В некоторых вариантах реализации, восстановитель представляет собой боргидрид. В некоторых вариантах реализации, восстановитель представляет собой боргидрид натрия. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в чистом виде. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в растворителе. Примеры растворителей включают, без ограничения, спиртовые растворители (например, метанол, этанол, изопропанол), хлорированные растворители (например, дихлорметан) и/или эфирные растворители (например, тетрагидрофуран). В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют при температуре ниже комнатной. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют при повышенных температурах.

В некоторых вариантах реализации, способы получения описанных соединений включают: приведение в контакт фрагмента формулы IV:

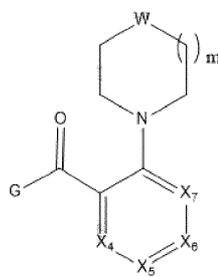


Формула (IV)

с фрагментом формулы VII-1 или VII-2:



Формула VII-1



Формула VII-2

где $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, Y_1, Y_2, Y_3, n, m$ и W такие, как определено выше; и G представляет собой $-F, -Cl, -Br, -OH, -OCH_3$ или $-OCH_2CH_3$; в присутствии основания.

В некоторых вариантах реализации основание является органическим (пиридин и/или триметиламин). В некоторых вариантах реализации, основание является неорганическим (например, карбонат калия/натрия и/или бикарбонат калия/натрия). В некоторых вариантах реализации, способ дополнительно

включает связывающий агент, такой как DCC и/или EDCI, но не ограничивается ими. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в чистом виде. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют в присутствии растворителя. Примеры растворителей включают, без ограничения, THF, DCM, ACN и/или DMSO. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют при комнатной температуре. В некоторых вариантах реализации, стадию приведение в контакт осуществляют при повышенных температурах.

Е. Композиции.

Описанные в настоящем документе соединения могут быть составлены в фармацевтическую композицию вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть составлены в соответствии со стандартной фармацевтической практикой в виде фармацевтической композиции. В соответствии с данным аспектом предлагается фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в настоящем документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

Типичный состав получают путем смешивания соединения, описанного в настоящем документе, и носителя, разбавителя или вспомогательного вещества. Подходящие носители, разбавители и вспомогательные вещества хорошо известны специалистам в данной области и включают такие материалы, как углеводы, воски, водорастворимые и/или набухающие полимеры, гидрофильные или гидрофобные материалы, желатин, масла, растворители, вода и т.п. Конкретный используемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество будет зависеть от средства и цели, для которой применяется соединение. Растворители обычно выбирают на основе растворителей, признанных специалистами в данной области техники безопасными (GRAS) для введения млекопитающему. Как правило, безопасные растворители представляют собой нетоксичные водные растворители, такие как вода и другие нетоксичные растворители, которые растворяются или смешиваются с водой. Подходящие водные растворители включают воду, этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоли (например, PEG 400, PEG 300) и т.д. и их смеси. Композиции могут также включать один или несколько буферов, стабилизаторов, поверхностно-активных веществ, смачивающих агентов, смазывающих агентов, эмульгаторов, суспендирующих агентов, консервантов, антиоксидантов, кроющих агентов, скользящих агентов, технологических добавок, красителей, подсластителей, ароматизаторов, отдушек и других известных добавок для обеспечения элегантного представления лекарственного средства (т.е. соединения, описанного в настоящем документе, или его фармацевтической композиции) или помощи в производстве фармацевтического продукта (т.е. лекарственного средства).

Композиции могут быть получены с использованием обычных процедур растворения и смешивания. Например, нерасфасованное лекарственное вещество (т.е. соединение, описанное в настоящем документе, или стабилизированная форма соединения (например, комплекс с производным циклодекстрина или другим известным комплексообразователем) растворяют в подходящем растворителе в присутствии одного или нескольких вспомогательных веществ, описанных выше. Соединение обычно составляют в виде фармацевтических дозированных форм, чтобы обеспечить легко контролируруемую дозу лекарственного средства и обеспечить соблюдение пациентом предписанного режима. Фармацевтическая композиция (или состав) для применения может быть упакована различными способами в зависимости от способа, используемого для введения лекарственного средства. Как правило, изделие для распространения включает контейнер, в котором находится фармацевтическая композиция в подходящей форме. Подходящие контейнеры хорошо известны специалистам в данной области техники и включают такие материалы, как бутылки (пластиковые и стеклянные), пакеты-саше, ампулы, пластиковые пакеты, металлические цилиндры и т.п. Контейнер может также включать защиту от несанкционированного доступа для предотвращения неосторожного доступа к содержимому упаковки. Кроме того, на контейнер нанесена этикетка, описывающая содержимое контейнера. Этикетка может также содержать соответствующие предупреждения.

Фармацевтические составы могут быть получены для различных путей и типов введения. Например, описанное в настоящем документе соединение, имеющее желаемую степень чистоты, может быть необязательно смешано с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980), 16-е издание, Osol, A. Ed.), в форме лиофилизованного состава, измельченного порошка или водного раствора. Составление может быть осуществлено путем смешивания при температуре окружающей среды при соответствующем pH и желаемой степени чистоты с физиологически приемлемыми носителями, т.е. носителями, которые нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. pH состава зависит главным образом от конкретного применения и концентрации соединения, но может варьироваться от около 3 до около 8. Состав в ацетатном буфере при pH 5 является подходящим вариантом реализации.

Соединения могут быть стерильными. В частности, составы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Такую стерилизацию легко осуществить путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны.

Соединение обычно можно хранить в виде твердой композиции, лиофилизованной композиции или водного раствора.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение, описанное в настоящем документе, могут быть составлены, дозированы и введены способом, т.е. количествами, концентрациями, графиком, курсом, носителями и путем введения, в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное лечашее заболевание, конкретное лечашее млекопитающее, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, график введения, и другие факторы, известные практикующим врачам. "Терапевтически эффективное количество" вводимого соединения будет определяться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения расстройства, опосредованного фактором свертывания крови. Такое количество предпочтительно ниже количества, которое является токсичным для хозяина или делает хозяина значительно более восприимчивым к кровотечению.

Приемлемые разбавители, носители, вспомогательные вещества и стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Активные фармацевтические ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методиками коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокapsулы) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, Osol, A. Ed. (1980).

Могут быть получены препараты соединений с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие соединение, описанное в настоящем документе, причем эти матрицы находятся в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент US 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Составы включают те, которые подходят для описанных в настоящем документе способов введения. Композиции могут быть удобно представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Методики и составы обычно можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, Pa.). Такие способы включают стадию связывания активного ингредиента с носителем, который представляет собой один или несколько вспомогательных ингредиентов. Как правило, составы получают путем однородного и тесного связывания активного ингредиента с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или с теми и другими, и затем, при необходимости, придавая продукту форму.

Составы соединения, описанного в настоящем документе, подходящие для перорального введения, могут быть получены в виде отдельных единиц, таких как пилюли, капсулы, облатки или таблетки, каждая из которых содержит предварительно определенное количество соединения.

Прессованные таблетки могут быть получены путем прессования в подходящей машине активного ингредиента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим, смазывающим, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим агентом. Формованные таблетки могут быть получены путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного активного ингредиента, смоченного инертным жидким разбавителем. Таблетки необязательно могут быть покрыты оболочкой или иметь риск и необязательно могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента.

Таблетки, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, например, желатиновые капсулы, сиропы или эликсиры

могут быть получены для перорального применения. Составы соединений, описанных в настоящем документе, предназначенные для перорального применения, могут быть получены в соответствии с любым способом, известным в данной области техники для производства фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или несколько агентов, включая подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, чтобы обеспечить вкусный препарат. Приемлемы таблетки, содержащие активный ингредиент в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, пригодным для получения таблеток. Данные вспомогательные вещества могут быть, например, инертными разбавителями, такими как карбонат кальция или натрия, лактоза, фосфат кальция или натрия; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты, такие как кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть непокрытыми или могут быть покрыты в соответствии с известными методиками, включая микроинкапсуляцию, для замедления дезинтеграции и адсорбции в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, обеспечения устойчивого действия в течение более длительного периода времени. Например, можно использовать материал с временной задержкой, такой как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина, отдельно или с воском.

Для лечения глаз или других внешних тканей, например рта и кожи, составы можно наносить в виде мази или крема для наружного применения, содержащих активный ингредиент(ы) в количестве, например, от 0,075 до 20% мас./мас. При получении мази для наружного применения активные ингредиенты можно использовать либо с парафиновой, либо со смешиваемой с водой мазевой основой. В качестве альтернативы активные ингредиенты могут быть составлены в состав крема на основе крема типа "масло в воде".

При желании водная фаза кремовой основы может включать многоатомный спирт, то есть спирт, имеющий две или более гидроксильных групп, такой как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, манит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль (включая PEG 400), и их смеси. Составы для наружного применения могут желателно включать соединение, которое усиливает абсорбцию или проникновение активного ингредиента через кожу или другие пораженные участки. Примеры таких усилителей проникновения через кожу включают диметилсульфоксид и родственные аналоги.

Масляная фаза эмульсий может быть составлена из известных ингредиентов известным способом. Хотя фаза может содержать только эмульгатор, она также может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора и жира или масла или обоих и жира и масла. Гидрофильный эмульгатор, включенный вместе с липофильным эмульгатором, может действовать как стабилизатор. Вместе эмульгатор(ы) со стабилизатором(ами) или без него составляют так называемый эмульгирующий воск и воск вместе с маслом и жиром составляют так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует маслянистую дисперсную фазу составов кремов. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии, подходящие для использования в составе, включают Tween® 60, Span® 80, цетостеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия.

Водные суспензии соединений содержат активные материалы в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для получения водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующие агенты, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, кроскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь и диспергирующие или смачивающие агенты, такие как природный фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеаратом), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксицетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром жирной кислоты и ангидридом гекситола (например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана). Водная суспензия может также содержать один или несколько консервантов, таких как этил или n-пропил-p-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, один или несколько ароматизаторов и один или несколько подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

Фармацевтические композиции соединений могут быть в форме стерильного препарата для инъекций, такого как стерильная водная или масляная суспензия для инъекций. Данная суспензия может быть составлена в соответствии с известным уровнем техники с использованием тех подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые были упомянуты выше. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, таком как 1,3-бутандиол. Стерильный препарат для инъекций также может быть получен в виде лиофилизированного порошка. В число приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, также могут быть использованы при получении препаратов для инъекций.

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для

получения разовой лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина и конкретного способа введения. Например, состав с пролонгированным высвобождением, предназначенный для перорального введения человеку, может содержать от около 1 до 1000 мг активного вещества, смешанного с подходящим и удобным количеством материала носителя, которое может варьироваться от около 5 до около 95% от общего количества композиций (масса:масса). Фармацевтическая композиция может быть получена так, чтобы обеспечить легко измеримые количества для введения. Например, водный раствор, предназначенный для внутривенной инфузии, может содержать от около 1 до 500 мкг активного ингредиента на миллилитр раствора для того, чтобы могла происходить инфузия подходящего объема со скоростью от около 10 до около 50 мл/ч.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители.

Препараты, подходящие для местного введения в глаза, также включают глазные капли, где активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, особенно в водном растворителе для активного ингредиента. Активный ингредиент предпочтительно присутствует в таких составах в концентрации от около 0,5 до 20% мас./мас., например, от около 0,5 до 10% мас./мас., например, около 1,5% мас./мас.

Составы, подходящие для местного введения в рот, включают леденцы, содержащие активный ингредиент на ароматизированной основе, обычно сахарозе и акации или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент на инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Препараты для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, масло какао или салицилат.

Составы, подходящие для внутрилегочного или назального введения, имеют размер частиц, например, в диапазоне от 0,1 до 500 микрон (включая размеры частиц в диапазоне от 0,1 до 500 микрон с шагом микрон, например, 0,5, 1, 30 микрон, 35 микрон и т.д.), который вводят путем быстрого вдыхания через носовой ход или путем вдыхания через рот, чтобы достичь альвеолярных мешочков. Подходящие составы включают водные или масляные растворы активного ингредиента. Препараты, подходящие для введения в виде аэрозоля или сухого порошка, могут быть получены в соответствии с обычными способами и могут быть доставлены с другими терапевтическими агентами, такими как соединения, ранее использовавшиеся для лечения или профилактики расстройств, как описано ниже.

Препараты, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие носители, которые, как известно в данной области техники, являются подходящими.

Составы могут быть упакованы в одноразовые или многоразовые контейнеры, например, запаянные ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном сублимацией (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды, для инъекции непосредственно перед применением. Растворы для инъекций и суспензии для экстенпорального применения получают из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных выше. Предпочтительными стандартными лекарственными формами являются те, которые содержат суточную дозу или стандартную суточную субдозу, как указано в настоящем документе выше, или ее соответствующую фракцию активного ингредиента.

Объектом изобретения также являются ветеринарные композиции, содержащие по меньшей мере один активный ингредиент, как определено выше, вместе с ветеринарным носителем. Ветеринарные носители представляют собой материалы, используемые для введения композиции, и могут представлять собой твердые, жидкие или газообразные материалы, которые в остальном являются инертными или приемлемыми в ветеринарии и совместимы с активным ингредиентом. Данные ветеринарные композиции можно вводить парентерально, перорально или любым другим желаемым путем.

В конкретных вариантах реализации фармацевтическая композиция, содержащая описанные в настоящем документе соединения, дополнительно содержит химиотерапевтический агент. В некоторых из этих вариантов реализации химиотерапевтический агент представляет собой иммунотерапевтический агент.

Ж. Способы лечения.

Соединения и композиции, описанные в настоящем документе, также можно использовать в способах лечения различных заболеваний и/или расстройств, которые, как было установлено, связаны с дисфункцией экспрессии и/или функции РНК, или с экспрессией и/или функцией белка, который производится из мРНК, либо с полезной ролью переключения конформации РНК с помощью небольшой молекулы, либо с изменением нативной функции рибопереклочателя как способа ингибирования роста инфекционного организма. Таким образом, способы согласно настоящему описанию направлены на лечение

заболевания или расстройства, которое связано с дисфункцией экспрессии и/или функции РНК, или на создание нового переключаемого терапевтического агента. См., например, публикация заявки на патент US 2018/010146, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах реализации, способы лечения заболевания или расстройства, как описано в настоящем документе (например, связанного с дисфункцией экспрессии и/или функции РНК), включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, дозы терапевтически эффективного количества соединения и/или композиции, описанных в настоящем документе.

Дисфункция экспрессии РНК характеризуется повышенной или недостаточной экспрессией одной или нескольких молекул РНК. В некоторых вариантах реализации, одна или несколько молекул РНК связаны со стимулированием заболевания и/или расстройства, подлежащего лечению. В некоторых вариантах реализации, молекула(ы) РНК характеризуется как часть механизма здоровой клетки и, таким образом, может предотвратить и/или облегчить заболевание и/или расстройство, подлежащее лечению. В некоторых вариантах реализации, заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с дисфункцией функции РНК, связанной с транскрипцией, процессингом и/или трансляцией. В некоторых вариантах реализации, заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с неточной экспрессией белков в результате дисфункциональной функции молекулы РНК. В некоторых вариантах реализации, заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с дисфункцией функции РНК, связанной с экспрессией генов. В некоторых вариантах реализации, заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, при котором желателно снизить экспрессию белка путем связывания молекулы с мРНК. В некоторых вариантах реализации, заболевание успешно лечится терапией, которую можно включать и выключать с помощью небольшой молекулы. Например, в некоторых вариантах реализации, заболевание или расстройство представляет собой генетическое заболевание, при котором желателно иметь возможность включать или выключать экспрессию терапевтического гена.

Заболевания и расстройства, подлежащие лечению, включают, без ограничения, дегенеративные расстройства, рак, диабет, аутоиммунные расстройства, сердечно-сосудистые расстройства, расстройства свертываемости крови, заболевания глаз, инфекционные заболевания и заболевания, вызванные мутациями в одном или нескольких генах.

Примеры дегенеративных заболеваний включают, без ограничения, болезнь Альцгеймера (БА), латеральный амиотрофический склероз (ЛАС, болезнь Лу Герига), рак, болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ), хроническую травматическую энцефалопатию, кистозный фиброз, недостаточность цитохром-с-оксидазы (часто является причиной дегенеративного синдрома Лея), синдром Элерса-Данлоса, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, атаксия Фридрейха, лобно-височная деменция (ЛВД), некоторые сердечно-сосудистые заболевания (например, атеросклеротические, такие как ишемическая болезнь сердца, аортальный стеноз и т.д.), болезнь Хантингтона, детская нейроаксональная дистрофия, кератоконус (КК), кератоглобус, лейкодистрофия, дегенерация желтого пятна (ДЖП), синдром Марфана (MFS), некоторые митохондриальные миопатии, синдром истощения митохондриальной ДНК, рассеянный склероз (РС), множественная системная атрофия, мышечные дистрофии (МД), нейрональный цероидный липофуциноз, болезнь Нимана-Пика, остеоартрит, остеопороз, болезнь Паркинсона, легочная артериальная гипертензия, все прионные заболевания (болезнь Крейтцфельдта-Якоба, фатальная семейная бессонница и т.д.), прогрессирующий надъядерный паралич, пигментный ретинит (ПР), ревматоидный артрит, болезнь Сандхоффа, спинальная мышечная атрофия (СМА, заболевание двигательных нейронов), подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Тея-Сакса и сосудистая деменция (сама по себе может не быть нейродегенеративной, но часто проявляется наряду с другими формами дегенеративной деменции).

Типичные виды рака включают, без ограничения, все формы карциномы, меланомы, бластомы, саркомы, лимфомы и лейкомии, включая, без ограничения, рак мочевого пузыря, карциному мочевого пузыря, опухоли головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак эндометрия, гепатоцеллюлярная карцинома, рак гортани, рак легкого, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки и рак щитовидной железы, острый лимфоцитарная лейкомия, острая миелоидная лейкомия, эпендимома, саркома Юинга, глиобластома, медуллобластома, нейробластома, остеосаркома, рабдомиосаркома, рабдоидный рак и нефробластома (опухоль Вильмса).

Примерные аутоиммунные расстройства включают, без ограничения, болезнь Стилла у взрослых, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, анти-ГБМ/анти-ТБМ нефрит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную дизавтономию, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную крапивницу, аксональную и нейрональную невропатию (AMAN), болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (CD), глютенную болезнь, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), хронический рецидивирующий многоочаговый остеомиелит (CRMO), синдром Черджа-Стросса (CSS) или эозинофильный гра-

нулематоз (EGPA), рубцовый пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодовой агглютинации, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, CREST-синдром, болезнь Крона, герпетический дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптикомиелит), дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный фасциит, узловатую эритему, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эванса, фибромиалгию, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), гигантоклеточный миокардит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, гранулематоз с полиангиитом, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпуру Шенлейна-Геноха (HSP), герпес беременных или пемфигоид беременных (PG), гидраденит Suppurativa (HS) (Acne Inversa), гипогаммаглобулинемию, IgA-нефропатию, склерозирующее заболевание, связанное с IgG4, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), миозит с включенными тельцами (IBM), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет 1 типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Кавасаки, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, деревянистый конъюнктивит, линейную болезнь IgA (LAD), волчанку, хроническую болезнь Лайма, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанное заболевание соединительной ткани (MCTD), язву Муруна, болезнь Мухи-Габермана, мультифокальную моторную нейропатию (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастению, миозит, нарколепсию, неонатальную волчанку, оптиконеуромиелит, нейтропению, глазной рубцовый пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS, паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри-Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Парсонажа-Тернера, пузырчатку, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию (РА), синдром ROEMS, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы типа I, II, III, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, постперикардитомический синдром, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориазический артрит, чистую эритроцитарную аплазию (PRCA), гангренозную пиодермию, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), ретроперитонеальный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склеродермию, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и ячеек, синдром тугоподвижного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию (SO), артериит Такаюсу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, диабет 1 типа, язвенный колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта-Коянаги-Харада.

Примеры сердечно-сосудистых расстройств включают, без ограничения, ишемическую болезнь сердца (CAD), стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, сердечный приступ, сердечную недостаточность, гипертоническую болезнь сердца, невротический порок сердца, кардиомиопатию, нарушение сердечного ритма, врожденный порок сердца, порок клапана сердца, кардит, аневризма аорты, заболевание периферических артерий, тромбоэмболию и венозный тромбоз.

Примеры расстройств свертывания крови включают, без ограничения, гемофилию, болезни фон Виллебранда, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, заболевания печени, избыточное образование циркулирующих антикоагулянтов, дефицит витамина К, дисфункцию тромбоцитов и другие нарушения свертывания крови.

Примеры заболеваний глаз включают, без ограничения, дегенерацию желтого пятна, выпученный глаз, катаракту, CMV ретинит, диабетический отек желтого пятна, глаукому, кератоконус, глазную гипертензию, глазную мигрень, ретинобластому, субконъюнктивальное кровоизлияние, птеригиум, кератит, сухость глаз и эрозию роговицы.

Примеры инфекционных заболеваний включают, без ограничения, острый вялый миелит (AFM), анаплазмоз, сибирскую язву, бабезиоз, ботулизм, бруцеллез, кампилобактериоз, карбапенем-резистентную инфекцию (CRE/CRPA), мягкий шанкр, вирусную инфекцию чикунгуньи (чикунгунья), хламидиоз, сигуатеру (вредные цветения водорослей (HABs)), инфекцию *Clostridium Difficile*, *Clostridium Perfringens* (токсин эpsilon), грибковую инфекцию кокцидиоидомикоз (лихорадка долины), COVID-19 (коронавирусная болезнь 2019 г.), болезнь Крейтцфельда-Якоба, трансмиссивная губчатая энцефалопатия (CJD), криптоспоридиоз (Crypto), циклоспориоз, тропическую лихорадку, 1,2,3,4 (лихорадка денге), дифтерию, инфекцию кишечной палочки, продуцируемый шига-токсин (STEC), восточный энцефалит лошадей (EEE), геморрагическую лихорадку Эбола (Эбола), эрлихиоз, энцефалит, арбовирусную или параинфекционную, энтеровирусную инфекцию, неполиомиелит (неполиомиелитный энтеровирус), энтеровирусную инфекцию, D68 (EV-D68), лямблиоз (лямблии), сап, гонококковую инфекцию (гонорея), паховую гранулёму, болезнь *Haemophilus Influenza*, тип В (Hib или H-flu), хантавирусный легочный синдром (HPS), гемолитико-уремический синдром (HUS), гепатит А (Hep A), гепатит В (Hep B), гепатит С (Hep C), гепатит D (гепатит D), гепатит Е (гепатит E), герпес, опоясывающий герпес, опоясывающий VZV (опоясывающий лишай), гистоплазмозную инфекцию (гистоплазмоз), вирус иммунодефицита человека/СПИД (ВИЧ/СПИД), вирус папилломы человека (HPV), Influenza (грипп), отравление свинцом, ле-

гионеллез (болезнь легионеров), проказы (болезнь Хансена), лептоспироз, листериоз (листерия), болезнь Лайма, инфекцию венерической лимфогранулемы (LGV), малярию, корь, мелиоидоз, менингит, вирусные (менингит, вирусные), эпидемический менингит, бактериальные (менингит, бактериальный), коронавирусы ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), паротит, норовирус, паралитическое отравление моллюсками (паралитическое отравление моллюсками, сигуатера), педикулез (вши, головные и платяные вши), тазовые воспалительные заболевания (PID), коклюш (судорожный кашель), чуму; бубонную, септицемическую, легочную (чума), пневмококковую болезнь (пневмония), полиомиелит (детский паралич), повассан, орнитоз (попугайная лихорадка), птериоз (крабы; заражение лобковыми вшами), гнойничковую сыпь (оспа, оспа обезьян, коровья оспа), Q-Лихорадка, бешенство, отравление рицином, риккетсиоз (пятнистая лихорадка Скалистых гор), краснуху, в том числе врожденная (немецкая корь), сальмонеллезный гастроэнтерит (сальмонелла), заражение чесоткой (чесотка), скомброид, септический шок (сепсис), тяжелый острый респираторный синдром (SARS), шигеллезный гастроэнтерит (шигелла), опсу, метициллин-резистентную стафилококковую инфекцию (MRSA), стафилококковое пищевое отравление, энтеротоксин-B отравление (пищевое отравление стафилококком), стафилококковую инфекцию, промежуточный ванкомицин (VISA), ванкомицин-резистентную стафилококковую инфекцию (VRSA), стрептококковую инфекцию группы А (инвазивная) (Strep A (инвазивная)), стрептококковую инфекцию группы В (Strep-B), стрептококковый токсико-шоковый синдром, STSS, токсический шок (STSS, TSS), сифилис (первичный, вторичный, ранний латентный, поздний латентный, врожденный), столбнячную инфекцию, столбняк (Lock Jaw), трихомониаз (трихомонадная инфекция), трихонозную инфекцию (трихинеллез), туберкулез (ТБ), туберкулез (латентный) (LTBI), туляремию (кроличья лихорадка), брюшной тиф (группа D), тиф, вагиноз, бактериальный (дрожжевые инфекции), повреждение легких, связанное с вейпингом (травма легких, связанная с электронной сигаретой), ветряная оспа (ветрянка), холерный вибрион (холера), вибриоз (вibriон), вирусную геморрагическую лихорадку (Эбола, Ласса, Марбург), вирус Западного Нила, желтую лихорадку, Yersenia (иерсиния) и вирусную инфекцию Зика (Zika).

Примеры

Пример 1. Дизайн конструкции и получение РНК.

Конструкция для скрининга была разработана таким образом, чтобы обеспечить включение широкого спектра одного или нескольких мотивов внутренней РНК-мишени. В конструкции присутствовали два мотива: домен рибопереклювателя TPP²⁷ и псевдоузел из 5'-UTR вируса денге²⁶. Дизайн полной последовательности конструкции, включая структурные кассеты, спираль штрих-кода РНК и две тестовые структуры РНК (разделенные линкером из шести нуклеотидов), оценивали с использованием структуры РНК³⁹. Чтобы уменьшить вероятность того, что две тестовые структуры будут взаимодействовать, было сделано небольшое количество изменений последовательности, чтобы воспрепятствовать неправильно свернутым структурам, предсказанным структурой РНК, при сохранении нативной укладки (фиг. 7). Структура конечной конструкции была подтверждена SHAPE-Map.

Штрих-коды РНК были разработаны так, чтобы складываться в автономные шпильки (фиг. 7). Все возможные перестановки штрих-кодов РНК были вычислены и свернуты в контексте полной последовательности конструкции, и любые штрих-коды, которые могли взаимодействовать с другой частью конструкции РНК, были удалены из набора. Конструкции со штрих-кодом были исследованы с помощью SHAPE-Map с использованием протокола "без лиганда" и свернуты с использованием структуры РНК с ограничениями реактивности SHAPE, чтобы подтвердить, что спирали штрих-кода свернуты в желаемые автономные шпильки.

Получение РНК.

Матрицы ДНК (Integrated DNA Technologies) для транскрипции *in vitro* кодировали целевой конструкцией последовательности (содержащую последовательность псевдоузла лихорадки денге, одноцепочечный линкер и последовательность рибопереклювателя TPP) и фланкирующие структурные кассеты²⁵:

5'-GTGGG CACTT CGGTG TCCAC ACGCG

AAGGA AACCG CGTGT CAACT GTGCA ACAGC TGACA AAGAG ATTCC TAAAA

CTCAG TACTC GGGGT GCCCT TCTGC GTGAA GGCTG AGAAA TACCC GTATC ACCTG

ATCTG GATAA TGCCA GCGTA GGGAA GTGCT GGATC CGGTT CGCCG GATCA ATCGG

GCTTC GGTCC GGTTC-3' (SEQ ID NO:1).

Сайты связывания праймеров подчеркнуты.

Праймеры прямой ПЦР, содержащие уникальные штрих-коды РНК и последовательность промотора T7, использовались для индивидуального добавления штрих-кодов РНК к каждой из 96 конструкций в индивидуальных реакциях ПЦР. Пример последовательности прямого праймера, где нуклеотиды штрих-кода выделены жирным шрифтом и сайт связывания праймера подчеркнут:

5'-GAAAT TACGA CTCAC TATAG GTCGC GAGTA ATCGC GACCG

CGCGT AGAGA TAGTG CCGTG GGCAC TTCGG TGTC -3' (SEQ ID NO:2).

ДНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием 200 мкМ смеси dNTP (New England Biolabs), 500 нМ прямого праймера, 500 нМ обратного праймера, 1 нг матрицы ДНК, 20% (об./об.) реакци-

онного буфера Q5 и 0,02 ед/мкл высокоточной полимеразы горячего старта Q5 (New England Biolabs) для создания матриц для транскрипции *in vitro*. Очищали ДНК (PureLink Pro 96 PCR Purification Kit; Invitrogen) и количественно определяли (набор высокочувствительного анализа Quant-iT dsDNA; Invitrogen) на устройстве для считывания микропланшетов Tecan Infinite M1000 Pro.

Транскрипцию *in vitro* осуществляли в формате 96-луночного планшета, при этом каждая лунка содержала 100 мкл общего реакционного объема. Каждая лунка содержала 5 мМ NTPs (New England Biolabs), 0,02 ед/мкл неорганической пирофосфатазы (дрожжи, New England Biolabs), 0,05 мг/мл полимеразы T7 в 25 мМ MgCl₂, 40 мМ Tris, pH 8,0, 2,5 мМ спермидина, 0,01% Triton, 10 мМ ДТТ и 200-800 нМ матрицы ДНК с уникальным штрих-кодом (созданного с помощью ПЦР). Реакции инкубировали при 37°C в течение 4 ч; затем обрабатывали TurboDNase (без РНКазы, Invitrogen) в конечной концентрации 0,04 ед/мкл; инкубировали при 37°C в течение 30 мин; с последующим добавлением второй ДНКазы до общей конечной концентрации 0,08 ед/мкл и дополнительной 30-минутной инкубацией при 37°C. Ферментативные реакции останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 50 мМ и помещали на лед. Очищали РНК (магнитные шарики Agencourt RNAClean XP; Beckman Coulter) в 96-луночном формате и ресуспендировали в 10 мМ Tris, pH 8,0, 1 мМ EDTA. Концентрации РНК определяли количественно (набор для анализа РНК широкого спектра Quant-iT; Invitrogen) на устройстве для считывания микропланшетов Tecan Infinite M1000 Pro, и РНК в каждой лунке отдельно разводили до 1 пмоль/мкл. РНК хранили при -80°C.

Пример 2. Химическая модификация и скрининг низкомолекулярных фрагментов.

Фрагменты получали в виде библиотеки скрининга фрагментов от Maybridge, которая была частью их библиотеки фрагментов разнообразия Ro3 и содержала 1500 соединений, растворенных в DMSO при 50 мМ. Большинство данных соединений придерживаются "правила трех" для фрагментных соединений; с молекулярной массой <300 Да, содержащими ≤3 доноров водородных связей и ≤3 акцепторов водородных связей, и ClogP ≤3,0. Все соединения, используемые для ИТС, за исключением соединений, перечисленных в Примере 5, были приобретены у Millipore-Sigma и использовались без дополнительной очистки. Эксперименты по скринингу осуществляли в 25 мкл в формате 96-луночных планшетов на жидкостном манипуляторе Tecan Freedom Evo-150, оснащенный 8-канальным пипеточным манипулятором с вытеснением воздуха, одноразовыми наконечниками с фильтрами, роботизированным манипулятором и сухой ванной для нагрева/охлаждения EchoTherm RIC20 с дистанционным управлением (Torrey Pines Scientific). Программы жидкостного манипулятора, используемые для скрининга, доступны по запросу.

Для скрининга первого фрагмента-лиганда, 5 пмоль РНК на лунку разводили до 19,6 мкл в воде без РНКазы на охлаждающем блоке при 4°C. Пластины нагревали при 95°C в течение 2 мин, после чего сразу же резко охлаждали до 4°C в течение 5 мин. В каждую лунку добавляли 19,6 мкл 2× кратного буфера (конечная концентрация 50 мМ HEPES, pH 8,0, 200 мМ ацетата калия и 10 мМ MgCl₂), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Для скрининга второго фрагмента-лиганда 24,3 мкл свернутой РНК на лунку добавляли к 2,7 мкл первичного связывающего фрагмента в DMSO до конечной концентрации фрагмента 10× K_d, и образцы инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Чтобы объединить РНК-мишень с фрагментом, 24,3 мкл раствора РНК или РНК плюс первичный связывающий фрагмент добавляли в лунки, содержащие 2,7 мкл 10× скрининговых фрагментов (в DMSO, чтобы получить конечную концентрацию фрагмента 1 мМ). Растворы тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали в течение 10 минут при 37°C. Для зондирования SHAPE 22,5 мкл раствора фрагмента РНК из каждой лунки планшета для скрининга добавляли к 2,5 мкл 10× реагента SHAPE в DMSO на нагревательном блоке при 37°C и быстро перемешивали пипеткой для достижения гомогенного распределения реагента SHAPE с РНК. После соответствующего времени реакции образцы помещали на лед. Для скрининга первого фрагмента в качестве реагента SHAPE использовали 1-метил-7-нитроизатоевый ангидрид (1M7) в конечной концентрации 10 мМ с реакцией в течение 5 мин. Для скрининга второго фрагмента в качестве реагента SHAPE использовали 5-нитроизатоевый ангидрид (5NTA)⁴⁰ в конечной концентрации 25 мМ с реакцией в течение 15 мин. Избыточные фрагменты, растворитель и гидролизованный реагент SHAPE удаляли с помощью 96-луночных планшетов AutoScreen-A (GE Healthcare Life Sciences), и объединяли 5 мкл модифицированной РНК из каждой лунки 96-луночного планшета в один образец на планшет для подготовки библиотеки для секвенирования.

Каждый скрининг состоял из 19 тестовых планшетов фрагментов, двух планшетов, содержащих распределение положительного (фрагмент 2, конечная концентрация 1 мМ) и отрицательного (растворитель, DMSO) контроля, и одного отрицательного контрольного планшета SHAPE, обработанного растворителем (DMSO) вместо реагента SHAPE. Для экспериментов по проверке хитов, расположение лунок каждого фрагмента хита измеряли, чтобы контролировать расположение лунок и эффекты штрих-кода РНК. Также были доступны карты планшетов как для основного, так и для дополнительного экрана.

После завершения скрининга тестовых фрагментов осуществляют статистические тесты для выявления различий в коэффициенте модификации данного нуклеотида. В частности, скрининговый анализ требует статистического сравнения коэффициента модификации данного нуклеотида в присутствии фрагмента по сравнению с его отсутствием. Для каждого нуклеотида количество модификаций в данной

реакции представляет собой процесс Пуассона с известной дисперсией; таким образом, статистическую значимость наблюдаемой разницы в коэффициентах модификации между двумя образцами можно установить, выполнив сравнение двух тестов Пуассона³¹. То есть, если модификации m_1 тестируемого нуклеотида были подсчитаны среди n_1 прочтений в образце 1 и модификации m_2 были подсчитаны среди n_2 прочтений в образце 2, тестируемая нулевая гипотеза предсказывает, что среди всех подсчитанных модификаций ($m_1 + m_2$) доля модификации в образце 1 будет $p_1 = n_1/(n_1 + n_2)$. Z-тест этой гипотезы:

$$Z_p = \frac{m_1 - p_1(m_1 + m_2) + 0.5}{\sqrt{p_1(1 - p_1)(m_1 + m_2)}}$$

$$Z_n = \frac{m_1 - p_1(m_1 + m_2) - 0.5}{\sqrt{p_1(1 - p_1)(m_1 + m_2)}}$$

$$Z = \min(|Z_p|, |Z_n|)$$

Если значение Z превышает заданный порог значимости, считается, что тестируемый нуклеотид подвержен статистически значимому влиянию присутствия тестируемого фрагмента.

Затем для каждого фрагмента необходимо провести Z-тест на большом количестве нуклеотидов, составляющих последовательность РНК, что увеличивает вероятность ложных положительных результатов. Хотя количество ложных положительных результатов определения реактивности SHAPE на нуклеотид можно свести к минимуму за счет повышения порога значимости Z , данный подход снизит чувствительность скрининга (то есть снизит способность обнаруживать более слабые связывающие лиганды). Чтобы уменьшить количество проводимых Z-тестов, такие тесты применялись только к нуклеотидам в интересующем участке, а не ко всем нуклеотидам в конструкции скрининга РНК. Для мотива денге РНК, участок интереса находилась в положениях 59-110; для мотива ТРР интересующим участком были позиции 100-199. Количество Z-тестов было дополнительно уменьшено за счет исключения нуклеотидов с низким коэффициентом модификации в обоих образцах. Порог для рассмотрения нуклеотида как имеющего низкий коэффициент модификации был установлен на уровне 25% от среднего коэффициента модификации планшета, которая была рассчитана для всех нуклеотидов во всех 96 лунках данного планшета. Z-тесты проводились только на тех нуклеотидах, которые хотя бы в одном из двух сравниваемых образцов имели коэффициент модификации, превышающий этот 25% порог.

В идеале единственным отличием условий в двух сравниваемых образцах было бы наличие фрагмента в одном образце, но его отсутствие в другом. Сравнение образцов отрицательного контроля друг с другом можно использовать для оценки распространенности неконтролируемых факторов, которые могут приводить к вариативности между образцами в коэффициенте модификации нуклеотидов. Например, если порог значимости Z установлен на уровне 2,7, при отсутствии каких-либо таких факторов, Z-тест примененный к парам образцов отрицательного контроля (без фрагментов), теоретически должен идентифицировать дифференциально реактивные нуклеотиды с вероятностью $P = 0,0035$. Однако, когда Z-тест применяли к парам образцов отрицательного контроля, выбранных случайным образом из 587 образцов отрицательного контроля, протестированных в ходе первичного скрининга, фактическая вероятность была в 90 раз выше с $P = 0,32$. Таким образом, наблюдалась статистически значимая вариативность SHAPE-реактивности отдельных нуклеотидов в отсутствие фрагментов.

Хотя большинство повторов имели по сути, одинаковые профили, было значительное количество повторов с разными профилями; некоторые коэффициенты детерминации составляли всего 0,85. Применение Z-теста к разным образцам отрицательного контроля привело к большому количеству случаев, когда нуклеотиды были ошибочно классифицированы как дифференциально реактивные. Чтобы избежать такого исхода, каждый образец сравнивали с пятью наиболее сильно коррелированными образцами отрицательного контроля. Z-тесты, применяемые к таким селективным парам отрицательных контролей с порогом значимости Z , равным 2,7, приводили к идентификации дифференциально реактивных нуклеотидов с вероятностью $P = 0,067$.

Эта вероятность в около 20 раз выше теоретического $P = 0,0035$, что указывает на вариативность обработки выборки. Часть этой вариативности одинаково масштабируется по реактивности всех нуклеотидов всех РНК в образце. Эту вариативность можно устранить, уменьшив общую реактивность более реактивного образца, чтобы она соответствовала общей реактивности менее реактивного образца. Такое масштабирование выполняли путем (i) вычисления для каждого нуклеотида в последовательности РНК соотношения его коэффициента модификации в более реактивном образце к коэффициенту его модификации в менее реактивном образце и (ii) деление коэффициента модификации всех нуклеотидов в более реакционном образце на медиану соотношений, полученных на стадии (i). Такое масштабирование пар лунок отрицательного контроля с максимальной корреляцией снизило вероятность обнаружения хитов нуклеотидов до $P = 0,030$, что в 9 раз выше теоретической вероятности. Таким образом, будет иметь место ложноположительная идентификация фрагментов, как это действительно происходит во всех анализах скрининга с высокой пропускной способностью, и фактические хиты фрагментов с нелигандными вариациями выделяли повторной проверкой SHAPE и прямым измерением связывания ли-

ганда с использованием ИТС.

Поскольку ожидается, что эффективный лиганд будет влиять на коэффициент модификации нескольких нуклеотидов в РНК-мишени, фрагмент считался хитом только в том случае, если количество нуклеотидов с реактивностью, отличной от реактивности в отрицательном контроле, превышало определенный порог, который был установлен на 2. Во-вторых, при поиске относительно сильных эффектов фрагментов на РНК, небольшие относительные различия в реактивности нуклеотида, даже если они статистически значимы, исключались из общего числа дифференциально реактивных нуклеотидов. На практике минимально допустимая разница была установлена на уровне 20% от среднего:

$$|r_1 - r_2| / (r_1 + r_2) / 2 = 0,2,$$

где r_1 и r_2 - коэффициента модификации нуклеотидов в двух образцах. В-третьих, данный образец был протестирован против пяти образцов отрицательного контроля, с которыми он имел наибольшую корреляцию. Все пять тестов были необходимы, чтобы обнаружить изменения в тестовом образце по сравнению с образцом отрицательного контроля.

Наконец, чувствительность и специфичность скрининга контролировались выбором порога значимости Z . Оценку образцов, содержащих фрагменты, и всех образцов отрицательного контроля осуществляли при множественных параметрах порога значимости Z . Для каждого такого параметра долю ложноположительных результатов (FPF) рассчитывали как долю образцов отрицательного контроля, в которых было обнаружено изменение, и долю лиганда (LF) оценивали путем вычитания FPF из доли измененных образцов, содержащих фрагмент. Баланс между LF и FPF определяли количественно по их соотношению LF/FPF. Наилучший баланс (LF/FPF \approx 1,3) для РНК рибопереклювателя TPP был достигнут при пороге значимости Z в диапазоне от 2,5 до 2,7, при котором $0,022 > FPF > 0,014$. Для псевдоузла денге наилучший баланс (LF/FPF \approx 4) был достигнут при пороге значимости Z в диапазоне от 2,5 до 2,65, при котором $0,007 > FPF > 0,005$.

Пример 3. Получение библиотеки и секвенирование.

Обратную транскрипцию проводили на объединенной модифицированной РНК в объеме 100 мкл. К 71 мкл объединенной РНК добавляли 6 мкл праймера обратной транскрипции для достижения конечной концентрации праймера 150 нМ, и образец инкубировали при 65°C в течение 5 мин, и затем помещали на лед. К этому раствору добавляли 6 мкл 10× буфера для синтеза первой цепи (500 мМ Tris, pH 8,0, 750 мМ KCl), 4 мкл 0,4 М DTT, 8 мкл смеси dNTP (по 10 мМ каждого) и 15 мкл 500 мМ MnCl₂, и раствор инкубировали при 42°C в течение 2 мин перед добавлением 8 мкл обратной транскриптазы Superscript II (Invitrogen). Реакцию инкубировали при 42°C в течение 3 ч с последующей инактивацией нагреванием при 70°C в течение 10 мин перед помещением на лед. Очищали полученный продукт кДНК (магнитные шарики Agencourt RNAClean; Beckman Coulter), элюировали водой, не содержащей РНКаз, и хранили при -20°C. Последовательность праймера для обратной транскрипции представляла собой 5'-CGGGC TTCGG TCCGG TTC-3' (SEQ ID NO: 3)

Библиотеки ДНК получали для секвенирования с использованием двухстадийной реакции ПНР для амплификации ДНК и добавления необходимых адаптеров TruSeq²⁴. ДНК амплифицировали с помощью ПНР с использованием 200 мкМ смеси dNTP (New England Biolabs), 500 нМ прямого праймера, 500 нМ обратного праймера, 1 нг кДНК или матрицы двухцепочечной ДНК, 20% (об./об.) реакционного буфера Q5 (New England Biolabs) и 0,02 ед/мкл высокоточной полимеразы горячего старта Q5 (New England Biolabs) Избыток невключенных dNTP и праймеров удаляли аффинной очисткой (магнитные шарики Agencourt AmpureXP; Beckman Coulter; при соотношении образца к гранулам 0,7:1). Библиотеки ДНК количественно определяли (набор для анализа высокой чувствительности Qubit dsDNA High Sensitivity; Invitrogen) на флуорометре Qubit (Invitrogen), проверяли на качество (прибор для электрофореза на чипе Bioanalyzer 2100; Agilent) и секвенировали на секвенаторе с высокой пропускной способностью Illumina NextSeq 550.

Ампликон-специфический прямой праймер для получения библиотеки SHAPE-MaP представлял собой 5'-CCCTA CACGA CGCTC TTCCG ATCTN NNNNG GCCTT CGGGCCAAGG A-3' (SEQ ID NO:4).

Ампликон-специфический обратный праймер для получения библиотеки SHAPE-MaP представлял собой 5'-GACTG GAGTT CAGAC GTGTG CTCTT CCGAT CTNNN NNTTG AACCG GACCG AAGCC CGATT T-3' (SEQ ID NO:5).

Последовательности, перекрывающие конструкцию для скрининга РНК, подчеркнуты.

Пример 4. Изотермическая титрационная калориметрия.

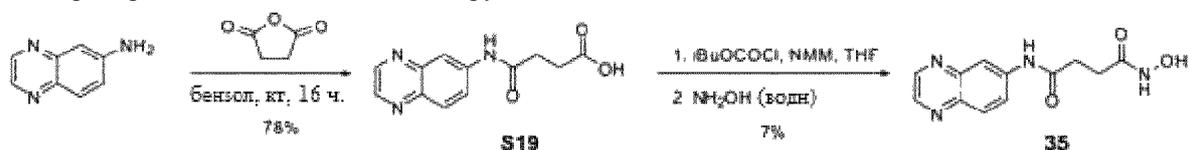
Эксперименты с ИТС проводили с использованием автоматизированного прибора Microcal PEAQ-ITC (Malvern Analytical) в условиях отсутствия РНКазы⁴¹. Транскрибированную *in vitro* РНК заменяли буфером для укладки, содержащим 100 мМ CHES, pH 8,0, 200 мМ ацетата калия и 3 мМ MgCl₂ с использованием центрифужного концентрирования (ультрацентрифужные фильтры Amicon, 10K MWCO, Millipore-Sigma). Лиганды растворяли в том же буфере (чтобы свести к минимуму теплоту перемешивания при добавлении лиганда к РНК) в концентрации, в 10-20 раз превышающей требуемую экспериментальную концентрацию РНК. Количественно определяли концентрацию РНК (спектрометр Nanodrop UV-VIS; ThermoFisher Scientific), разбавляли в 1-10 раз по сравнению с ожидаемой K_d в буфере, и разбавлен-

ную РНК повторно количественно определяли для подтверждения конечной экспериментальной концентрации РНК. РНК, разведенную в буфере для складывания, нагревали при 65°C в течение 5 мин, помещали на лед на 5 мин и оставляли для складывания при 37°C в течение 15 мин. При необходимости первичный связывающий лиганд (например, 2) предварительно связывали с РНК путем добавления 0,1 объема в 10 раз по сравнению с желаемой конечной концентрацией связанного лиганда с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 мин.

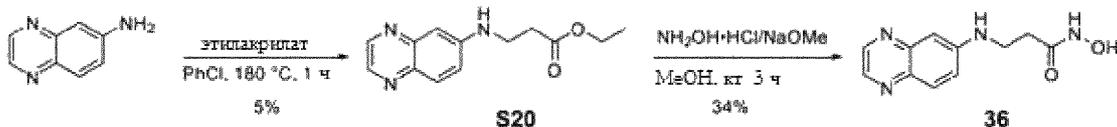
Каждый эксперимент ИТС включал два прогона: один, в котором лиганд титровался в РНК (экспериментальная кривая), и другой, в котором тот же лиганд титровался в буфере (контрольная кривая). Эксперименты ИТС проводились с использованием следующих параметров: температура ячейки 25°C, эталонная мощность 8 мкКал/с, скорость перемешивания 750 об/мин, режим высокой обратной связи, начальная инъекция 0,2 мкл, затем 19 инъекций по 2 мкл. Для завершения каждой инъекции требовалось 4 секунды и интервал между инъекциями составлял 180 с.

Данные ИТС анализировали с использованием программного обеспечения для анализа MicroCal PEAQ-ИТС (Malvern Analytical). Во-первых, базовая линия для каждого пика инъекции корректировалась вручную, чтобы исправить любые неправильно выбранные конечные точки инъекции. Во-вторых, контрольная кривая вычиталась из экспериментальной кривой поточечным вычитанием. В-третьих, линия регрессии наименьших квадратов была подобрана к данным с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта. В случае слабосвязывающих лигандов (> 500 мкМ) N вручную устанавливали на 1,0, чтобы можно было подобрать кривые с низким значением с.

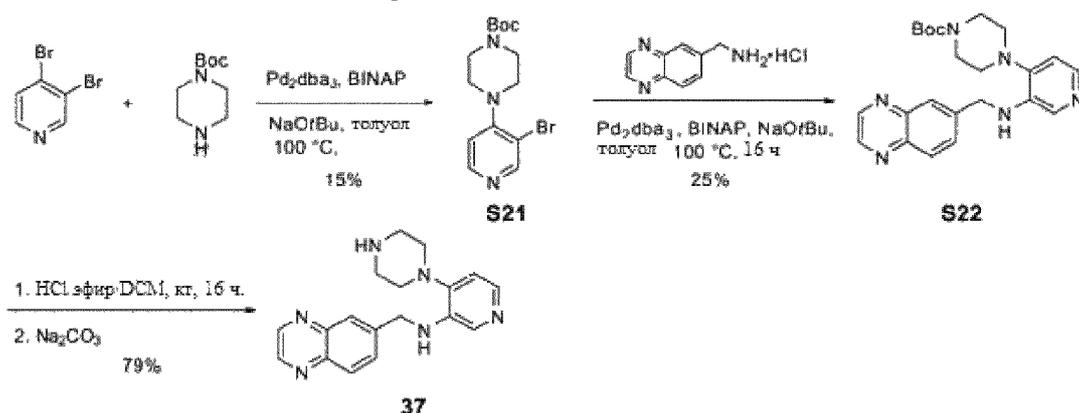
Пример 5. Химический синтез тестируемых соединений 35, 36, 37, 38, 39 и 40.



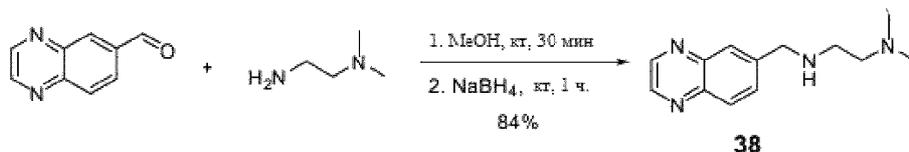
Соединение 35: 3-С-связанную гидроксамовую кислоту 35 получали из карбоновой кислоты S19 через промежуточный смешанный ангидрид путем взаимодействия с водным гидроксиламином. Кислоту S19 получали обработкой хиноксалин-6-амина циклизованным ангидридом дигидрофуран-2,5-диона.



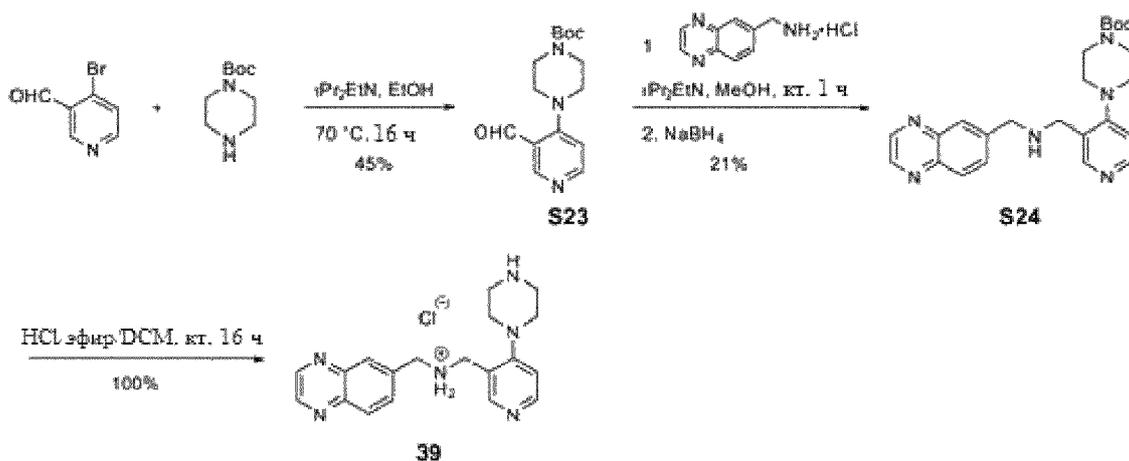
Соединение 36. 2-С-связанный аналог 36 получали из соответствующего сложного эфира S20 путем взаимодействия с гидроксиламином, образующимся *in situ*. Сложный эфир S20 получали добавлением по Михаэлю хиноксалин-6-амина с этилакрилатом.



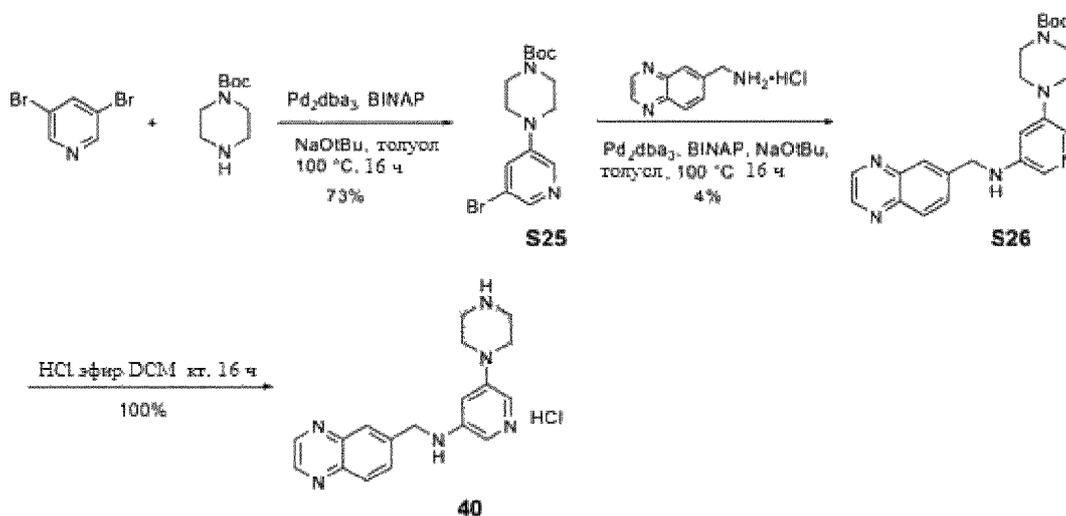
Соединение 37. Реакцию Бухвальда-Хартвига использовали для синтеза промежуточных соединений S21 и S22. Удаление защитной группы (Boc) достигали с помощью HCl в простом эфире с последующей дополнительной обработкой Na₂CO₃ с получением 37.



Соединение 38. Образование имина и последующее восстановление хиноксалин-6-карбальдегида и диамина боргидридом натрия с получением соединения 38.



Соединение 39. Образование имина и последующее восстановление боргидридом натрия гидрохлорида хиноксалин-6-илметанамина и альдегида S23, полученного по реакции S_NAr , дали промежуточное соединение S24, которое после снятия защиты (Boc) с помощью HCl дало 39.



Соединение 40. Аналог 40 с меньшими ограничениями получали с помощью двух реакций Бухвальда-Хартвига с 3,5-дибромпиридином с последующим снятием защиты (Boc) с помощью HCl.

Пример 6. Рентгеновская кристаллография.

Чтобы оценить, будут ли структурные варианты 2 хорошими кандидатами на связывание с рибопереключателем TPP, Соединение 17 исследовали с помощью рентгеновской кристаллографии. РНК рибопереключатателя TPP получали путем транскрипции *in vitro*, как описано²⁷. РНК рибопереключатателя TPP (0,2 мМ) и 17 (2 мМ) нагревали в буфере, содержащем 50 мМ ацетата калия (pH 6,8) и 5 мМ $MgCl_2$, при 60°C в течение 3 мин, резко охлаждали в дробленом льду и инкубировали при 4°C в течение 30 мин до кристаллизации. Для кристаллизации 1,0 мкл комплекса РНК-17 смешивали с 1,0 мкл резервуарного раствора, содержащего 0,1 М ацетата натрия (pH 4,8), 0,35 М ацетата аммония и 28% (об./об.) PEG4000. Кристаллизацию проводили при 291 К путем метода висячей капли посредством диффузии в парах в течение 2 недель. Кристаллы подвергали криозащите в маточном растворе с добавлением 15% глицерина перед быстрой заморозкой в жидком азоте. Данные собирали на линии луча 17-ID-2 (FMX) в NSLS-II (Brookhaven National Laboratory) при длине волны 0,9202 Å. Данные обрабатывали с помощью HKL200043. Структура решали путем молекулярной замены с использованием Phenix44 и структуры РНК рибопереключатателя 2GDI²⁷. Структура уточняли в Phenix. Органический лиганд, молекулы воды и ионы добавляли на поздних стадиях уточнения на основе карт электронной плотности Fo-Fc и 2Fo-Fc.

Результаты показали, что соединение 17 связывает рибопереключататель TPP способом, сходным с тиаминовым фрагментом лиганда TPP, располагаясь между G42 и A43 в соединении J3/2 (фиг. 3)^{27,28}. 17 образует с РНК три водородные связи: по одному на рибозу и поверхность Уотсона-Крика G40 и по одному на рибозу G19. По сравнению с РНК, в комплексе с нативным лигандом TPP происходит значительное изменение локальной структуры РНК. В 17-связанной структуре G72 перевернут в сайт связывания, где находится пиррофосфатный фрагмент лиганда TPP. Этот способ связывания согласуется с предыдущей работой, в которой визуализировалась перевернутая ориентация G72 для фрагментов, связанных в

тиаминовом субсайте кармана связывания рибопереключател^{17,34}. В соответствии с анализом SAR ориентация заместителя С-6, по-видимому, относительно не затруднена взаимодействиями с РНК, что означает, что данный вектор может стать хорошим кандидатом для создания фрагментов.

Ссылки

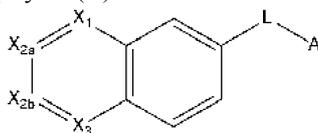
1. Hajduk, P. J., Huth, J. R. & Tse, C. Predicting protein druggability. *Drug Discov. Today* **10**, 1675–1682 (2005).
2. Vukovic, S. & Huggins, D. J. Quantitative metrics for drug–target ligandability. *Drug Discov. Today* **23**, 1258–1266 (2018).
3. Batey, R. T., Rambo, R. P. & Doudna, J. A. Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2326–2343 (1999).
4. Warner, K. D., Hajdin, C. E. & Weeks, K. M. Principles for targeting RNA with drug-like small molecules. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 547–558 (2018).
5. Sharp, P. A. The Centrality of RNA. *Cell* **136**, 577–580 (2009).
6. Kozak, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**, 13–37 (2005).
7. Corbino, K. A., Sherlock, M. E., McCown, P. J., Breaker, R. R. & Stav, S. Riboswitch diversity and distribution. *RNA* **23**, 995–1011 (2017).
8. Cech, T. R. & Steitz, J. A. The noncoding RNA revolution - Trashing old rules to forge new ones. *Cell* **157**, 77–94 (2014).
9. Parsons, C., Slack, F. J., Zhang, W. C., Adams, B. D. & Walker, L. Targeting noncoding RNAs in disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 761–771 (2017).
10. Matsui, M. & Corey, D. R. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 167–179 (2017).
11. Guan, L. & Disney, M. D. Recent advances in developing small molecules targeting RNA. *ACS Chem. Biol.* **7**, 73–86 (2012).
12. Connelly, C. M., Moon, M. H. & Schneekloth, J. S. The Emerging Role of RNA as a Therapeutic Target for Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* **23**, 1077–1090 (2016).
13. Murray, C. W. & Rees, D. C. The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* **1**, 187–92 (2009).
14. Doak, B. C., Norton, R. S. & Scanlon, M. J. The ways and means of fragment-based drug design. *Pharmacol. Ther.* **167**, 28–37 (2016).
15. Cressina, E., Chen, L., Abell, C., Leeper, F. J. & Smith, A. G. Fragment screening against the thiamine pyrophosphate riboswitch thiM. *Chem. Sci.* **2**, 157–165 (2011).
16. Mounné, R., Catala, M., Larue, V., Micouin, L. & Tisné, C. Fragment-based design of small RNA binders: Promising developments and contribution of NMR. *Biochimie* **94**, 1607–1619 (2012).
17. Warner, K. D. *et al.* Validating fragment-based drug discovery for biological RNAs: Lead fragments bind and remodel the TPP riboswitch specifically. *Chem. Biol.* **21**, 591–595 (2014).

18. Zeiger, M. *et al.* Fragment based search for small molecule inhibitors of HIV-1 Tat-TAR. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **24**, 5576–5580 (2014).
19. Bottini, A. *et al.* Targeting Influenza A Virus RNA Promoter. *Chem. Biol. Drug Des.* **86**, 663–673 (2015).
20. Hunter, C. A. & Anderson, H. L. What is cooperativity? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 7488–7499 (2009).
21. Ichihara, O., Barker, J., Law, R. J. & Whittaker, M. Compound design by fragment-linking. *Mol. Inform.* **30**, 298–306 (2011).
22. Zeller, M. J., Li, K., Aubé, J. & Weeks, K. M. Multisite ligand recognition and cooperativity in the TPP riboswitch RNA. *Prep.* (2019).
23. Siegfried, N. A., Busan, S., Rice, G. M., Nelson, J. A. E. & Weeks, K. M. RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-MaP). *Nat. Methods* **11**, 959–65 (2014).
24. Smola, M. J., Rice, G. M., Busan, S., Siegfried, N. A. & Weeks, K. M. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-MaP) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 1643–1669 (2015).
25. Merino, E. J., Wilkinson, K. A., Coughlan, J. L. & Weeks, K. M. RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4223–4231 (2005).
26. Liu, Z.-Y. *et al.* Novel cis-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization. *J. Virol.* **87**, 6804–18 (2013).
27. Serganov, A., Polonskaia, A., Phan, A. T., Breaker, R. R. & Patel, D. J. Structural basis for gene regulation by a thiamine pyrophosphate-sensing riboswitch. *Nature* **441**, 1167–1171 (2006).
28. Edwards, T. E. & Ferré-D'Amaré, A. R. Crystal structures of the thi-box riboswitch bound to thiamine pyrophosphate analogs reveal adaptive RNA-small molecule recognition. *Structure* **14**, 1459–68 (2006).
29. Thore, S., Frick, C. & Ban, N. Structural basis of thiamine pyrophosphate analogues binding to the eukaryotic riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8116–8117 (2008).
30. Busan, S. & Weeks, K. M. Accurate detection of chemical modifications in RNA by mutational profiling (MaP) with ShapeMapper 2. *RNA* **24**, 143–148 (2018).
31. Woolson, R. *Statistical Methods for the Analysis of Biomedical Data.* (John Wiley & Sons, 1987).
32. Jhoti, H., Williams, G., Rees, D. C. & Murray, C. W. The 'rule of three' for fragment-based drug discovery: Where are we now? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 644 (2013).
33. Chen, L. *et al.* Probing riboswitch–ligand interactions using thiamine pyrophosphate analogues. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5924–5931 (2012).

34. Warner, K. D. & Ferré-D'Amaré, A. R. Crystallographic analysis of TPP riboswitch binding by small-molecule ligands discovered through fragment-based drug discovery approaches. *Methods Enzymol.* **549**, 221–233 (2014).
35. Codd, R. Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coord. Chem. Rev.* **252**, 1387–1408 (2008).
36. Jencks, W. P. On the attribution and additivity of binding energies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4046–4050 (1981).
37. Olejniczak, E. T. *et al.* Stromelysin inhibitors designed from weakly bound fragments: Effects of linking and cooperativity. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5828–5832 (1997).
38. Borsi, V., Calderone, V., Fragai, M., Luchinat, C. & Sarti, N. Entropic contribution to the linking coefficient in fragment based drug design: A case study. *J. Med. Chem.* **53**, 4285–4289 (2010).
39. Reuter, J. S. & Mathews, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 129 (2010).
40. Busan, S., Weidmann, C. A., Sengupta, A. & Weeks, K. M. Guidelines for SHAPE Reagent Choice and Detection Strategy for RNA Structure Probing Studies. *Biochemistry* **58**, 2655–2664 (2019).
41. Gilbert, S. D. & Batey, R. T. Monitoring RNA-ligand interactions using isothermal titration calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **540**, 97–114 (2009).
42. Turnbull, W. B. Divided We Fall? Studying low affinity fragments of ligands by ITC. *Microcal Application Notes* (2005).
43. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* (1997). doi:10.1016/S0076-6879(97)76066-X.
44. Liebschner, D. *et al.* Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr.* **75**, 861–877 (2019).
45. Hajduk, P. J. *et al.* Discovery of potent nonpeptide inhibitors of stromelysin using SAR by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5818–5827 (1997).
46. Howard, N. *et al.* Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.* **49**, 1346–1355 (2006).
47. Barker, J. J. *et al.* Discovery of a novel Hsp90 inhibitor by fragment linking. *ChemMedChem* **5**, 1697–1700 (2010).
48. Möbitz, H. *et al.* Discovery of Potent, Selective, and Structurally Novel Dot1L Inhibitors by a Fragment Linking Approach. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 338–343 (2017).
49. Hung, A. W. *et al.* Application of fragment growing and fragment linking to the discovery of inhibitors of mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 8452–8456 (2009).
50. Jordan, J. B. *et al.* Fragment-Linking Approach Using ¹⁹F NMR Spectroscopy to Obtain Highly Potent and Selective Inhibitors of β -Secretase. *J. Med. Chem.* **59**, 3732–3749 (2016).
51. Maly, D. J., Choong, I. C. & Ellman, J. A. Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2419–2424 (2000).
52. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. Discovering High-Affinity Ligands for Proteins : SAR by NMR. *Science (80-.)*. **274**, 1531–1534 (1996).
53. Mondal, M. *et al.* Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 9422–9426 (2016).
54. Swayze, E. E. *et al.* SAR by MS: A ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets. *J. Med. Chem.* **45**, 3816–3819 (2002).

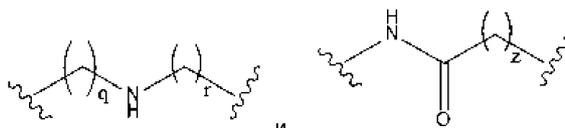
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение со структурой формулы (II):

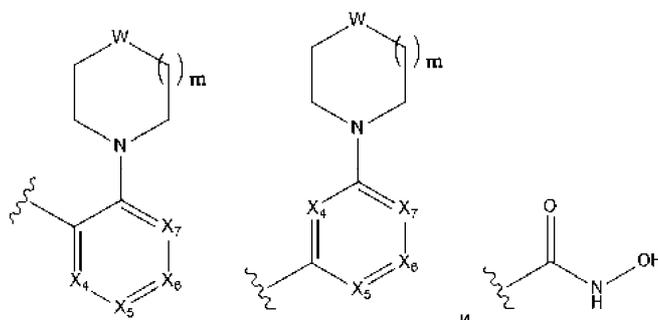


Формула (II)

где X_{2a} и X_{2b} представляют собой CR₁;
X₁ и X₃ представляют собой N;
L выбран из

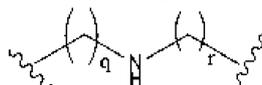


где q и r независимо выбраны из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4 и 5;
z независимо выбран из целых чисел 1, 2, 3, 4 и 5; и
A выбран из



где X₄ и X₇ представляют собой CR₃, и X₅ и X₆ независимо выбраны из CR₃ и N;
где R₁ и R₃ представляют собой -H;
m представляет собой 1;
W представляет собой -O или -NR₄, где R₄ представляет собой -H;
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что L представляет собой



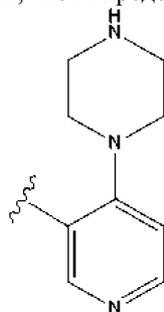
где q и r независимо выбраны из целых чисел 0, 1, 2 и 3.

3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что q и r представляют собой 0 или 1.

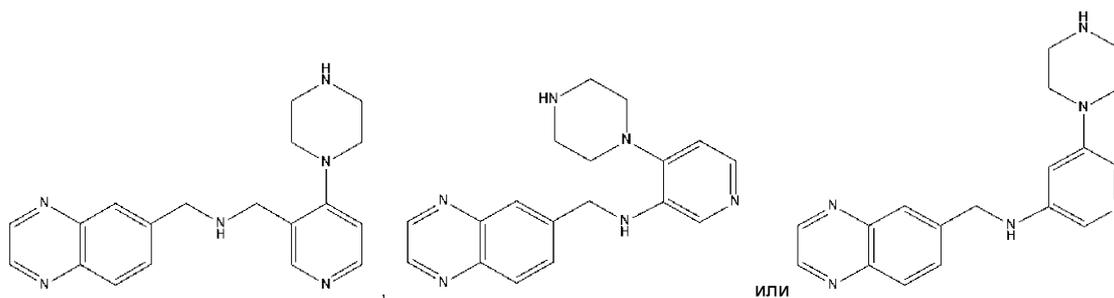
4. Соединение по п.3, отличающееся тем, что W представляет собой -NH.

5. Соединение по п.4, отличающееся тем, что X₅ или X₆ представляют собой N.

6. Соединение по п.5, отличающееся тем, что A представляет собой

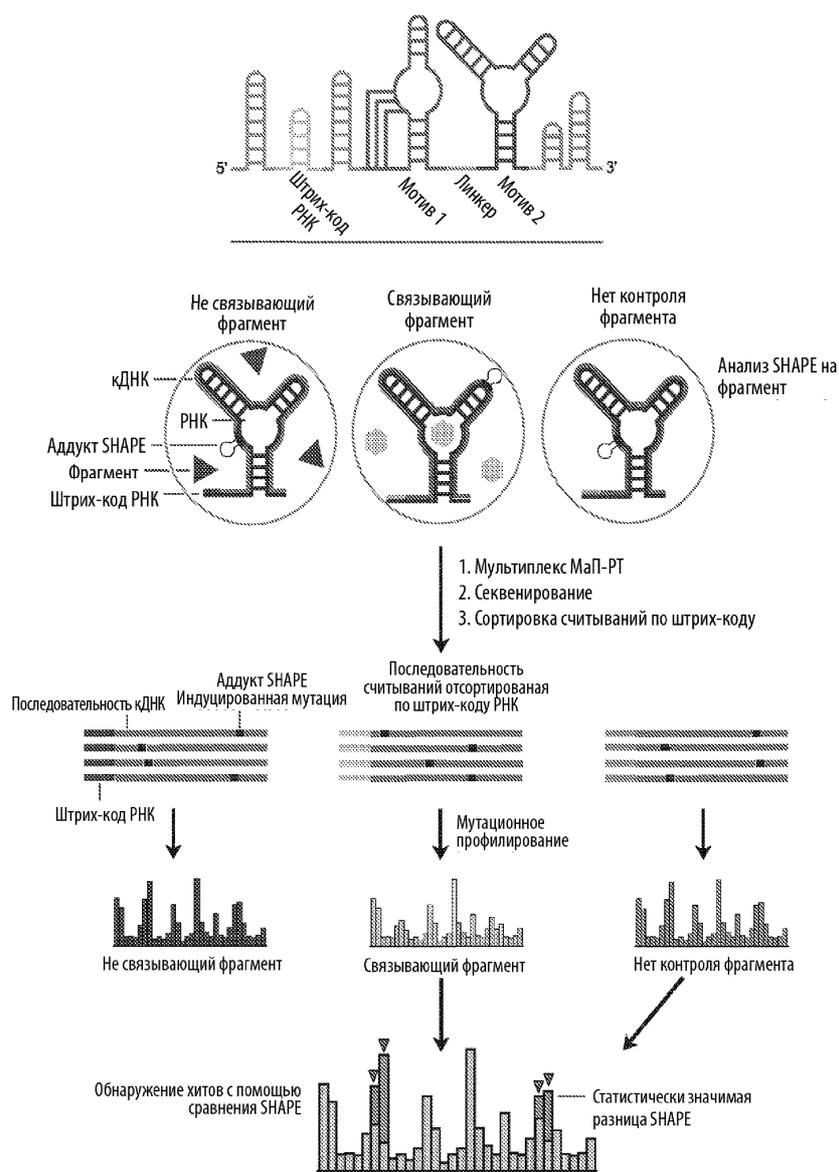


7. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение имеет структуру:

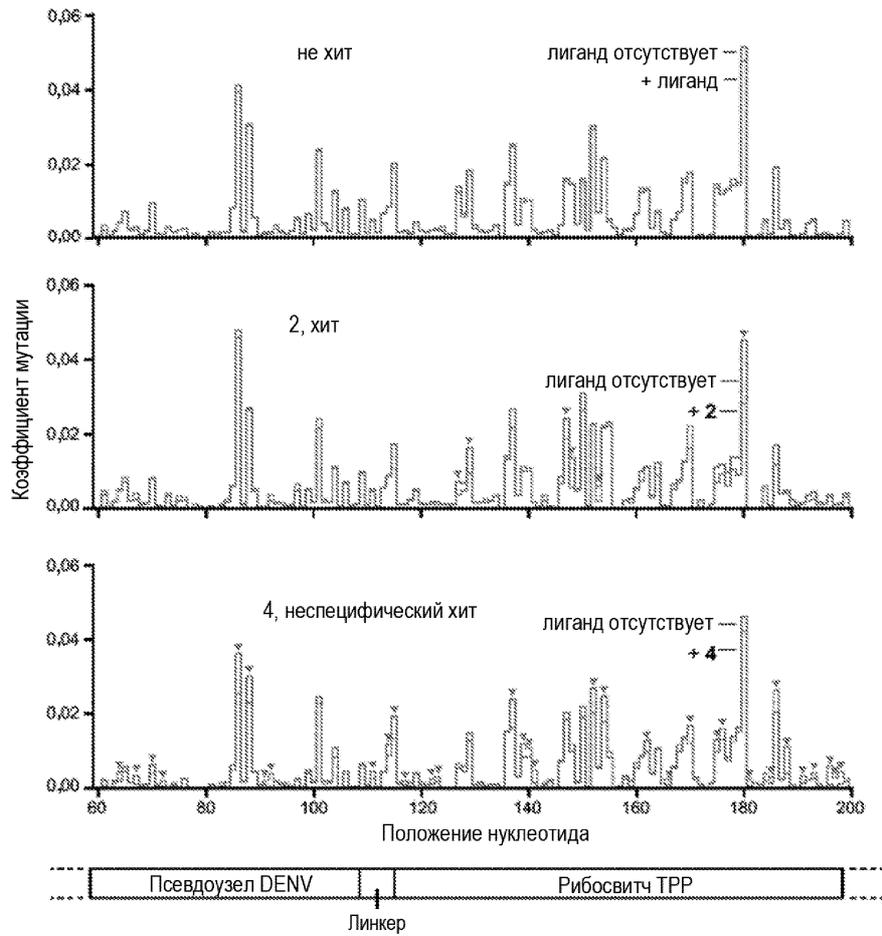


или его фармацевтически приемлемая соль.

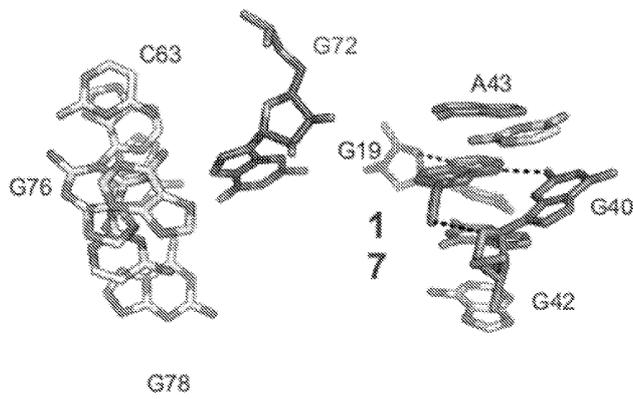
8. Применение соединения по любому из пп.1-7 в качестве агента, связывающегося с участком кодирующей молекулы РНК, где указанная кодирующая молекула РНК представляет собой мРНК, и участок мРНК представляет собой рибопереключател TRP.



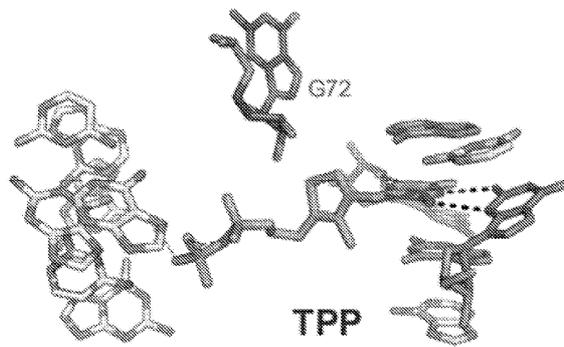
Фиг. 1



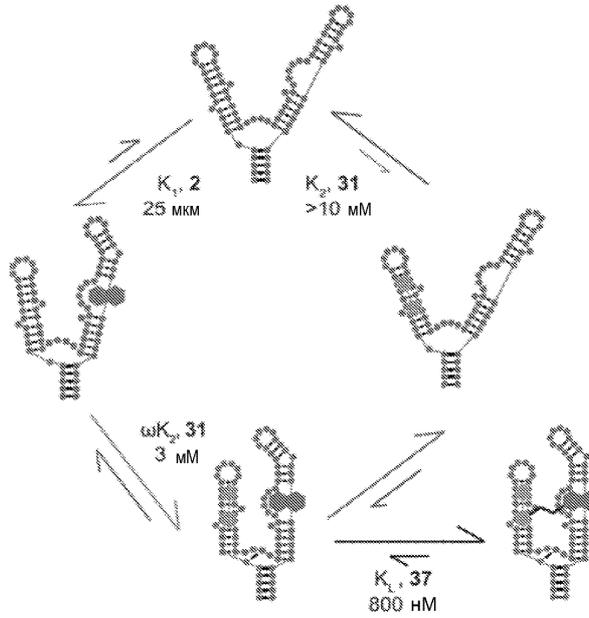
Фиг. 2



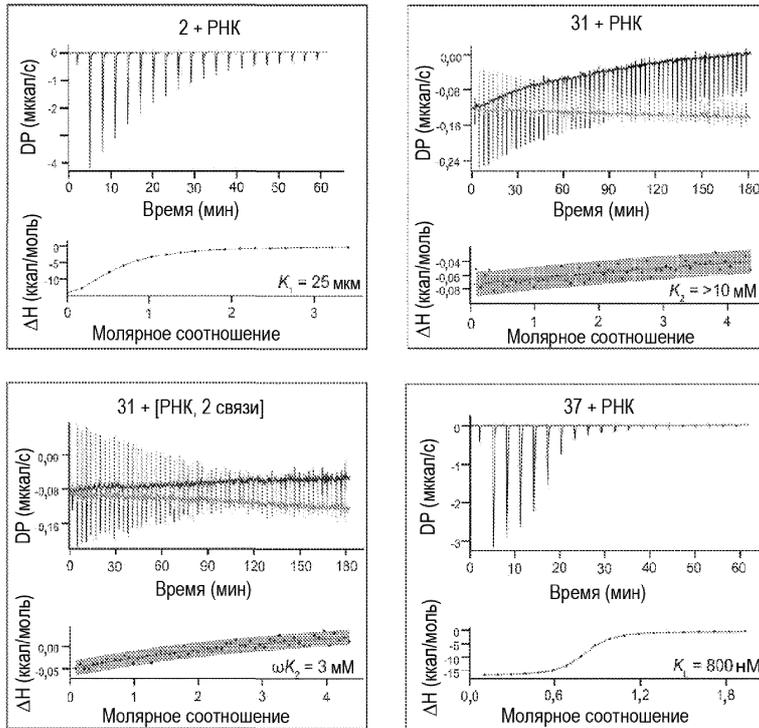
Фиг. 3А



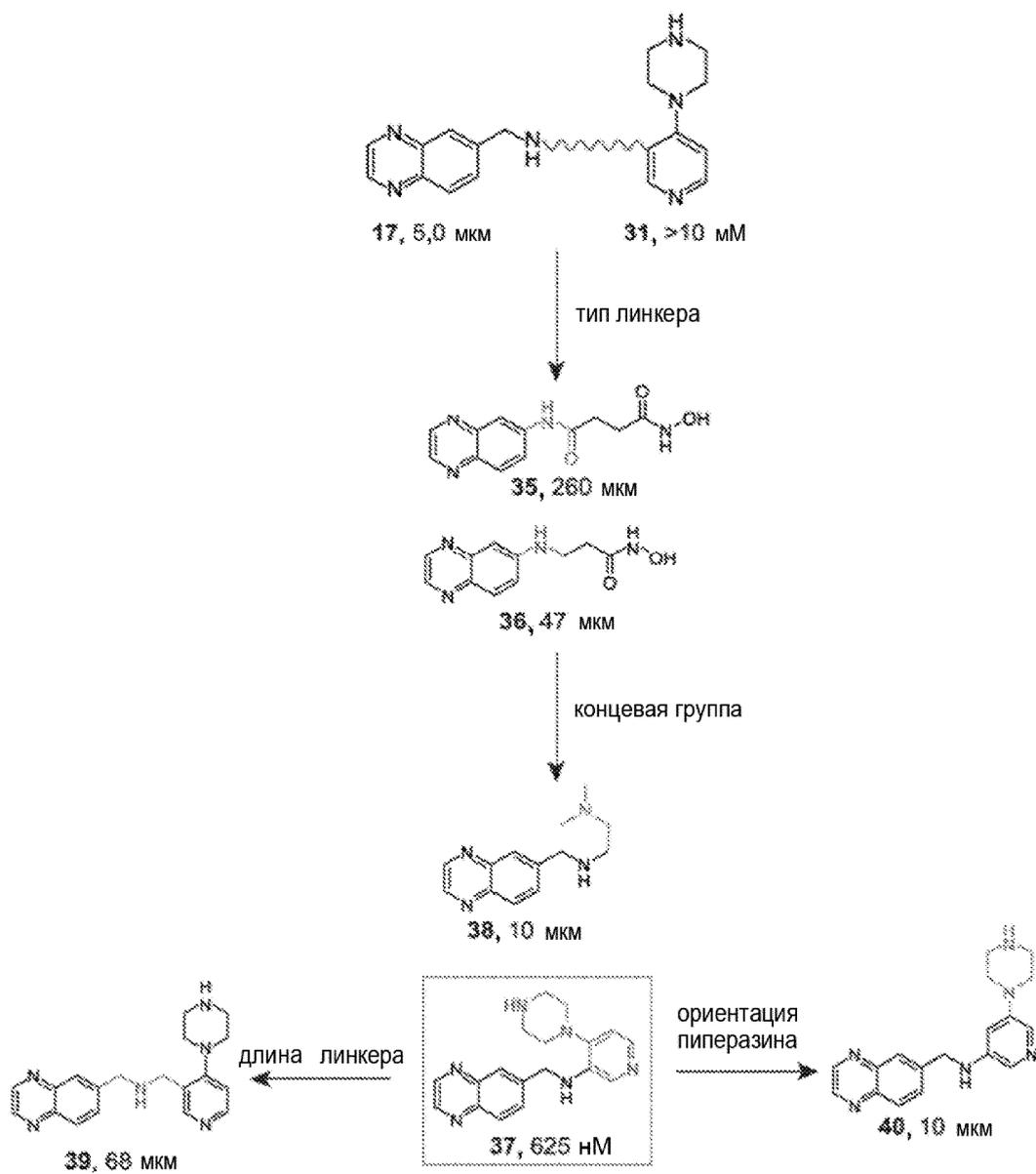
Фиг. 3В



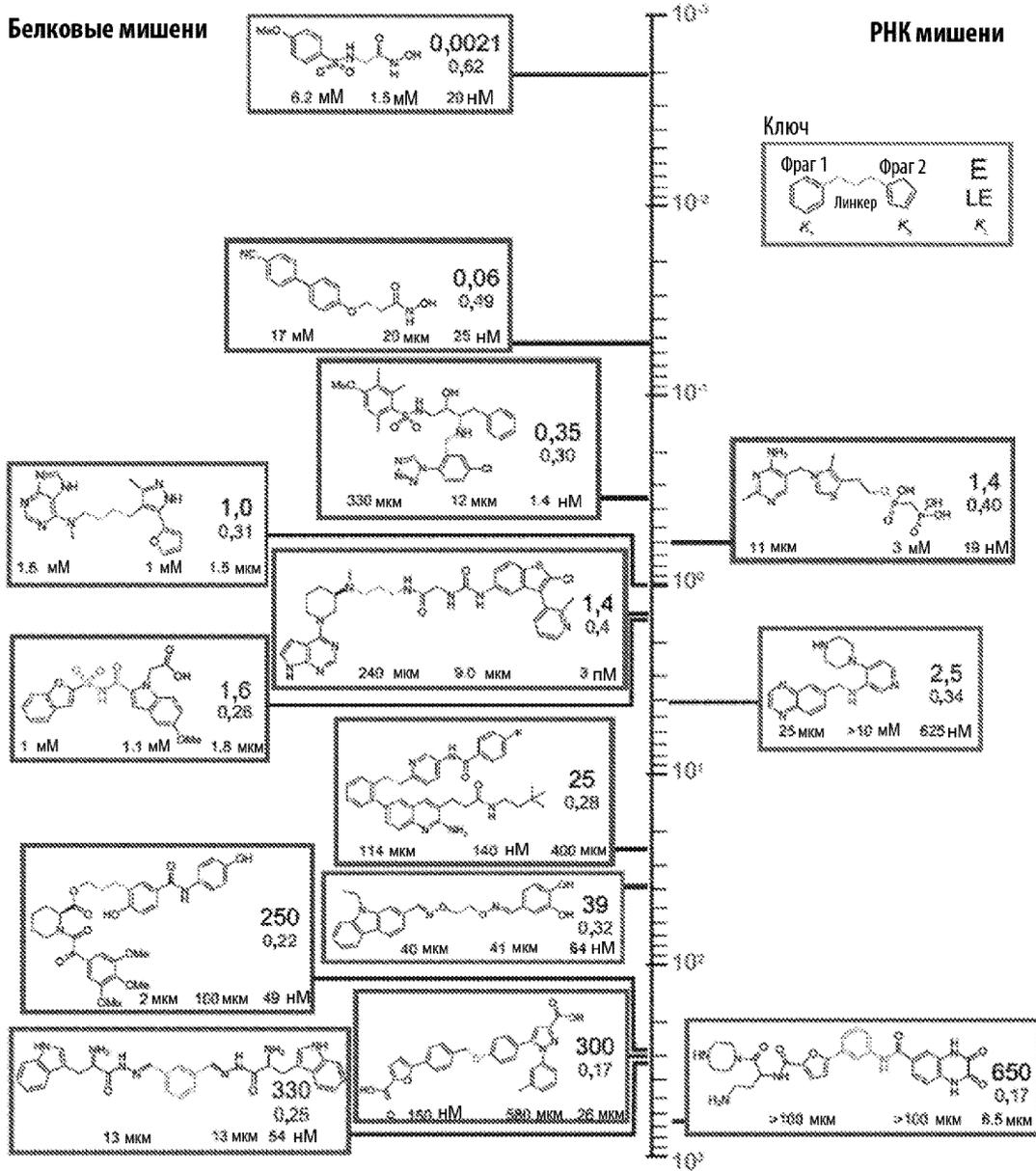
Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 5



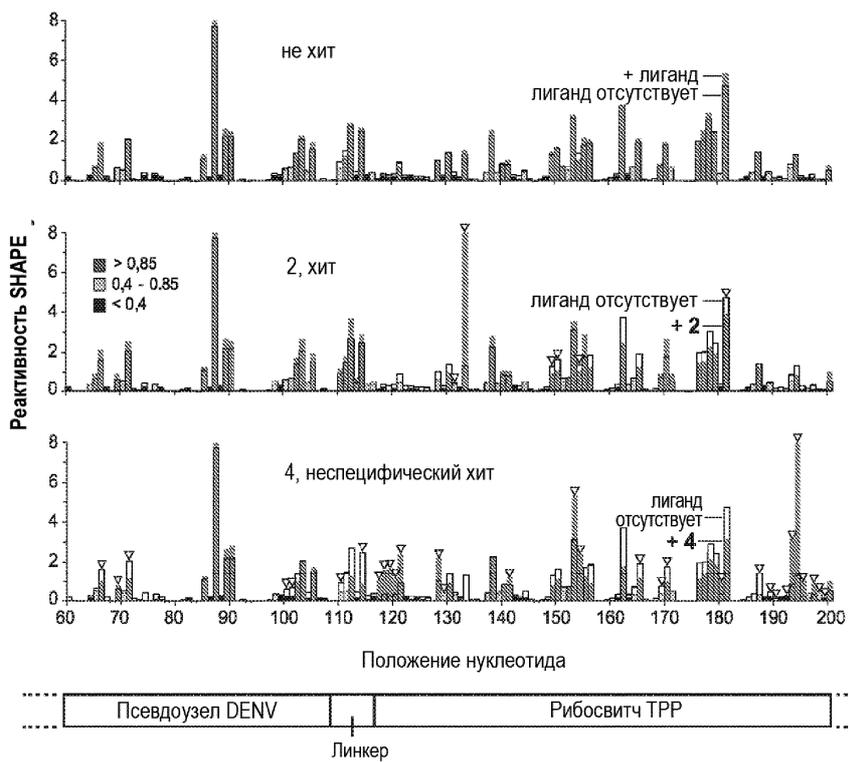
Фиг. 6

GGUCGCGAGUAAUUCGCGACCGCUGCAAGAGAUUGUAGCGUGGGCACUUCGGUGUCCACACGCGAAGGAAAC
 CGCGUGUCAACUGUGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCUAAAACUCAGUACUCGGGGUGCCCUUCUCGCGUGA
 AGGUCGAGAAAUACCCGUUACCCUGAUCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUGGAUCCGGUUCGCCG
 GAUCAUUCGGGCUUCGGUCCGGUUC

Фиг. 7А

A G
 G A — Тетрапетля
 A — U
 N — M — Штрих-код нуклеотида
 N — M
 G ● U — Нуклеотид без штрих-кода
 N — M
 N — M
 G — C

Фиг. 7В



Фиг. 8

