



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.06.17

(51) Int. Cl. C07D 401/12 (2006.01)
C07D 241/12 (2006.01)
A61K 31/498 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(54) РНК-НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 63/195,779

(72) Изобретатель:

(32) 2021.06.02

Уикс Кевин, Об Джеффри, Ли Кэлинь,
Зеллер Мередит (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/031736

(74) Представитель:

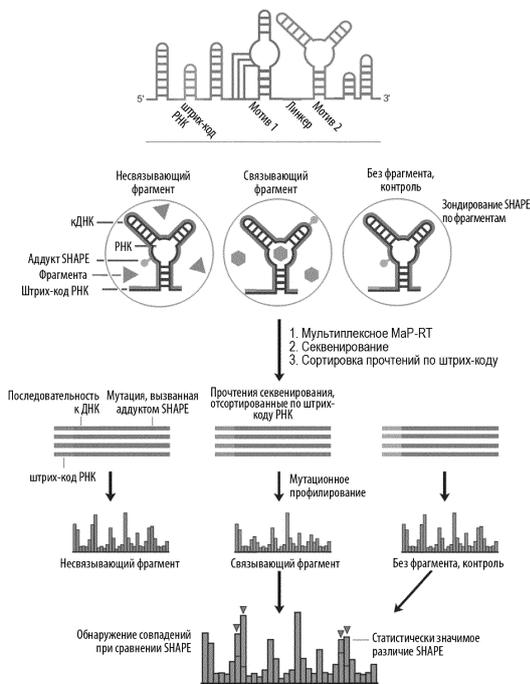
(87) WO 2022/256382 2022.12.08

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ НОРЗ
КАРОЛИНА ЭТ ЧАПЕЛ ХИЛЛ (US)

(57) Изобретение относится к соединениям, которые связываются с молекулой РНК-мишени, такой как ТРР-рибопереключателю, к композициям, содержащим указанные соединения, и к способам их получения и применения. Предложенные соединения содержат два структурно различных фрагмента, которые обеспечивают возможность связывания с РНК-мишенью в двух разных сайтах связывания с образованием лиганда с более высокой аффинностью связывания по сравнению с соединениями, которые связываются только с одним сайтом связывания РНК.



РНК-НАЦЕЛИВАЮЩИЕ ЛИГАНДЫ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к соединениям, которые связываются с молекулой РНК-мишени, такой как TRP-рибопереключателю, к композициям, содержащим указанные соединения, и к способам их получения и применения. Предложенные соединения содержат два структурно различных фрагмента, которые обеспечивают возможность связывания с РНК-мишенью в двух различных сайтах связывания, что приводит к получению лиганда с более высокой связывающей аффинностью по сравнению с соединениями, которые связываются только с одним сайтом связывания РНК.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Материал, представленный в сопроводительном перечне последовательностей, полностью включен в данную заявку посредством ссылки. Сопроводительный файл под названием «Перечень последовательностей 39397600002_ST25» создан 5 августа 2020 года и имеет размер 4 кб.

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное изобретение сделано при государственной поддержке по грантам № GM098662 и AI068462, присужденным Национальными институтами здравоохранения (НИИ). Государство имеет определенные права на данное изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

подавляющее большинство низкомолекулярных лигандов разработаны, в первую очередь, для осуществления действий с биологическими системами с помощью нацеливающих белков. Белки имеют очень сложные трехмерные структуры, которые

имеют решающее значение для их правильного функционирования и которые содержат щели и карманы, в которых могут связываться низкомолекулярные лиганды^{1,2}.

Транскриптом – набор всех молекул РНК, вырабатываемых в организме – также включает перспективные мишени для исследования и осуществления действий с биологическими системами. Например, транскриптомы РНК не только играют важную роль в системах млекопитающих, но они также присутствуют и в бактериях, и в вирусах и, следовательно, представляют собой мишени для низкомолекулярных соединений для модулирования экспрессии генов.

РНК может принимать трехмерные структуры, по сложности конкурирующие со сложностью белков³, что является ключевым свойством, необходимым для разработки высокоселективных лигандов⁴, а РНК играют важную роль в управлении характеристиками биологических систем⁵. Первоначально рассматриваемая как просто носитель генетической информации, который существует исключительно для передачи сообщений, кодирующих белок и управляющих процессом биосинтеза белка, в настоящее время РНК имеет современное и углубленное понимание, включающее расширенную роль, при этом в настоящее время известно, что широкий спектр молекул РНК играет широкую и далеко идущую роль в модуляции экспрессии генов и других биологических процессов посредством различных механизмов. Было обнаружено, что даже большое количество недавно открытых некодирующих РНК связано с такими заболеваниями как рак и неопухолевые заболевания. Таким образом, осознание того, что РНК вносят свой вклад в болезненные состояния, помимо кодирования патогенных белков, открывает множество ранее неизученных терапевтических мишеней.

Однако, несмотря на то, что было показано, что низкомолекулярные лиганды могут связываться с мРНК и потенциально повышать или понижать эффективность трансляции, настраивая экспрессию белка в клетках^{6,7}, существуют проблемы, связанные с идентификацией низкомолекулярных лигандов РНК, которые отсутствуют при нацеливании на белки^{4,11,12}. Они также включают в себя разработку малых молекул, направленных на некодирующие РНК, которые также представляют собой богатый пул мишеней⁸⁻¹⁰. К сожалению, несмотря на развитие различных технологий анализа структуры РНК и открытия новых функций, возможности эффективно и быстро идентифицировать или создавать ингибиторы, которые связываются с РНК и нарушают ее функцию, остаются

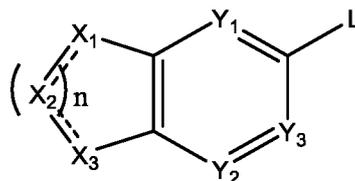
далеко позади. Таким образом, в данной области техники существует большая потребность в разработке новых способов и технологий, обеспечивающих возможность быстрой и эффективной идентификации низкомолекулярных лигандов, нацеленных на молекулы РНК.

5

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как упомянуто выше, транскриптом представляет собой перспективный, но недостаточно используемый набор мишеней для низкомолекулярных лигандов. Низкомолекулярные лиганды (и, в конечном итоге, лекарственные средства), нацеленные на матричные РНК и некодирующие РНК, обладают потенциалом модулировать состояние
10 клетки и заболевание. В настоящем изобретении использованы стратегии скрининга по фрагментам с использованием селективного ацилирования 2'-гидроксила, анализируемого методом удлинения праймера (SHAPE) и зондированием структуры РНК методом SHAPE-мутационного профилирования (MaP), для обнаружения низкомолекулярных фрагментов, которые связываются со структурой РНК-мишени. В частности, были идентифицированы
15 фрагменты и пары кооперативно связывающихся фрагментов, которые связываются с TRP-рибопереключателем с миллимолярной или микромолярной аффинностью. Были проведены исследования зависимости активности от структуры (SAR) для получения информации для эффективной разработки связанного фрагмента лиганда, который связывается с TRP-рибопереключателем с высокой наномолярной аффинностью.
20 Принципы настоящего изобретения не ограничены TRP-рибопереключателем и также могут быть широко применимы для других структур РНК-мишеней с использованием кооперативного и многоцентрового связывания для разработки высококачественных лигандов для разнообразных РНК-мишеней.

Таким образом, в одном аспекте описанный объект изобретения представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (I):



Формула (I)

где

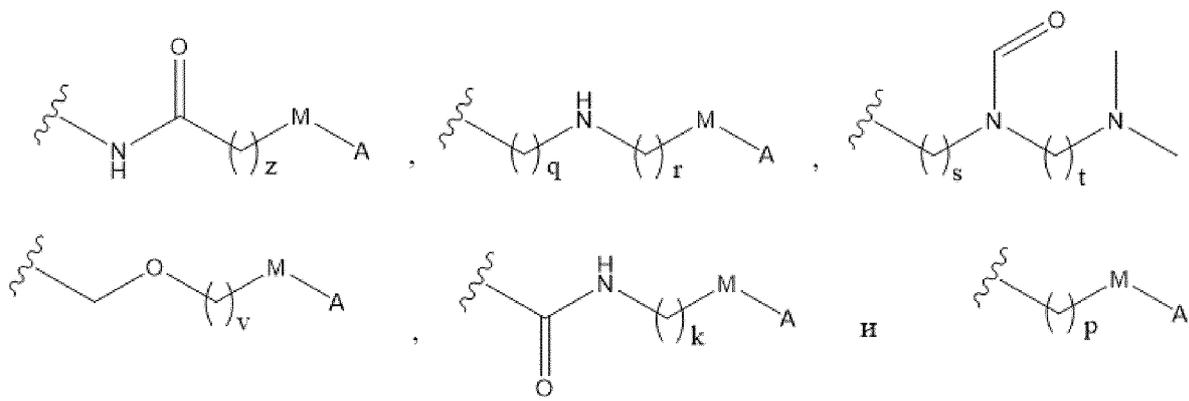
X_1 , X_2 и X_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_1 , CHR_1 , N, NH, O и S, при этом смежные X_1 , X_2 и X_3 выбраны так, что одновременно не представляют собой O или S;

пунктирные линии представляют собой необязательные двойные связи;

Y_1 , Y_2 и Y_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_2 и N;

n равен 1 или 2, при этом если n равен 1, то только одна из пунктирных линий представляет собой двойную связь;

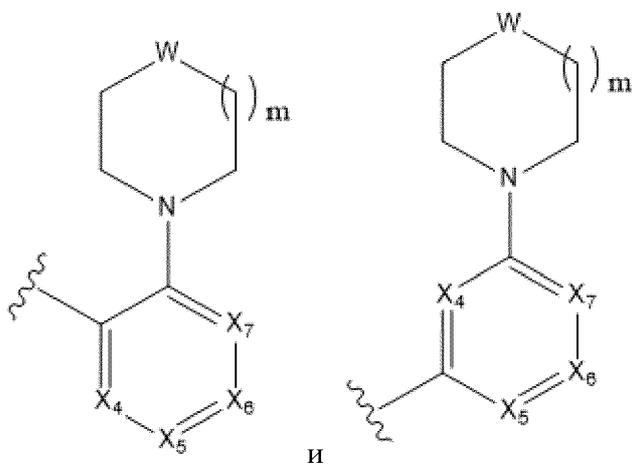
L выбран из



где z , r , s , t , v , k и p независимо выбраны из целых чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, q выбран из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

M выбран из $-NH-$, $-O-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)NH-$, $-S-$ и $-C(=O)-$; и

A выбран из



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

при этом R_1 , R_2 и R_3 независимо выбраны из -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CF₃, -OH, -CN, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ алкила), -N(C₁-C₆ алкила)₂, -COOH, -COO(C₁-C₆ алкила), -CO(C₁-C₆ алкила), -O(C₁-C₆ алкила), -OCO(C₁-C₆ алкила), -NCO(C₁-C₆ алкила), -CONH(C₁-C₆ алкила) и замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила;

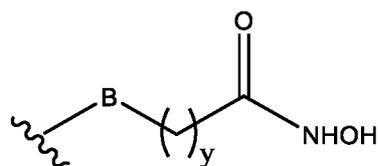
m равен 1 или 2, и

W представляет собой -O- или -N(R₄)-, где R_4 выбран из -H, -CO(C₁-C₆ алкила), замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила, замещенного или незамещенного арила, замещенного или незамещенного гетероарила, замещенного или незамещенного циклоалкила, -CO(арила), -CO(гетероарила) и -CO(циклоалкила);

при условии, что по меньшей мере два из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляют собой N;

или его фармацевтически приемлемая соль.

В дополнительном варианте реализации L представляет собой



, где B выбран из -NH- и -NHC(=O)-; и y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5.

В дополнительном аспекте описанного объекта изобретения предложены способы получения соединений, описанных в данном документе.

Дополнительные аспекты описанного объекта изобретения представлены ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** представлены схемы конструкций для скрининга РНК и рабочая схема скрининга фрагментов. Показаны мотивы РНК 1 и 2, спираль штрих-кода; и спирали структурных кассет. РНК зондируют с помощью SHAPE в присутствии или в отсутствие
5 низкомолекулярного фрагмента и считывают химические модификации, соответствующие зависимой от лиганда структурной информации с помощью мультиплексного секвенирования MaP.

На **Фиг. 2** представлено репрезентативное сравнение частоты мутаций для совпадений и несовпадений фрагментов. Нормализованные частоты мутаций для образцов,

подверженных действию фрагмента, обозначены как +лиганд, +2 или +4 и сравнены с линиями без лиганда, обозначенными как «без лиганда». Статистически значимые изменения частоты мутаций обозначены треугольниками (см. Фиг. 7, где представлены подтверждающие данные SHAPE). (вверху) Сравнение частоты мутаций для иллюстративного фрагмента, который не связывается с экспериментальным конструктом. (посередине) Совпадение фрагмента с областью TRP-рибопереключателя РНК. (внизу) Неспецифическое совпадение, которое вызывает изменения реакционной способности во всем экспериментальном конструкте. Реперы мотивов 1 и 2 представлены под профилями SHAPE.

10 На **фиг. 3А и 3В** представлено сравнение структур TRP-рибопереключателя, связанного (Фиг. 3А) фрагментом 17, и (Фиг. 3В) нативного лиганда TRP (2HOJ²⁸). На каждом изображении структуры РНК изображены и одинаковой ориентации. Водородные связи между лигандами и РНК изображены пунктирными линиями. Показаны катионы Mg²⁺ и Mn²⁺ и молекулы воды. Кристаллические структуры рибопереключателя, связанного (3А) соединением 17, (3В) TRP. Стрелка показывает вращение G72 в 17-связанной структуре. Ру, пиримидин; и РР, пирофосфатные фрагменты TRP.

На **Фиг. 4** представлен термодинамический цикл и аффинности поэтапного связывания лиганда для фрагментов 2 и 31.

20 На **Фиг. 5** представлено сравнение лигандов фрагмент-линкер-фрагмент, разработанных способами, основанными на фрагментах, упорядоченных по коэффициенту связывания (E). Значения представлены на логарифмической оси. Кооперативное связывание соответствует более низким значениям E (верхняя часть вертикальной оси). Фрагмент 37 демонстрирует значение E 2,5 и значение LE 0,34. Константы диссоциации отдельных фрагментов (слева, посередине) и связанного лиганда (справа) указаны под составными фрагментами; показано значение E (вверху) и эффективность лиганда (внизу). Ковалентное связывание, возникшее между фрагментами, выделено светло-серым. Структуры составных фрагментов подробно описаны в таблице 7.

30 На **Фиг. 6А и 6В** представлено строение конструкта для скрининга. На Фиг. 6А 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

(подчеркнут штрих-код NT); GUGGGCACUUCGGUGUCCAC (SEQ ID NO: 9) представляет собой структурную кассету; ACGCGAAGGAAACCGCGUGUCAACUGUGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCU (SEQ ID NO: 10) представляет собой псевдоузел DENV (мутации выделены жирным); AAAACU 5 представляет собой линкер; CAGUACUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGAAGGCUGAGAAAUACCCGUAUCACCUGA UCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUG (SEQ ID NO: 11) представляет собой TPP-рибопереключател (мутации выделены жирным); и GAUCCGGUUCGCCGGAUCAAUCCGGGCUUCGGUCCGGUUC (SEQ ID NO: 12) 10 представляет собой структурную кассету. На Фиг. 6B представлена вторичная структура штрих-кода последовательности РНК в контексте ее самосворачивающейся шпильки.

На Фиг. 7 представлены профили SHAPE для несовпадающих, совпадающих и неспецифических совпадающих фрагментов. Профили частоты мутаций, соответствующие воздействию фрагмента, и контрольные профили без лиганда обозначены сплошным серым 15 цветом и черным контуром, соответственно. Нуклеотиды, которые были определены как статистически значимо отличные для образцов, подверженных воздействию фрагмента, и для образцов без фрагмента, обозначены треугольниками. Профили частоты мутаций для тех же фрагментов схематически представлены на Фиг. 2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

20 Описанный объект изобретения будет более подробно описан далее. Однако многочисленные модификации и другие варианты реализации описанного объекта изобретения, описанного в данном документе, станут понятны специалистам в той области техники, к которой относится описанный объект изобретения, с использованием идей, представленных в предшествующих описаниях. Таким образом, следует понимать, что 25 описанный объект изобретения не ограничен конкретными описанными вариантами реализации, и что модификации и другие варианты реализации считаются входящими в объем прилагаемой формулы изобретения. Иными словами, объект изобретения, описанный в данном документе, охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты. В том случае, если один из включенных литературных источников, патентов

и подобных материалов отличается от данной заявки или противоречит ей, включая, без ограничения, определение терминов, использование терминов, описанные технологии или т.п., следует руководствоваться данной заявкой. Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области техники. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки.

Определения

В данном контексте 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 нециклическому алкановому соединению, модифицированному посредством удаления одного атома водорода из нециклического алкана и, следовательно, посредством замещения неводородной группы или радикала. Радикалы алкильных групп могут быть разветвленными или неразветвленными. Радикалы низших алкильных групп содержат от 1 до 4 атомов углерода. Радикалы высших алкильных групп содержат от 5 до 8 атомов углерода. Примеры радикалов алкильных, низших алкильных и высших алкильных групп включают, без ограничения, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, амил, трет-амил, н-пентил, н-гексил, изооктил и подобные радикалы.

В данном контексте записи «C(=O)», «CO» и «C(O)» использованы для обозначения карбонильного фрагмента. Примеры подходящих карбонильных фрагментов включают, без ограничения, те, которые встречаются в кетонах и альдегидах.

Термин «циклоалкил» относится к углеводороду, содержащему 3-8 членов, или 3-7 членов, или 3-6 членов, или 3-5 членов, или 3-4 члена, и он может быть моноциклическим или бициклическим. Кольцо может быть насыщенным или может иметь определенную степень ненасыщенности. Циклоалкильные группы могут быть необязательно замещены одним или более заместителями. В одном варианте реализации 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца циклоалкильной группы могут быть замещены заместителем. Иллюстративные примеры циклоалкильной группы включают циклопропил, циклопентил, циклогексил,

циклобутил, циклогептил, циклопентенил, циклопентаденил, циклогексенил, циклогексаденил и т.п.

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

10 Термин «гетероарил» относится к ароматическим 5-10-членным кольцевым системам, в которых гетероатомы выбраны из O, N или S, а остальные кольцевые атомы являются атомами углерода (с соответствующими атомами водорода, если не указано иное). Гетероарильные группы могут быть необязательно замещены одним или более 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, хнолинил, пиразолил, изотиазолил, пиридазинил, пириимидинил, пиразинил, триазинил, изохинолинил, индазолил и т.п.

В данном контексте термин «замещенный» относится к фрагменту (такому как гетероарил, арил, циклоалкил, алкил и/или алкенил), причем указанный фрагмент связан с 20 одним или более дополнительными органическими или неорганическими радикалами заместителей. В некоторых вариантах реализации замещенный фрагмент содержит 1, 2, 3, 4 или 5 дополнительных групп или радикалов заместителей. Подходящие органические и неорганические радикалы заместителей включают без ограничения галоген, 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 галогеналкокси-радикалы, и определение указанных терминов представлено в данном документе. Если не указано иное, органические заместители могут содержать от 1 до 4 или 30

от 5 до 8 атомов углерода. Если замещенный фрагмент связан более чем с одним радикалом заместителя, то радикалы заместителей могут быть одинаковыми или различными.

В данном контексте термин «незамещенный» относится к фрагменту (такому как гетероарил, арил, алкенил и/или алкил), который не связан с одним или более
5 дополнительными органическими или неорганическими радикалами заместителей, как описано выше, что означает, что такой фрагмент замещен только атомами водорода.

Следует понимать, что структуры, представленные в данном документе, и любое упоминание «замещения» или «замещенного чем-либо» включает явное условие, что такие структуры и замещения соответствуют допустимой валентностью замещенного атома и
10 заместителя, и что замещение приводит к стабильному соединению, например, которое не подвергается самопроизвольному превращению, такому как превращение вследствие перегруппировки, циклизации, элиминирования и т.д.

В данном контексте термин «РНК» относится к рибонуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимерную молекулу, необходимую для выполнения различных
15 биологических функций для кодирования, декодирования, регуляции и экспрессии генов. РНК и ДНК представляют собой нуклеиновые кислоты и вместе с липидами, белками и углеводами составляют четыре важнейших вида макромолекул, необходимых для всех известных форм жизни. Подобно ДНК, РНК собирается в виде цепи нуклеотидов, но в отличие от ДНК, РНК встречается в природе в виде одной нити, свернутой сама с собой, а
20 не парную двойную нить. Клеточные организмы используют матричную РНК (мРНК) для передачи генетической информации (с помощью азотистых оснований гуанина, урацила, аденина и цитозина, обозначаемых буквами G, U, A и C), которая обеспечивает направленный синтез конкретных белков. Многие вирусы кодируют свою генетическую информацию с помощью генома РНК. Некоторые молекулы РНК играют активную роль в
25 клетках посредством катализа биологических реакций, регулирования экспрессии генов или восприятия и передачи ответов на клеточные сигналы. Одним из таких активных процессов является синтез белка, универсальная функция, в которой молекулы РНК обеспечивают направленный синтез белков на рибосомах. В указанном процессе используются молекулы транспортной РНК (тРНК) для доставки аминокислот к рибосоме,
30 где рибосомная РНК (рРНК) затем связывает аминокислоты друг с другом с образованием кодированных белков.

В данном контексте термин «некодирующая РНК (нкРНК)» относится к молекуле РНК, которая не транслируется в белок. Последовательность ДНК, из которой транскрибируется функциональная некодирующая РНК, часто называют геном РНК. Распространенные и функционально значимые типы некодирующих РНК включают транспортные РНК (тРНК) и рибосомные РНК (рРНК), а также малые РНК, такие как микроРНК, миРНК, piРНК, мякРНК, мяРНК, внеклеточные РНК, scaРНК и длинные нкРНК, такие как as Xist и HOTAIR.

В данном контексте термин «кодирующая РНК» относится к РНК, которая кодирует белок, т.е. к матричной РНК (мРНК). Такие РНК составляют транскриптом.

В данном контексте термин «рибопереключатель» относится к регуляторному сегменту молекулы матричной РНК, который связывается с малой молекулой, что приводит к изменению выработки белка, кодируемого мРНК. Таким образом, мРНК, которая содержит рибопереключатель, напрямую участвует в регулировании собственной активности, в ответе на концентрации ее эффекторной молекулы.

В данном контексте термин «ТРР-рибопереключатель», также известный как элемент THI и рибопереключатель Thi-box, относится к высококонсервативной вторичной структуре РНК. Он служит в качестве рибопереключателя, который напрямую связывается с тиаминпирофосфатом (ТРР) для регуляции экспрессии генов посредством различных механизмов у архей, бактерий и эукариотов. ТРР представляет собой активную форму тиамина (витамина B1), важного кофермента, синтезируемого посредством связывания пиримидиновых и тиазольных фрагментов у бактерий.

В данном контексте термин «псевдоузел» относится к вторичной структуре нуклеиновой кислоты, содержащей по меньшей мере две структуры типа «стебель-петля», причем половина одного стебля интеркалирована между двумя половинами другого стебля. Псевдоузел был впервые распознан в вирусе желтой мозаики турнепса в 1982 году. Псевдоузлы сворачиваются в узлоподобные трехмерные конформации, но не являются истинными топологическими узлами.

«Аптамер» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая способна связываться с определенной молекулой, представляющей собой интерес, с высокой аффинностью и специфичностью (Tuerk and Gold, 1990; Ellington and Szostak, 1990) и может быть либо сконструированной искусственно, либо природного происхождения. Связывание

лиганда с аптамером, который обычно представляет собой РНК, изменяет конформацию аптамера и нуклеиновой кислоты, в которой находится аптамер. В некоторых случаях конформационное изменение ингибирует трансляцию мРНК, в которой находится аптамер, например, или иным образом препятствует нормальной активности нуклеиновой кислоты.

5 Аптамеры также могут состоять из ДНК или могут содержать неприродные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Аптамер чаще всего получают посредством *in vitro* выбора для связывания с молекулой-мишенью. Однако возможен также *in vivo* выбор аптамера. Аптамер также является лиганд-связывающим доменом рибопереключателем. Аптамер обычно имеет длину от около 10 до около 300 нуклеотидов. Более часто аптамер имеет
10 длину от около 30 до около 100 нуклеотидов. См., например, патент США № 6949379, включенный в данный документ посредством ссылки. Примеры аптамеров, применимых для данного 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).

В данном контексте «ПЦР» относится к полимеразной цепной реакции и обозначает
15 способ, широко используемый в молекулярной биологии для быстрого получения миллионов и миллиардов копий образца конкретной ДНК, что обеспечивает возможность ученым использовать очень маленький образец ДНК и амплифицировать его до количества, достаточного большого для детального исследования.

Выражение «фармацевтически приемлемые» означает, что вещество или
20 композиция являются химически и/или токсикологически совместимыми с другими ингредиентами, входящими в состав, и/или с субъектом, подлежащим лечению с их применением.

Выражение «фармацевтически приемлемая соль» в данном контексте относится к
фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по
25 данному изобретению. Примеры солей включают, без ограничения, сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, иодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, гидроцитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные,
30 глюкуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные «мезилатные», этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные,

памоатный (т.е. 1,1'-метиленис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли, соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может подразумевать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион.

5 Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. В тех случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, указанная соль может иметь несколько противоионов. Таким образом, фармацевтически
10 приемлемая соль может содержать один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

«Носители» в данном контексте включают фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, на которое они оказывают воздействие, в используемых дозах
15 и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный рН-буферный раствор. Неограничивающие примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (содержащие менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный
20 альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные
25 поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый носитель представляет собой не встречающийся в природе фармацевтически приемлемый носитель.

Термины «лечить» и «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к
30 профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или расстройства,

такого как развитие или распространение рака. В контексте данного изобретения преимущественные или требуемые клинические результаты включают, без ограничения, ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. не ухудшение) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как поддающуюся, так и не поддающуюся обнаружению. «Лечение» также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни без получения лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже есть патологическое состояние или расстройство, а также тех, кто склонен к приобретению патологического состояния или расстройства, или тех, у кого должно быть предотвращено патологическое состояние или расстройство.

Термин «введение» или «вводить» включает способы внедрения соединения(-й) субъекту для осуществления их предполагаемой функции. Примеры способов введения, которые могут быть использованы, включают инъекции (включая, без ограничения, подкожные, внутривенные, парентеральные, интраперитонеальные, интратекальные), местное введение, пероральное введение, ингаляции, ректальное и трансдермальное введение.

Термин «эффективное количество» включает количество, эффективное для достижения требуемого результата при использовании в необходимых дозах и в течение необходимого периода времени. Эффективное количество соединения может варьироваться в зависимости от таких факторов как болезненное состояние, возраст и масса субъекта, а также от способности соединения вызывать требуемый ответ у субъекта. Схемы введения доз можно корректировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа.

Выражения «системное введение», «введен системно», «периферическое введение» и «введен периферически» в данном контексте означают введение соединения(-й), лекарственного средства или другого материала таким образом, что он поступает в систему пациента и, следовательно, подвергается метаболизму и другим подобным процессам.

Выражение «терапевтически эффективное количество» означает количество соединения по данному изобретению, которое (i) обеспечивает лечение или предотвращение конкретного заболевания, патологического состояния или расстройства,

(ii) уменьшает, улучшает или исключает один или более симптомов конкретного заболевания, патологического состояния или расстройства или (iii) обеспечивает предотвращение или задержку возникновения одного или более симптомов конкретного заболевания, патологического состояния или расстройства, описанного в данном документе. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшать количество раковых клеток; уменьшать 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) метастазы опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. В зависимости от степени, в которой лекарственное средство может предотвращать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака эффективность может быть измерена, например, посредством 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 изобретение относится к стратегии поиска лигандов по фрагментам, подходящей для определения малых молекул, которые связываются с определенными областями РНК с высокой аффинностью. Ранее, в международной заявке № РСТ/2020/045022 была описана такая стратегия поиска лигандов по фрагментам, используемая для определения различных малых молекул, которые специфически нацеливаются на определенные области связывания РНК, и указанная заявка полностью включена в данный документ посредством ссылки. В целом, поиск лигандов по фрагментам обеспечивает возможность определения одного или более низкомолекулярных «фрагментов», которые связываются с интересующей мишенью с низкой или средней аффинностью. Затем указанные фрагменты дорабатывают или связывают с получением более мощных лигандов^{13,14}. Обычно такие фрагменты имеют молекулярную массу менее

300 Да и для обнаруживаемого связывания обеспечивают по существу высокопрочные связи с интересующей мишенью.

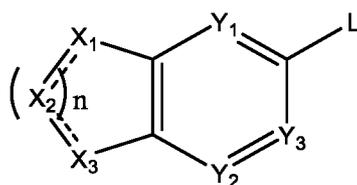
Поиск лигандов по фрагменту до сих пор успешно применялся лишь для идентификации первоначальных совпадающих соединений, которые представляют собой совпадения одиночных фрагментов, связывающихся с данной РНК¹⁵⁻¹⁹. Идентификация нескольких фрагментов, связывающихся с одной и той же РНК обеспечит возможность использования преимущества потенциальных аддитивных и кооперативных взаимодействий между фрагментами в связывающем кармане^{20,21}. Однако недавно было показано, что многие РНК связываются со своими лигандами посредством множества «субсайтов», которые представляют собой области связывающего кармана, которые контактируют с лигандом независимым или кооперативным образом²². Кроме того, было показано, что высокоаффинное связывание РНК может возникать даже если связывание субсайта демонстрирует лишь умеренный кооперативный эффект. Указанные особенности предвещают эффективность поиска лигандов по фрагментам применимо к РНК-мишеням.

Таким образом, на основании вышеизложенного, настоящее изобретение относится к способам идентификации фрагментов, которые связываются с РНК, представляющей собой интерес, такой как, например, ТРР-рибопереключатель. Во-вторых, описанные способы относятся к определению позиционирования связывания фрагмента в РНК с разрешением порядка одного нуклеотида. В-третьих, описанные способы относятся к идентификации фрагментов второго сайта, которые связываются вблизи сайта первоначального совпадения фрагмента. Описанный способ объединяет подход к поиску лигандов по фрагментам с зондированием структуры РНК методом SHAPE-MaP^{23,24}, который используют как для идентификации РНК-связывающих фрагментов, так и для определения отдельных сайтов связывания фрагментов. В конечном итоге, лиганд, который образуется посредством связывания двух фрагментов, не похож на нативный лиганд рибопереключателя, и он связывается со структурно сложным ТРР-рибопереключателем РНК с высокой аффинностью.

Предложенные способы и идентификация лигандов более подробно описаны ниже.

А. Соединения

Первый аспект описанного объекта изобретения представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (I):



Формула (I)

где

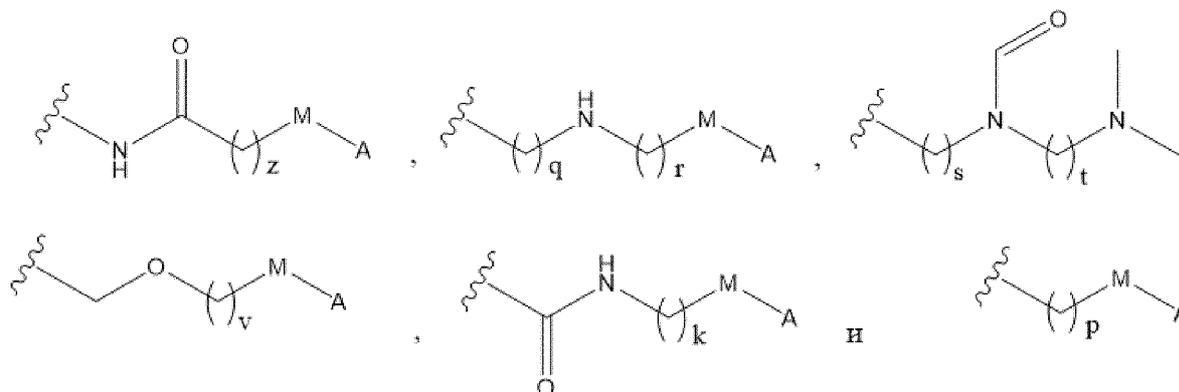
X_1 , X_2 и X_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_1 , CHR_1 , N, NH, O и S, при этом смежные X_1 , X_2 и X_3 выбраны так, что одновременно не представляют собой O или S;

пунктирные линии представляют собой необязательные двойные связи;

Y_1 , Y_2 и Y_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_2 и N;

n равен 1 или 2, при этом если n равен 1, то только одна из пунктирных линий представляет собой двойную связь;

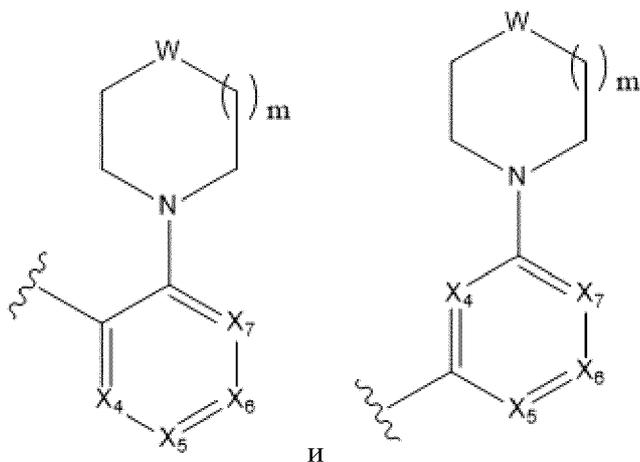
L выбран из



где z , r , s , t , v , k и p независимо выбраны из целых чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, q выбран из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

M выбран из $-NH-$, $-O-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)NH-$, $-S-$ и $-C(=O)-$; и

A выбран из



где X_4 , X_5 , X_6 и X_7 независимо выбраны из CR_3 и N ;
 при этом R_1 , R_2 и R_3 независимо выбраны из $-H$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-F$, $-CF_3$, $-OH$, $-CN$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-N(C_1-C_6 \text{ алкила})_2$, $-COOH$, $-COO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-CO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-O(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-OCO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-NCO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-CONH(C_1-C_6 \text{ алкила})$ и замещенного или незамещенного C_1-C_6 алкила;

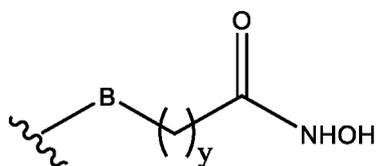
m равен 1 или 2; и

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

при условии, что по меньшей мере два из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляют собой N ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

В дополнительном варианте реализации L представляет собой



, где B выбран из $-NH-$ и $-NHC(=O)-$; и y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из X_1 , X_2 или X_3 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X_1 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X_2 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X_3 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором в каждом случае два из X_1 , X_2 и X_3 представляют собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X_1 и X_3 представляют собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из Y_1 , Y_2 и Y_3 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_1 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_2 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_3 представляет собой N .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из Y_1 , Y_2 и Y_3 представляет собой CR_2 .

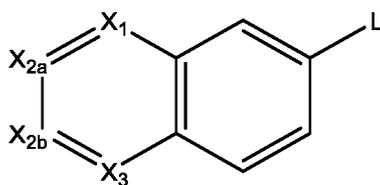
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_1 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_2 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_3 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором n равен 2.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (II):



Формула (II)

где

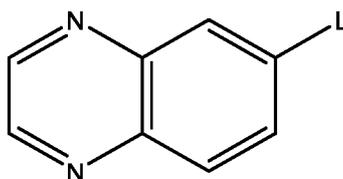
X_{2a} и X_{2b} независимо выбраны из CR_1 и N ;

X_1 и X_3 независимо выбраны из CR_1 и N ;

L и R_1 являются такими, как описано для формулы (I); и

два из X_1 , X_{2a} , X_{2b} и X_3 представляют собой N ; или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (III):



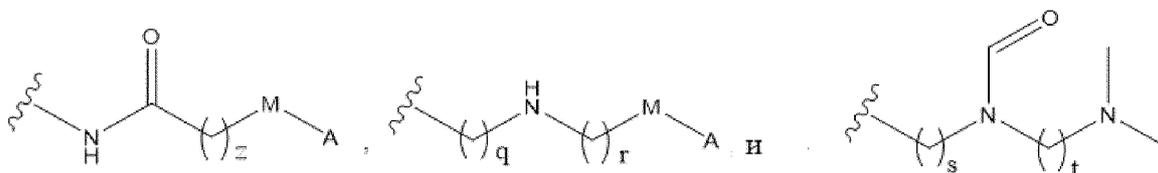
Формула (III)

где

L является таким, как описано для формулы (I); или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z , g , s , t , v , k и r независимо выбраны из целых чисел 1, 2 и 3.

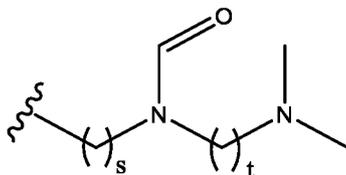
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором L выбран из



Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z , g , s и t независимо выбраны из целых чисел 1, 2 и 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z , g и s равны 1.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором L представляет собой



Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором s и t независимо выбраны из 1, 2 и 3.

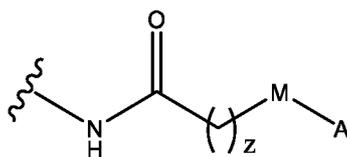
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором s и t равны 1 или 2.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором s равен 1.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором t равен 2.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором s равен 1, а t равен 2.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором L представляет собой



Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z равен 1, 2 или 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z равен 1.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z равен 2

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z равен 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором М выбран из –NH-, -O- и –S-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором М представляет собой –NH-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором z равен 1, а М представляет собой –NH-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором m равен 1.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором W выбран из -NH-, -O- и -N(C₁-C₆ алкила)-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором W представляет собой -NH-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из X₄, X₅, X₆ и X₇ представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₄ представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₅ представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₆ представляет собой N.

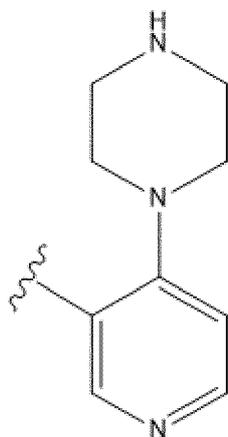
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₇ представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₄ и X₆ представляют собой N.

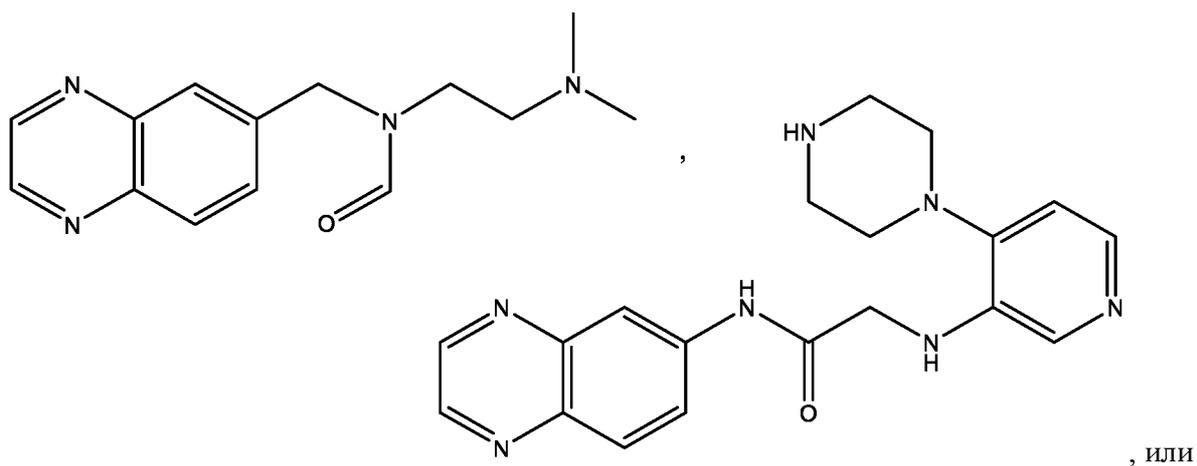
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₅ и X₇ представляют собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором X₅ или X₆ представляют собой N, и оба X₄ и X₇ независимо представляют собой CR₂.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором А представляет собой

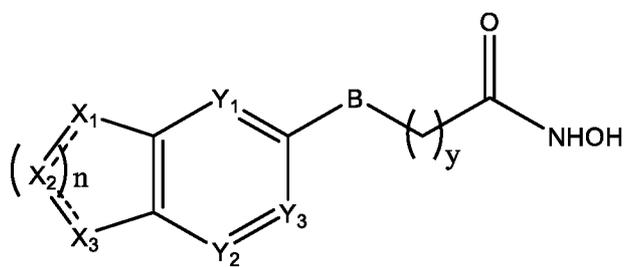


Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру:



его фармацевтически приемлемая соль.

Другой аспект описанного объекта изобретения представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (IV):



Формула (IV)

где X_1 , X_2 и X_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_1 , CHR_1 , N, NH, O и S, при этом смежные X_1 , X_2 и X_3 выбраны так, что одновременно не представляют собой O или S;

пунктирные линии представляют собой необязательные двойные связи;

Y_1 , Y_2 и Y_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_2 и N;

R_1 и R_2 независимо выбраны из -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CF₃, -OH, -CN, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ алкила), -N(C₁-C₆ алкила)₂, -COOH, -COO(C₁-C₆ алкила), -CO(C₁-C₆ алкила), -O(C₁-C₆ алкила), -OCO(C₁-C₆ алкила), -NCO(C₁-C₆ алкила), -CONH(C₁-C₆ алкила) и замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила;

n равен 1 или 2, при этом если n равен 1, то только одна из пунктирных линий представляет собой двойную связь;

у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5; и

В выбран из -NH- и -NHC(=O)-; или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где В представляет собой -NH-

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где В представляет собой -NHC(=O)-.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где у представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 и 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где у равен 1 или 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из Y_1 , Y_2 и Y_3 представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_1 представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_2 представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_3 представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором по меньшей мере один из Y_1 , Y_2 и Y_3 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_1 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_2 представляет собой CR_2 .

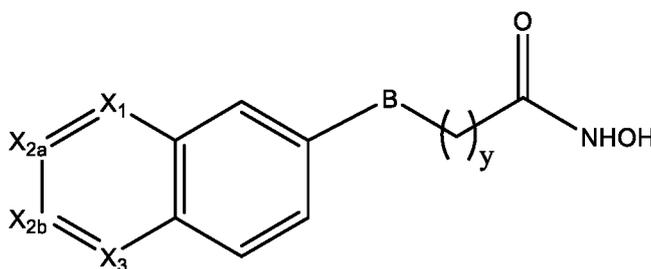
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором Y_3 представляет собой CR_2 .

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где по меньшей мере один из X_1 , X_2 или X_3 представляет собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где в каждом случае два из X_1 , X_2 и X_3 представляют собой N.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (IV), где n равен 2.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (V):



Формула (V)

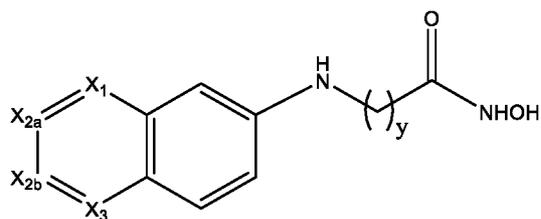
X_{2a} и X_{2b} независимо выбраны из CR_1 и N;

X_1 и X_3 независимо выбраны из CR_1 и N;

при этом два из X_1 , X_{2a} , X_{2b} и X_3 представляют собой N; и

B , R_1 и y являются такими, как описано для формулы (IV); или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (Va) или (Vb)



Формула (Va)

X_{2a} и X_{2b} независимо выбраны из CR_1 и N ;

X_1 и X_3 независимо выбраны из CR_1 и N ;

при этом два из X_1 , X_{2a} , X_{2b} и X_3 представляют собой N ;

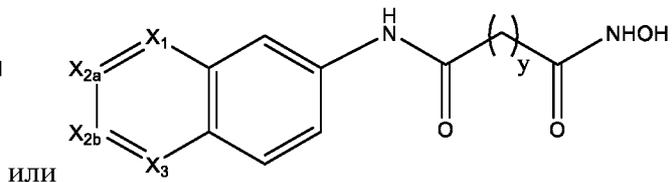
причем y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2 и 3; и R_1 является

таким, как описано для формулы (IV); или его фармацевтически приемлемая соль.

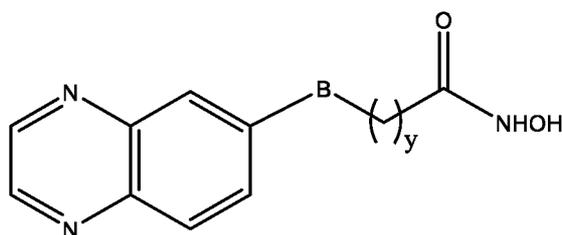
Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, у равен 1.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, у равен 3.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру формулы (VI):



Формула (Vb)



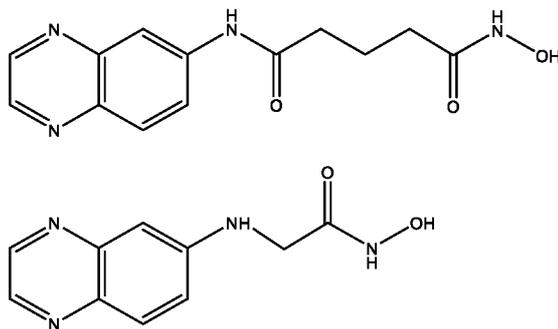
Формула (VI)

где B и y являются такими, как описано для формулы (IV); или его фармацевтически приемлемая соль.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором B представляет собой $-NH-$.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, в котором B представляет собой $-NHC(=O)-$.

Соединение по любому из вышеуказанных вариантов реализации, имеющее структуру:



; или его фармацевтически приемлемая

соль

В. Способы скрининга

Настоящее изобретение относится к разработке и валидации гибкого селективного ацилирования 2'-гидроксила, анализируемого методом скрининга фрагментов на основе удлинения праймера (SHAPE). Доказано, что поиск лигандов по фрагментам является эффективным подходом для идентификации новых соединений, которые образуют по существу плотные контакты с макромолекулами, включая РНК^{13,14,17}. Предпосылкой успеха этой стратегии поиска является адаптируемый высококачественный биофизический анализ для обнаружения связывания лигандов. Так, в некоторых вариантах реализации использовали зондирование структуры РНК методом SHAPE для обнаружения связывания лигандов²³⁻²⁵, в котором измеряют локальную гибкость нуклеотида в качестве относительной реакционной способности 2'-гидроксильной группы рибозы в отношении электрофильных реагентов. Метод SHAPE может быть использован для любой РНК и обеспечивает данные о практически всех нуклеотидах в РНК за один эксперимент, с получением структурной информации по каждому нуклеотиду, помимо простоты обнаружения связывания, и он более подробно описан ниже. Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению SHAPE-мутационного профилирования (MaP)^{23,24}, которое сочетает SHAPE со считыванием данных посредством высокопроизводительного секвенирования, что обеспечивает возможность мультиплексирования и эффективного высокопроизводительного анализа многих тысяч образцов.

Так, в некоторых вариантах реализации данное изобретение относится к способу скрининга с использованием SHAPE и/или SHAPE-MaP для идентификации низкомолекулярных фрагментов и/или соединений, которые связываются и/или образуют

ассоциат с молекулой РНК, представляющей интерес. Способы, описанные в данном документе, дополнительно включают использование SHAPE и/или SHAPE-MaP для идентификации низкомолекулярных фрагментов (например, фрагмента 2), которые связываются и/или образуют ассоциат с молекулой РНК, которая уже предварительно инкубирована с другим низкомолекулярным фрагментом (например, фрагментом 1). Не ограничиваясь теорией, полагают, что фрагмент 1 связывается с первым сайтом связывания, а фрагмент 2 связывается со вторым сайтом связывания (например, субсайтом) в той же молекуле РНК. Таким образом, комбинирование структурных признаков фрагмента 1 и фрагмента 2 (например, посредством связывания двух фрагментов линкером L) с получением соединений, описанных в данном документе, предположительно обуславливает повышенную аффинность связывания лигандов, связанных с фрагментом, с РНК, по сравнению с фрагментом 1 и/или фрагментом 2 по отдельности.

Ниже представлено более подробное описание способов скрининга SHAPE и SHAPE-MaP

15 I. Химия SHAPE

Химия SHAPE по меньшей мере частично основана на том наблюдении, что нуклеофильность 2'-положения рибозы РНК чувствительно к электронному влиянию смежной 3'-фосфодиэфирной группы. Незатрудненные нуклеотиды обуславливают образуют больше конформаций, которые усиливает нуклеофильность 2'-гидроксильной группы, чем нуклеотиды со спаренными основаниями или иным образом ограниченные нуклеотиды. Таким образом, гидроксил-селективные электрофилы, такие как, без ограничения, N-метилизатоевый ангидрид (NMIA), быстрее образуют стабильные 2'-O-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 реакционную способность SHAPE можно сравнивать по всем положениям РНК, поскольку реакционная способность 2'-гидроксила нечувствительна к идентичности оснований. Также возможно, что нуклеотид может быть реакционноспособным, поскольку он находится в конформации, которая усиливает нуклеофильность определенного 2'-гидроксила.

Ожидается, что такой класс нуклеотидов будет редким, будет иметь неканоническую локальную геометрию, и его будет правильно считать неспаренным положением.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500

Описанный в данном документе объект изобретения обеспечивает в некоторых вариантах реализации способы обнаружения структурных данных в молекуле РНК путем исследования структурных затруднений в молекуле РНК произвольной длины и структурной сложности. В некоторых вариантах реализации такие 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; удлинение праймеров с получением 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 крупных биологических лигандов и/или соединений. Праймеры могут быть необязательно мечены радиоизотопами, флуоресцентными метками, тяжелыми атомами, ферментными метками, хемилюминесцентной группой, биотинильной группой, предварительно определенным полипептидным эпитопом, распознаваемым вторичным репортером, или их комбинациями. Анализ может включать разделение, количественное определение, сортировку или их комбинации. Анализ может включать извлечение данных флуоресценции или количества красителя в зависимости от данных времени элюирования, которые называются следами. Например, кДНК можно анализировать в одной колонке прибора для капиллярного электрофореза или в устройстве для микрофлюидики.

В некоторых вариантах реализации можно рассчитать площадь пика в следах для молекулы РНК, содержащей 2'-О-аддукты, и для молекулы РНК, не содержащей 2'-О-аддуктов, в зависимости от нуклеотидной последовательности. Следы можно сравнивать и сопоставлять с последовательностями РНК. Следы, наблюдаемые и учитывающие те кДНК, которые получены в результате секвенирования, 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 путем интегрирования всего следа, аппроксимированного по Гауссу.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации в данном описании предложены 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, при этом электрофил селективно модифицирует свободные нуклеотиды в молекуле РНК с образованием ковалентного 1'-О-аддукта рибозы.

5 В некоторых вариантах реализации электрофил, такой как, без ограничения, N-метилизатоевый ангидрид (NMIA), растворяют в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ДМСО. Раствор реагента и растворителя добавляют в сложный биологический раствор, содержащий 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 требуемой степени модификации молекулы РНК. Электрофил может реагировать со всеми свободными гидроксильными группами в растворе с образованием 2'-О-аддуктов рибозы на молекуле РНК. Кроме того, электрофил может селективно модифицировать неспаренные или иным образом незатрудненные нуклеотиды в молекуле РНК.

15 Молекула РНК может быть подвергнута воздействию электрофила в концентрации, которая приводит к немногочисленной модификации РНК с образованием 2'-О-аддуктов, которые можно обнаружить по способности ингибировать удлинение праймера под действием обратной транскриптазы. Все сайты РНК можно исследовать в одном эксперименте, поскольку химический механизм нацелен на общую реакционную способность 2'-гидроксильной группы. В некоторых вариантах реализации параллельно можно проводить контрольную реакцию удлинения без включения электрофила для оценки фона, а также удлинение дидезокси-секвенирования для определения положений нуклеотидов. Такие комбинированные стадии называются селективным ацилированием 2'-гидроксила, анализируемым по удлинению праймера, или SHAPE.

25 В некоторых вариантах реализации предложенный 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.

30 Количество нуклеотидов, исследуемых в одном эксперименте SHAPE, зависит не только от обнаружения и разрешения используемой технологии разделения, но также от

характера модификации РНК. Учитывая условия реакции, существует длина, при которой почти все молекулы РНК имеют хотя бы одну модификацию. Когда удлинение праймера достигает этой длины, количество удлиняющейся кДНК уменьшается, что ослабляет экспериментальный сигнал. Изменение условий для уменьшения выхода модификации может увеличить длину прочтения. Однако снижение выхода реагента может также уменьшить измеряемый сигнал для каждой длины кДНК. Учитывая эти соображения, предпочтительная максимальная длина одного прочтения SHAPE, вероятно, составляет около 1 тыс. оснований РНК, но не должна ограничиваться этим.

II. SHAPE-MaP

10 В SHAPE-MaP аддукты SHAPE обнаруживают с помощью мутационного профилирования (MaP), в котором используют способность ферментов обратной транскриптазы включать некомплементарные нуклеотиды или создавать делеции в сайтах химических аддуктов SHAPE. В некоторых вариантах реализации SHAPE-MaP можно использовать для конструирования библиотек и секвенирования. В некоторых вариантах реализации в SHAPE-MaP можно использовать методы мультиплексирования.

15 Обычно РНК обрабатывают реагентом SHAPE, который взаимодействует конформационно-динамических нуклеотидах. Во время обратной транскрипции полимераза считывает химические аддукты в РНК и включает в кДНК нуклеотид, некомплементарный исходной последовательности. Полученную кДНК секвенируют с использованием любого массово-параллельного подхода для создания мутационных профилей (MaP). Считывания секвенирования выравнивают по эталонной последовательности, рассчитывают частоту мутаций с разрешением на уровне одного нуклеотида, корректируют по фону и нормализуют с получением стандартного профиля реакционной способности SHAPE. Затем можно использовать реакционную способность SHAPE для моделирования вторичных структур, визуализации конкурирующих и альтернативных структур или количественной оценки любого процесса или функции, которая модулирует динамику локальной нуклеотидной РНК. После SHAPE-модификации молекулы РНК используют обратную транскриптазу для создания мутационного профиля. Эта стадия кодирует положение и относительную частоту аддуктов SHAPE как мутаций в кДНК. кДНК преобразуют в дцДНК с использованием известных в данной области методов (например, реакции ПЦР), а дцДНК дополнительно амплифицируют во второй реакции

ПЦР, добавляя секвенирование для мультиплексирования. После очистки библиотеки секвенирования имеют одинаковый размер, и каждая молекула ДНК содержит всю интересующую последовательность.

5 Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного объекта изобретения предложены способы обнаружения одной или более химических модификаций в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает предоставление нуклеиновой кислоты, предположительно имеющей химическую модификацию; синтез нуклеиновой кислоты с использованием полимеразы и предоставленной нуклеиновой кислоты в качестве матрицы, причем синтез проводят в
10 условиях, когда полимеразы считывает химическую модификацию в предоставленной нуклеиновой кислоте, производя неправильный нуклеотид в полученной нуклеиновой кислоте в месте химической модификации; и обнаружение неправильного нуклеотида.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации данного изобретения предложены способы обнаружения структурных данных в нуклеиновой кислоте. В
15 некоторых вариантах реализации способ включает предоставление нуклеиновой кислоты, предположительно имеющей химическую модификацию; синтез нуклеиновой кислоты с использованием полимеразы и предоставленной нуклеиновой кислоты в качестве матрицы, причем синтез проводят в условиях, когда полимеразы считывает химическую модификацию в предоставленной нуклеиновой кислоте, производя неправильный
20 нуклеотид в полученной нуклеиновой кислоте в месте химической модификации; обнаружение неправильного нуклеотида; и создание выходных файлов, содержащих структурные данные предоставленной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах реализации описанного объекта изобретения предоставленная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК (например,
25 молекулу кодирующей РНК и/или некодирующей РНК). В некоторых вариантах реализации предложенные способы включают обнаружение двух или более химических модификаций. В некоторых вариантах реализации полимеразы считывает множество химических модификаций с производством множества неправильных нуклеотидов, и способы включают обнаружение каждого неправильного нуклеотида.

30 В некоторых вариантах реализации нуклеиновая кислота (например, молекула РНК) была подвержена 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 создана клеткой, из которой получена нуклеиновая кислота, например, без ограничения, эпигенетическая модификация, и/или модификация представляет собой 1-метиладенозин, 3-метилцитозин, 6-метиладенозин, 3-метилуридин и/или 2-метилгуанозин. В некоторых вариантах реализации нуклеиновые кислоты, такие как молекулы РНК, могут быть модифицированы в присутствии белка или других малых и крупных биологических лигандов и/или соединений.

В некоторых вариантах реализации реагент содержит электрофил. В некоторых вариантах реализации электрофил селективно модифицирует незатрудненные нуклеотиды в молекуле РНК с образованием ковалентного 2'-О-аддукта рибозы. В некоторых вариантах реализации реагент представляет собой 1M7, 1M6, 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 совпадает с последовательностью предоставленной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации обнаружение неправильного нуклеотида включает использование массивно-параллельного секвенирования нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает амплификацию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способ включает амплификацию нуклеиновой кислоты с применением сайт-направленного подхода с использованием специфических праймеров, полногеномную амплификацию с использованием случайного праймирования, амплификацию всего транскриптома с использованием случайного праймирования или их комбинаций.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного объекта изобретения предложены компьютерные программные продукты, содержащие

исполняемые компьютером инструкции, воплощенные на машиночитаемом носителе, по выполнению стадий, включающих любую стадию способа по любому варианту реализации описанного в данном документе объекта изобретения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного объекта изобретения предложены библиотеки нуклеиновых кислот, полученные любым способом в соответствии с описанным объектом изобретения.

III. Электрофилы SHAPE

Как описано выше, химия SHAPE использует преимущество обнаружения того факта, что нуклеофильная реакционная способность 2'-гидроксильной группы рибозы контролируется локальной гибкостью нуклеотидов. В нуклеотидах, затрудненных вследствие спаривания оснований или третичных взаимодействий, 3'-фосфодиэфирный анион 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'-О-аддукта. Например, NMIA обычно реагирует со всеми четырьмя нуклеотидами, и реагент подвергается параллельной реакции гидролиза, приводящей к самоинактивации. Действительно, описанный в данном документе объект изобретения предусматривает, что любая молекула, которая может реагировать с нуклеиновой кислотой, как описано в данном документе, может быть использована в соответствии с некоторыми вариантами реализации описанного в данном 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 бензилизоцианата и их комбинаций. Производное соединение изатоевого ангидрида может включать 1-метил-7-нитроизатоевый ангидрид (1M7). Производное бензоилцианида может быть выбрано из группы, включающей, без ограничения, бензоилцианид (BC), 3-карбоксибензоилцианид (3-CBC), 4-карбоксибензоилцианид (4-CBC), 3-аминометилбензоилцианид (3-AMBC), 4-аминометилбензоилцианид, и их комбинаций. Производное бензоилхлорида может включать бензоилхлорид (BCl). Производное фталевого ангидрида может включать 4-нитрофталевоый ангидрид (4NPA). Производное бензилизоцианата может включать бензилизоцианат (BIC).

IV. Молекулярный дизайн РНК

Поскольку реакционную способность SHAPE можно оценить в одной или более реакциях удлинения праймера, то информация может быть потеряна как на 5'-конце, так и вблизи сайта связывания праймера молекулы РНК. Обычно образование аддукта на 10-20 нуклеотидах, соседних с сайтом связывания праймера, трудно определить количественно вследствие присутствия фрагментов кДНК, которые отражают приостановку или нематричное удлинение с помощью фермента обратной транскриптазы (RT) во время фазы инициации удлинения праймера. Позиции 8-10 на 5'-конце РНК может быть трудно визуализировать вследствие присутствия большого количества полноразмерных продуктов удлинения.

Для мониторинга реакционной способности SHAPE на 5'- и 3'-концах интересующей последовательности молекулу РНК можно внедрить в более крупный фрагмент нативной последовательности или поместить между сильно сворачивающимися последовательностями РНК, которые содержат уникальный сайт связывания праймера. В некоторых вариантах реализации можно сконструировать структурную кассету, которая содержит 5'- и 3'-фланкирующие последовательности нуклеотидов, чтобы обеспечить возможность оценки всех положений внутри интересующей молекулы РНК с помощью любого метода разделения, обеспечивающего разрешение на уровне нуклеотида, такого как, без ограничения, секвенирующий гель, капиллярный электрофорез и т.п. В некоторых вариантах реализации как 5'-, так и 3'-удлинения могут сворачиваться в стабильные шпилечные структуры, которые не мешают сворачиванию различных внутренних РНК. Сайт связывания праймера указанной кассеты может эффективно связываться с праймером кДНК. Последовательность любых 5'- и 3'-элементов структурной кассеты можно проверить, чтобы убедиться, что они не склонны к образованию стабильных взаимодействий при спаривании оснований с внутренней последовательностью.

В некоторых вариантах реализации представляющая интерес молекула РНК содержит два разных целевых мотива, которые связаны нуклеотидным линкером. Целевым мотивом может быть любая представляющая интерес нуклеотидная последовательность. Типичные целевые мотивы включают, без ограничения, рибопереключател, вирусные регуляторные элементы, структурированные области в мРНК, многоспиральные соединения, псевдоузлы и/или аптамеры. В некоторых вариантах реализации первый

целевой мотив представляет собой псевдоузел, такой как псевдоузел из 5'UTR генома вируса денге. В некоторых вариантах реализации второй целевой мотив представляет собой аптамерный домен, такой как аптамерный домен ТРР-рибопереключател. 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 область штрих-кода РНК. Область штрих-кода РНК представляет собой уникальный штрих-код, который позволяет идентифицировать конкретную молекулу РНК в смеси молекул РНК (например, во время мультиплексирования). Расположение области РНК-штрих-кода может варьироваться, но обычно она находится рядом с одной из кассет, присутствующих в молекуле РНК. В некоторых вариантах реализации штрих-код РНК предназначен для сворачивания в автономную структуру, которая не взаимодействует ни с одной другой частью молекулы РНК. Структура области штрих-кода РНК может различаться. В некоторых вариантах реализации структура области штрих-кода РНК содержит спираль пар 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 область штрих-кода РНК содержит 7 пар оснований. В некоторых вариантах реализации пары оснований кэпированы тетрапетлей, заякоренной на концевой паре оснований спирали из пар оснований. Кэпирование спирали из пар оснований сохраняет общую стабильность области штрих-кода РНК. В некоторых вариантах реализации тетрапетля содержит нуклеотидную последовательность GNRA, но не ограничивается ею. В некоторых вариантах реализации область штрих-кода РНК сконструирована таким образом, что любой отдельный штрих-код претерпевает по меньшей мере две мутации, которые могут быть ошибочно приняты за другой штрих-код.

V. Сворачивание молекулы РНК

Описанный в данном документе объект изобретения может быть реализован с использованием молекул РНК, полученных способами, включающими, без ограничения,

транскрипцию *in vitro*, и молекул РНК, полученных в клетках и вирусах. В некоторых вариантах реализации молекулы РНК можно очистить посредством денатурирующего гель-электрофореза и ренатурировать с получением биологически релевантной конформации. Кроме того, можно заменить любую процедуру, обеспечивающую сворачивание молекулы РНК в требуемую конформацию при требуемом значении рН (например, около рН 8). Молекулы РНК можно сначала нагреть и мгновенно охладить в буфере с низкой ионной силой, чтобы исключить мультимерные формы. Затем можно добавить раствор для сворачивания для обеспечения возможности достижения соответствующей конформации молекул РНК и их подготовки к структурно-чувствительному зондированию с помощью электрофила. В некоторых вариантах реализации РНК может быть свернута в ходе одной реакции, а затем разделена на (+) и (-) в реакциях с электрофилом. В некоторых вариантах реализации молекула РНК не подвергается нативному сворачиванию перед модификацией. Модификация может происходить, пока молекула РНК денатурируется под действием тепла и/или в условиях низкого содержания соли.

15 VI. Модификация молекулы РНК

К РНК можно добавить электрофил с получением 2'-О-аддуктов в гибких положениях нуклеотидов. Затем реакционную смесь можно инкубировать до тех пор, пока практически весь электрофил либо не прореагирует с РНК, либо не разложится вследствие гидролиза водой. Не требуется никакой специальной стадии для погашения реакции. Модификация может происходить в присутствии сложных лигандов и биомолекул, а также в присутствии различных солей. РНК также может быть модифицирована внутри клеток и вирусов. Указанные соли и сложные лиганды могут включать соли магния, натрия, марганца, железа и/или кобальта. Сложные лиганды могут включать, без ограничения, белки, липиды, другие молекулы РНК, ДНК или небольшие органические молекулы. В некоторых вариантах реализации сложный лиганд представляет собой низкомолекулярный фрагмент, описанный в данном документе. В некоторых вариантах реализации сложный лиганд представляет собой соединение, описанное в данном документе. Модифицированную РНК можно очистить от продуктов реакции и компонентов буфера, которые могут оказаться вредными для реакции удлинения праймера, например, путем осаднения этанолом.

VII. Удлинение праймера и полимеризация

Анализ аддуктов РНК путем удлинения праймера в соответствии с описанным в данном 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 вышесказанного. Интактная, неразложившаяся РНК, не содержащая побочных продуктов реакции и других низкомолекулярных примесей, также может быть использована в качестве матрицы для обратной транскрипции. РНК-компонент полученных гибридов РНК-кДНК можно разложить посредством обработки основанием. Фрагменты кДНК затем можно разделить, используя, например, полиакриламидный гель для секвенирования, капиллярный электрофорез или другой метод разделения, который будет очевиден для специалиста в данной области после обзора настоящего изобретения.

Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ (dNTP) и/или дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dNTP) можно добавлять в синтезируемую смесь отдельно или вместе с праймерами в достаточных количествах и нагревать полученный раствор до около 50-100 °С от около 1 до 10 минут. После периода нагревания раствор можно охладить. В некоторых вариантах реализации к охлажденной смеси можно добавить соответствующий агент для проведения реакции удлинения праймера и оставить реакцию 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 протекать до температуры, выше которой агент полимеризации перестает действовать.

Агентом для полимеризации может быть любое соединение или система, которая обеспечивает синтез 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. те ферменты, которые выполняют удлинение праймера после воздействия температур, достаточно

повышенных, чтобы вызвать денатурацию), таких как ферменты обратной транскриптазы мышей или птиц. Подходящие ферменты могут способствовать правильному объединению нуклеотидов с образованием продуктов удлинения праймера, которые комплементарны каждой цепи нуклеиновых кислот полиморфного локуса. В некоторых вариантах реализации синтез может быть инициирован на 5'-конце каждого праймера и продолжаться в 3'-направлении до тех пор, пока синтез не завершится на конце матрицы, путем включения дидезоксинуклеотидтрифосфата или 2'-О-аддукта с образованием молекул разной длины.

Вновь синтезированная цепь и комплементарная ей цепь нуклеиновых кислот могут образовывать двухцепочечную молекулу в условиях гибридизации, описанных в данном документе, и полученный гибрид используют на последующих стадиях, как описано в способах, представленных в патенте США № 10240188 и в патенте США № 8318424, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации вновь синтезированная двухцепочечная молекула также может быть подвергнута условиям денатурации с использованием любого из известных в данной области способов для получения одноцепочечных молекул.

VII. Обработка исходных данных

Объект изобретения, описанный в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, такой как молекулы РНК, анализ химической модификации и/или анализ структуры нуклеиновой кислоты, может быть реализован с использованием компьютерного программного продукта, содержащего исполняемые компьютером инструкции, записанные на машиночитаемом носителе. Примеры машиночитаемых носителей, подходящих для реализации описанного в данном документе объекта изобретения, включают в себя микросхемные запоминающие устройства, дисковые запоминающие устройства, программируемые логические устройства и интегральные схемы для конкретных приложений. Кроме того, компьютерный программный продукт, реализующий описанный в данном документе объект изобретения, может быть расположен на одном устройстве или вычислительной платформе или может быть распределен среди множества устройств или вычислительных платформ. Таким образом, объект изобретения, описанный в данном документе, может включать в себя набор компьютерных инструкций, которые при выполнении компьютером осуществляют конкретную 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, вверху). Конструкция была разработана таким образом, что она содержит два целевых мотива, таких как псевдоузел из 5'UTR генома вируса денге, который снижает репликативную способность вируса при нарушении его структуры²⁶, и аптамерный домен ТРР-рибопереключателя²⁷⁻²⁹. Включение двух различных структурных мотивов в одну конструкцию обеспечивает возможность использования каждого из них в качестве внутреннего контроля специфичности другого. Фрагменты, связавшиеся с обеими структурами РНК, были без труда идентифицированы как неспецифические связывающие фрагменты. Указанные две структуры были соединены шестинуклеотидным линкером, сконструированным так, чтобы быть одноцепочечным, что обеспечивает возможность сохранения структурной независимости указанных двух структур РНК. Фланкирующими для структурного ядра конструкции являются структурные кассеты²⁵; эти области, образующие структуру «стебель-петля», используются в качестве сайтов связывания праймеров на стадиях, необходимых в рабочем процессе скрининга, и они сконструированы так, чтобы не взаимодействовать с другими структурами в конструкции (Фиг. 6А).

Другим компонентом скрининговой конструкции является штрих-код РНК; штрих-кодирование обеспечивает возможность мультиплексирования, что существенно уменьшает трудоемкость следующих процессов. Каждая лунка 96-луночного планшета, используемого для скрининга библиотеки фрагментов, содержит РНК с уникальным штрих-кодом в контексте идентичной в остальной конструкции; таким образом, последовательность штрих-кода идентифицирует положение лунки и наличие фрагмента (или фрагментов) после мультиплексирования (Фиг. 1). Область штрих-кода РНК сконструирована так, чтобы сворачиваться в автономную структуру, которая не взаимодействует ни с какой другой частью конструкции. Структура штрих-кода представляет собой спираль из семи пар оснований, кэпированную тетрапетлей GNRA и заякоренную парой оснований G-C для поддержания стабильности шпильки (Фиг. 6В). Каждый набор из 96 штрих-кодов был сконструирован таким образом, что любой отдельный штрих-код претерпевает две или более мутации, которые могут быть ошибочно приняты за другой штрих-код.

Такая конструкция обеспечивает гибкость в выборе структур РНК для скрининга связывания лиганда и обеспечивает простой и понятный скрининговый эксперимент (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 с контролем без фрагмента (растворителем), а затем подвергают воздействию реагента SHAPE. Полученные в результате аддукты SHAPE химически кодируют структурную информацию каждого нуклеотида. После SHAPE-зондирования информация, необходимая для определения идентичности фрагмента (штрих-код РНК) и связывания фрагмента (профиль аддукта SHAPE), перманентно закодирована в каждой цепи РНК, поэтому РНК из 96 лунок планшета можно объединить в один образец. Эксперимент по скринингу фрагментов проводят способом, очень похожим на стандартный рабочий процесс зондирования структуры MaP²⁴. Например, в некоторых вариантах реализации для получения кДНК, которые содержат нематричные кодируемые изменения последовательностей в положениях любых аддуктов SHAPE на РНК³⁰, используют специализированную реакцию обратной транскрипции с ослабленной точностью. Затем полученные кДНК используют для подготовки библиотеки ДНК для высокопроизводительного секвенирования. Множество планшетов для экспериментов могут быть закодированы на уровне библиотеки ДНК²⁴, что обеспечивает возможность сбора данных о тысячах соединений за один цикл секвенирования (Фиг. 1). Полученные данные секвенирования содержат миллионы отдельных прочтений, каждое из которых соответствует определенной цепи РНК. Эти прочтения сортируют по штрих-коду для обеспечения возможности анализа данных 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.

С. Идентификация и выбор лиганда

Как упоминалось выше, использовали SHAPE и SHAPE-MaP для идентификации низкомолекулярных фрагментов, которые связываются или образуют ассоциат с интересующей молекулой РНК. В частности, при тестировании низкомолекулярных фрагментов с использованием SHAPE-MaP обнаружение сигнатур связанных фрагментов на основе частоты понуклеотидных мутаций SHAPE-MaP включает в себя несколько этапов

для нормализации данных на большом экспериментальном экране и обеспечения статистической строгости. Ключевые признаки стратегии анализа попаданий на основе SHAPE включают в себя: (i) сравнение каждого фрагмента РНК, подверженного воздействию фрагмента, или «экспериментального образца», с пятью отрицательными, без фрагментов, контрольными образцами для учета изменений между планшетами и лунками – межлуночной вариабельности; (ii) обнаружение совпадений, выполняемое независимо для каждого из двух структурных мотивов в конструкции, в данном описании псевдоузла и TRP-рибопереклювателя; (iii) маскирование отдельных нуклеотидов с низкой реакционной способностью во всех образцах, поскольку эти нуклеотиды маловероятно проявят изменения, вызванные фрагментами; и (iv) расчет понуклеотидных различий в частоте мутаций между экспериментальным образцом, подверженным воздействию фрагмента, и образцом отрицательного контроля, не подвергавшимся воздействию фрагментов. Те нуклеотиды, у которых разница в частоте мутаций между одним из мотивов и контролем без фрагментов составляла 20% или более, были выбраны для анализа Z-показателя. Однако опытный специалист может соответствующим образом скорректировать разницу в частоте мутаций, допуская, что она может варьироваться. Например, в некоторых вариантах реализации разница в частоте мутаций может составлять 25%, 30%, 35%, 45% или 50% или более. В некоторых вариантах реализации разница в частоте мутаций может составлять 15%, 10%, 5% или менее. Фрагмент определяли как имеющий существенно измененный профиль реакционной способности SHAPE, если три или более нуклеотидов в одном из двух мотивов имели Z-значения, превышающие 2,7 (по результатам определения путем сравнения отсчетов Пуассона для двух мотивов³¹, см. пример 2). Однако Z-значения могут варьироваться, и опытный специалист сможет соответствующим образом скорректировать их. Например, в некоторых вариантах реализации Z-значения 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 Z-значения 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 связывают друг с другом с получением соединений, описанных в данном документе, выполняют ряд этапов. Сначала проводят первичный скрининг, в ходе которого проверяют большое количество соединений, например, по меньшей мере 100 соединений, для идентификации любых исходных лидерных или

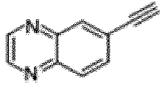
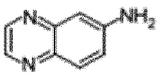
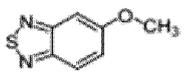
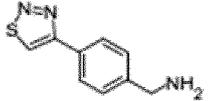
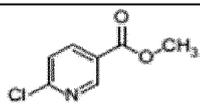
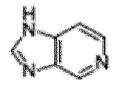
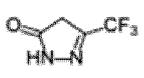
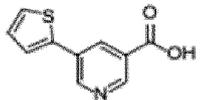
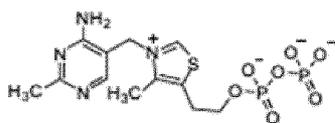
совпадающих соединений, которые проявляют подходящую связывающую активность по отношению к молекуле РНК-мишени. Затем на этапе 2 совпадающие соединения дополнительно изучают в исследованиях зависимости активности от структуры (SAR), где определяют изменения аффинности связывания РНК-мишени по мере модификации структуры совпадающих соединений. Когда несколько фрагментов малых молекул идентифицированы как подходящие лиганды связывания для молекулы РНК-мишени, могут быть проведены дополнительные исследования связывания для дальнейшего изучения сайта связывания для каждого низкомолекулярного фрагмента (т.е. этап 3). Например, в некоторых вариантах реализации РНК-мишень может быть предварительно инкубирована с первым фрагментом (идентифицированным как лиганд, связывающий РНК-мишень, согласно исследованиям SAR на этапе 2) перед воздействием на РНК-мишень второго фрагмента (также идентифицированного как РНК-связывающий лиганда в исследованиях SAR на этапе 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 с получением соединения, описанного в данном документе (т.е. этап 4). Каждый из вышеупомянутых этапов более подробно описан ниже.

Этап 1: Первичный скрининг

При первичном скрининге протестировали 1500 фрагментов, и 41 фрагмент был обнаружен как совпадения, с начальной частотой совпадений 2,7%. Проверку совпадений выполняли с помощью трехкратного анализа SHAPE (Фиг. 2, Фиг. 7), и соединение считалось истинным совпадением только в том случае, если оно было обнаружено в качестве связывающего вещества во всех трех повторностях. Затем повторно совпадающие соединения анализировали с помощью изотермической титрационной калориметрии (ИТС) для определения аффинности связывания с РНК, соответствующей только целевому мотиву (исключая фланкирующие последовательности в конструкции для скрининга). Из полученных первоначальных совпадений восемь совпадений были подтверждены повторным анализом и ИТС (таблица 1). Семь из совпадений были связаны с TRP-рибопереключателем на основании сигнатур их мутаций, локализующихся в основном или полностью в области TRP-рибопереключатателя тестируемой конструкции. Оставшееся

попадание было неспецифичным, поскольку этот фрагмент затрагивал нуклеотиды во всех частях конструкции РНК. Не было обнаружено ни одного соединения, которое специфически связывало бы область псевдоузла лихорадки денге в тестируемой конструкции.

5 **Таблица 1.** Фрагменты, которые связываются с TRP-рибопереключателем, по результатам обнаружения зондированием методом SHAPE.

Структура	ID	K_d (мкМ)
	1	$11 \pm 0,2$
	2	$25 \pm 6 \ddagger$
	3	95 ± 3
	4	220 ± 10
	5	$265 \pm 80 \ddagger$
	6	650 ± 100
	7	нерастворим
	8	нерастворим
	9	$0,028 \pm 0,002$

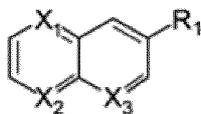
Совпадения обнаруживали зондированием структуры методом SHAPE и проверяли повторным анализом и ИТС. Константу диссоциации определяли методом ИТС; значения погрешности, обозначенные символом «±», обозначают стандартную ошибку, полученную для ≥ 3 повторностей, другие оценки погрешности рассчитывали на основании 95% доверительного интервала для регрессии наименьших квадратов кривой связывания. Для сравнения включали нативный лиганд TRP.

Семь фрагментов, которые связываются с TRP-рибопереключателем, по результатам проверки методом ИТС, имеют разные хемотипы; большинство имеют небольшое сходство или отсутствие сходства с нативным лигандом TRP (таблица 1). В целом, преобладают гетероароматические азотсодержащие кольца; вероятно, они участвуют в образовании водородных связей. Три соединения содержат пиридиновые кольца, и два содержат пиразиновые кольца. Фрагмент азольного кольца присутствует в трех соединениях: два тиадиазола и один имидазол. В нативном лиганде TRP есть тиазольное кольцо, но этот фрагмент не участвует в связывающих взаимодействиях с РНК^{28,29,33}. Кроме того, ряд идентифицированных фрагментов содержит первичные амины, сложноэфирные и эфирные, а также фтор-группы, которые могут служить в качестве акцепторов или доноров для водородной связи.

Этап 2: Зависимость активности от структуры (SAR) фрагментов, связывающих рибопереключателем

Затем были исследованы аналоги некоторых первоначальных совпадений с целью повышения аффинности связывания и выявления положений, в которых совпадения фрагментов можно было модифицировать с помощью линкера, не препятствуя связыванию. В частности, были рассмотрены аналоги соединений 2 и 5, поскольку эти два фрагмента структурно различны, а их аналоги доступны в продаже. Связывание РНК с аналогом оценивали с помощью ИТС. Было протестировано шестнадцать аналогов для соединения 2. Изменение центральной хиноксалиновой структуры 2 путем удаления одного или обоих кольцевых атомов азота привело к изменению связывающей активности (таблица 2А).

Таблица 2А. SAR для аналогов фрагмента 2.



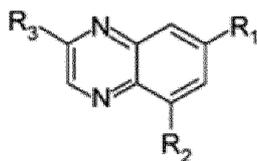
Молекула	R ₁	X ₁ , X ₂ , X ₃	K _d (мкМ)
2		N, N, C	25
10		N, C, C	3500
11		C, N, C	2100
12		C, C, C	отсутствие связывания
13	H	N, N, N	354
14	H	N, N, C	120

Были исследованы модификации хиноксалинового ядра и получены константы диссоциации методом ИТС.

Улучшение аффинности связывания произошло в результате введения связанного с метилом донора или акцептора водородной связи (таблица 2В, соединения 16 и 17). Варьирование заместителей в других положениях ядра хиноксалинового кольца приводило к снижению связывающей активности. 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.

10

Таблица 2В. Зависимость активности от структуры аналогов фрагмента 2, связывающихся с ТРР-рибопереключателем РНК. Модификации боковых групп хиноксалинового ядра. Константы диссоциации получены методом ИТС.

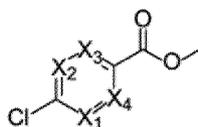


Молекула	R ₁	R ₂	R ₃	K _d (мкМ)
----------	----------------	----------------	----------------	----------------------

15		Н	Н	18
16		Н	Н	12
17		Н	Н	5,0
18		Н	Н	35
19		Н	Н	58
20		Н	Н	33
21	Н		Н	75
22	Н		Н	286
23	Н		Н	220
24	Н	Н		379
25	Н	Н		600

Затем исследование 18 аналогов фрагмента 5 показало, что центральная пиридиновая функциональная группа молекулы, по-видимому, важна для связывания, поскольку изменение положения атома азота в кольце, добавление или удаление атома азота в кольце – все это уменьшает или исключает связывание (таблица 3).

Таблица 3. Зависимость активности от структуры аналогов фрагмента 5, связывающихся с ТРР-переключателем РНК. Модификации в пиридиновом ядре и константы диссоциации, полученные методом ИТС.

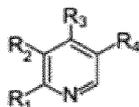


Молекула	X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄	K _d (мкМ)
6	Н, С, С, С	265

S1	C, C, C, N	490
S2	N, N, C, C	420
S3	N, C, N, C	1200
S4	C, C, C, C	отсутствие связывания

Модификации кольцевых заместителей обычно приводили к значительной потере связывающей активности (таблица 4). Единственный аналог, увеличивающий аффинность, содержал хлор в положении С-4, S12, в результате чего соединение имело примерно в три
5 раза более высокую аффинность к TRP-рибопереключителю, чем фрагмент 5.

Таблица 4. Зависимость активности от структуры аналогов фрагмента 5, связывающихся с TRP-рибопереклютелем РНК. Модификации боковых групп пиридинового ядра. Константы диссоциации получены методом ИТС.

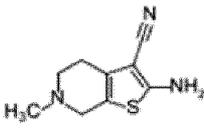
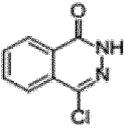
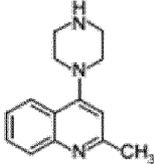


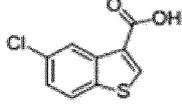
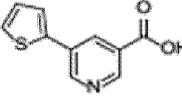
Молекула	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	K _d (мкМ)
S5		H	H		440
S6		H	H		390
S7		H	H		1800
S8		H	H		1100
S9		H	H		отсутствие связывания
S10		H	H		отсутствие связывания
S11			H		820
S12		H			93
S13		H	H		600
S14		H	H		1300
S15		H	H		1800
S16		H	H		1300
S17		H	H		отсутствие связывания
S18		H	H		отсутствие связывания

Стадия 3: Идентификация фрагментов, которые связываются со вторым сайтом TPP-рибопереключателя

Скрининг второго раунда использовали для идентификации фрагментов, которые связываются с областью TPP-рибопереключателя конструкции для скрининга, предварительно связанной с соединениями 2 или S12. В этом скрининге выявлены фрагменты, которые преимущественно взаимодействуют с TPP-рибопереключателем, когда соединение 2 или S12 уже связано, либо вследствие кооперативных эффектов, либо вследствие того, что новые способы связывания становятся доступными благодаря структурным изменениям, которые происходят при первичном связывании лиганда (Фиг. 4). Из 1500 проверенных фрагментов было подтверждено, что пять связываются одновременно либо с 2, либо с S12 (таблица 5).

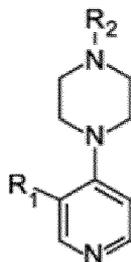
Таблица 5. Фрагменты, которые связываются с TPP-рибопереключателем в присутствии предварительно связанного фрагмента-партнера, по результатам обнаружения методом SHAPE. Совпадения проверяли повторным анализом SHAPE. Первичные партнеры по связыванию (2, 6) представлены в таблице 1.

Первичный партнер	ID	Структура
2	26	
2	27	
2	28	

6, 2	29	
6	30	

Одно попадание при втором скрининге, 29, вызвало очень сильное изменение сигнала реакционной способности SHAPE и, по-видимому, вызвало существенное изменение структуры РНК, включая разворачивание спирали P1. Этот фрагмент вызывал изменения в других областях РНК, соответствующие неспецифическим взаимодействиям, поэтому этот фрагмент в дальнейшем не рассматривали в качестве кандидата на связывание фрагментов. Фрагмент 28 был нерастворим в концентрациях, необходимых для анализа ИТС; поэтому родственные аналоги, содержащие пиридин вместо хинолинового кольца, были исследованы методом ИТС (таблица 6). Эти соединения связывались со слабой аффинностью, тем не менее 31 и 32 демонстрировали явную, но умеренную кооперативность связывания с 2.

Таблица 6. Зависимость активности от структуры аналогов фрагмента 28, связывающихся с TRP-рибопереключателем РНК, в присутствии и в отсутствие предварительно связанного фрагмента 2.*



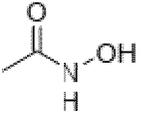
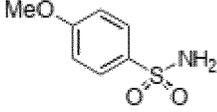
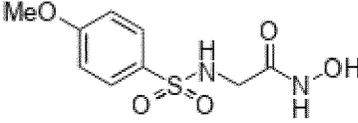
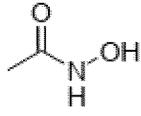
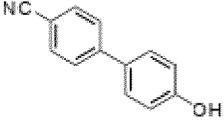
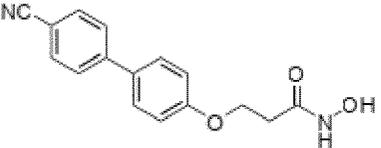
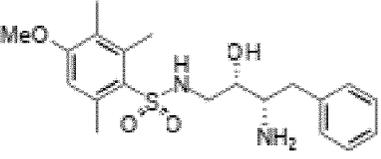
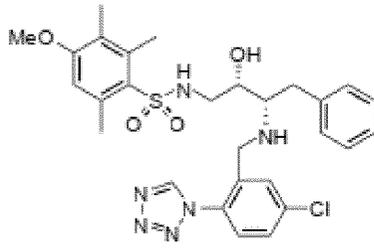
Молекула	R ₁	R ₂	K _d (мМ)	
			Предварительно 5-связанный	Без связанного лиганда
31	H	H	3	>10

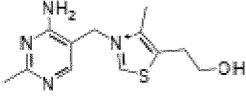
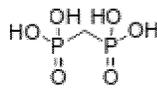
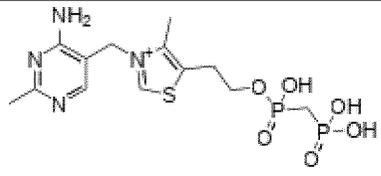
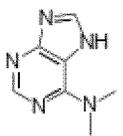
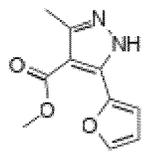
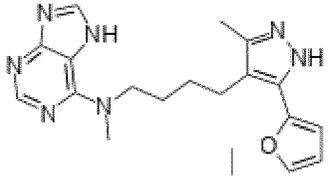
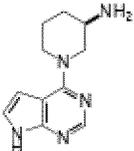
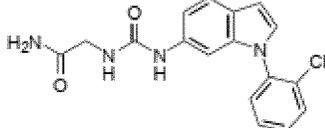
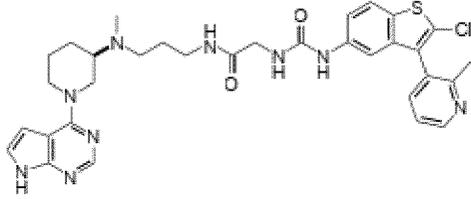
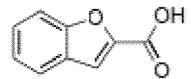
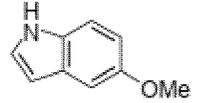
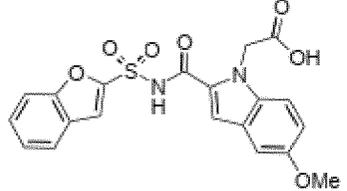
32		Н	4	>10
33	Н		НО	>10
34		Н	НО	>10
28		Н	нерастворим	нерастворим

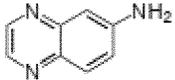
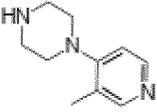
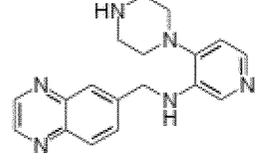
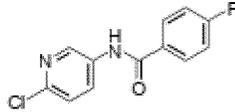
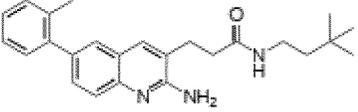
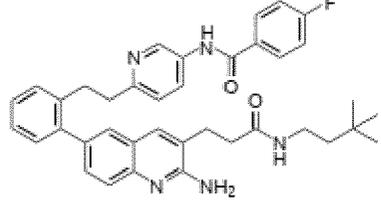
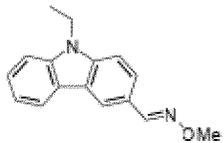
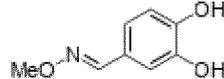
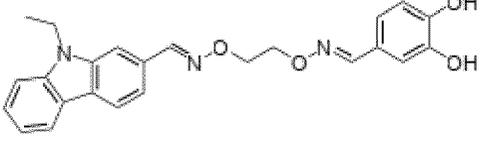
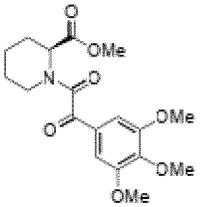
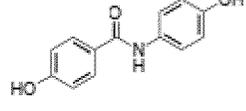
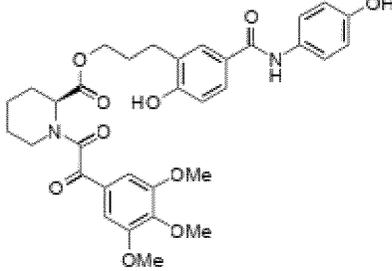
*НО (не определяли) вследствие невозможности построения кривой ИТС;

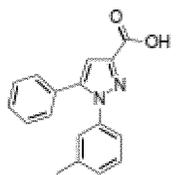
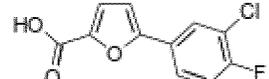
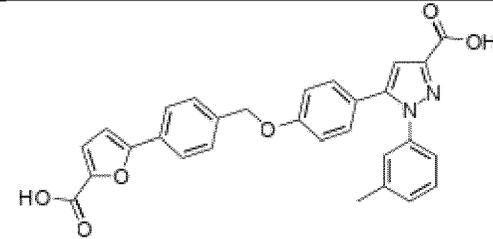
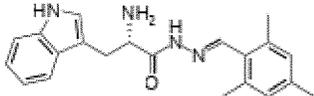
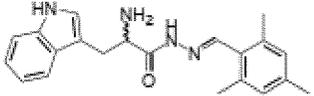
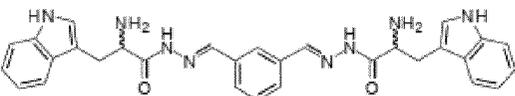
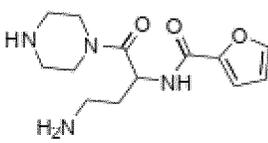
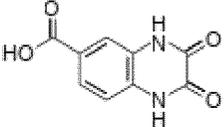
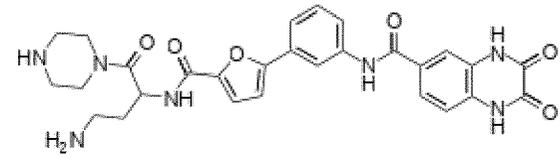
Нерастворим – соединение нерастворимо в концентрациях, необходимых для ИТС.

- 5 **Таблица 7.** Подробное сравнение иллюстративного белка и лигандов РНК фрагмент-линкер-фрагмент, разработанных способами на основе фрагментов. Примеры РНК отмечены звездочкой. В каждой строке представлена подробная информация о двух составляющих фрагментах и их индивидуальных значениях K_d , о связанном соединении и его соответствующем значении K_d , а также эффективности лиганда (LE) и коэффициенте связывания (E) для связанного соединения^{22,38,53,54,45-52}
- 10

Фрагмент 1 <i>K_d</i> (мкМ)	Фрагмент 2 <i>K_d</i> (мкМ)	Связанное соединение <i>K_d</i> (мкМ)	LE	E	Эталон
 6,2 мМ	 1,5 мМ	 20 нМ	0,62	0,0021	[H]
 17 мМ	 20 мкМ	 25 нМ	0,49	0,06	[H]
 330 мкМ	 12 мкМ	 1,4 нМ	0,30	0,35	[H]

 11 мкМ	 3 мМ	 19 нМ	0,40	0,60	[H] *
 1,5 мМ	 1 мМ	 1,5 мкМ	0,31	1,0	[H]
 240 мкМ	 9,0 мкМ	 3 нМ	0,40	1,4	[H]
 1 мМ	 1,1 мМ	 1,8 мкМ	0,26	1,6	[H]

 25 мкМ	 >10 мМ	 625 нМ	0,34	2,5	[H] *
 114 мкМ	 140 нМ	 400 пМ	0,28	25	[H]
 40 мкМ	 41 мкМ	 64 нМ	0,32	39	[H]
 2 мкМ	 100 мкМ	 49 нМ	0,22	250	[H]

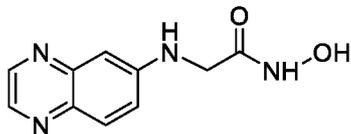
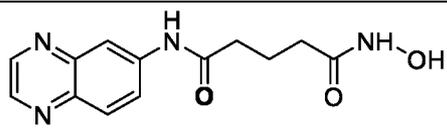
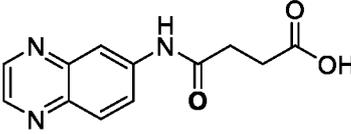
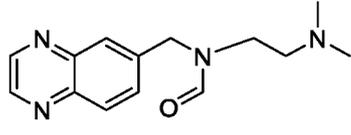
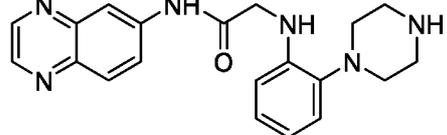
 <p>150 мкМ</p>	 <p>580 мкМ</p>	 <p>26 мкМ</p>	0,17	300	[H]
 <p>13 мкМ</p>	 <p>13 мкМ</p>	 <p>54 нМ</p>	0,25	330	[H]
 <p>>100 мкМ</p>	 <p>>100 мкМ</p>	 <p>6,5 мкМ</p>	0,17	650	[H] *

Стадия 4: Кооперативность и связывание фрагментов

Взаимодействия с кооперативным связыванием между 2 и 31 количественно определяли методом ИТС. По отдельности соединение 2 связывается с K_d 25 мкМ, а 31 с гораздо более высоким значением K_d 10 мМ. Как и во вторичном скрининге, исследовали также аффинность фрагмента 31, когда фрагмент 2 был предварительно связан с ТРР-рибопереключателем РНК, образуя комплекс 2-РНК. В этих условиях фрагмент 31 связывался с комплексом РНК 2-ТРР с K_d около 3 мМ (Фиг. 4). Данный эксперимент также показал, что, когда связывание с соединением 2 насыщено, то соединение 31 связывается с ТРР РНК, подразумевая, что эти два фрагмента не связываются в одном и том же положении. Поскольку соединения 2 и 31 связывались с превосходной и достаточной аффинностью, соответственно с различными участками ТРР РНК, то эти два фрагмента использовали для связывания с целью создания лиганда с высокой аффинностью.

Таким образом, был получен аналог KW-29-1 в дополнение к различным связанным аналогам нескольких фрагментов SAR, как показано в следующей таблице.

15 Таблица 8. Связанные аналоги

Номер	Соединение	K_d (мкМ)
KW-31-1		58,1
KW-5-1		477
KW-16-1		653
KW-79-1		69,1
KW-29-1		10,5

Специалистам в данной области техники будет понятно, что вышеуказанные этапы I-IV не предназначены для ограничения, а просто служат примерным вариантом реализации. Следует понимать, что специалист в данной области сможет применить описанные выше этапы I-IV для идентификации альтернативных фрагментов, которые могут быть связаны друг с другом для получения соединений, описанных в данном документе, с подходящей аффинностью связывания с TRP-рибопереключателем. Кроме того, следует понимать, что специалист в данной области сможет применить описанные выше этапы I-IV для идентификации фрагментов, которые могут быть связаны друг с другом с получением соединений, описанных в данном документе, которые связываются с другими представляющими интерес молекулами РНК.

D. Обобщение и дополнительные соображения

Поскольку и кодирующими (мРНК), и не кодирующими РНК потенциально можно манипулировать для изменения хода клеточной регуляции и заболеваний, была предпринята попытка разработать эффективную стратегию для идентификации низкомолекулярных лигандов для структурированных РНК. Исследование, раскрытое в данном документе, демонстрирует перспективность использования скринингового прочтения SHAPE для обнаружения связывания лиганда с РНК в комбинации со стратегией на основе фрагментов. Здесь эта стратегия была использована для получения различных лигандов, которые связываются TRP-рибопереключателем, который не является структурно родственным нативному лиганду, с K_d в диапазоне от 10,5 до 653 мкМ. Подход, основанный на комбинировании SHAPE и скрининга по фрагментам, является общим как в отношении структуры РНК, на которую можно воздействовать, так и в отношении хемотипов лигандов, которые можно разработать. Такая стратегия особенно хорошо подходит для поиска лигандов РНК со сложными структурами, что может быть важно для идентификации мотивов РНК, которые связываются в трехмерных карманах⁴. Кроме того, благодаря использованию подхода MaP и применению мультиплексирования посредством штрих-кодирования как РНК, так и ДНК, усилия, необходимые для скрининга библиотеки фрагментов, насчитывающей более тысячи членов, являются умеренными, что позволяет эффективно проверять множество структурно различных мишеней.

Многие из полученных лигандов были аналогичны тем, о которых сообщалось ранее для однораундного скрининга, также проведенного для TRP-рибопереклювателя^{15,17}. Совпадения при первичном скрининге, по-видимому, были немного смещены в сторону более высоких значений аффинности, так что большинство лигандов, обнаруженных с помощью SHAPE, связывались в диапазоне 10-1000 мкМ. Используемый анализ обнаружения попаданий, вероятно, смещен в сторону обнаружения наиболее прочно связывающих фрагментов и тех связывающих фрагментов, которые вызывают наиболее существенные изменения в реактивности SHAPE. Фрагменты с более низкой аффинностью, вероятно, были пропущены. Считается, что такое смещение в сторону прочно связывающих фрагментов в целом является преимуществом. Не было идентифицировано ни одного фрагмента, связанного с псевдоузлом денге, который достиг бы аффинности и специфичности, необходимых для удовлетворения вышеуказанным критериям скрининга. РНК псевдоузла денге высокоструктурирована, и вероятность того, что фрагмент может нарушить эту структуру, может быть низкой. Другая возможность состоит в том, что эта конкретная структура псевдоузла может не содержать кармана, подходящего для лиганда.

В стратегии идентификации пар фрагментов, в которой совпадающий фрагмент, полученный при первичном скрининге, предварительно связывали с РНК и проверяли на наличие дополнительных партнеров по связыванию фрагментов, специально использовали понуклеотидную информацию, которая может быть получена с помощью SHAPE, и она была успешно использована в данной работе для обнаружения пар фрагментов, индуцированных совпадением. Основной принцип разработки лигандов по фрагментам заключается в том, что кооперативность между двумя фрагментами может быть достигнута посредством проксимального связывания и что такое аддитивное связывание может быть использовано путем связывания кооперативных фрагментов друг с другом с помощью минимально инвазивного ковалентного линкера^{20,21,36,37}. Разработка различных связанных соединений на основе первичных и вторичных совпадений фрагментов показывает, что обнаружение лигандов по фрагментам может быть эффективно применено к РНК-мишеням. Успешная разработка таких соединений показывает, что для эффективного создания субмикромольного лиганда нет необходимости достигать совершенства ни в степени кооперативности между фрагментами, ни в конструкции ковалентного линкера, соединяющего их, как показано на примере соединений, представленных в таблице 8.

Е. Композиции

Описанные в данном документе соединения могут быть составлены в фармацевтические композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

5 Соединения, описанные в данном документе, могут быть составлены в соответствии со стандартной фармацевтической практикой в виде фармацевтической композиции. Согласно этому аспекту предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в данном документе, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем.

10 Типичную лекарственную форму получают путем смешивания соединения, описанного в данном 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 в воде полимеры, гидрофильные или гидрофобные материалы, желатин, масла, растворители, вода и т.п. Конкретный используемый носитель, 15 разбавитель или вспомогательное вещество будет зависеть от способа и цели, для которой применяется соединение. Растворители обычно выбирают на основе растворителей, признанных специалистами в данной области безопасными (GRAS) для введения млекопитающим. Как правило, безопасными растворителями являются нетоксичные водные растворители, такие как вода и другие нетоксичные растворители, растворимые или 20 смешивающиеся с водой. Подходящие водные растворители включают воду, этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоли (например, ПЭГ 400, ПЭГ 300) и т.д., а также их смеси. Лекарственные формы могут также содержать один или более буферов, стабилизирующих агентов, поверхностно-активных веществ, смачивающих агентов, смазывающих агентов, эмульгаторов, суспендирующих агентов, консервантов, 25 антиоксидантов, замутнителей, скользящих веществ, технологических добавок, окрашивающих веществ, подсластителей, отдушек, ароматизаторов и других известных добавок для обеспечения приятного внешнего вида лекарственного средства (т.е. соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтической композиции) или для облегчения производства фармацевтического продукта (т.е. лекарственного средства).

30 Лекарственные формы могут быть получены с использованием обычных процедур растворения и смешивания. Например, нерасфасованное лекарственное вещество (т.е.

соединение, описанное в данном документе, или стабилизированная форма соединения (например, комплекс с производным циклодекстрина или другим известным комплексообразователем)) растворяют в подходящем растворителе в присутствии одного или более вспомогательных веществ, описанных выше. Соединение обычно составляют фармацевтические лекарственные формы, чтобы обеспечить легко контролируемую дозировку лекарственного средства и соблюдение пациентом предписанного режима лечения. Фармацевтическая композиция (или лекарственная форма) для применения может быть упакована различными способами в зависимости от способа, используемого для введения лекарственного средства. Обычно изделие для продажи включает в себя контейнер, в котором находится фармацевтический состав в подходящей форме. Подходящие контейнеры хорошо известны специалистам в данной области и включают такие материалы, как флаконы (пластиковые и стеклянные), пакетики, ампулы, пластиковые пакеты, металлические цилиндры и т.п. Контейнер может также включать в себя систему с индикацией вскрытия для предотвращения случайного доступа к содержимому упаковки. Кроме того, на контейнер нанесена этикетка, описывающая содержимое контейнера. Этикетка также может содержать соответствующие предупреждения.

Фармацевтические лекарственные формы могут быть получены для различных способов и типов введения. Например, описанное в данном документе соединение, имеющее требуемую степень чистоты, необязательно может быть смешано с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16e издание, Osol, A. ред.) в форме лиофилизированного состава, измельченного порошка или водного раствора. Лекарственная форма может быть получена путем смешивания при температуре окружающей среды, подходящем pH и требуемой степени чистоты с физиологически приемлемыми носителями, т.е. носителями, которые нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Значение pH лекарственной формы зависит главным образом от конкретного применения и концентрации соединения, но может находиться в диапазоне от около 3 до около 8. Подходящим вариантом реализации является получение лекарственной формы в ацетатном буфере с pH 5.

Соединения могут быть стерильными. В частности, лекарственные формы, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Такую стерилизацию можно без труда осуществить путем фильтрования через стерильные фильтрующие мембраны.

5 Обычно предложенные соединения можно хранить в виде твердой композиции, лиофилизированной лекарственной формы или в форме водного раствора.

10 Фармацевтические композиции, содержащие соединение, описанное в данном документе, могут быть составлены, дозированы и введены таким способом, т.е. в количествах, концентрациях, схемах, курсах, носителях и способах введения, которые соответствуют надлежащей медицинской практике. Факторы, подлежащие рассмотрению в этом контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное

15 молокопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. «Терапевтически эффективное количество» соединения, подлежащее введению, будет определяться такими соображениями и представляет собой минимальное количество, необходимое для предотвращения, облегчения или лечения расстройства, опосредованного фактором свертывания крови. Такое количество предпочтительно меньше количества, которое является токсичным для

20 реципиента или делает реципиента значительно более восприимчивым к кровотечению.

20 Приемлемые разбавители, носители, вспомогательные вещества и стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатные, цитратные буферы и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония,

25 хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин,

30 гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; 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™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Активные фармацевтические ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризацией, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Такие методы описаны в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 165 изд., Osol, A. ред. (1980).

Могут быть получены препараты соединений с пролонгированным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с пролонгированным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие соединение, описанное в данном документе, причем указанные матрицы представлены в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с пролонгированным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 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.

Лекарственные формы включают препараты, подходящие для способов введения, подробно описанных в данном документе. Лекарственные формы могут быть удобно представлены в виде стандартной дозированной формы и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Технологии и лекарственные формы представлены, в целом, в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Истон, штат Пенсильвания). Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, который представляет собой один или более вспомогательных ингредиентов. Обычно лекарственные формы получают путем равномерного и тщательного объединения активного ингредиента с жидкими носителями или

тонкоизмельченными твердыми носителями, или и с теми, и с другими, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

5 Лекарственные формы соединения, описанного в данном 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.

10 Прессованные таблетки можно получить путем прессования в подходящей машине активного ингредиента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным веществом 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 насечки и необязательно могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента.

15 Для перорального применения могут быть получены таблетки, пастилки, таблетки для рассасывания, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, например, желатиновые капсулы, сиропы или эликсиры. Лекарственные формы соединений, описанных в данном документе, предназначенные для перорального применения, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для производства фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или более агентов, включая подсластители, ароматизаторы, окрашивающие агенты и консерванты, для обеспечения приятного на вкус препарата. Приемлемы таблетки, содержащие активный ингредиент в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, пригодным для изготовления таблеток. Такие вспомогательные вещества могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция или натрия, лактоза, фосфат кальция или натрия; гранулирующие агенты и разрыхлители, такие как маисовый крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, такие как крахмал, желатин или гуммиарабик; и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть без покрытия или могут быть покрыты оболочкой с использованием известных технологий,

включая микрокапсулирование, для замедления распада и адсорбции в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, обеспечения устойчивого действия в течение более длительного периода. Например, может быть использован материал для замедления действия, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, отдельно или вместе с воском.

Для лечения глаз или других внешних тканей, например рта и кожи, лекарственные формы можно применять в виде мази или крема для местного применения, содержащих активный ингредиент(-ы) в количестве, например, от 0,075 до 20% мас./мас. При составлении мази активные ингредиенты можно использовать либо с парафиновой, либо со смешивающейся с водой основой для мази. Альтернативно, активные ингредиенты могут быть включены в состав крема с кремовой основой типа «масло в воде».

При необходимости водная фаза основы для крема может содержать многоатомный спирт, т.е. спирт, имеющий две или более гидроксильных групп, такой как пропиленгликоль, бутан-1,3-диол, маннит, сорбит, глицерин и полиэтиленгликоль (включая ПЭГ 400) и их смеси. Лекарственные формы для местного применения могут при необходимости содержать 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. Несмотря на то, что фаза может содержать только эмульгатор, она также может содержать смесь по меньшей мере одного эмульгатора и жира или масла или и жира, и масла. Гидрофильный эмульгатор, включенный вместе с липофильным эмульгатором, может действовать как стабилизатор. Эмульгатор(-ы) вместе со стабилизатором(-ами) или без него образуют так называемый эмульгирующий воск, а воск вместе с маслом и жиром образуют так называемую эмульгирующую мазевую основу, которая образует маслянистую дисперсную фазу кремовых лекарственных форм. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсии, подходящие для использования в такой лекарственной форме, включают Tween® 60, Span® 80, цетостеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия.

Водные суспензии соединений содержат активные вещества в смеси со вспомогательными веществами, подходящими для производства водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующий агент, такой как карбоксиметилцеллюлоза натрия, кроскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь, а также диспергирующие или смачивающие агенты, такие как природный фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксицетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром, полученным из жирной кислоты, и ангидрида гексита (например, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана). Водная суспензия может также содержать один или более консервантов, таких как этил- или н-пропил-п-гидроксibenzoат, один или более окрашивающих агентов, один или более ароматизаторов и один или более 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. Такую суспензию можно составить в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, которые были упомянуты выше. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, таком как 1,3-бутандиол. Стерильный инъекционный препарат также может быть получен в виде лиофилизированного порошка. Среди приемлемых несущих сред и растворителей, которые могут быть использованы, – вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды традиционно можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое безвкусное нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для получения инъекционных препаратов также можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Количество активного ингредиента, которое можно объединять с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, будет варьироваться в

зависимости от получающего лечение хозяина и конкретного способа введения. Например, препарат с высвобождением по времени, предназначенный для перорального введения людям, может содержать от около 1 до 1000 мг активного материала, смешанного с подходящим и подходящим количеством материала-носителя, которое может варьироваться от около 5 до около 95% от общего количества композиции (масса:масса). Фармацевтическая композиция может быть получена так, чтобы обеспечивать 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 обеспечения инфузии подходящего объема со скоростью от около 10 мл/час до около 50 мл/час.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые обеспечивают изотоничность состава с кровью предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители.

Лекарственные формы, подходящие для местного введения в глаза, также включают глазные капли, в которых активный ингредиент растворен или суспендирован в подходящем носителе, особенно в водном растворителе для активного ингредиента. Активный ингредиент предпочтительно присутствует в таких лекарственных формах 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.

Лекарственные формы, подходящие для местного применения в полости рта, включают пастилки, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

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

Лекарственные формы, подходящие для внутрилегочного или назального введения, имеют размер частиц, например, в диапазоне от 0,1 до 500 мкм (включая размеры частиц в диапазоне от 0,1 до 500 мкм с приращением в несколько микрон, например, 0,5, 1, 30 микрон, 35 микрон и т.д.), и их вводят путем быстрой ингаляции через носовой проход или через рот так, чтобы достичь альвеолярных мешочков. Подходящие лекарственные формы включают водные или масляные растворы активного ингредиента. Лекарственные формы, подходящие для введения в виде аэрозоля или сухого порошка, могут быть получены обычными способами и могут быть доставлены с другими терапевтическими агентами, такими как соединения, ранее использовавшиеся для лечения или профилактики заболеваний, описанных ниже.

Лекарственные формы, 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 известны в данной области как подходящие.

Лекарственные формы могут быть упакованы в однодозовые или многодозовые контейнеры, например, запечатанные ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном замораживанием (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды, для инъекций непосредственно перед использованием. Растворы и суспензии для экстемпоральных инъекций получают из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного типа. Предпочтительными единичными лекарственными формами являются препараты, содержащие суточную дозу или единичную суточную субдозу активного ингредиента, как указано выше, или соответствующую ее часть.

Объектом изобретения также являются ветеринарные композиции, содержащие по меньшей мере один активный ингредиент, определенный выше, соответственно, вместе с ветеринарным носителем. Ветеринарные носители представляют собой материалы, подходящие для введения композиции, и могут быть твердыми, жидкими или газообразными материалами, которые в других отношениях являются инертными или приемлемыми в ветеринарии и совместимы с активным ингредиентом. Такие ветеринарные композиции можно вводить парентерально, перорально или любым другим требуемым способом.

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

5

Г. Способы лечения

Соединения и композиции, описанные в данном документе, также можно использовать в способах лечения различных заболеваний и/или расстройств, которые были идентифицированы как связанные с нарушением экспрессии и/или функции РНК, или с экспрессией и/или функцией белка, который производится из мРНК, или с полезной ролью переключения конформации РНК с использованием небольшой молекулы, или с изменением нативной функции рибопереклювателя как способа ингибирования роста инфекционного организма. Таким образом, способы по данному изобретению относятся к лечению заболевания или расстройства, которое связано с нарушением экспрессии и/или функции РНК, или к созданию нового переключаемого терапевтического средства. См., например, публикацию заявки на патент США № 2018/010146, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах реализации способы лечения заболевания или расстройства, описанного в данном документе (например, связанного с нарушением экспрессии и/или функции РНК), включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, дозы терапевтически эффективного количества соединения и/или композиции, описанных в данном документе.

Нарушение экспрессии РНК характеризуется сверхэкспрессией или недостаточной экспрессией одной или более молекул РНК. В некоторых вариантах реализации одна или более молекул РНК связаны с промотированием заболевания и/или расстройства, подлежащего лечению. В некоторых вариантах реализации молекула(-ы) РНК характеризуется тем, что она является частью механизма здоровых клеток и, следовательно, предотвращает и/или облегчает заболевание и/или расстройство, подлежащее лечению. В некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с нарушением функции РНК, связанной с транскрипцией, процессированием и/или трансляцией. В некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с неточной экспрессией белков в результате нарушенной

функции молекулы РНК. В некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство, подлежащее лечению, связано с нарушением функции РНК, связанной с экспрессией генов. В некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, при котором желательно снизить экспрессию белка посредством связывания молекулы с мРНК. В некоторых вариантах реализации заболевание преимущественно лечат с помощью терапии, которую можно включать или отключать с помощью низкомолекулярного соединения. Например, в некоторых вариантах реализации заболевание или расстройство представляет собой генетическое заболевание, при котором необходимо иметь возможность включения или отключения экспрессии терапевтического гена.

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

Примеры дегенеративных заболеваний включают, без ограничения, болезнь Альцгеймера (AD), боковой амиотрофический склероз (ALS, болезнь Лу Герига), рак, болезнь Шарко-Мари-Тута (СМТ), хроническую травматическую энцефалопатию, муковисцидоз, некоторые дефициты цитохром-с-оксидазы (часто являются причиной дегенеративного синдрома Лея), синдром Элерса-Данлоса, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, атаксию Фридрейха, лобно-височную деменцию (FTD), некоторые сердечно-сосудистые заболевания (например, атеросклеротические, такие как ишемическая болезнь сердца, аортальный стеноз и т.д.), болезнь Хантингтона, детскую нейроаксональную дистрофию, кератоконус (КС), кератоглобус, лейкодистрофию, макулодистрофию (AMD), синдром Марфана (MFS), некоторые митохондриальные миопатии, синдром истощения митохондриальной ДНК, рассеянный склероз (MS), множественную системную атрофию, мышечные дистрофии (MD), нейрональный цероидный липофусциноз, болезнь Нимана-Пика, остеоартрит, остеопороз, болезнь Паркинсона, легочную артериальную гипертензию, все прионные заболевания (болезнь Крейцфельда-Якоба, фатальная семейная бессонница и т.д.), прогрессирующий надъядерный паралич, пигментный ретинит (RP), ревматоидный артрит, болезнь Сандхоффа, спинальную мышечную атрофию (SMA, болезнь двигательных нейронов),

подострый склерозирующий панэнцефалит, болезнь Тея-Сакса и сосудистую деменцию (сама по себе не может быть нейродегенеративной, но часто появляется вместе с другими формами дегенеративной деменции).

Иллюстративные виды рака включают, но не ограничиваются ими, все формы
5 карцином, меланом, бластом, сарком, лимфом и лейкозов, включая, без ограничения, рак мочевого пузыря, карциному мочевого пузыря, опухоли головного мозга, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак эндометрия, гепатоцеллюлярную карциному, рак гортани, рак легких, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки и рак щитовидной железы,
10 острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, эпендимому, саркому Юинга, глиобластому, медуллобластому, нейробластому, остеосаркому, рабдомиосаркому, рабдоидный рак и нефробластому (опухоль Вильмса).

Иллюстративные аутоиммунные заболевания включают, но не ограничиваются ими, болезнь Стилла у взрослых, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз,
15 анкилозирующий спондилит, анти-GBM/анти-TBM нефрит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную дисавтономию, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный оофорит, аутоиммунный орхит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную крапивницу,
20 аксональную и нейрональную невропатию (AMAN), болезнь Бало, болезнь Бехчета, доброкачественный пемфигоид слизистой оболочки, буллезный пемфигоид, болезнь Кастлемана (CD), целиакию, болезнь Шагаса, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP), хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит (CRMO), синдром Черджа-Стросса (CSS) или
25 эозинофильный гранулематоз (EGPA), рубцующийся пемфигоид, синдром Когана, болезнь холодových агглютининов, врожденную блокаду сердца, миокардит Коксаки, синдром CREST, болезнь Крона, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптический нейромиелит), дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный фасциит, узловатую эритему,
30 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 Геноха-Шенлейна (HSP), герпес беременных или пемфигоид беременных (PG), гнойный гидраденит (HS) (инверсные угри), гипогаммаглобулинемию, IgA-нефропатию, IgG4-ассоциированную склерозирующую болезнь, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP), миозит с тельцами включения (IBM), интерстициальный цистит (IC), ювенильный артрит, ювенильный диабет (диабет I типа), ювенильный миозит (JM), болезнь Kawasaki, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, плоский лишай, склеротический лишай, деревянистый конъюнктивит, IgA-зависимый линейный дерматоз (LAD), волчанку, хроническую болезнь Лайма, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит (MPA), смешанную болезнь соединительной ткани (MCTD), язву Мурена, болезнь Мухи-Габерманна, мультифокальную моторную нейропатию (MMN) или MMNCB, рассеянный склероз, миастению гравис, миозит, нарколепсию, неонатальную волчанку, оптический нейромиелит, нейтропению, глазной рубцующийся пемфигоид, неврит зрительного нерва, палиндромный ревматизм (PR), PANDAS, паранеопластическую дегенерацию мозжечка (PCD), пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри Ромберга, парспланит (периферический увеит), синдром Парсонейджа-Тернера, пемфигус, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, пернициозную анемию (PA), синдром POEMS, узелковый полиартериит, полигландулярные синдромы I, II, III типа, ревматическую полимиалгию, полимиозит, постинфарктный синдром, постперикардитомический синдром, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, прогестероновый дерматит, псориаз, псориатический артрит, чистую красноклеточную аплазию (PRCA), гангренозная пиодермию, феномен Рейно, реактивный артрит, рефлекторную симпатическую дистрофию, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног (RLS), забрюшинный фиброз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шмидта, склеродермию, синдром Шегрена, аутоиммунитет спермы и яичек, синдром ригидного человека (SPS), подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию (SO), артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, тромбоцитопеническую пурпуру (TTP), синдром Толоса-Ханта (THS), поперечный миелит, диабет I типа, язвенный

колит (UC), недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), увеит, васкулит, витилиго и болезнь Фогта-Коянаги-Харада.

5 Иллюстративные сердечно-сосудистые расстройства включают, но не ограничиваются ими, коронарную болезнь сердца (CAD), стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, сердечный приступ, сердечную недостаточность, гипертоническую болезнь сердца, ревматическую болезнь сердца, кардиомиопатию, аномальные сердечные ритмы, врожденные пороки сердца, пороки клапана сердца, кардиты, аневризмы аорты, заболевания периферических артерий, тромбозы артерий и венозные тромбозы.

10 Иллюстративные расстройства свертывания крови включают, но не ограничиваются ими, гемофилию, болезнь фон Виллебранда, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, заболевание печени, чрезмерную выработку циркулирующих антикоагулянтов, дефицит витамина К, дисфункцию тромбоцитов и другие нарушения свертывания крови.

15 Иллюстративные заболевания глаз включают, но не ограничиваются ими, дегенерацию желтого пятна, экзофтальм, катаракту, ЦМВ-ретинит, диабетический макулярный отек, глаукому, кератоконус, глазную гипертензию, глазную мигрень, ретинобластому, субконъюнктивальное кровоизлияние, птеригиум, кератит, сухость глаз и абразию роговицы.

Иллюстративные инфекционные заболевания включают, но не ограничиваются ими, острый вялый миелит (AFM), анаплазмоз, сибирскую язву, бабезиоз, ботулизм, бруцеллез, кампилобактериоз, резистентную к карбапенемам инфекцию (CRE/CRPA), шанкр, вирусную инфекцию чикунгунья (чикунгунья), хламидию, сигуатеру (вредоносное цветение водорослей (HAB)), инфекцию *Clostridium Difficile*, *Clostridium Perfringens* (токсин эпсилон), грибковую инфекцию кокцидиоидомикоза (лихорадка долины), COVID-19 (коронавирусная болезнь 2019), болезнь Крейцфельдта-Якоба, трансмиссивную губчатую энцефалопатию (CJD), криптоспориоз (крипто), циклоспориаз, денге, 1,2,3,4 (лихорадка денге), дифтерию, инфекцию *E. coli*, бактерии, продуцирующие шига-токсин (STEC), восточный энцефалит лошадей (EEE), геморрагическую лихорадку Эбола (эбола), эрлихиоз, энцефалит, арбовирусный или параинфекционный, энтеровирусную инфекцию, неполиомиелит (неполиомиелитный энтеровирус), энтеровирусную инфекцию, D68 (EV-

D68), лямблиоз (жиардиаз), сап, гонококковую инфекцию (гонорею), паховую гранулему, болезнь, вызванную гемофильной инфекцией типа 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 (Hep D), гепатит Е (Hep E), герпес, опоясывающий герпес, опоясывающий герпес, вызванный вирусом VZV (опоясывающий лишай), инфекцию гистоплазмоза (гистоплазмоз), вирус иммунодефицита человека/СПИД (ВИЧ/СПИД), вирус папилломы человека (HPV), грипп (Flu), отравление свинцом, легионеллез (болезнь легионеров), проказу (болезнь Хансенса), лептоспироз, листериоз (листерия), болезнь Лайма, инфекцию венерической лимфогранулемы (LGV), малярию, корь, мелиоидоз, менингит вирусный (вирусный менингит), бактериальную менингококковую болезнь, (бактериальный менингит), ближневосточный респираторный синдром, коронавирус (MERS-CoV), паротит, норовирус, паралитическое отравление моллюсками (паралитическое отравление моллюсками, сигуатера), педикулез (вши, головные и платяные вши), воспалительные заболевания органов малого таза (PID), коклюш (судорожный кашель), чуму: бубонную, септическую, легочную (чума), пневмококковую болезнь (пневмония), полиомиелит (Polio), повассан, пситтакоз (попугайная лихорадка), фтириаз (вши; заражение лобковыми вшами), пустулезную сыпь (оспа, обезьянья оспа, коровья оспа), лихорадку Q, бешенство, отравление рицином, риккетсиоз (пятнистая лихорадка Скалистых гор), краснуху, в том числе врожденную (германская корь), сальмонеллезный гастроэнтерит (сальмонелла), заражение чесоткой (чесотка), скомбротоксикоз, септический шок (сепсис), тяжелый острый респираторный синдром (SARS), шигеллезный гастроэнтерит (шигеллы), оспу, метициллин-резистентную стафилококковую инфекцию (MRSA), стафилококковое пищевое отравление, отравление энтеротоксином В (пищевое отравление стафилококком), стафилококковую инфекцию с промежуточной чувствительностью к ванкомицину (VISA), стафилококковую инфекцию, устойчивую к ванкомицину (VRSA), стрептококковая болезнь группы А (инвазивная) (Strep A (инвазивная)), стрептококковая болезнь группы В (Strep B), стрептококковый синдром токсического шока, STSS, токсический шок (STSS, TSS), сифилис (первичный, вторичный, ранний латентный, поздний латентный, врожденный), инфекцию столбняка, столбняк (судорожное смыкание челюстей), трихомоноз (трихомонадная инфекция), трихонозную инфекцию (трихиноз), туберкулез (ТБ), туберкулез (латентный) (LTBI), туляремию

(кроличья лихорадка), брюшной тиф (группа D), тиф, вагиноз, бактериальный (дрожжевая инфекция), повреждение легких, связанное с вейпингом (повреждение легких, связанное с курением электронных сигарет), ветряную оспу (ветрянка), холерный вибрион (холера), вибриоз (*Vibrio*), вирусную геморрагическую лихорадку (Эбола, Ласса, Марбург), вирус Западного Нила, желтую лихорадку, иерсению (йерсиния) и вирусную инфекцию Зика (Зика).

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Дизайн конструкции и получение РНК

5 Конструкцию для скрининга разрабатывали так, чтобы обеспечить включение широкого спектра одного или более внутренних мотивов РНК-мишени. В конструкции присутствовали два мотива: домен ТРР-рибопереключателе²⁷ и псевдоузел из 5'-UTR вируса денге²⁶. Дизайн полной последовательности конструкции, включая структурные кассеты, спираль штрих-кода РНК и две экспериментальные структуры РНК (разделенные шестинуклеотидным линкером), оценивали с использованием структуры РНК³⁹. Для 10 снижения вероятности взаимодействия двух экспериментальных структур, было сделано небольшое количество изменений последовательности, чтобы предотвратить неправильно свернутые структуры, спрогнозированные по структуре РНК, с сохранением нативной складки (Фиг. 6А, 6В). Структура окончательной конструкции была подтверждена с помощью SHAPE-MaP.

15 Штрих-коды РНК были разработаны так, чтобы складываться в автономные шпильки (Фиг. 6А, 6В). Все возможные перестановки штрих-кодов РНК были вычислены и свернуты в контексте полной последовательности конструкции, а любые штрих-коды, которые потенциально могли взаимодействовать с другой частью конструкции РНК, были удалены из набора. Конструкции со штрих-кодом зондировали с помощью SHAPE-MaP с 20 использованием протокола «без лиганда» и сворачивали с использованием структуры РНК с затруднением реакционной способности по SHAPE, чтобы подтвердить, что спирали штрих-кода сворачиваются в требуемые автономные шпильки.

Получение РНК

ДНК-матрицы (Integrated DNA Technologies) для транскрипции *in vitro* кодировали последовательность целевой конструкции (содержащую последовательность псевдоузла денге, одноцепочечный линкер и последовательность ТРР-рибопереключателя) и кассеты фланкирующей структуры²⁵: 5'-GTGGG CACTT CGGTG TCCAC ACGCG AAGGA AACCG
5 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 CGGTG CGCCG GATCA ATCGG
GCTTC GGTCC GGTTC-3' (SEQ ID NO:1). Сайты связывания праймера подчеркнуты.
Прямые праймеры для ПЦР, содержащие уникальные штрих-коды РНК и
10 последовательность промотора Т7, использовали для индивидуального добавления штрих-
кодов РНК к каждой из 96 конструкций в отдельных реакциях ПЦР. Образец
последовательности прямого праймера, нуклеотиды штрих-кода которого выделены
жирным шрифтом, а сайт связывания праймера подчеркнут, представляет собой:
5'- GAAAT TACGA CTCAC TATAG GTCGC GAGTA ATCGC GACCG **GCGCT** AGAGA
15 **TAGTG CCGTG GGCAC TTCGG TGTC** -3' (SEQ ID NO:2).

ДНК амплифицировали методом ПЦР с использованием смеси 200 мкМ dNTP (New England Biolabs), 500 нМ прямого праймера, 500 нМ обратного праймера, 1 нг ДНК-матрицы, 20% (об./об.) реакционного буфера Q5 и 0,02 ед./мкл высокоточной полимеразы для горячего старта Q5 (New England Biolabs) с получением матриц для транскрипции *in vitro*. ДНК очищали (набор для очистки ПЦР PureLink Pro 96; Invitrogen) и измеряли количественно (набор для высокочувствительного анализа дцРНК Quant-iT; Invitrogen) на микропланшетном ридере Tecan Infinite M1000 Pro.

Транскрипцию *in vitro* проводили в формате 96-луночного планшета, каждая лунка содержала общий реакционный объем 100 мкл. Каждая лунка содержала 5 мМ NTP (New England Biolabs), 0,02 ед./мкл неорганической пирофосфатазы (дрожжи, New England Biolabs), 0,05 мг/мл полимеразы Т7 в 25 мМ MgCl₂, 40 мМ Tris, рН 8,0, 2,5 мМ спермидина, 0,01% Triton, 10 мМ DTT и 200–800 нМ ДНК-матрицы с уникальным штрих-кодом (генерируемой методом ПЦР). Реакционные смеси инкубировали при 37 °С в течение 4 часов; затем обрабатывали реагентом TurboDNase (без РНКазы, Invitrogen) в конечной
25 концентрации 0,04 ед./мкл; инкубировали при 37 °С в течение 30 мин; с последующим
30 вторым добавлением ДНКазы до общей конечной концентрации 0,08 ед./мкл и

дополнительной 30-минутной инкубацией при 37 °С. Ферментативные реакции останавливали добавлением ЭДТК до конечной концентрации 50 мМ и помещали на лед. РНК очищали (магнитные шарики Agencourt RNAClean XP; Beckman Coulter) в 96-луночном формате и ресуспендировали в 10 мМ Tris, pH 8,0, 1 мМ ЭДТК. Концентрации РНК определяли количественно (набор для анализа широкого спектра РНК Quant-iT; Invitrogen) на микропланшетном ридере Tecan Infinite M1000 Pro, и РНК в каждой лунке индивидуально разбавляли до 1 пмоль/мкл. РНК хранили при -80°C.

Пример 2: Химическая модификация и скрининг низкомолекулярных фрагментов

Фрагменты получали в виде библиотеки для скрининга фрагментов от Maybridge, которая представляла собой подмножество их библиотеки фрагментов разнообразия Ro3 и содержала 1500 соединений, растворенных в ДМСО в концентрации 50 мМ. Большинство этих соединений подчинялись «правилу трех» для фрагментных соединений; имели молекулярную массу <300 Да, содержали ≤ 3 доноров водородных связей и ≤ 3 акцепторов водородных связей и имел $ClogP \leq 3,0$. Все соединения, использованные для ИТС, за исключением тех, которые перечислены в примере 5, были приобретены у Millipore-Sigma и использованы без дополнительной очистки. Скрининговые эксперименты проводили в 25 мкл в формате 96-луночного планшета на жидкостном манипуляторе Tecan Freedom Evo-150, оснащенный 8-канальным рычагом для пипетирования с вытеснением воздухом, одноразовыми наконечниками с фильтрами, роботизированным манипулятором и дистанционно управляемой сухой баней для нагрева/охлаждения EchoTherm RIC20 (Torrey Pines Scientific). Программы жидкостного манипулятора, использованные для скрининга, доступны по запросу.

Для первого скрининга фрагмента-лиганда 5 пмоль РНК на лунку разводили до 19,6 мкл в воде, не содержащей РНКазы, на охлаждающем блоке при 4 °С. Планшет нагревали при 95 °С в течение 2 минут, после чего сразу же резко охлаждали до 4 °С в течение 5 минут. В каждую лунку добавляли 19,6 мкл 2× буфера для сворачивания (конечные концентрации 50 мМ HEPES, pH 8,0, 200 мМ ацетата калия и 10 мМ $MgCl_2$) и инкубировали планшеты при 37 °С в течение 30 минут. Для второго скрининга фрагмента-лиганда 24,3 мкл свернутой РНК на лунку добавляли к 2,7 мкл первичного связывающего фрагмента в ДМСО до конечной концентрации $10 \times K_d$ фрагмента и инкубировали образцы при 37 °С в течение

10 минут. Для объединения РНК-мишени с фрагментом 24,3 мкл раствора РНК или РНК с первичным связывающим фрагментом добавляли в лунки, содержащие 2,7 мкл 10× фрагментов для скрининга (в ДМСО с получением конечной концентрации фрагмента 1 мМ). Растворы тщательно перемешивали пипеткой и инкубировали в течение 10 минут при 5 37 °С. Для зондирования SHAPE 22,5 мкл раствора фрагмента РНК из каждой лунки скринингового планшета добавляли к 2,5 мкл 10× реагента SHAPE в ДМСО на нагревательном блоке при 37 °С и быстро перемешивали пипеткой для достижения однородного распределения реагента SHAPE с РНК. По истечении соответствующего времени реакции образцы помещали на лед. Для первого скрининга фрагмента в качестве 10 реагента SHAPE использовали 1-метил-7-нитроизазолевый ангидрид (1M7) в конечной концентрации 10 мМ и проводили реакцию в течение 5 минут. Для второго скрининга фрагмента в качестве реагента SHAPE использовали 5-нитроизазолевый ангидрид (5NIA)⁴⁰ в конечной концентрации 25 мМ и проводили реакцию в течение 15 минут. Избыточные фрагменты, растворитель и гидролизованный реагент SHAPE удаляли с помощью 96-луночных планшетов AutoScreen-A (GE Healthcare Life Sciences), а 5 мкл модифицированной РНК из каждой лунки 96-луночного планшета объединяли в один образец на планшет с получением библиотеки для секвенирования.

Каждый скрининг состоял из 19 экспериментальных планшетов с фрагментами, двух планшетов, содержащих распределение положительных (фрагмент 2, конечная 20 концентрация 1 мМ) и отрицательных (растворитель, ДМСО) контролей, а также одного отрицательного контрольного планшета SHAPE, обработанного растворителем (ДМСО) вместо реагента SHAPE. Для экспериментов по проверке совпадений меняли местоположения лунок каждого совпадающего фрагмента, чтобы контролировать расположение лунок и влияние штрих-кодов РНК. Также были доступны карты планшетов 25 как для первичного, так и для вторичного скрининга.

После завершения скрининга экспериментальных фрагментов проводили статистические испытания для выявления различий в частоте модификаций данного нуклеотида. В частности, скрининговый анализ требует статистического сравнения частоты модификаций данного нуклеотида в присутствии фрагмента по сравнению с его 30 отсутствием. Для каждого нуклеотида количество модификаций в данной реакции представляет собой процесс Пуассона с известной дисперсией; таким образом,

статистическую значимость наблюдаемой разницы в частоте модификаций между двумя образцами можно установить, выполнив тест сравнения двух счетчиков Пуассона³¹. То есть, если модификации m_1 тестируемого нуклеотида подсчитывались среди прочтений n_1 в образце 1, а модификации m_2 подсчитывались среди прочтений n_2 в образце 2, то проверяемая нулевая гипотеза прогнозирует, что среди всех подсчитанных модификаций ($m_1 + m_2$) доля модификаций в образце 1 составит $p_1 = n_1/(n_1 + n_2)$. Z-критерий указанной 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 Z-значение превышает указанный порог значимости, считается, что на тестируемый нуклеотид статистически значимо влияет присутствие экспериментального фрагмента.

Затем для каждого фрагмента следует выполнить Z-тест на большом количестве нуклеотидов, входящих в последовательность РНК, что увеличивает вероятность ложноположительных результатов. Несмотря на то, что количество ложноположительных определений реакционной способности SHAPE на нуклеотид можно минимизировать путем повышения порога значимости Z, такой подход снизит чувствительность скрининга (то есть уменьшит способность обнаруживать более слабые связывающие лиганды). Чтобы уменьшить количество выполняемых Z-тестов, такие тесты применяли только к нуклеотидам в интересующей области, а не ко всем нуклеотидам в конструкции для скрининга РНК. Для мотива РНК денге интересующей областью были положения 59-110; для мотива ГРР интересующей областью были положения 100-199. Количество Z-тестов было дополнительно сокращено путем исключения нуклеотидов с низкой частотой модификаций в обоих образцах. Порог, позволяющий считать, что нуклеотид имеет низкую частоту модификаций, устанавливали на уровне 25% от средней частоты модификаций по планшету, которую рассчитывали по всем нуклеотидам во всех 96 лунках данного планшета. Z-тесты проводили только на тех нуклеотидах, которые меньшей мере в одном

из двух сравниваемых образцов имели частоту модификаций, превышающую указанный 25%-ный порог.

В идеале единственной разницей между условиями в двух сравниваемых образцах было бы наличие фрагмента в одном образце, но не в другом. Сравнение образцов отрицательного контроля друг с другом можно использовать для оценки распространённости неконтролируемых факторов, которые могут привести к вариативности частоты модификаций нуклеотидов. Например, если порог значимости Z установлен на уровне 2,7, то при полном отсутствии таких факторов Z -тест, применённый к парам образцов отрицательного контроля (без фрагментов), теоретически должен идентифицировать дифференциально реактивные нуклеотиды с вероятностью $P = 0,0035$. Однако если Z -тест был применён к парам образцов отрицательного контроля, выбранных случайным образом из 587 образцов отрицательного контроля, протестированных в первичном скрининге, то фактическая вероятность была в 90 раз выше, с $P = 0,32$. Таким образом, наблюдалась статистически значимая вариативность реакционной способности SHAPE по отдельным нуклеотидам в отсутствие фрагментов.

Несмотря на то, что большинство повторов имели по существу одинаковые профили, было значительное количество повторов с разными профилями; некоторые коэффициенты детерминации составляли лишь 0,85. Применение Z -теста к разным образцам отрицательного контроля выявило большое количество случаев, когда нуклеотиды были ошибочно классифицированы как дифференциально реакционноспособные. Чтобы избежать такого результата, каждый образец сравнивали с пятью наиболее коррелирующими образцами отрицательного контроля. Z -тесты, применённые к таким селективным парам отрицательного контроля с порогом значимости Z 2,7, привели к идентификации дифференциально реакционноспособных нуклеотидов с вероятностью $P = 0,067$.

Такая вероятность примерно в 20 раз выше теоретического значения $P = 0,0035$, что указывает на вариативность обработки образцов. Часть этой вариативности одинаково масштабируется по реакционной способности всех нуклеотидов всех РНК в образце. Указанную вариативность можно устранить, уменьшив общую реактивность более реакционноспособного образца, чтобы она соответствовала общей реактивности менее реакционноспособного образца. Такое масштабирование осуществляли путем (i)

вычисления для каждого нуклеотида в последовательности РНК отношения частоты его модификаций в более реакционноспособном образце к частоте его модификаций в менее реактивном образце и (ii) деления частот модификаций всех нуклеотидов в более реакционноспособном образце на медиану отношений, полученных на этапе (i). Такое масштабирование пар лунок с отрицательным контролем с максимальной корреляцией снизило вероятность обнаружения совпадений нуклеотидов до $P = 0,030$, что в 9 раз выше теоретической вероятности. Таким образом, ложноположительная идентификация фрагментов будет происходить, как это действительно происходит во всех высокопроизводительных скрининговых анализах, а фактические попадания фрагментов из безлигандных вариантов отличали путем повторной проверки SHAPE и прямым измерением связывания лиганда с помощью ИТС.

Поскольку ожидается, что эффективный лиганд будет влиять на частоту модификаций нескольких нуклеотидов в РНК-мишени, то фрагмент признавали удачным только в том случае, если количество нуклеотидов с реакционной способностью, отличной от таковой в отрицательном контроле, превышало определенный порог, который был установлен на уровне 2. Во-вторых, при поиске относительно устойчивого воздействия фрагментов на РНК небольшие относительные различия в реактивности нуклеотида, даже если они были статистически значимыми, исключали из общего подсчета дифференциально-реактивных нуклеотидов. На практике минимальная 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 представляют собой частоту модификаций нуклеотидов в двух образцах. В-третьих, данный образец сравнивали с пятью образцами отрицательного контроля, с которыми он наиболее сильно коррелировал. Все пять тестов были необходимы для того, чтобы обнаружить изменения в тестируемом образце по сравнению с образцом отрицательного контроля.

Наконец, чувствительность и специфичность скрининга контролировали выбором порога значимости Z . Оценку образцов, содержащих фрагменты, и всех образцов отрицательного контроля проводили при нескольких настройках порога значимости Z . Для каждой такой настройки ложноположительную фракцию (FPF) рассчитывали как долю образцов отрицательного контроля, в которых было обнаружено изменение, а фракцию

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 TRP-рибопереклювателя РНК 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 и секвенирование библиотеки

Обратную транскрипцию проводилась на объединенной модифицированной РНК в объеме 100 мкл. К 71 мкл объединенной РНК добавляли 6 мкл праймера для обратной транскрипции с получением конечной концентрации праймера 150 нМ, и инкубировали образец инкубировали при 65 °С в течение 5 минут, а затем помещали на лед. К полученному раствору добавляли 6 мкл 10× буфера для первой цепи (500 мМ Tris, pH 8,0, 750 мМ KCl), 4 мкл 0,4 М DTT, 8 мкл смеси dNTP (каждый 10 мМ) и 15 мкл 500 мМ MnCl₂ и инкубировали раствор при 42 °С в течение 2 минут, затем добавляли 8 мкл обратной транскриптазы SuperScript II (Invitrogen). Реакционную смесь инкубировали при 42 °С в течение 3 часов с последующей тепловой инактивацией при 70 °С в течение 10 минут, а затем помещали на лед. Полученный продукт кДНК очищали (магнитные шарики Agencourt RNAClean; Beckman Coulter), элюировали в воду, не содержащую РНКазы, и хранили при 20 °С. Последовательность праймера обратной транскрипции представляла собой 5'- CGGGC TTCGG TCCGG TTC-3' (SEQ ID NO:3).

Библиотеки ДНК для секвенирования получали с использованием двухстадийной реакции ПЦР для амплификации ДНК и добавления необходимых адаптеров TruSeq²⁴. ДНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием смеси 200 мкМ 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 для горячего старта Q5 (New England Biolabs). Избыточные не внедренные dNTP и праймеры удаляли путем аффинной очистки (магнитные шарики Agencourt AmpureXP; Beckman Coulter; при соотношении образец:шарики 0,7:1). Библиотеки ДНК количественно измеряли (набор для

высококочувствительного анализа дцДНК Qubit; Invitrogen) на флуорометре Qubit (Invitrogen), проверяли на качество (прибор для электрофореза на чипе Bioanalyzer 2100; Agilent) и секвенировали на высокопроизводительном секвенаторе Illumina NextSeq 550.

5 Ампликон-специфичный прямой праймер для получения библиотеки SHAPE-MaP представлял собой 5'-CCCTA CACGA CGCTC TTCCG ATCTN NNNNG GCCTT CGGGC CAAGG A-3' (SEQ ID NO:4). Ампликон-специфичный 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, перекрывающиеся с конструкцией для скрининга РНК, подчеркнуты.

10

Пример 4: Изотермическая титрационная калориметрия

Эксперименты ИТС проводили с использованием автоматизированного прибора Microcal PEAQ-ITC (Malvern Analytical) в условиях отсутствия РНКазы⁴¹. Транскрибированную *in vitro* РНК обменивали в фолдинг-буфере, содержащем 100 мМ CHES, рН 8,0, 200 мМ ацетата калия и 3 мМ MgCl₂, используя центробежное концентрирование (центробежные фильтры Amicon Ultra, номинальное отсечение по молекулярной массе 10000, Millipore Sigma). Лиганды растворяли в том же буфере (чтобы минимизировать теплоту смешивания при добавлении лиганда к РНК) в концентрации, в 10-20 раз превышающей требуемую экспериментальную концентрацию РНК.

20 Концентрацию РНК определяли количественно (спектрометр Nanodrop UV-VIS; ThermoFisher Scientific), разводили в буфере до концентрации, в 1-10 раз превышающей ожидаемое значение K_d , и повторно количественно определяли разбавленную РНК для подтверждения конечной концентрации экспериментальной РНК. РНК, разведенную в буфере для сворачивания, нагревали при 65 °С в течение 5 минут, помещали на лед на 5

25 минут и оставляли сворачиваться при 37 °С в течение 15 минут. При необходимости первичный связывающий лиганд (например, 2) предварительно связывали с РНК путем добавления 0,1 объема в 10-кратной требуемой конечной концентрации связанного лиганда с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 10 минут.

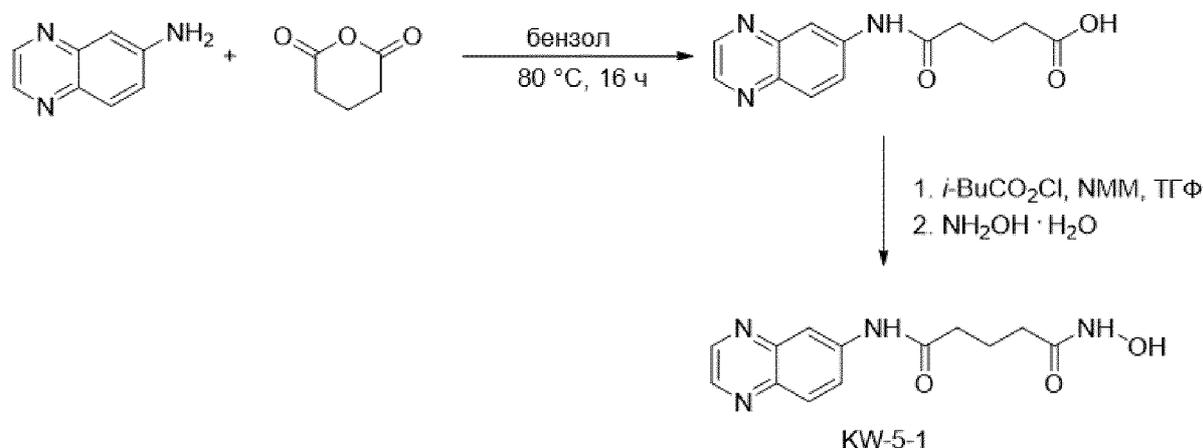
Каждый эксперимент ИТС включал два запуска: один, в котором лиганд титровали в РНК (экспериментальный след), и другой, в котором тот же лиганд титровали в буфере (контрольный след). Эксперименты ИТС проводили с использованием следующих

30

параметров: температура ячейки 25 °С, эталонная мощность 8 мккал/с, скорость перемешивания 750 об/мин, режим высокой обратной связи, первоначальный объем ввода пробы 0,2 мкл, затем 19 вводов по 2 мкл. Для завершения каждого ввода пробы требовалось 4 секунды, а интервал между вводами проб составлял 180 секунд.

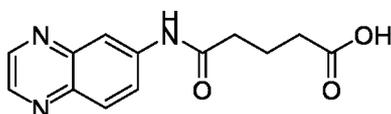
5 Данные ИТС анализировали с использованием программного обеспечения MicroCal PEAQ-ИТС Analysis (Malvern Analytical). Во-первых, базовую линию для каждого пика ввода проб корректировали вручную, чтобы устранить любые неправильно выбранные конечные точки ввода проб. Во-вторых, вычитали контрольный след из экспериментального следа методом поточечного вычитания. В-третьих, линию регрессии
10 методом наименьших квадратов аппроксимировали к данным с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта. В случае слабосвязывающих лигандов (>500 мкМ) N вручную устанавливали равным 1,0, чтобы можно было подобрать кривые с низким значением с.

Пример 5: Химический синтез экспериментального соединения KW-5-1.



15

5.1 Получение промежуточного соединения KW-2:

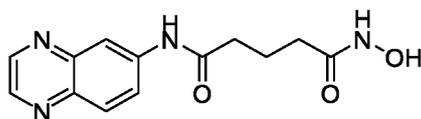


20

К раствору дигидро-2*H*-пиран-2,6(3*H*)-диона (173 мг, 1,52 ммоль) в бензоле (2,8 мл) добавляли хиноксалин-6-амин (200 мг, 1,38 ммоль). Перемешивали смесь при 80 °С в течение 16 часов. За ходом реакции следили с помощью ТСХ до исчезновения исходного материала. Отфильтровывали осадок и промывали бензолом с получением 5-окос-5- (хиноксалин-6-иламино)пентановой кислоты (273,5 мг, 77%) в виде светло-желтого

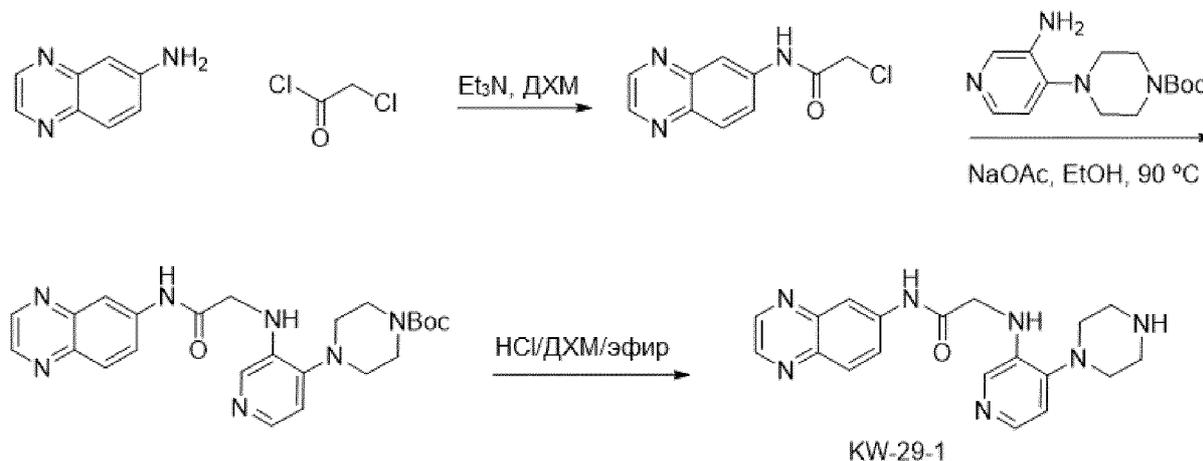
5 твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 12,12 (с, 1H), 10,42 (с, 1H), 8,86 (д, $J = 1,9$ Гц, 1H), 8,79 (д, $J = 1,9$ Гц, 1H), 8,51 (д, $J = 2,3$ Гц, 1H), 8,02 (д, $J = 9,1$ Гц, 1H), 7,91 (дд, $J = 9,1, 2,3$ Гц, 1H), 2,47 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H), 2,32 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H), 1,86 (п, $J = 7,4$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 174,2, 171,6, 145,9, 143,9, 143,1, 140,4, 139,1, 129,5, 123,8, 115,3, 35,6, 33,0, 20,3.

5.2 Получение соединения KW-5-1:

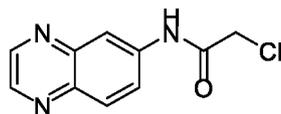


10 К раствору 5-оксо-5-(хиноксалин-6-иламино)пентановой кислоты (100,0 мг, 385,7 мкмоль) в тетрагидрофуране (1,9 мл) при 0 °С добавляли *N*-метилморфолин (51 мкл, 462,8 мкмоль), затем изобутилхлорформиат (60,49 мкл, 462,8 мкмоль). Перемешивали смесь при 0 °С в течение 1 часа. Фильтрат добавляли к гидроксиламину (0,24 мл, 50% водный раствор, 3,857 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Удаляли растворители и очищали остаток обращенно-фазовой ЖХСД с получением N^1 -гидрокси- N^5 -
15 (хиноксалин-6-ил)глутарамида (5,0 мг, 5%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,42 (с, 1H), 8,86 (д, $J = 1,9$ Гц, 1H), 8,80 (д, $J = 1,9$ Гц, 1H), 8,53 (д, $J = 2,3$ Гц, 1H), 8,03 (д, $J = 9,1$ Гц, 1H), 7,91 (дд, $J = 9,1, 2,3$ Гц, 1H), 7,30 (с, 1H), 6,75 (с, 1H), 2,43 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H), 2,14 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H), 1,85 (п, $J = 7,4$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (151 МГц, ДМСО) δ 173,8, 171,8, 145,9, 143,8, 143,1, 140,6, 140,5, 139,0, 129,5, 123,7, 115,3, 36,1, 35,8,
20 34,2, 20,8.

Пример 6: Химический синтез экспериментального соединения KW-29-1.



6.1 Получение промежуточного соединения KW-20:



5

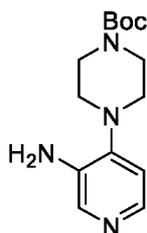
К суспензии хиноксалин-6-амина (200,0 мг, 1,378 ммоль) и Et₃N (0,95 мл, 6,888 ммоль) в ДХМ (6,9 мл) добавляли 2-хлорацетилхлорид (164,6 мкл, 2,067 ммоль).

Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 2 часов. Удаляли растворитель и очищали остаток с помощью нормально-фазовой ЖХСД с получением 2-

10 хлор-*N*-(хиноксалин-6-ил)ацетамида (194,8 мг, 64%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃-*d*) δ 8,83 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H), 8,78 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H), 8,60 (с, 1H), 8,40 (д, *J* = 2,4 Гц, 1H), 8,09 (д, *J* = 9,0 Гц, 1H), 7,94 (дд, *J* = 9,0, 2,4 Гц, 1H), 4,27 (с, 2H). ¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃) δ 164,3, 145,8, 144,4, 143,6, 140,8, 138,1, 130,6, 123,8, 118,0, 43,1. МС-ИЭР: [M + H]⁺.

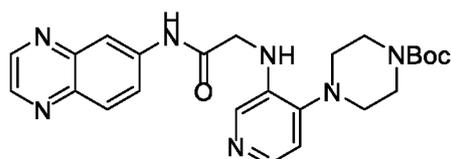
15

6.2 Получение *tert*-бутил-4-(3-аминопиридин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата:



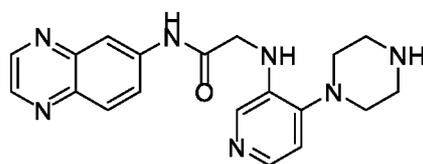
трет-Бутил-4-(3-аминопиридин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилат синтеировали описанным ранее способом: Basso, Andrea Dawn; международная заявка PCT 2009017701 от 05 февраля 2009 года, Burger, Matthew T. et al, из ACS Medicinal Chemistry Letters, 4(12), 1193-1197; 2013.

5 6.3 Получение промежуточного соединения KW-26:



Смесь 2-хлор-*N*-(хиноксалин-6-ил)ацетамида (50,0 мг, 226 мкмоль), *трет*-бутил-4-(3-аминопиридин-4-ил)пиперазин-1-карбоксальдегида (62,8 мг, 226 мкмоль) и ацетата натрия (37,0 мг, 451 мкмоль) в EtOH (37,6 мкл) перемешивали при 90 °С в течение 16 часов. Выпаренный остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ЖХСД с получением *трет*-бутил-4-(3-((2-оксо-2-(хиноксалин-6-иламино)этил)амино)пиридин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата (43,3 мг, 41%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃-*d*) δ 11,47 (с, 1H), 8,56 (д, *J* = 2,0 Гц, 1H), 8,52 (д, *J* = 2,1 Гц, 2H), 8,16 (д, *J* = 2,2 Гц, 1H), 8,06 (д, *J* = 6,4 Гц, 1H), 7,84 (дд, *J* = 9,1, 2,2 Гц, 1H), 7,62 (д, *J* = 9,0 Гц, 1H), 6,72 (д, *J* = 6,7 Гц, 1H), 5,74 (шс, 2H), 5,45 (шс, 2H), 3,45 (д, *J* = 5,2 Гц, 4H), 3,03 – 2,96 (м, 4H), 1,42 (с, 9H). ¹³C ЯМР (101 МГц, CDCl₃) δ 164,3, 154,5, 150,5, 145,2, 143,6, 142,9, 139,7, 139,40, 139,35, 135,5, 130,0, 129,5, 124,1, 116,6, 113,4, 80,5, 61,5, 47,9, 29,8, 28,5.

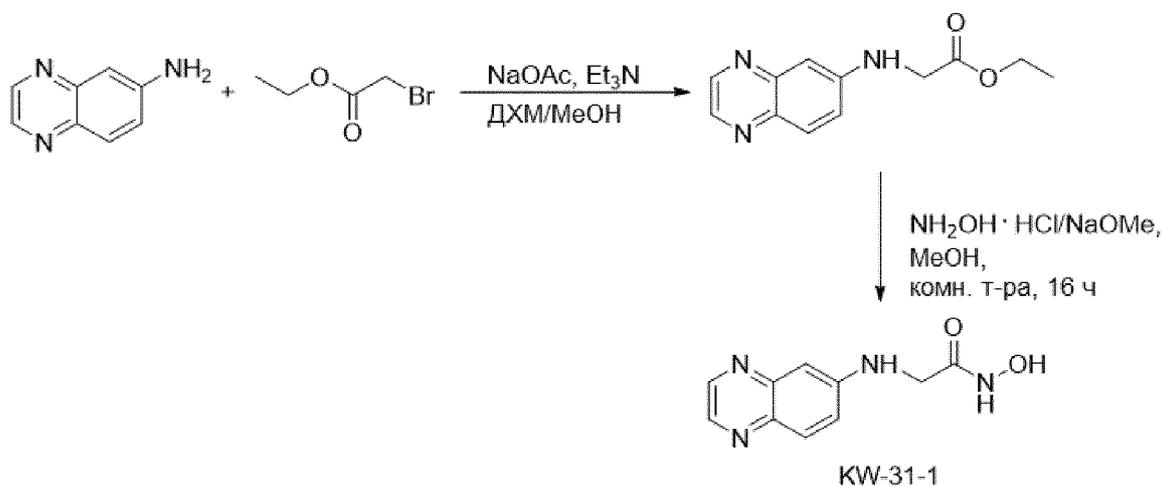
20 6.4 Получение соединения KW-29-1:



К раствору *трет*-бутил-4-(3-((2-оксо-2-(хиноксалин-6-иламино)этил)амино)пиридин-4-ил)пиперазин-1-карбоксилата (40,0 мг, 86,3 мкмоль) в ДХМ (4,3 мл) добавляли HCl (431 мкл, 863 мкмоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 16 часов. Добавляли твердый Na₂CO₃ для нейтрализации кислоты с получением свободного основания. Фильтрат выпаривали досуха. Выпаренный остаток

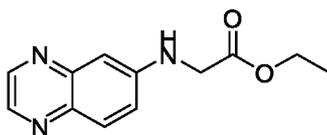
очищали с помощью нормаль-фазовой ЖХСД с получением 2-((4-(пиперазин-1-ил)пиридин-3-ил)амино)-*N*-(хиноксалин-6-ил)ацетамида (29,1 мг, 93%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 11,95 (с, 1H), 8,88 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H), 8,83 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,24 (дд, *J* = 6,8, 1,8 Гц, 1H), 8,13 – 8,03 (м, 3H), 7,38 (д, *J* = 6,8 Гц, 1H), 6,04 (с, 2H), 5,54 (с, 2H), 3,50 (шс, 4H), 3,28 (шс, 4H). ¹³C ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 164,8, 149,3, 146,1, 144,3, 142,9, 139,7, 139,3, 139,1, 135,4, 129,8, 129,3, 123,6, 115,9, 114,1, 60,6, 44,7, 42,3.

Пример 7: Химический синтез экспериментального соединения KW-31-1.



10

7.1 Получение промежуточного соединения KW-24:



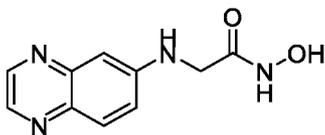
15

20

К смеси хиноксалин-6-амина (200,0 мг, 1,378 ммоль), этилбромацетата (307 мкл, 2,755 ммоль) и триэтиламина (0,95 мл, 6,888 ммоль) в EtOH (6,9 mL) добавляли ацетат натрия (226 мг, 2,755 ммоль). Перемешивали смесь при 90 °С в течение 60 минут. Добавляли дополнительное количество этилбромацетата (2 экв.) и ацетата натрия (2 экв.) и перемешивали смесь при 90 °С в течение 60 минут. Удаляли растворитель и очищали остаток с помощью ЖХСД (EtOAc) с получением этилхиноксалин-6-илглицината (152,0 мг, 48%) в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,62 (д, *J* = 2,0 Гц, 1H), 8,51 (д, *J* = 2,0 Гц, 1H), 7,82 (д, *J* = 9,1 Гц, 1H), 7,17 (дд, *J* = 9,1, 2,6 Гц, 1H), 6,86 (д, *J* = 2,6 Гц, 1H), 4,99 (шс, 1H), 4,25 (к, *J* = 7,1 Гц, 2H), 4,00 (д, *J* = 4,7 Гц, 2H), 1,29 (т, *J* = 7,1 Гц,

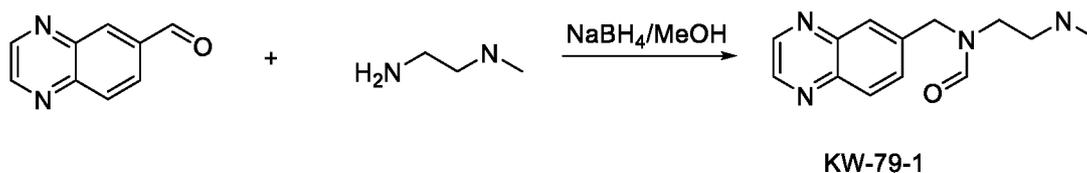
3H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, CDCl_3) δ 170,4, 148,1, 145,4, 145,0, 140,8, 138,3, 130,3, 122,3, 104,2, 61,8, 45,3, 14,3.

7.2 Получение соединения KW-31-1:



5 К раствору гидрохлорида гидроксиламина (24,0 мг, 346 мкмоль) в MeOH (0,43 мл, 173 мкмоль) при комнатной температуре добавляли метоксид натрия (0,13 мл, 571 мкмоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 0,5 часа. Затем добавляли этилхиноксалин-6-илглицинат (40,0 мг, 173 мкмоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 3 часов. Затем гасили льдом и нейтрализовали 1 н. раствором HCl, экстрагировали EtOAc. Выпаренный остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ЖХСД с получением *N*-гидрокси-2-(хиноксалин-6-иламино)ацетамида (35,6 мг, 94%, смесь 10:1) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,34 (шс, 2H), 8,64 (д, $J = 2,0$ Гц, 1H), 8,48 (д, $J = 2,0$ Гц, 1H), 7,75 (д, $J = 9,1$ Гц, 1H), 7,36 (дд, $J = 9,1, 2,6$ Гц, 1H), 6,93 (т, $J = 6,1$ Гц, 1H), 6,75 (д, $J = 2,6$ Гц, 1H), 3,77 (д, $J = 6,1$ Гц, 2H). Второстепенный ротамер: δ 4,08 (д, $J = 5,4$ Гц, 2H). ^{13}C ЯМР (101 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166,3, 149,7, 145,00, 144,91, 140,1, 137,05, 129,33, 122,77, 102,20, 44,08. Второстепенный ротамер: δ 150,6, 145,0, 139,7, 136,5, 129,7, 122,5, 105,0.

Пример 8: Химический синтез экспериментального соединения KW-79-1.



20 Смесь хиноксалин-6-карбальдегида (100 мг, 632 мкмоль) и N^1, N^1 -диметилэтан-1,2-диамина (55,7 мг, 632 мкмоль) в MeOH (2,5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Добавляли тетрагидроборат натрия (38,3 мг, 1,01 ммоль). Перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Удаляли растворитель и очищали остаток с помощью обращенно-фазовой ЖХСД (основные условия) с получением *N*-(2-(диметиламино)этил)-*N*-(хиноксалин-6-илметил)формамида (86,4 мг, 53%, 1:1 смесь ротамеров) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц,

MeOD-*d*₄) δ 8,88 (д, *J* = 2,0 Гц, 2H), 8,87 (д, *J* = 2,0 Гц, 2H), 8,86 – 8,83 (м, 2H), 8,43 (с, 1H), 8,32 (с, 1H), 8,09 (д, *J* = 8,7 Гц, 1H), 8,04 (д, *J* = 8,7 Гц, 1H), 8,00 (д, *J* = 1,8 Гц, 1H), 7,97 (д, *J* = 1,8 Гц, 1H), 7,78 – 7,74 (м, 2H), 4,87 – 4,77 (м, 4H), 3,46 = 3,39 (м, 4H), 2,48 – 2,43 (м, 4H), 2,21 (два с, 12H). ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 168,4, 168,2, 149,6, 149,4, 149,3, 149,0, 146,4, 146,3, 146,1, 145,8, 143,7, 143,4, 134,0, 133,6, 133,4, 133,1, 131,5, 131,1, 60,9, 59,3, 54,7, 49,3, 48,9, 48,2, 48,1, 43,4.

Пример 9: Рентгеновская кристаллография

Чтобы оценить, будут ли структурные варианты 2 хорошими кандидатами на связывание для TRP-рибопереключателя, соединение 17 исследовали с помощью рентгеновской кристаллографии. TRP-рибопереключатель РНК получали путем транскрипции *in vitro*, как описано ранее²⁷. TRP-рибопереключатель РНК (0,2 мМ) и соединение 17 (2 мМ) нагревали в буфере, содержащем 50 мМ ацетата калия (рН 6,8) и 5 мМ MgCl₂, при 60 °С в течение 3 мин, мгновенно охлаждали колотым льдом и инкубировали при 4 °С за 30 мин до кристаллизации. Для кристаллизации смешивали 1,0 мкл комплекса РНК-17 с 1,0 мкл резервуарного раствора, содержащего 0,1 М ацетата натрия (рН 4,8), 0,35 М ацетата аммония и 28% (об./об.) ПЭГ4000. Кристаллизацию осуществляли при 291 К путем капельной диффузии паров в течение 2 недель. Кристаллы помещали в криопротекторный маточный раствор с добавлением 15% глицерина перед мгновенным замораживанием в жидком азоте. Данные записывали на канале 17-ID-2 (FMX) на приборе NSLS-II (Брукхейвенская национальная лаборатория) при длине волны 0,9202 Å. Данные обрабатывали с помощью HKL200043. Структура была решена путем молекулярной замены с использованием Phenix44 и структуры РНК-рибопереключателя 2GDI²⁷. Структуру уточняли в программе 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 TRP-рибопереключатель аналогично тиаминовому фрагменту лиганда TRP, располагаясь между G42 и A43 в соединении J3/2 (Фиг. 3)^{27,28}. Соединение 17 образует три водородные связи с РНК: по одной с рибозой и гранью Уотсона-Крика G40 и одну с рибозой G19. По сравнению с РНК в комплексе с нативным лигандом TRP наблюдали значительное изменение локальной

структуры РНК. В структуре, связанной с соединением 17, G72 переворачивается в сайт связывания, где находится пирофосфатный остатков лиганда TPP. Такой способ связывания согласуется с предыдущей работой, в которой визуализирована перевернутая ориентация G72 для фрагментов, связанных в тиаминном субсайте связывающего кармана рибопереклочателя^{17,34}. В соответствии с анализом SAR, ориентация заместителя С-6, по-видимому, относительно не затруднена взаимодействиями с РНК, что означает, что этот вектор может стать хорошим кандидатом для разработки фрагмента.

Кроме того, соединение 16 также исследовали с помощью рентгеновской кристаллографии. В таблице, представленной ниже, показаны данные, собранные в ходе описанных исследований для обоих соединений.

Таблица 9. Сбор данных рентгеновской кристаллографии и статистика уточнений для тиаминпирофосфатного (TPP) рибопереклочателя, кристаллизованного совместно с фрагментом и подобными лекарству лигандами 16 и 17.

Сбор данных		
Совместно кристаллизованные соединения	16	17
Длина волны (Å)	0,9252	0,9184
Пространственная группа	C2	C2
Размеры ячейки		
a, b, c (Å)	150,16, 29,61, 95,51	148,73, 30,40, 95,57
α , β , γ (°)	90,00 94,32 90,00	90,00 93,51 90,00
Разрешение (Å)	30,00-2,70 (2,80-2,70)	29,78-2,21 (2,27-2,21)
R_{merge}^b	0,152 (0,581)	0,080 (0,729)
R_{plm}^c	0,101 (0,407)	0,069 (0,623)
$CC_{1/2}$	0,981 (0,656)	0,997 (0,765)

И $\bar{\sigma}$ (I)	9,9 (1,3)	10,4 (1,6)
Полнота (%)	95,2 (92,3)	99,2 (91,4)
Избыточность	2,9 (2,5)	4,0 (3,7)
Кол-во уникальных отражений	11400 (1061)	21835 (1447)
Уточнение		
Разрешение (Å)	29,05 – 2,70	29,78 – 2,21
R _{work} /R _{free} (%)	20,3/26,1	20,4/24,4
Кол-во атомов		
РНК	3335	3361
Лидер	48	24
Другие лиганды ^d	3	11
Вода	34	126
Средние В-факторы (Å ²)		
РНК	43,47	53,50
Лидер	35,13	39,14
Лиганд	46,24	45,54
Вода	28,91	36,79
Среднеквадратичные отклонения		
Длина связей (Å)	0,003	0,005
Углы связей (°)	0,848	1,115
Код PDB	7TZR	7TZS

^aЗначения оболочки с наибольшим разрешением указаны в скобках

$R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i | I(h)_i - \langle I(h) \rangle | / \sum_h \sum_i I(h)_i$, где $I(h)$ представляет собой интенсивность отражения h , \sum_h представляет собой сумму всех отражений, и \sum_i представляет собой сумму для i измерений отражения h .

$$R_{\text{int}} = \sum_{hkl} \sqrt{1/(n-1)} \sum_i | I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle | / \sum_{hkl} \sum_i I(hkl)_i$$

- 5 ^dЛиганд указывает компоненты раствора для кристаллизации (буфер, катионы и т.д.), помимо молекул лидера или лекарственного вещества.

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. Moumné, 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).

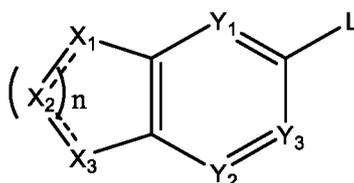
19. Bottini, A. *et al.* Targeting Influenza A Virus RNA Promoter. *Chem. Biol. Drug Des.* **86**, 663–673 (2015).
20. Hunter, C. A. & Anderson, H. L. What is cooperativity? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 7488–7499 (2009).
21. Ichihara, O., Barker, J., Law, R. J. & Whittaker, M. Compound design by 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 и 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, имеющее структуру формулы (I):



Формула (I)

где

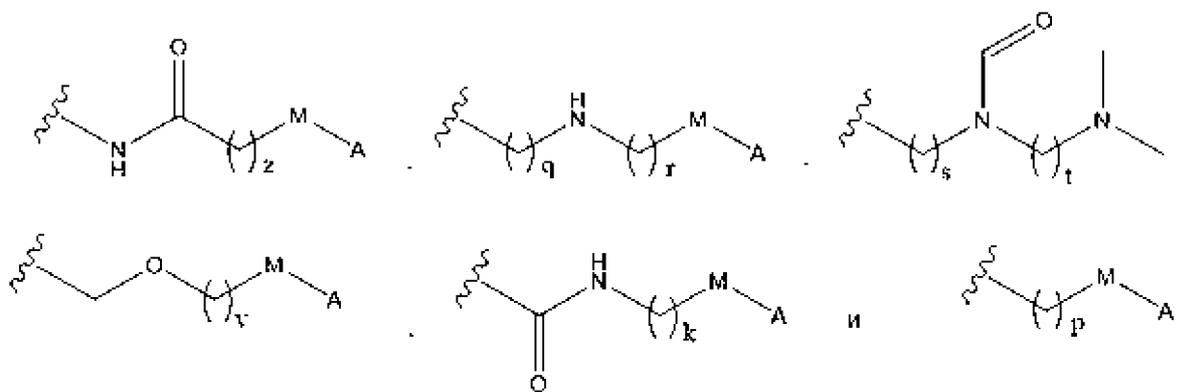
X_1 , X_2 и X_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_1 , CHR_1 , N, NH, O и S, при этом смежные X_1 , X_2 и X_3 выбраны так, что одновременно не представляют собой O или S;

пунктирные линии представляют собой необязательные двойные связи;

Y_1 , Y_2 и Y_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_2 и N;

n равен 1 или 2, при этом если n равен 1, то только одна из пунктирных линий представляет собой двойную связь;

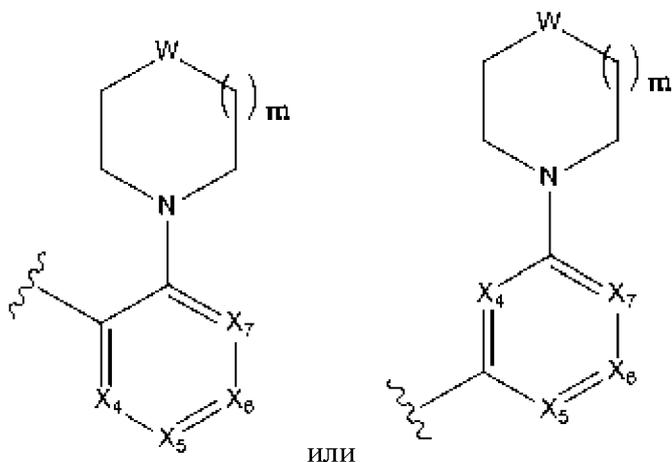
L выбран из:



где z , r , s , t , v , k и p независимо выбраны из целых чисел 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, q выбран из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

M выбран из $-NH-$, $-O-$, $-NHC(=O)-$, $-C(=O)NH-$, $-S-$ и $-C(=O)-$; и

A выбран из



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

при этом R_1 , R_2 и R_3 независимо выбраны из $-H$, $-Cl$, $-Br$, $-I$, $-F$, $-CF_3$, $-OH$, $-CN$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-NH(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-N(C_1-C_6 \text{ алкила})_2$, $-COOH$, $-COO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-CO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-O(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-OCO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-NCO(C_1-C_6 \text{ алкила})$, $-CONH(C_1-C_6 \text{ алкила})$ и замещенного или незамещенного C_1-C_6 алкила;

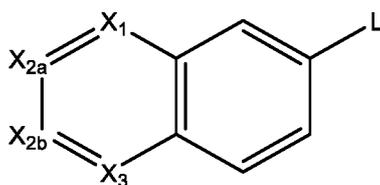
m равен 1 или 2, и

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

при условии, что по меньшей мере два из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляют собой N ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что по меньшей мере один из X_1 , X_2 , или X_3 представляет собой N .
3. Соединение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что n равен 2.
4. Соединение по любому из пп. 1–3, отличающееся тем, что в каждом случае два из X_1 , X_2 и X_3 представляют собой N .
5. Соединение по любому из пп. 1–4, имеющее структуру формулы (II):



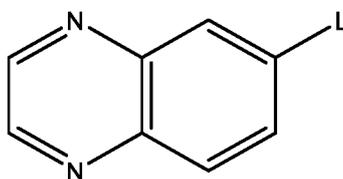
Формула (II)

X_{2a} и X_{2b} независимо выбраны из CR_1 и N ;

X_1 и X_3 независимо выбраны из CR_1 и N ;

при этом два из X_1 , X_{2a} , X_{2b} и X_3 представляют собой N .

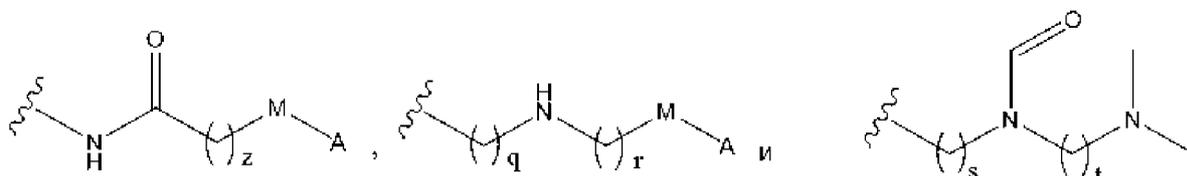
6. Соединение по любому из пп. 1–5, имеющее структуру формулы (III):



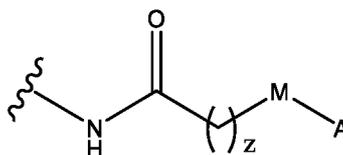
Формула (III).

7. Соединение по любому из пп. 1–6, отличающееся тем, что z , r , s , t , v и p независимо выбраны из целых чисел 1, 2 и 3.

8. Соединение по любому из пп. 1–7, отличающееся тем, что L выбран из:



9. Соединение по любому из пп. 1–8, отличающееся тем, что L представляет собой



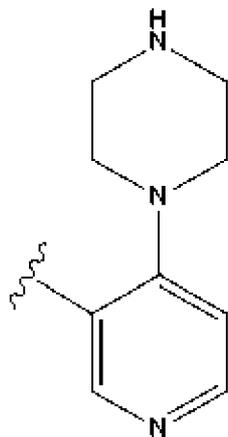
10. Соединение по п. 9, отличающееся тем, что z равен 1, 2 или 3.

11. Соединение по п. 9, отличающееся тем, что z равен 2.

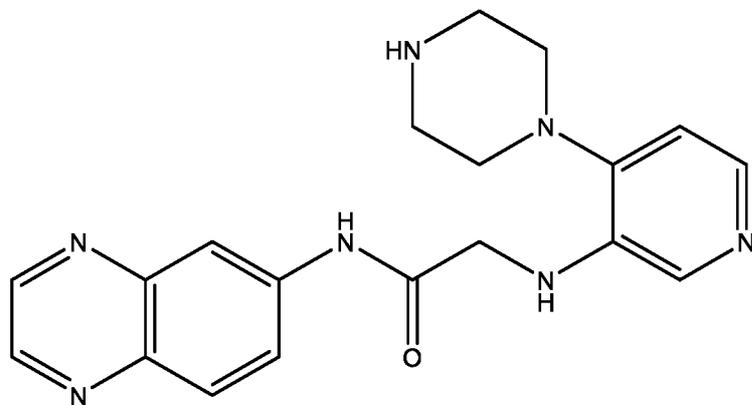
12. Соединение по любому из пп. 1–11, отличающееся тем, что M выбран из $-NH-$, $-O-$ и $-S-$.

13. Соединение по любому из пп. 1–12, отличающееся тем, что M представляет собой $-NH-$.

14. Соединение по любому из пп. 1–13, отличающееся тем, что m равен 1.
15. Соединение по любому из пп. 1–14, отличающееся тем, что W выбран из $-NH-$, $-O-$ и $-N(C_1-C_6 \text{ алкила})-$.
16. Соединение по любому из пп. 1–15, отличающееся тем, что W представляет собой $-NH-$.
17. Соединение по любому из пп. 1–16, отличающееся тем, что A представляет собой

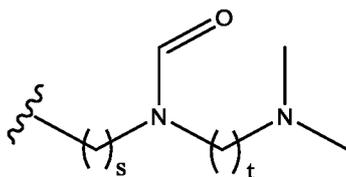


18. Соединение по любому из пп. 1–17, имеющее структуру

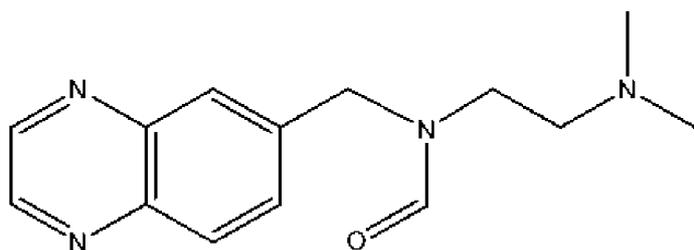


, или его фармацевтически приемлемая соль.

19. Соединение по любому из пп. 1–8, отличающееся тем, что L представляет собой

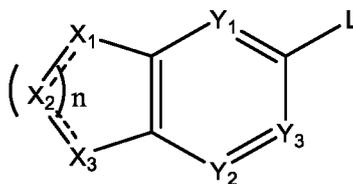


20. Соединение по п. 19, отличающееся тем, что s и t равны 1 или 2.
21. Соединение по п. 19, отличающееся тем, что s равен 1, а t равен 2.
22. Соединение по любому из пп. 1–21, отличающееся тем, что по меньшей мере один из X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляет собой N.
23. Соединение по любому из пп. 1–22, отличающееся тем, что X_5 или X_6 представляет собой N, и оба X_4 и X_7 независимо представляют собой CR_2 .
24. Соединение по любому из пп. 19–23, имеющее структуру:



, или его фармацевтически приемлемая соль.

25. Соединение, имеющее структуру формулы (I):



Формула (I),

где

X_1 , X_2 и X_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_1 , CHR_1 , N, NH, O и S, при этом смежные X_1 , X_2 и X_3 выбраны так, что одновременно не представляют собой O или S;

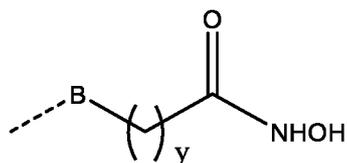
пунктирные линии представляют собой необязательные двойные связи;

Y_1 , Y_2 и Y_3 в каждом случае независимо выбраны из CR_2 и N;

R_1 и R_2 независимо выбраны из -H, -Cl, -Br, -I, -F, -CF₃, -OH, -CN, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ алкила), -N(C₁-C₆ алкила)₂, -COOH, -COO(C₁-C₆ алкила), -CO(C₁-C₆ алкила), -O(C₁-C₆ алкила), -OCO(C₁-C₆ алкила), -NCO(C₁-C₆ алкила), -CONH(C₁-C₆ алкила) и замещенного или незамещенного C₁-C₆ алкила;

n равен 1 или 2, при этом если n равен 1, то только одна из пунктирных линий представляет собой двойную связь; и

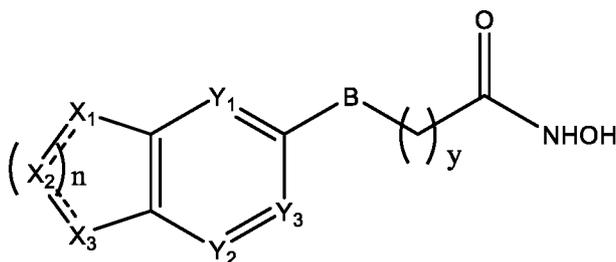
L представляет собой



при этом y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5; и

B выбран из $-\text{NH}-$ и $-\text{NHC}(=\text{O})-$; или его фармацевтически приемлемая соль.

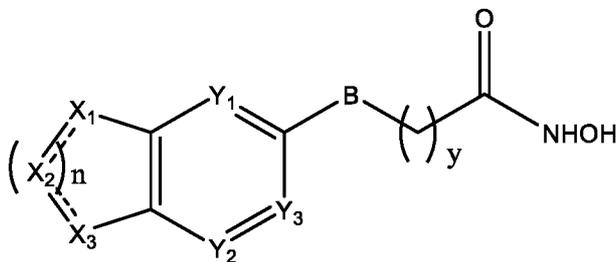
26. Соединение по п. 25, имеющее структуру формулы (IV):



Формула (IV)

где B представляет собой $-\text{NH}-$.

27. Соединение по п. 25, имеющее структуру формулы (IV):



Формула (IV)

где B представляет собой $-\text{NHC}(=\text{O})-$.

28. Соединение по п. 26, отличающееся тем, что y равен 1.

29. Соединение по п. 27, отличающееся тем, что y равен 3.

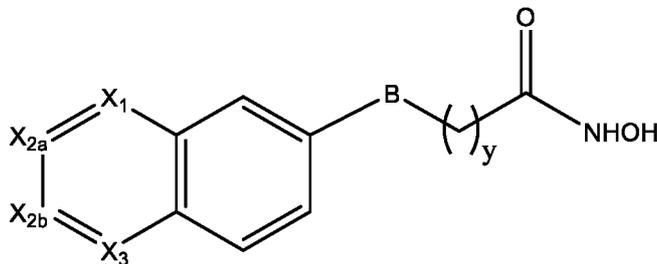
30. Соединение по любому из пп. 25–29, отличающееся тем, что по меньшей мере один из Y_1 , Y_2 и Y_3 представляет собой CR_2 .

31. Соединение по любому из пп. 25–30, отличающееся тем, что по меньшей мере один из X_1 , X_2 или X_3 представляет собой N.

32. Соединение по любому из пп. 25–31, отличающееся тем, что в каждом случае два из X_1 , X_2 и X_3 представляют собой N.

33. Соединение по любому из пп. 25–32, отличающееся тем, что n равен 2.

34. Соединение по любому из пп. 25–33, имеющее структуру формулы V:



Формула (V),

где

X_{2a} и X_{2b} независимо выбраны из CR_1 и N ;

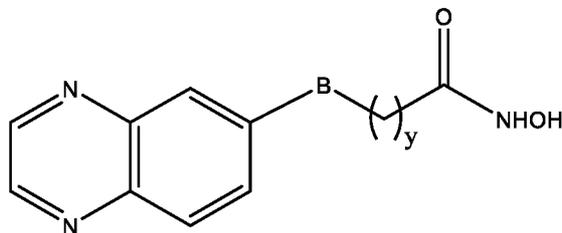
X_1 и X_3 независимо выбраны из CR_1 и N ;

причем два из X_1 , X_{2a} , X_{2b} и X_3 представляют собой N ;

B выбран из $-NH-$ и $-NHC(=O)-$; и

y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5; или его фармацевтически приемлемая соль.

35. Соединение по любому из пп. 25–34, имеющее структуру формулы VI:



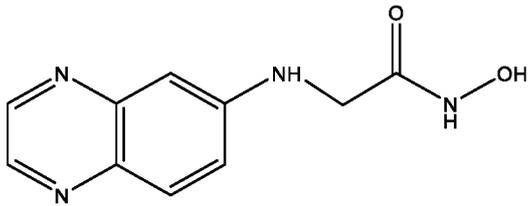
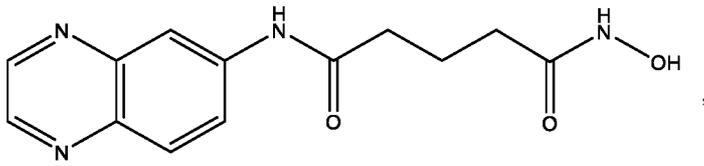
Формула (VI),

где B выбран из $-NH$ и $-NHC(=O)$, y представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4 и 5; или его фармацевтически приемлемая соль.

36. Соединение по п. 35, отличающееся тем, что B представляет собой $-NH-$.

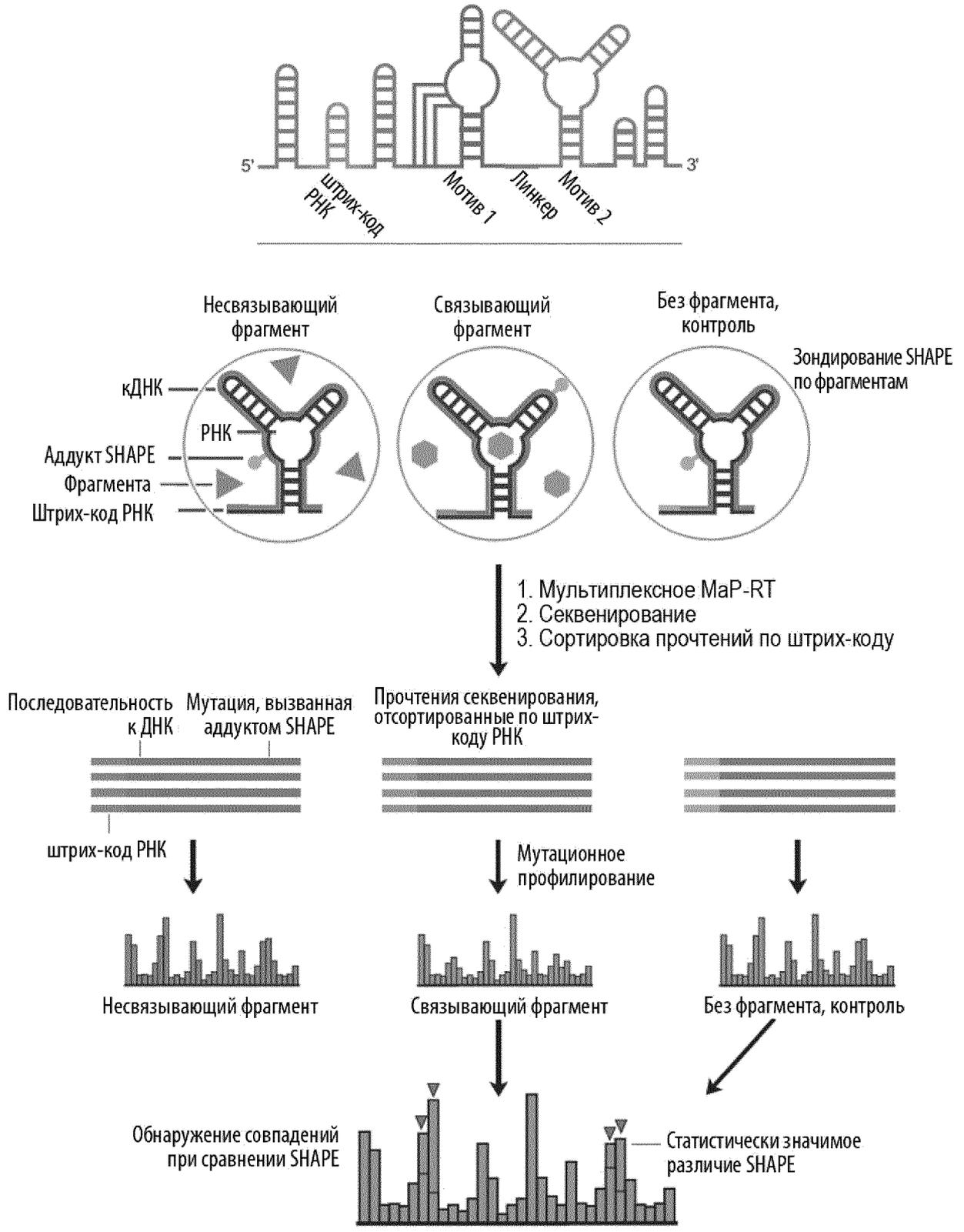
37. Соединение по п. 35, отличающееся тем, что B представляет собой $-NHC(=O)-$.

38. Соединение по п. 25, имеющее структуру:

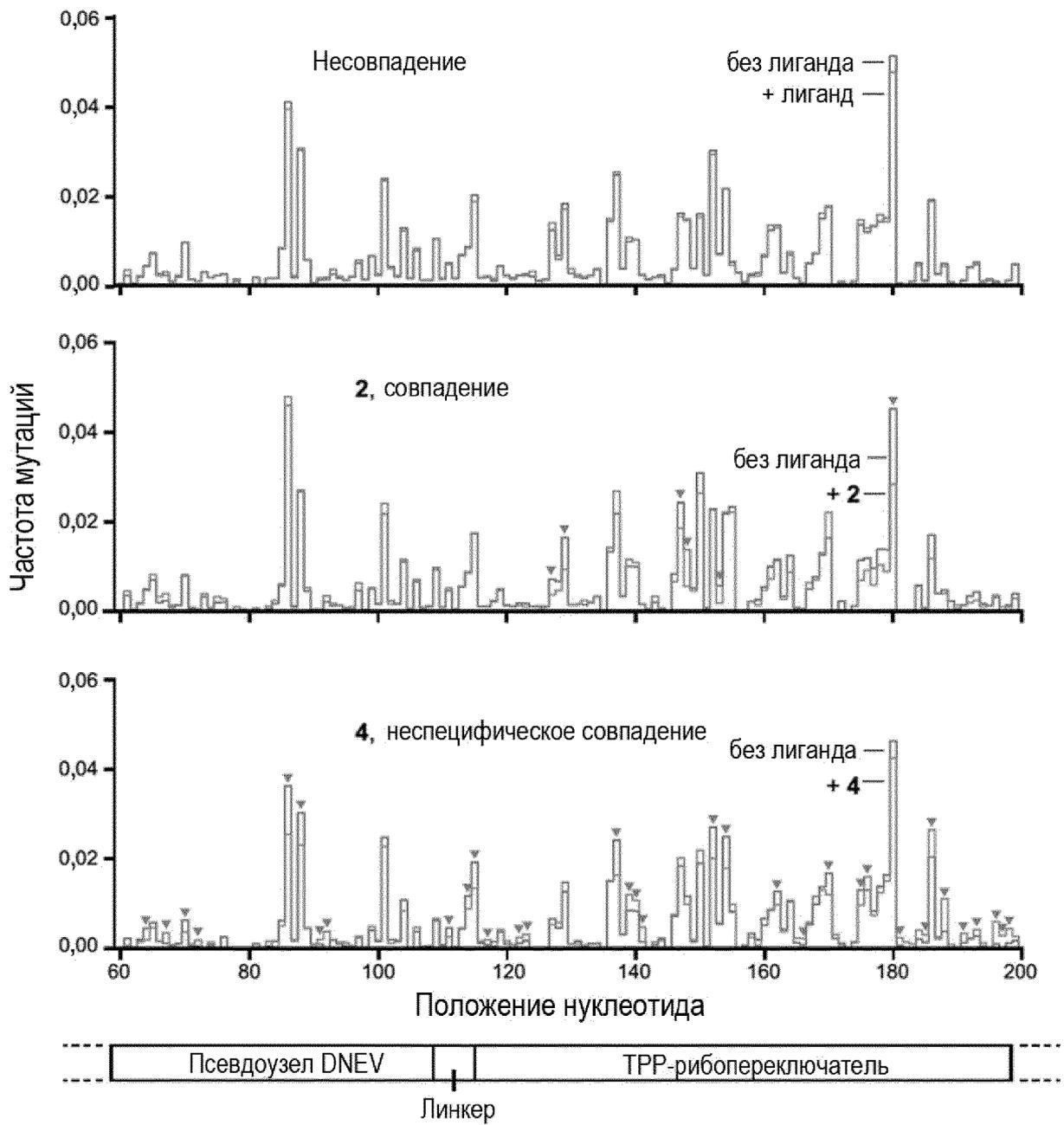


, или его фармацевтически

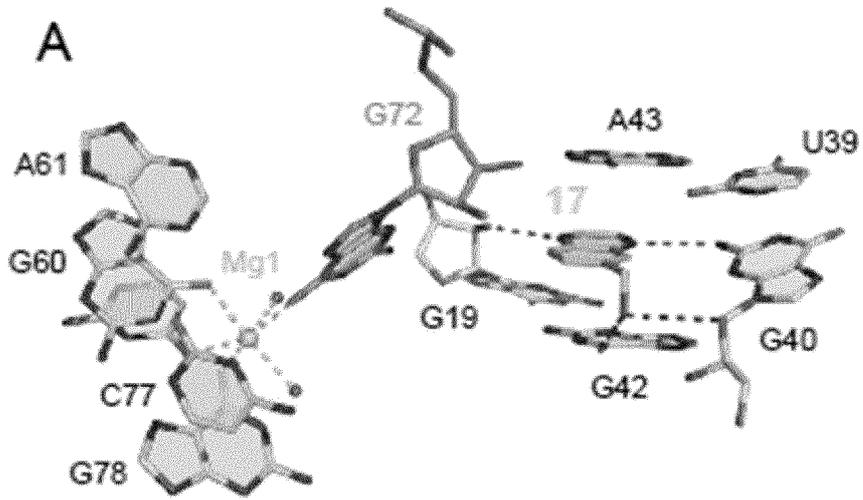
приемлемая соль.



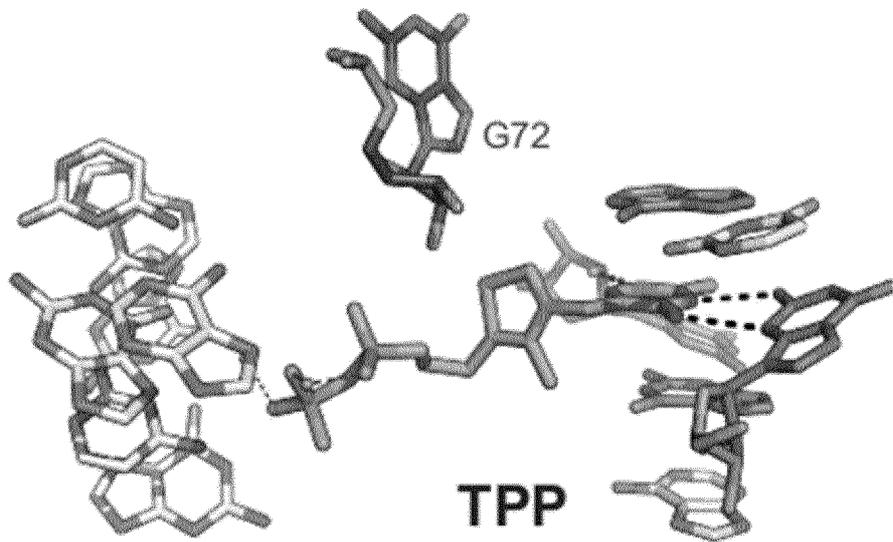
Фиг. 1

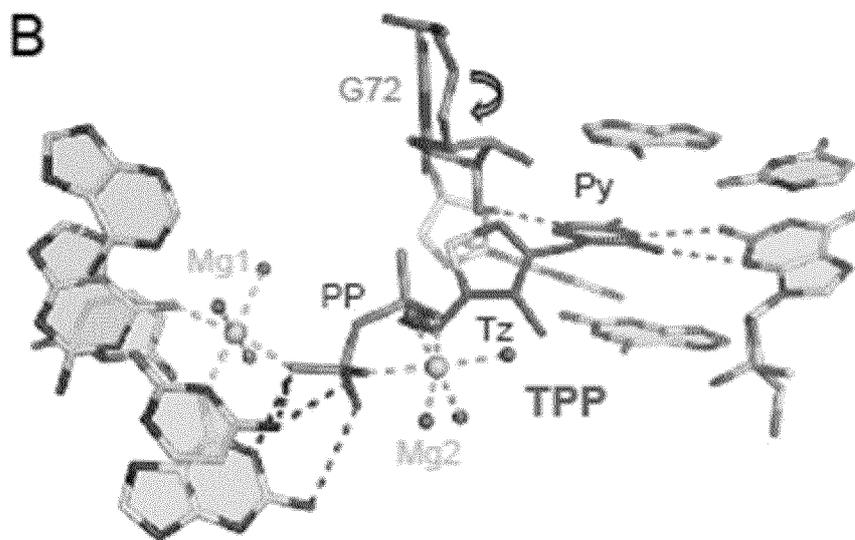


Фиг. 2



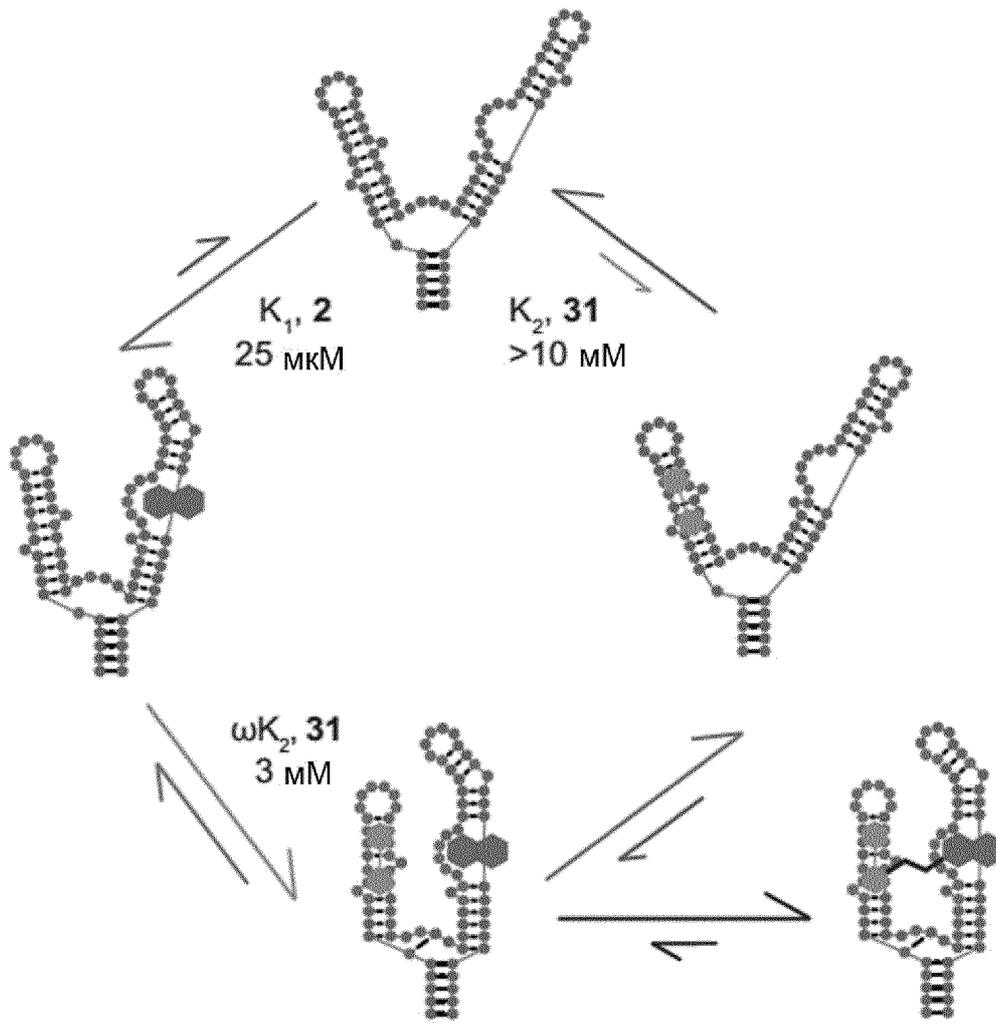
Фиг. 3А



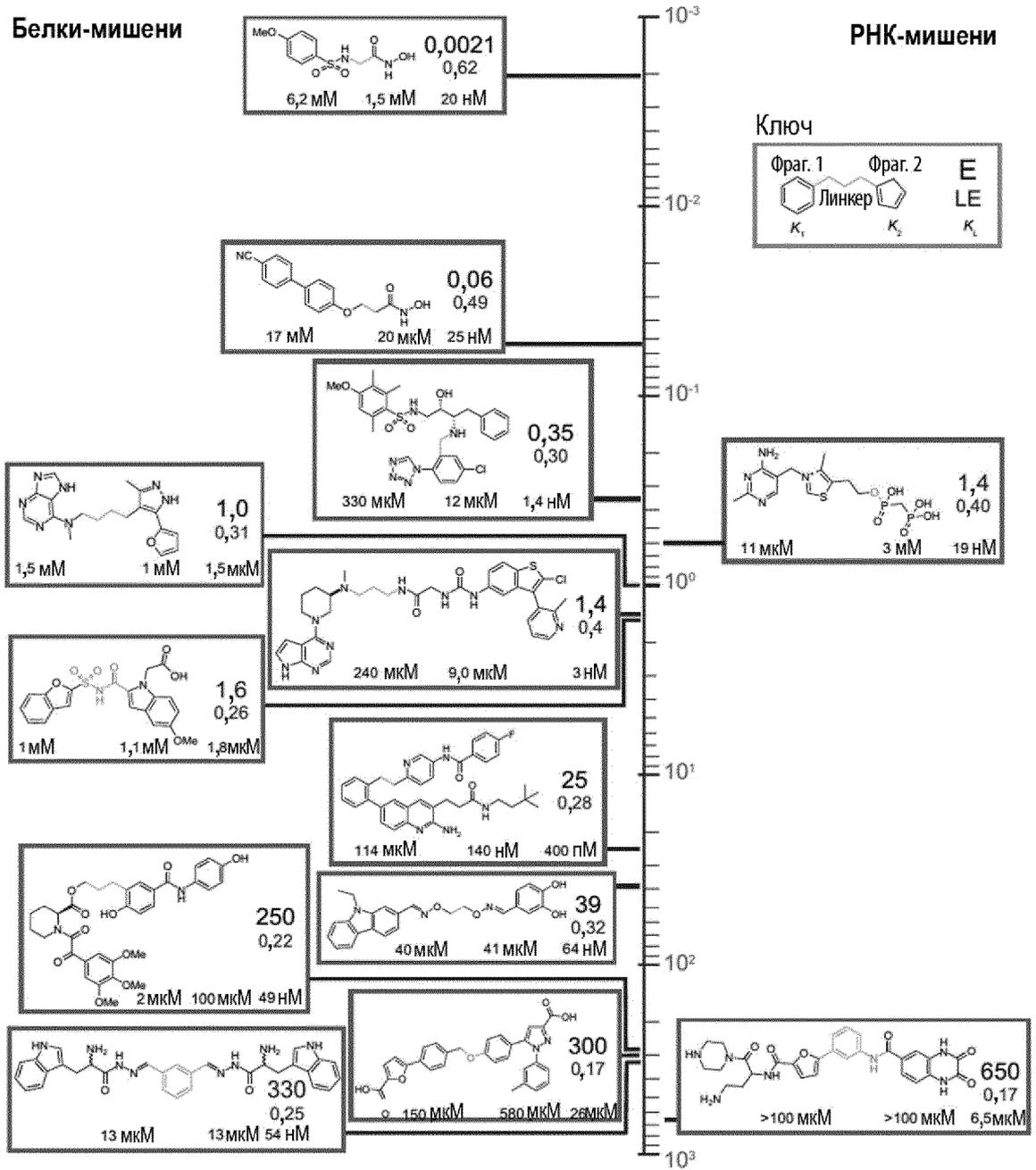


Фиг. 3В

5/8



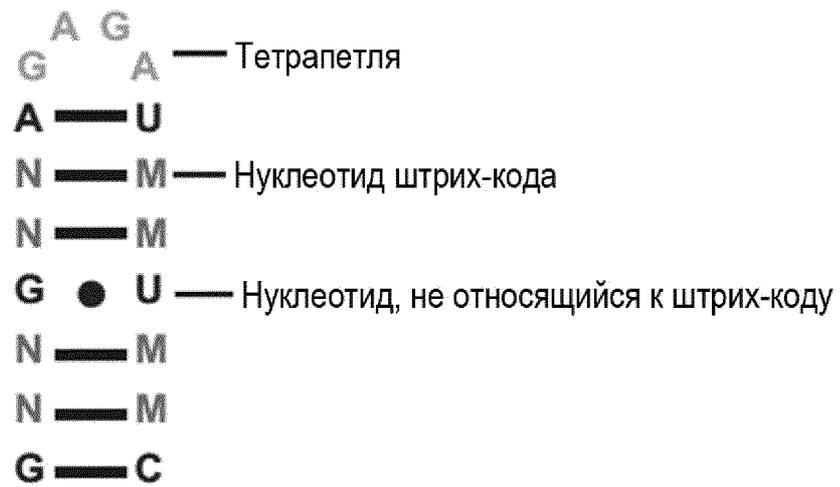
Фиг. 4



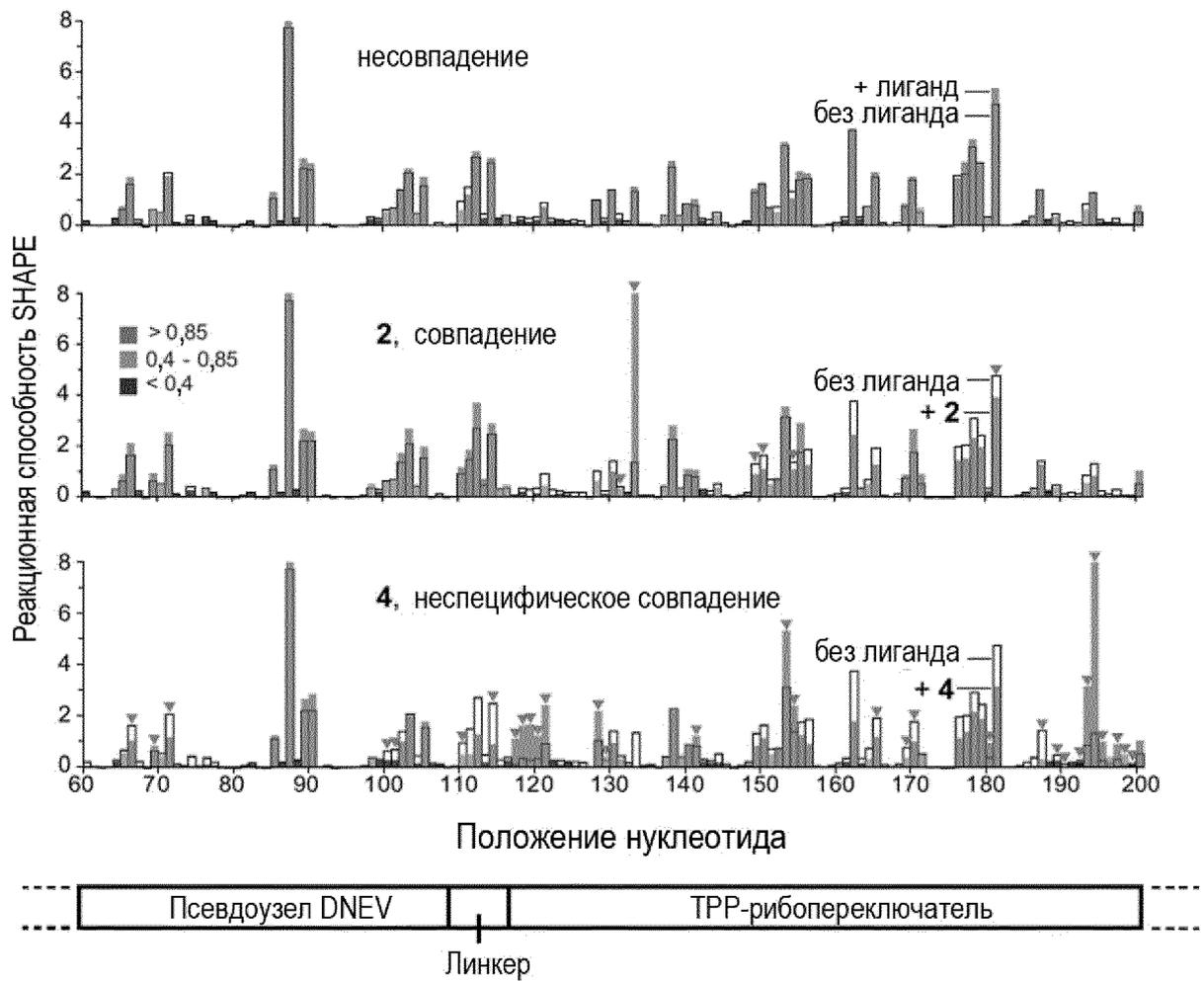
Фиг. 5

GGUCGCGAGUAAUCGCGACCGCUGCAAGAGAUUGUAGCGUGGGCACUUCGGUGUCCACACGCGAAGGAAAC
 CGCGUGUCAACUGUGCAACAGCUGACAAAGAGAUUCCUAAAACUCAGUACUCGGGGUGCCCUUCUGCGUGA
 AGGCUGAGAAAUACCCGUAUCACCGUAUCUGGAUAAUGCCAGCGUAGGGAAGUGCUGGAUCCGGUUCGCCG
 GAUCAAUCCGGGCUUCGGUCCGGUUC

Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7