

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690782** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2011.06.21

(54) **ОПТИМИЗИРОВАННАЯ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОСОМОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ
СИСТЕМА ДОСТАВКИ IN VIVO КОНЬЮГАТОВ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

(31) **10166936.4**

(32) **2010.06.22**

(33) **EP**

(62) **201300039; 2011.06.21**

(71) Заявитель:

**ДНА ТЕРАПЬЮТИКС; ЭНСТИТЮ
КЮРИ; САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ
РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК (FR)**

(72) Изобретатель:

**Сунь Дзиань-Шен, Дютреи Мари,
Канз Мария (FR)**

(74) Представитель:

Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение имеет отношение к оптимизированной с помощью эндосомолитических средств системе доставки in vivo нуклеиновой кислоты, представляющей терапевтический интерес, конъюгированной с молекулами, способствующими эндоцитозу, в частности для использования при лечении рака.

A1

201690782

201690782

A1

ОПТИМИЗИРОВАННАЯ С ПОМОЩЬЮ ЭНДОСОМОЛИТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ СИСТЕМА ДОСТАВКИ IN VIVO КОНЬЮГАТОВ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение имеет отношение к области медицины, в частности онкологии.

Предшествующий уровень техники

Лечение рака в основном включает в себя хирургическое вмешательство (когда это возможно), применение цитотоксических средств, таких как химиотерапевтические препараты и радиотерапия. В последнее десятилетие появились молекулярные методы лечения рака, например, моноклональные антитела, нацеленные на рецепторы клеточной мембраны, ингибиторы тирозинкиназных рецепторов или других киназ, мишенью которых является передача сигнала, участвующего в пролиферации, гибели и выживании клеток. Использование цитостатических средств в режиме монотерапии часто не имеет соответствующего клинического результата. При комбинированном применении цитотоксических средств во многих случаях получают синергические результаты, которые ограничиваются их совокупными побочными действиями.

Большая часть методов лечения прямо или косвенно вызывает повреждение ДНК в подвергнутых воздействию пролиферирующих опухолевых клетках, что в конечном итоге приводит к их гибели. При этом исходная (природная) и приобретенная резистентность опухоли к этим видам лечения, по меньшей мере, отчасти, обуславливается эффективностью репарации ДНК в опухолевых клетках. В настоящее время является общепризнанным тот факт, что репарация ДНК представляет собой важную мишень для лечения рака (Helleday et al. *Nat. Rev. Cancer*, 2008, 8:193-204). В области разработки подобных лекарственных средств наиболее перспективными являются ингибиторы PARP.

Поскольку репарация ДНК представляет собой необходимый для выживания процесс во всем живом царстве, имеется несколько специализированных путей репарации, обладающих некоторой избыточностью, которая делает этот процесс надежным, в том случае, когда один путь является недостаточным или заблокированным терапевтическим средством, например, ингибитором репарации ДНК. Следовательно, вместо того, чтобы нацеливаться на ключевой ген/белок, вовлеченный в процесс репарации ДНК, независимо от его биологического значения и клинической значимости, инновационная молекулярная терапия должна воздействовать на один или несколько ключевых путей как глобальную

мишень в сочетании с обычными методами лечения, для того чтобы достигнуть наиболее эффективного лечения рака.

Было задумано нацелиться в целом на пути обнаружения поврежденных ДНК, передачи сигнала и репарации для того, чтобы вывести из строя «защиту» рака к существующим методам лечения. Одна стратегия заключается во введении коротких модифицированных молекул ДНК, имитирующих двунитевые разрывы (DSB), названные Dbait, в клетки, которые до этих пор могли эффективно репарировать DSB и таким образом выживали. Противоопухолевая эффективность Dbait в сочетании с радиотерапией (RT) или химиотерапией (CT) объясняется тем фактом, что молекулы Dbait улавливают комплексы обнаружения DSB, останавливают нисходящий сигнал репарации, последовательно дезорганизуют все системы репарации DSB (и негомологичное соединение концов и гомологичную рекомбинацию), и наконец ингибируют репарацию DSB (WO2005/040378; WO2008/034866; Quanz et al, 2009, *Clinical Cancer Research* **15**:1308 ; Quanz et al, 2009, *PLoS ONE* **4**:e6298; Dutreix et al, 2010, *Mut. Res.* **704**:182). В конечном итоге раковые клетки уже не могут избежать своей гибели. Кроме того, было обнаружено, что молекулы Dbait являются эффективными в отдельности, без комбинации с радиотерапией (RT) или химиотерапией (CT) (WO2008/084087).

Однако, после установления активных, представляющих клинический интерес средств, основной проблемой является поиск наилучшего способа доставки активных средств, в частности нуклеиновокислотных средств. При разработке и оптимизации эффективных невирусных систем доставки ДНК/РНК необходимо обращать внимание на проблемы, связанные с токсичностью, «тканевые и системные барьеры», такие как деградация, опсонизация частиц заряженными компонентами сыворотки, быстрое выведение и накопление в тканях, не являющихся мишенями, при введении активного вещества системным путем, «клеточные барьеры» для их доставки, например, низкое поглощение через цитоплазматическую мембрану, недостаточное высвобождение молекул ДНК в активный клеточный компартмент и отсутствие нацеливания на ядро (необходимое для генной терапии).

В самом деле для проявления своей эффективности большинство из этих активных средств должно поглощаться клетками и достигать цитоплазмы и/или ядра. В частности, когда активные агенты, включая нуклеиновые кислоты, вводятся в их "свободной" или "голой" форме, они часто страдают от деградации до или после поглощения клетками-мишенями. Внутри клеток эта деградация в основном происходит вследствие того, что нуклеиновые кислоты поступают в клетки путем эндоцитоза и изолируются в клеточных эндосомах, которые в конечном счете превращаются в лизосомы, где химическая и

ферментативная деградация является очень эффективной.

В предшествующем уровне техники активные средства объединяли с различными носителями и инкапсулировали в липосомы, мицеллы и наночастицы, где они были защищены от деградации в сыворотке. Кроме того, в предшествующем уровне техники используется целый ряд химических веществ для ковалентного соединения нуклеиновых кислот и других активных агентов с молекулярными носителями, включая такие полимеры, как декстран или PEG, или молекулами, направленными на уменьшение клиренса, носители включают также трансферрин, липофильные молекулы, например, холестерин, связанный с малой интерферирующей РНК (миРНК или siRNA) для увеличения поглощения клетками (Chen et al., 2010, *J. Controlled Release* **144**:227). Подобные носители могут включать нацеливающие частицы, такие как антитела, полипептиды, нуклеиновые кислоты и другие субстанции, обеспечивающие направленную доставку активных агентов к выбранным клеткам-мишеням. Предшествующий уровень техники также раскрывает молекулы, улучшающие эндоцитоз, для применения в фармацевтических композициях (США 2008/0194540).

Однако, при поглощении клетками путем эндоцитоза активные ДНК/РНК агенты часто оказываются изолированными в эндосомах и неспособны этого избежать, что значительно уменьшает их лечебные возможности. Например, Zimmermann et al. показали, что конъюгат холестерин-siRNA(ApoB-1) является примерно в 1000 раз менее эффективным, чем его липосомальная композиция (вектор SNALP) у мышей: 100мг/кг хол-siApoB-1 является равноценным дозе 0,1мг/кг SNALP-ApoB-1 (Zimmermann et al. *Nature*, 2006, 441:111-114, дополнительная фиг. 1).

В отношении нуклеиновых кислот предшествующий уровень техники пытается решить эту проблему применением катионных полимеров, таких как полиэтиленимин (PEI) (WO96/02655), или липосом с фузогенными липидами или пептидами, такими как вектор SNALP. PEI способен дестабилизировать эндосомы посредством хорошо описанного эффекта протонной губки и, следовательно, облегчить высвобождение нуклеиновой кислоты. Однако, использование PEI часто ограничивается его цитотоксичностью, и на настоящий момент его применение на людях не одобрено. Липосомальная композиция также проявляет токсичность и ограниченную возможность инкапсулирования нуклеиновых кислот (обычно в пределах 1-2мг/мл), что может не подходить для применения, при котором требуется высокая полезная нагрузка нуклеиновокислотных средств.

Известно, что "эндосомолитические" средства, такие как хлорохины, увеличивают трансфекцию нуклеиновых кислот, облегчая их высвобождение из эндосом в цитоплазму

в культивируемых клетках. Однако, применение хлорохина ограничивается использованием *in vitro* и только в редких случаях исследуется в отношении оказания содействия доставке нуклеиновых кислот *in vivo*. Это может быть результатом сообщений в области нуклеиновых кислот, которые учат избегать использования хлорохина *in vivo* из-за его токсичности.

Benns, et al (2000, *Bioconj. Chem.* 11: 637) сообщили, что "*Хотя доказано, что хлорохин способствует высвобождению плазмидной ДНК в цитоплазму, было обнаружено, что он является токсичным, и поэтому не может использоваться in vivo*". Эта проблема существует отчасти вследствие того факта, что необходимы относительно высокие концентрации свободного хлорохина для достижения такого сайта как нуклеиновая кислота (т.е. плазмидная ДНК) в эндосоме. Подобным образом, Zhang et al (2003, *J Gene Med* 5:209) исследовали применение хлорохина *in vivo* для генной доставки в печень. В этой статье они использовали плазмиду вместе с пептидом (полилизин/молоссин) в качестве ДНК-вектора. Они сделали заключение, что хотя хлорохин является эффективным для оказания содействия генной доставке в печень, требуется многократное дозирование, поэтому его использование ограничивается системной токсичностью. В самом деле, они продемонстрировали, что острая системная токсичность хлорохина ограничивает применение *in vivo* до уровней, являющихся существенно более низкими, чем необходимые для оптимальной генной доставки. Локальная доставка хлорохина также ограничивается локальной токсичностью хлорохина и его диффузией из места доставки. Наконец, они не наблюдали генную доставку или наблюдали очень низкий уровень генной доставки при использовании «голой ДНК».

В этом контексте WO2007/040469 раскрывает, что проблему, связанную с необходимой высокой концентрацией хлорохина, можно преодолеть путем ковалентного соединения хлорохина с активным агентом, таким образом, снизив общую необходимую дозировку. WO2009/126933 предлагает ковалентно соединить нуклеиновую кислоту для доставки к эндосомолитическому средству и к нацеливающему лиганду.

Хлорохин и его производные, такие как гидроксихлорохин, используются при лечении и профилактике малярии. Кроме того, было исследовано его применение в комбинации с радиотерапией и/или химиотерапией рака (Sotelo et al., 2006, *Ann Intern Med* 144:337-342; NCT01023477 и NCT00969306). Гипотеза заключается в том, что хлорохин/гидроксихлорохин ингибирует аутофагию, которая является нормальным способом защиты клеток путем переноса терапевтических средств в лизосомы, где они подвергаются разрушению.

В заключение, оптимизация методов лечения на основе нуклеиновых кислот

требует дополнительного исследования эффективности и цитотоксичности систем доставки синтетической ДНК.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предоставляет новый эффективный способ доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, представляющих терапевтический интерес, основанный на ковалентном соединении представляющих интерес нуклеиновых кислот с молекулой, способствующей эндоцитозу, и применение конъюгированных нуклеиновых кислот, представляющих терапевтический интерес, в комбинации с эндосомолитическим средством. В частности, эта система доставки *in vivo* используется для молекул Dbait.

Следовательно, настоящее изобретение имеет отношение к фармацевтической композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, имеющей, по меньшей мере, один свободный конец и двухцепочечный участок ДНК, состоящий из 20-200 пар оснований с идентичностью последовательности менее чем 60% к какому-либо гену в геноме человека, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты является ковалентно связанной с молекулой, облегчающей эндоцитоз, выбранной из липофильной молекулы или лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, опосредующий эндоцитоз, и хинолиновое эндосомолитическое средство. Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать повреждающее ДНК противоопухолевое средство.

Настоящее изобретение также имеет отношение к продукту, содержащему конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, один свободный конец и двухцепочечный участок ДНК, состоящий из 20-200 пар оснований, с идентичностью последовательности менее чем 60%, к какому-либо гену в геноме человека, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты является ковалентно связанной с молекулой, облегчающей эндоцитоз, выбранной из липофильной молекулы или лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, опосредующий эндоцитоз, и хинолиновое эндосомолитическое средство, в виде комбинированного препарата для одновременного, совместного или последовательного использования. Данный продукт может дополнительно содержать повреждающее ДНК противоопухолевое средство. Предпочтительно, хинолиновое эндосомолитическое средство вводится до и/или одновременно с конъюгированной молекулой нуклеиновой кислоты. В частности, хинолиновое эндосомолитическое средство вводится в качестве предварительной обработки (лечения), по меньшей мере, за одну неделю пероральным путем, а затем вводятся конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты и хинолиновое эндосомолитическое средство в виде комбинированного препарата для одновременного,

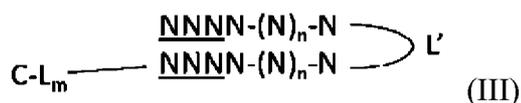
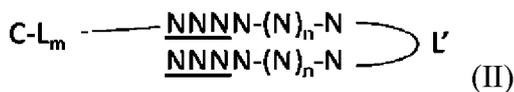
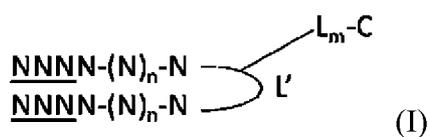
совместного или последовательного использования.

Настоящее изобретение имеет отношение к фармацевтической композиции или продукту, раскрытому в описании, предназначенному для использования при лечении рака. Предпочтительно, лечение дополнительно включает радиотерапию или химиотерапию, предпочтительно вместе с повреждающим ДНК противоопухолевым средством. Необязательно, повреждающее ДНК противоопухолевое средство выбирают из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I или II, агента, сшивающего ДНК (ДНК-кросслинкера), препарата, алкилирующего ДНК, антиметаболического средства и ингибиторов митотического веретена.

В предпочтительном варианте осуществления хинолиновое эндосомолитическое средство представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин, предпочтительно хлорохин.

В предпочтительном варианте осуществления молекулу, способствующую эндоцитозу, выбирают из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, таких как октадецил и диолеил, токоферол, фолаты или фолиевая кислота, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахаридов, пептида, такого как RGD и бомбезин, и белка, такого как интегрин, предпочтительно одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина, более предпочтительно из диолеоила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина, еще более предпочтительно молекула, способствующая эндоцитозу, является холестерином.

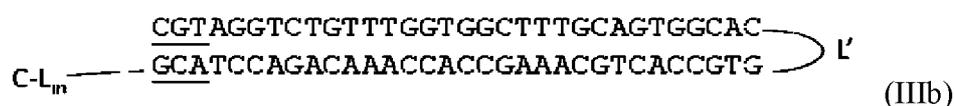
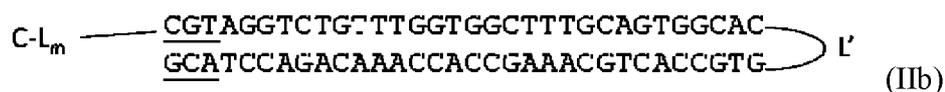
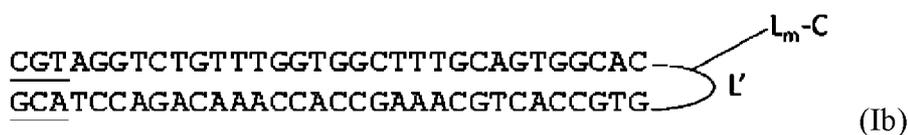
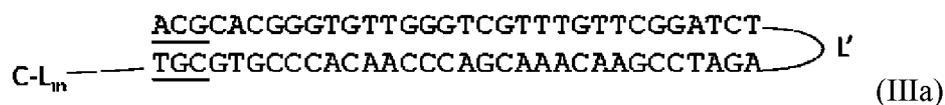
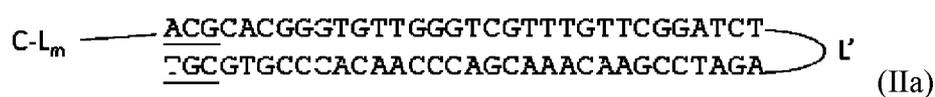
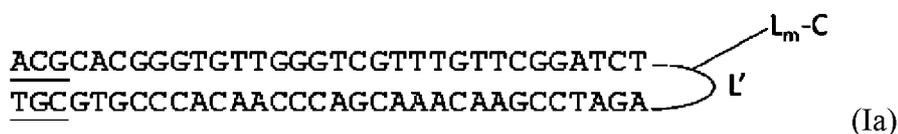
В предпочтительном варианте осуществления конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет одну из следующих формул:

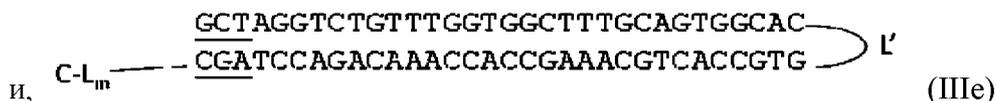
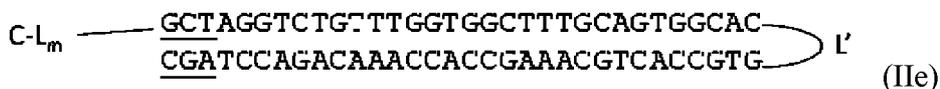
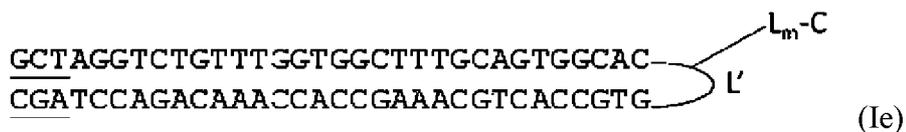
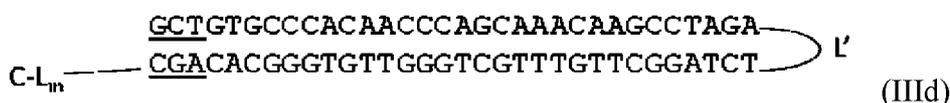
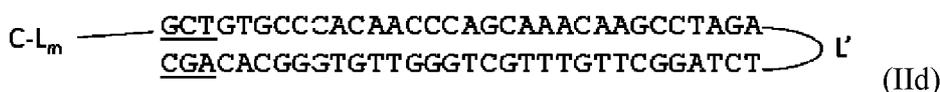
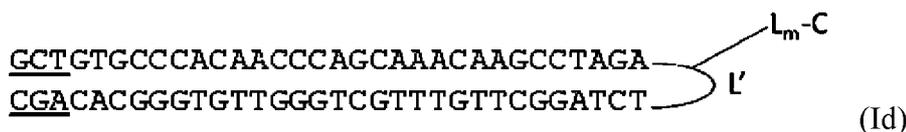
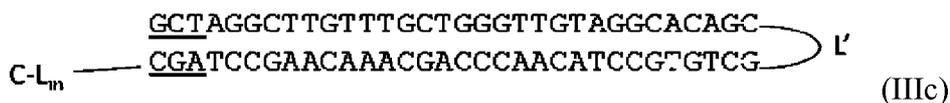
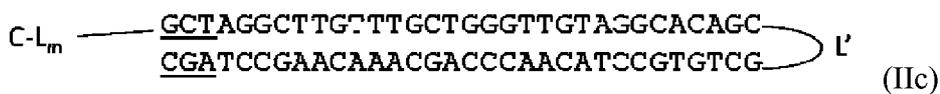
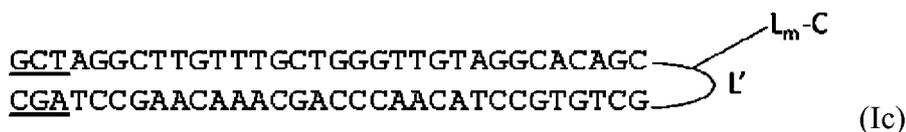


где N представляет собой нуклеотид, n является целым числом от 15 до 195, подчеркнутое N относится к нуклеотиду, имеющему или не имеющему модифицированный фосфодиэфирный остов, L' является линкером, C представляет собой молекулу, способствующую эндоцитозу, L является линкером, m представляет собой целое число, 0 или 1. Предпочтительно, подчеркнутое N обозначает нуклеотид, имеющий

модифицированный фосфоэфирный остов. Предпочтительно, связанный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; и/или, m является 1, а L представляет собой карбоксамидо олигоэтиленгликоль, предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; и/или С выбирают из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно, связанный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; при этом m является 1, а L представляет собой карбоксамидо олигоэтиленгликоль, предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; а С выбирают из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза, и их олигосахарида, петида, такого как RGD и бомбезин, и белка, такого как интегрин, предпочтительно одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно С выбирают из группы, состоящей из диолеоила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина. Еще более предпочтительно С представляет собой холестерин.

В более определенном варианте осуществления конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет одну из следующих формул:

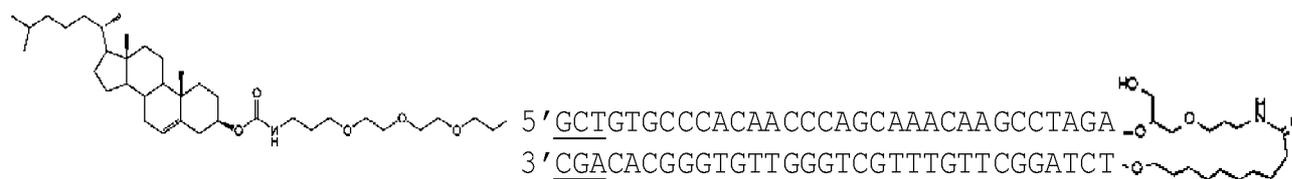




где подчеркнутый нуклеотид обозначает нуклеотид, имеющий или не имеющий фосфориоатный или метилфосфонатный остов, L' является линкером, C представляет собой молекулу, способствующую эндоцитозу, L является линкером, m представляет собой целое число, будучи 0 или 1. Предпочтительно, подчеркнутый нуклеотид относится к нуклеотиду, имеющему фосфориоатный или метилфосфонатный остов. Предпочтительно подчеркнутый нуклеотид обозначает нуклеотид, имеющий фосфориоатный остов; и/или, связанный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; и/или, m является, а L представляет собой олигоэтиленгликоль, предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль, карбоксамидо тетраэтиленгликоль, карбоксамидо олигоэтиленгликоль, более предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; и/или C выбирают из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты,

холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахарида, пептида, такого как RGD и бомбезин, и белка, такого как интегрин, предпочтительно одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно связанный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксононадекана; при этом m является 1, а L представляет собой карбоксамидополиэтиленгликоль, предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; а С выбирают из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно С выбирают из группы, состоящей из диолеоила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина. Еще более предпочтительно С представляет собой холестерин.

В специальном варианте осуществления конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой



где подчеркнутый нуклеотид обозначает нуклеотид, имеющий фосфориотатный остов.

Краткое описание чертежей

Фигура 1: Поглощение клетками созданных молекул Dbait. (А) Микроскопическое исследование комплексов Dbait с PEI11k (а). (В) Анализ поглощения клетками при помощи проточной цитометрии проводили через 5 часов после начала обработки для разных условий трансфекции. Dbait-су3 вместе с реактивом superfect, 2 мкг/мл соDbait-су3 без обработки или с обработкой хлорохином перед трансфекцией, 25 мкг/мл соDbait-су3 без или с CQ.

Фигура 2: Активность созданных молекул Dbait. (А) Активацию ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК) определяли после добавления 50 μ очищенного ферментного комплекса к «пробе без ДНК», 0,25 мкг Dbait или 0,25 мкг соDbait. (В) Иммунообнаружение γ -H2AX в клетках через 24 часа после обработки 1,6 мкг/мл Dbait (слева), 1,6 мкг/мл Dbait/PEI11K (в середине), 16 мкг/мл соDbait + CQ. Масштабная метка: 20 мкм. (С) Количественное определение γ -H2AX через 5 часов (черные) и 24 часа (серые) после обработки различными Dbait. Трансфекцию проводили при 1,6 мкг/мл Dbait или 16 мкг/мл соDbait. Если указано, перед трансфекцией был добавлен CQ.

Фигура 3: Фенотипы через 24 часа после инъекции Dbait во внеклеточное пространство эмбрионов данио на клеточной стадии 1К. (А-С) Вид слева сбоку эмбрионов данио через 24 часа после инъекции Dbait-cy3 + PEI (2-5 нл) в анимальный полюс эмбриона данио на клеточной стадии 1К: верхняя панель, вид в светлом поле; нижняя панель, 2-кратное увеличение области головы с эпифлюоресцентным перекрытием, показанным меченым тexasским красным Dbait-cy3. (А) Тип 1 - фенотип неотличимый от неинъецированного (не показано). (В) Тип 2 - умеренный фенотип с обширной гибелью клеток в области головы. (С) Тип 3 – сильный тератогенез и широко распространенная гибель клеток. (D) Гистограмма, показывающая процент трех фенотипических классов в зависимости от адьюванта. Для каждого состояния было исследовано более 100 эмбрионов. NA: Dbait введенный в отдельности; Sup: Superfect; 25k, 22k, 11k PEI соответствующего размера; chloro: хлорохин; Lut: Lutrol.

Фигура 4: Диффузия и активность в опухолях. В опухоли было введено 1,6 мкг Dbait-cy5.5/PEI или 16 мкг coDbait-cy5.5 (1/10 cy5.5 меченого coDbait + 9/10 немеченого coDbait для сохранения одинаковой интенсивности флуоресценции), на следующий день анализировали распределение флуоресценции и активность DNA-ПКcs. Диффузия флуоресцентных Dbait после двух типов инъекций: одна внутриопухолевая инъекция или две подкожные инъекции.

Фигура 5: Выживаемость 5 групп бестимусных мышей с ксенотрансплантатами меланомы SK28: 1) нелеченные (n=16); 2) облученные (IR, n=12); 3) облученные с внутрибрюшинным введением 1 мг хлорохина (CQ, IR, n=10); 4) леченые внутриопухолевым введением 0,6 мг DT01 (также называемых CoDbait) и облученные через 5 часов после этого (DT01, IR, n=11) и 5) предварительно обработанные внутрибрюшинным введением 1мг хлорохина за 2 часа до внутриопухолевого введения 0,6мг DT01 (также называемых CoDbait) и облученные через 5 часов после этого (DT01, CQ, IR, n=13).

Фигура 6. Исследование роста ксенотрансплантата меланомы SK28 на бестимусных мышах. Вверху: протокол лечения: 4 обработки DT01 (также называемых CoDbait) в сочетании с 4 сеансами облучения (RT) за две недели. 4 мг DT01 инъецировали подкожно в двух противоположных точках на расстоянии 5 мм от границы опухоли. Перед началом лечения и во время лечения DT01+RT животных предварительно обрабатывали путем перорального введения (р.о.)*1 мг хлорохина (CQ) два раза в неделю. В середине: Среднее значение роста опухоли разных групп животных: необработанные или CQ: необработанные или обработанные только CQ (n=11); RT или CQ+RT: облученные вместе с или без одновременной обработки хлорохином (n=16); DT01+RT: обработка

DT01 и облучение (n=10); DT01+CQ+RT: обработанные DT01 вместе с хлорохином и облучение (n=12). Внизу: Подробности результатов для групп DT01+RT и DT01+CQ+RT. Каждая кривая соответствует росту одной опухоли.

Фигура 7: Активность DNA-РК контролировали с помощью набора SignaTECT DNA-dependent Protein Kinase Assay System (Promega, Madison, Висконсин, США). Биотинилированный пептидный субстрат, 50 единиц DNA-РК (Promega, Madison, Висконсин, США) и 500 нМ различных молекул Dbait инкубировали в течение 5 минут при 30°C с (γ - 32 P)АТФ согласно инструкциям производителя. Биотинилированный субстрат собирали на стрептавидиновой мембране, промывали и подсчитывали на сцинтилляционном счетчике. Процент фосфорилирования вычисляли путем деления связанной радиоактивности на общий счет (γ - 32 P)АТФ на образец. Dbait32Hc представляют собой неконъюгированные молекулы Dbait. 0813, 0815, 0902, 0903, 0904 и 0905 представляют собой конъюгированные молекулы Dbait (см. таблицы “Альтернативные конъюгированные молекулы Dbait”). Dbait8H представляют собой короткие (8 пар оснований) Dbait, использованные в качестве отрицательного контроля активности DNA-РК.

Фигура 8: Активность молекул Dbait, определенная по H2AX фосфорилированию. Иммунологический анализ γ -H2AX в линии клеток MRC5 через 24 часа после трансфекции различных конъюгированных молекул Dbait (см. таблицы “Альтернативные конъюгированные молекулы Dbait”) с или без предварительной обработки 50 мкМ хлорохином. Молекулы Dbait, заключенные в состав с полиэтиленимином (PEI), использовали в качестве положительного контроля.

Подробное описание изобретения

Введение небольших молекул ДНК (Dbait) уменьшает репарацию ДНК поврежденных хромосом и обеспечивает действенный способ увеличения эффективности радиотерапии или химиотерапии в опухолях, в частности в резистентных опухолях. Однако, сенсibiliзирующая активность молекул Dbait зависит от эффективности их доставки в опухолевые клетки.

Соответственно изобретатели сравнили различные стратегии с целью улучшить этот ключевой этап. Для проверки этих стратегий была разработана система анализов: (i) молекулярное исследование комплексов, образованных с молекулами Dbait, (ii) клеточные тесты на поглощение и активность Dbait, (iii) мониторинг распределения *in vivo* и биологической активности созданных молекул на живом эмбрионе данио (зебрафиш) с помощью конфокальной микроскопии. Эти тесты предоставили возможность отбора

самых эффективных композиций и протоколов введения до исследований на ксенотрансплантатах опухолей у мышей. Сравнили два класса композиций: поликатионные полимеры с линейным или разветвленным полиэтиленимином (PEI) и ковалентно связанные с холестерином Dbait (coDbait). Линейные комплексы PEI были наиболее эффективны для трансфекции Dbait *in vitro* и *in vivo*, однако проявляли высокую токсичность. Действительно, были необходимы более высокие дозы (в 10 раз) coDbait, использованные вместе с 1 мг хлорохина (согласно аллометрическому преобразованию эквивалентные профилактической дозе, использованной у людей), чтобы наблюдать тот же самый противоопухолевый эффект на ксенографте меланомы, как при использовании Dbait в составе с PEI. Однако, было обнаружено, что проверенные дозы coDbait при введении вместе с хлорохином являются нетоксичными.

В соответствии с этим настоящее изобретение описывает комбинацию и протокол введения конъюгата холестерин-нуклеиновая кислота при системном введении хлорохина в клинически релевантной дозе, в частности использование конъюгата холестерин-Dbait вместе с профилактической дозой хлорохина (по аллометрическому преобразованию у животных), без заметной токсичности. Изобретатели показали, что в 10 раз более высокое количество (10x) холестерин-Dbait обладают похожей эффективностью по сравнению с 1x Dbait, преобразованными (vectorized) с помощью невирусной векторной системы у мышей, вместо 1000-кратного без применения хлорохина, описанного в предшествующем уровне техники. В результате конъюгация терапевтических нуклеиновых кислот с липофильным или нацеливающим на клетки средством становится безопасной и экономически применимой системой доставки.

Соответственно, несмотря на необходимость в более высокой дозе coDbait, изобретатели неожиданно обнаружили, что:

1) Комбинация coDbait с хлорохином показывает низкую, если она вообще есть, токсичность *in vivo*. Это позволяет улучшить терапевтический индекс (отношение эффективность дозы/токсичность дозы) почти от 1 для Dbait/PEI до >20 для coDbait; токсичность отсутствовала после внутривенной инъекции, подкожной инъекции и даже после внутримозговой инъекции у мыши, крысы, кролика и обезьяны;

2) Комбинация coDbait с хлорохином дает замедленную и длительную активацию DNA-РК (основная мишень Dbait) и продолжительный терапевтический эффект. Конкретнее, повышенная активность или эффект наблюдается на протяжении определенного периода времени;

3) Неожиданно было обнаружено, что coDbait хорошо распространяется в опухоли/ткани по сравнению с Dbait/PEI.

4) Впервые изобретатели наблюдали, что хлорохин дает возможность увеличить поглощение клетками соDbait, в то время как этот эффект является менее выраженным при использовании холестерина, конъюгированного с молекулами siRNA.

Основываясь на этих данных, настоящее изобретение имеет отношение к

- фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, и необязательно б) повреждающее ДНК противоопухолевое средство и фармацевтически приемлемый носитель, в частности, для использования при лечении рака;

- фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, б) эндосомолитическое средство как описано ниже, и необязательно с) повреждающее ДНК противоопухолевое средство и фармацевтически приемлемый носитель, в частности, для использования при лечении рака;

- продукту или набору, содержащему (а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, и необязательно б) повреждающее ДНК противоопухолевое средство, как комбинированному препарату для одновременного, отдельного или последовательного использования, в частности, при лечении рака;

- продукту или набору, содержащему (а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, б) эндосомолитическое средство как описано ниже, и необязательно с) повреждающее ДНК противоопухолевое средство, как комбинированному препарату для одновременного, отдельного или последовательного использования, в частности, при лечении рака;

- комбинированному препарату, содержащему (а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, б) эндосомолитическое средство, как описано ниже, и необязательно с) повреждающее ДНК противоопухолевое средство для одновременного, отдельного или последовательного использования, в частности, при лечении рака;

- фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, для использования при лечении рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait

или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, и б) эндосомолитическое средство как описано ниже, для использования при лечении рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- продукту или набору, содержащему а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, и б) эндосомолитическое средство, как описано ниже, как комбинированному препарату для одновременного, отдельного или последовательного использования, в частности при лечении рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- применению фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, для производства медикамента для лечения рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством или для увеличения эффективности лечения рака с помощью радиотерапии и/или повреждающего ДНК противоопухолевого средства или для увеличения чувствительности опухоли к радиотерапии и/или к лечению повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- применению фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как описано ниже, для производства медикамента для лечения рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством и с эндосомолитическим средством, раскрытым ниже;

- применению фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», раскрытую в описании, и б) эндосомолитическое средство, как описано ниже, для производства медикамента для лечения рака в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- применению фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», раскрытую в описании, и б) эндосомолитическое средство, как описано ниже, для производства медикамента для увеличения эффективности лечения рака с помощью радиотерапии и/или повреждающего ДНК противоопухолевого средства или для увеличения чувствительности опухоли к радиотерапии и/или к лечению повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- применению фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, б) эндосомолитическое средство, раскрытое ниже, и необязательно с) повреждающее ДНК противоопухолевое средство и фармацевтически приемлемый носитель для производства медикамента для лечения рака;

- способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, и необязательно повреждающее ДНК противоопухолевое средство и фармацевтически приемлемый носитель;

- способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, б) эндосомолитическое средство, раскрытое ниже, и необязательно с) повреждающее ДНК противоопухолевое средство и фармацевтически приемлемый носитель;

- способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей эндосомолитическое средство, как описано ниже, и необязательно эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей повреждающее ДНК противоопухолевое средство;

- способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, и эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей эндосомолитическое средство, как описано ниже, в комбинации с радиотерапией и/или повреждающим ДНК противоопухолевым средством;

- способу увеличения эффективности лечения рака с помощью радиотерапии и/или повреждающего ДНК противоопухолевого средства или увеличения чувствительности опухоли к радиотерапии и/или к лечению повреждающим ДНК противоопухолевым средством у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей а) конъюгированную молекулу

Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, b) эндосомолитическое средство, описанное ниже, и фармацевтически приемлемый носитель;

- способу увеличения эффективности лечения рака с помощью радиотерапии и/или повреждающего ДНК противоопухолевого средства или увеличения чувствительности опухоли к радиотерапии и/или к лечению повреждающим ДНК противоопухолевым средством у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», как раскрывается в описании, и эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей эндосомолитическое средство, описанное ниже.

При использовании в описании термины “набор”, “продукт” или “комбинированный препарат” определяют, в частности, “набор частей (набор, состоящий из частей)” в том смысле, что «компоненты комбинации» (a) и (b), и необязательно (c), как определено выше, могут даваться дозами независимо или путем использования различных фиксированных комбинаций с известными количествами «компонентов комбинации» (a) и (b), и необязательно (c), т.е. одновременно или в разные моменты времени. Например, части набора могут быть введены отдельно или с временными интервалами, то есть в разные моменты времени и с равными или различными интервалами времени для каждой части набора, состоящего из частей. Соотношение общих количеств «компонента комбинации» (a) к «компоненту комбинации» (b), и необязательно (c), предназначенных для введения в комбинированном препарате, может варьировать. Комбинация «компонентов» (a) и (b) и необязательно (c), может вводиться одним и тем же способом или разными способами.

В контексте изобретения термин лечение означает лечебное, симптоматическое и профилактическое лечение. Фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные препараты изобретения могут применяться на людях при наличии рака или опухоли, включая раннюю и позднюю стадии развития рака. Фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные препараты изобретения необязательно будут исцелять пациента, имеющего раковое заболевание, однако будут задерживать или замедлять прогрессирование болезни или предотвращать дальнейшее прогрессирование болезни, таким образом, улучшая состояние пациента. В частности, фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные препараты изобретения уменьшают развитие опухолей, уменьшают опухолевую массу, вызывают регрессию опухоли у хозяина-млекопитающего и/или предотвращают возникновение

метастазов и рецидива опухоли. При лечении рака фармацевтическую композицию изобретения вводят в терапевтически эффективном количестве.

Под "эффективным количеством" имеется в виду количество фармацевтической композиции изобретения, предотвращающее, устраняющее или уменьшающее вредные воздействия рака у млекопитающих, включая людей, отдельно или в комбинации с другими активными ингредиентами фармацевтической композиции, набора, продукта или комбинированного препарата. Понятно, что вводимая доза может регулироваться специалистом в данной области техники в соответствии с пациентом, патологией, способом введения и т.д.

В случае, когда в описании в отношении фармацевтической композиции изобретения упоминается "лечение рака" или тому подобное, имеется в виду: а) способ лечения рака, при этом указанный способ включает введение фармацевтической композиции изобретения субъекту, нуждающемуся в таком лечении; б) применение фармацевтической композиции изобретения для лечения рака; в) применение фармацевтической композиции изобретения для производства медикамента, предназначенного для лечения рака; и/или d) фармацевтическая композиция изобретения, предназначенная для применения при лечении рака.

Молекулы Dbait

Молекулы Dbait подробно описаны в РСТ патентных заявках WO2005/040378, WO2008/034866 и WO2008/084087, раскрытие которых включается в описание путем ссылки.

Молекулы Dbait можно охарактеризовать некоторым количеством свойств, необходимых для их терапевтической активности, такими как их минимальная длина, наличие, по меньшей мере, одного свободного конца и наличие двухцепочечного участка, предпочтительно участка двухцепочечной ДНК. Как будет обсуждаться далее, необходимо отметить, что точная нуклеотидная последовательность молекул Dbait не влияет на их активность. Более того, молекулы Dbait могут содержать модифицированные и/или неприродные остовы.

Предпочтительно, молекулы Dbait являются молекулами нечеловеческого происхождения (т.е. их нуклеотидная последовательность и/или конформация (например, «шпилька») не существует как таковая в клетках человека), наиболее предпочтительно синтетического происхождения. Поскольку последовательность молекул Dbait играет небольшую, если вообще играет, роль, молекулы Dbait предпочтительно имеют незначительную степень гомологии последовательности или идентичности с известными

генами, промоторами, энхансерами, 5'- или 3'-предшествующими последовательностями, экзонами, интронами и т.п. Другими словами, молекулы Dbait имеют менее чем 80% или 70%, даже менее чем 60%, или 50% идентичность последовательности с каким-либо геном в геноме человека. Способы определения идентичности последовательности хорошо известны в данной области техники и включают, например, BLASTN 2.2.25. В случае генома человека для установления идентичности последовательности предпочтительно используют Human Genome Build 37 (исходный GRCh37.p2 и дополнительные варианты). При строгих условиях молекулы Dbait не гибридизуются с геномной ДНК человека. Типичными строгими условиями являются такие, которые обеспечивают распознавание полностью комплементарных нуклеиновых кислот на основании частично комплементарных нуклеиновых кислот.

В дополнение к этому последовательность молекул Dbait предпочтительно не содержит CpG, для того, чтобы избежать хорошо известных, опосредованных toll-подобными рецепторами иммунологических реакций.

Длина молекул Dbait может быть переменной, при условии, что она является достаточной для обеспечения надлежащего связывания Ku-белкового комплекса, содержащего Ku и DNA-ПКс белки. Было показано, что длина молекул Dbait должна быть больше, чем 20 п.о., предпочтительно около 32 п.о., чтобы обеспечить связывание с таким Ku-комплексом и возможность активации DNA-ПКс. Предпочтительно, молекулы Dbait содержат примерно 20-200 п.о., более предпочтительно 24-100 п.о., еще более предпочтительно 26-100 и наиболее предпочтительно в промежутке 32-100 п.о. Например, молекулы Dbait содержат примерно 24-160, 26-150, 28-140, 30-120 или 32-100 п.о. При использовании "п.о." имеется в виду, что молекула содержит двухцепочечный участок указанной длины.

В отдельном варианте осуществления молекулы Dbait, имеющие двухцепочечный участок, по меньшей мере, 32 п.о., или примерно 32 п.о., содержат ту же самую нуклеотидную последовательность как Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5). Необязательно молекулы Dbait имеют тот же самый нуклеотидный состав как Dbait32, Dbait32Ha, Dbait32Hb, Dbait32Hc или Dbait32Hd, однако последовательность нуклеотидов у них другая. Кроме того, молекулы Dbait содержат одну цепь двухцепочечного участка с 3 А, 6 С, 12 G и 11 Т. Предпочтительно, последовательность молекул Dbait не содержит ни одного CpG динуклеотида.

Альтернативно, двухцепочечный участок содержит, по меньшей мере, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотидов Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha

(SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5). В конкретном варианте осуществления двухцепочечный участок состоит из 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотидов Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5).

Dbait должна иметь, по меньшей мере, один свободный конец в качестве имитатора DSB. Указанный свободный конец может быть или свободным тупым концом или 5'-3'-выступающим концом. «Свободный конец» в описании относится к молекуле нуклеиновой кислоты, в частности участку двухцепочечной нуклеиновой кислоты, имеющему и 5' конец и 3' конец или имеющему или 3' конец или 5' конец. Необязательно, один из концов 5' и 3' может использоваться для соединения (конъюгации) с молекулой Dbait или может связываться с блокирующей группой, например, или для 3'-3' нуклеотидной связи.

В конкретном варианте осуществления они содержат два свободных конца и могут быть линейными. Соответственно, молекула Dbait также может быть двухцепочечной молекулой с двумя свободными концами, имеющей нуклеотидную последовательность Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5).

В другом отдельном варианте осуществления они содержат только один свободный конец. Предпочтительно молекулы Dbait состоят из нуклеиновокислотной «шпильки» с двухцепочечным ДНК «стеблем» и «петлей». «Петля» может быть нуклеиновой кислотой или другой химической группой, известной специалисту, или их смесью. Нуклеотидный линкер может включать от 2 до 10 нуклеотидов, предпочтительно, 3, 4 или 5 нуклеотидов. Ненуклеотидный линкер (не исчерпывающим образом) включает нуклеотид, лишенный азотистого основания, простой полиэфир, полиамин, полиамид, пептид, углевод, липид, полиуглеводород или другие полимерные соединения (например, олигоэтиленгликоли, например, имеющие от 2 до 10 единиц этиленгликоля, предпочтительно 4, 5, 6, 7 или 8 единиц этиленгликоля). Предпочтительный линкер выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и других линкеров, таких как 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекан. Соответственно, в конкретном варианте осуществления молекулы Dbait могут быть молекулой в виде «шпильки», имеющей двухцепочечный участок или «стебель», содержащий, по меньшей мере, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотидов Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5), и петлю, представляющую собой гексаэтиленгликолевый

линкер, тетрадезокситимидилатный линкер (Т4) или 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекан. В конкретном варианте осуществления молекулы Dbait могут иметь двухцепочечный участок, состоящий из 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотидов Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5).

Молекулы Dbait предпочтительно содержат 2'-дезоксинуклеотидный остов и необязательно содержат один или несколько (2, 3, 4, 5 или 6) модифицированных нуклеотидов и/или нуклеиновых оснований, отличных от аденина, цитозина, гуанина и тимина. Соответственно, молекулы Dbait по существу представляют собой ДНК-структуру. В частности, двухцепочечный участок или «стебель» молекул Dbait состоит из дезоксирибонуклеотидов.

Предпочтительные молекулы Dbait содержат один или несколько химически модифицированных нуклеотидов или групп на конце одной или каждой цепочки, в частности для того, чтобы защитить их от деградации. В конкретном предпочтительном варианте осуществления свободный конец(ы) молекул Dbait является (являются) защищенным одним, двумя или тремя модифицированными фосфодиэфирными остовами на конце одной или каждой цепочки. Предпочтительные химические группы, в частности, модифицированный фосфодиэфирный остов, содержат фосфотиоаты. Альтернативно, предпочтительные Dbait имеют 3'-3' нуклеотидную связь, или нуклеотиды с метилфосфонатным остовом. Другие модифицированные остовы хорошо известны в данной области техники и включают фосфорамидаты, морфолино-нуклеиновую кислоту, 2'-0,4'-С метилен/этилен запертую/закрытую нуклеиновую кислоту, пептидно-нуклеиновую кислоту (PNA) и алкил с короткой цепью или циклоалкильные связи между сахарами или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические связи между сахарами переменной длины, или любые модифицированные нуклеотиды, известные квалифицированному специалисту. В первом предпочтительном варианте осуществления молекулы Dbait имеют свободный конец(ы), защищенный одним, двумя или тремя модифицированными фосфодиэфирными остовами на конце одной или каждой цепочки, более предпочтительно тремя модифицированными фосфодиэфирными остовами (в частности фосфортиоатным или метилфосфонатным) по меньшей мере на 3' конце, но еще более предпочтительно на обоих концах и 5' и 3'.

В самом предпочтительном варианте осуществления молекула Dbait представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», содержащую двухцепочечный участок ДНК или «стебель» из 32 п.о. (например, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 1-5, в частности

SEQ ID № 4) и петлю, соединяющую две нити двухцепочечного участка ДНК или «стебель», содержащую или состоящую из линкера, выбранного из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана, при этом три конца участка с двухцепочечной ДНК или «стебель» (т.е. напротив петли) имеют три модифицированных фосфодиэфирных остова (в частности фосфотиоатные связи между нуклеотидами).

Указанные молекулы Dbait получают с помощью химического синтеза, полу-биосинтеза или биосинтеза, любого метода амплификации, а затем любых методов экстракции, получения и любой химической модификации. Используют линкеры, которые могут быть введены путем стандартного химического синтеза нуклеиновых кислот.

Более предпочтительно молекулы Dbait получают с помощью специально разработанного конвергентного синтеза: две комплементарные нити получают с помощью общепринятого химического синтеза нуклеиновых кислот одновременно с введением подходящего линкера, после очистки они ковалентно соединяются друг с другом.

Конъюгированные молекулы Dbait

Настоящее изобретение имеет отношение к молекулам Dbait, конъюгированным с молекулами, способствующими эндоцитозу или поглощению клетками.

В частности, молекулы могут быть липофильными молекулами, такими как холестерин, одно- или двухцепочечные жирные кислоты, или лигандами, нацеленными на клеточные рецепторы, опосредующие эндоцитоз, такими как фолиевая кислота и производные фолата или трансферрин (Goldstein et al. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1985 1:1-39; Leamon & Lowe, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88: 5572–5576.). Жирные кислоты могут быть насыщенными или ненасыщенными и могут быть C₄-C₂₈, предпочтительно C₁₄-C₂₂, еще более предпочтительно C₁₈, такими как олеиновая кислота или стеариновая кислота. В частности, жирные кислоты могут представлять собой октадецил или диолеоил. Жирные кислоты могут встречаться как двухцепочечная форма, связанная с соответствующим линкером, таким как глицерин, фосфатидилхолин или этаноламин и т.п., или связанная вместе линкерами, использованными для присоединения на молекуле Dbait. При использовании в описании термин "фолат" относится к фолату и производным фолата, включая производные и аналоги птероевой кислоты. Аналоги и производные фолиевой кислоты, подходящие для использования в настоящем изобретении включают, но не ограничиваются этим, антифолаты, дигидрофолаты, тетрагидрофолаты, фолиновую кислоту, птерополиглутаминовую кислоту, 1-деаза, 3-деаза, 5-деаза, 8-деаза, 10-деаза, 1,5-деаза, 5,10-дидеаза, 8,10-дидеаза, и 5,8-дидеазафолаты, антифолаты, и производные

птероевой кислоты. Другие аналоги фолата описаны в США 2004/242582. Молекула, способствующая эндоцитозу, может быть токоферолом, сахаром, таким как галактоза и манноза и их олигосахарид, пептидом, таким как RGD и бомбезин, и белками, такими как интегрин. Соответственно, молекулу, способствующую эндоцитозу, можно выбрать из группы, состоящей из одно- или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно молекулу, способствующую эндоцитозу, выбирают из группы, состоящей из диолеоида, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина. В самом предпочтительном варианте осуществления молекула Dbait является конъюгированной с холестерином.

Молекулы, способствующие эндоцитозу, являются конъюгированными с молекулами Dbait, предпочтительно через линкер. Любой линкер, известный в данной области техники, используется для того, чтобы ковалентно присоединить молекулу, способствующую эндоцитозу, к молекулам Dbait. Например, WO09/126933 предоставляет большой список подходящих линкеров, страницы 38-45. Линкер может быть, не ограничиваясь этим, алифатической цепью, простым полиэфиром, полиамином, полиамидом, пептидом, углеводом, липидом, полиуглеводородом или другими полимерными соединениями (например, олигоэтиленгликолями, такими как соединения, имеющие от 2 до 10 единиц этиленгликоля, предпочтительно 3, 4, 5, 6, 7 или 8 единиц этиленгликоля, еще более предпочтительно 6 единиц этиленгликоля), а также содержащими любые связи, которые могут быть разрушены химическим или ферментативным путем, такие как дисульфидная связь, защищенная дисульфидная связь, кислотнеустойчивая связь (например, гидразоновая связь), сложноэфирная связь, ортоэфирная связь, фосфонамидная связь, биорасщепляемая пептидная связь, азосвязь или альдегидная связь. Такие расщепляемые линкеры подробно представлены в WO2007/040469, стр. 12-14, и в WO2008/022309, стр. 22-28.

В отдельном варианте осуществления молекула Dbait может быть связана с одной молекулой, способствующей эндоцитозу. Альтернативно, несколько молекул, способствующих эндоцитозу (например, две, три или четыре) могут быть присоединены к одной молекуле Dbait.

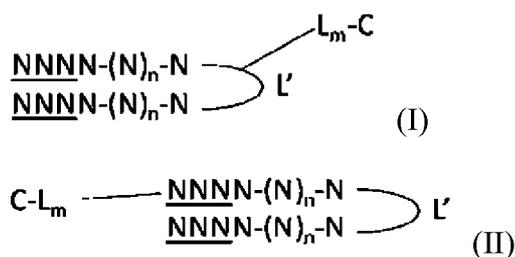
В специальном варианте осуществления линкер между молекулой, способствующей эндоцитозу, в частности, холестерином, и молекулой Dbait представляет собой $\text{CO-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n$, где n является целым числом от 1 до 10, предпочтительно n выбирают из группы, состоящей из 3, 4, 5 и 6. В конкретном варианте осуществления линкер представляет собой $\text{CO-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_4$ (карбоксамидотриэтиленгликоль). Линкер может быть связан с молекулами Dbait в любом удобном месте, не изменяющем

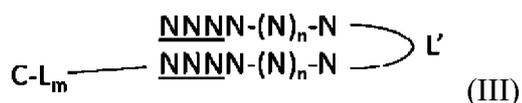
активность молекул Dbait. В частности, линкер может присоединяться на 5' конце, 3' конце или в петле, когда молекула Dbait представляет собой «шпильку». Однако, в случае, когда молекула Dbait представляет собой «шпильку», изобретатели неожиданно обнаружили, что холестерин, соединенный с молекулой Dbait через линкер на 5' конце, является более эффективным, чем холестерин, соединенный с молекулой Dbait через линкер на петле. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления рассматриваемая конъюгированная молекула Dbait представляет собой молекулу Dbait, имеющую структуру «шпильки», которая конъюгирована с молекулой, способствующей эндоцитозу, предпочтительно через линкер на 5' конце.

В другом специальном варианте осуществления линкер между молекулой, способствующей эндоцитозу, в частности холестерином, и Dbait молекулой представляет собой диалкил-дисульфид {например, $(\text{CH}_2)_p\text{-S-S-(CH}_2)_q$ при этом p и q являются целым числом от 1 до 10, предпочтительно от 3 до 8, например, 6}.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления конъюгированная молекула Dbait представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», содержащую участок двухцепочечной ДНК или «стебель» из 32 пар оснований (например, с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID №№ 1-5, в частности SEQ ID № 4) и петлю, соединяющую две цепи двухцепочечного участка ДНК или «стебель», содержащий или состоящий из линкера, выбранного из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана, три конца двухцепочечного участка ДНК или «стебель» (т.е. напротив петли) имеют три модифицированных фосфодиэфирных остова (в частности фосфотиоатные связи между нуклеотидами), при этом указанная молекула Dbait соединяется с холестерином на 5' конце, предпочтительно через линкер (например, карбоксамидо олигоэтиленгликоль, предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль).

Конъюгированная молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», также может описываться следующими формулами:





где N представляет собой нуклеотид, n является целым числом больше, чем 14, подчеркнутый N относится к нуклеотиду, имеющему или не имеющему модифицированный фосфодиэфирный остов, L' представляет собой линкер, C является молекулой, способствующей эндоцитозу, L представляет собой линкер, m представляет собой целое число, являясь 0 или 1. Предпочтительно, подчеркнутый N относится к нуклеотиду, имеющему модифицированный фосфодиэфирный остов. В формулах (II) и (III) C-L_m соответственно является связанным с 5' концом или 3' концом нуклеотида. В формуле (I-III) C-L_m предпочтительно является связанным с L' через дисульфидную связь (S-S).

В предпочтительных вариантах осуществления молекула формулы (I), (II) или (III) имеет один или несколько следующих признаков:

- N представляет собой дезоксинуклеотид, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из A (аденина), C (цитозина), T (тимина) и G (гуанина) и выбранный так, чтобы избежать возникновения CpG динуклеотида и иметь менее чем 80% или 70%, даже менее чем 60% или 50% идентичности последовательности к какому-либо гену в геноме человека; и/или,

- n представляет собой целое число от 15 до 195, предпочтительно от 19 до 95, более предпочтительно от 21 до 95 и еще более предпочтительно от 27 до 95. В особенно предпочтительном варианте осуществления, n представляет собой 27; и/или,

- подчеркнутый N относится к нуклеотиду, имеющему фосфориатный или метилфосфонатный остов, более предпочтительно фосфориатный остов; и/или,

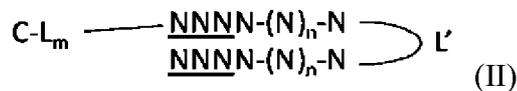
- связанный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (T4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксононадекана; и/или,

- m представляет собой 1 и L представляет собой карбоксамидо олигоэтиленгликоль, более предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; и/или,

- C выбирают из группы, состоящей из холестерина, одно- или двухцепочечной жирной кислоты, такой как олеиновая кислота или стеариновая кислота, или лиганда (включая пептид, белок, аптамер), нацеленного на клеточный рецептор, такого как фолат, и трансферрина, предпочтительно является холестерином, октадецилом, диолеилом или фолатом, более предпочтительно представляет собой холестерин.

Предпочтительно, C-L_m представляет собой триэтиленгликолевый линкер (10-O-[1-пропил-3-N-карбамоилхолестерил]-триэтиленгликолевый радикал).

В предпочтительном варианте осуществления конъюгированная молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», имеет следующую формулу:

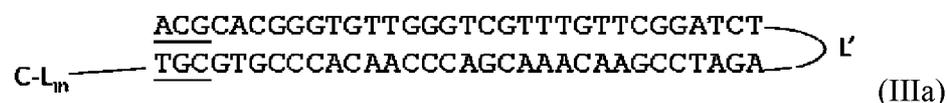
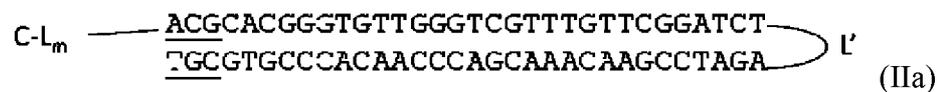
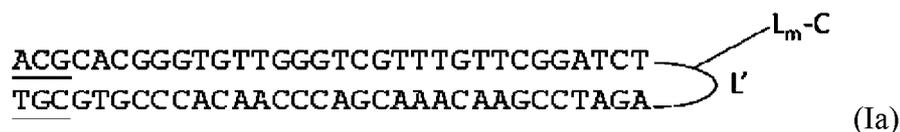


С теми же самыми определениями для N, подчеркнутого N, n, L, L', C и m, как в формулах (I), (II) и (III).

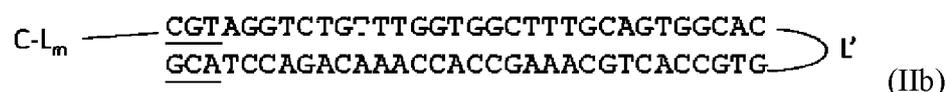
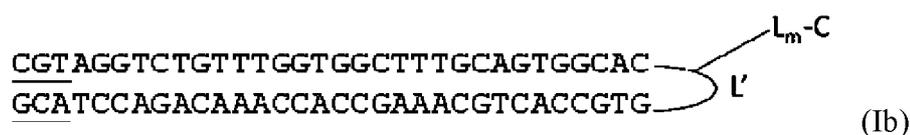
В предпочтительном варианте осуществления, NNNN-(N)_n-N содержит, по меньшей мере, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотида Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5) или состоит из 20, 22, 24, 26, 28, 30 или 32 последовательных нуклеотидов Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5). В отдельном варианте осуществления, NNNN-(N)_n-N содержит или состоит из Dbait32 (SEQ ID № 1), Dbait32Ha (SEQ ID № 2), Dbait32Hb (SEQ ID № 3), Dbait32Hc (SEQ ID № 4) или Dbait32Hd (SEQ ID № 5), более предпочтительно Dbait32Hc (SEQ ID № 4).

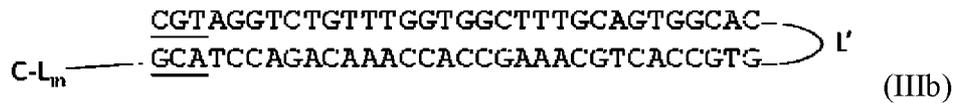
Таким образом, конъюгированная молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», может быть выбрана из группы, состоящей из:

при NNNN-(N)_n-N, представляющим собой SEQ ID № 1

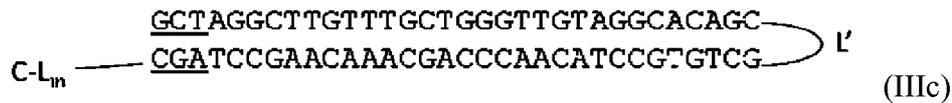
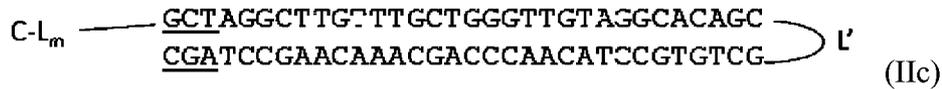
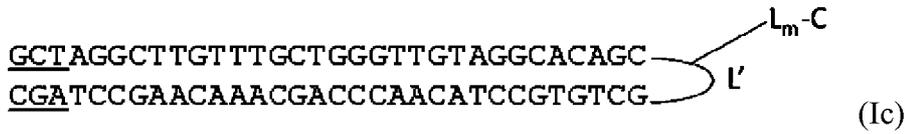


при NNNN-(N)_n-N, представляющим собой SEQ ID № 2

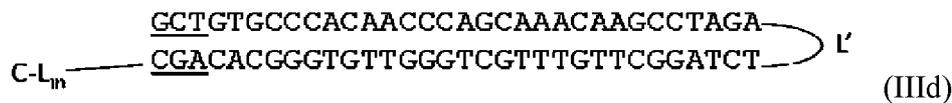
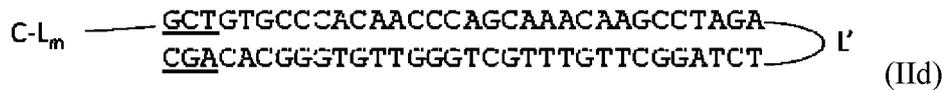
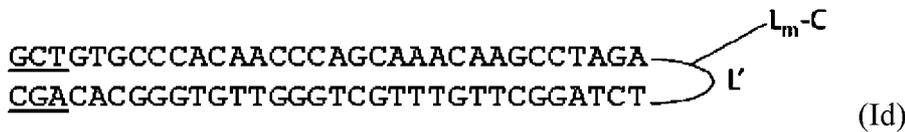




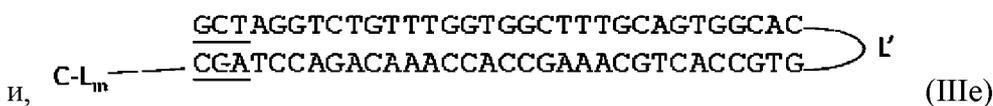
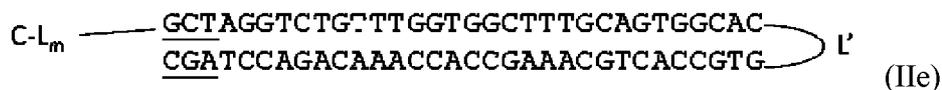
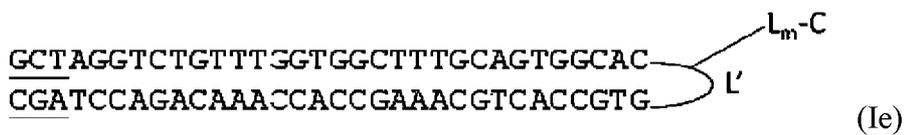
при $\text{NNNN}-(\text{N})_n\text{-N}$, представляющим собой SEQ ID № 3



при $\text{NNNN}-(\text{N})_n\text{-N}$, представляющим собой SEQ ID № 4



при $\text{NNNN}-(\text{N})_n\text{-N}$, представляющим собой SEQ ID № 5



и, с теми же самыми определениями для L, L', C и m, как в формулах (I), (II) и (III).

В предпочтительных вариантах осуществления молекула формул (Ia), (IIa), (IIIa), (Ib), (IIb), (IIIb), (Ic), (IIc), (IIIc), (Id), (IIId), (IIIId), (Ie), (IIe) и (IIIe), предпочтительно формул (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IIId) и (IIe), имеет один или несколько следующих признаков:

- неподчеркнутый нуклеотид относится к нуклеотиду, имеющему или не имеющему фосфориоатный или метилфосфонатный остов, более предпочтительно нуклеотиду, имеющему фосфориоатный или метилфосфонатный остов, еще более предпочтительно нуклеотиду, имеющему фосфориоатный остов; и/или,

- соединенный L' выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; и/или,

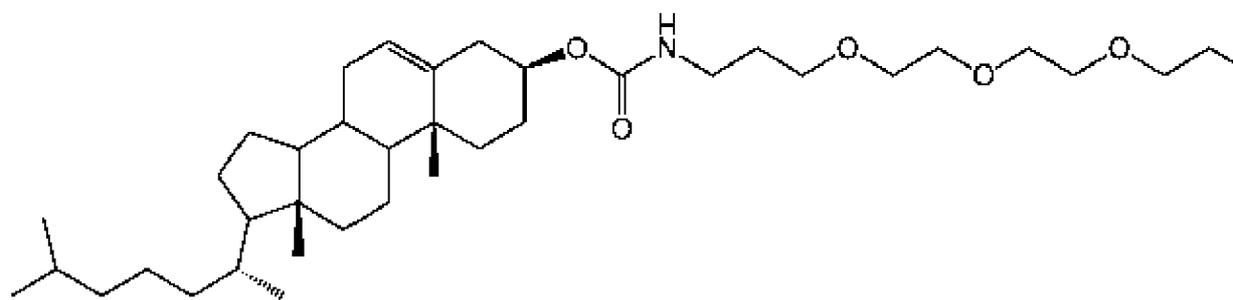
- m является 1, и L представляет собой олигоэтиленгликоль, более предпочтительно карбоксамидо триэтиленгликоль; и/или,

- С выбирают из группы, состоящей из холестерина, одно- или двухцепочечной жирной кислоты, такой как олеиновая кислота или стеариновая кислота, или лиганда (включая пептид, белок, аптамер), нацеленного на клеточный рецептор, такого как фолат, и трансферрина, предпочтительно является холестерином, октадецилом, диолеилом или фолатом, более предпочтительно представляет собой холестерин.

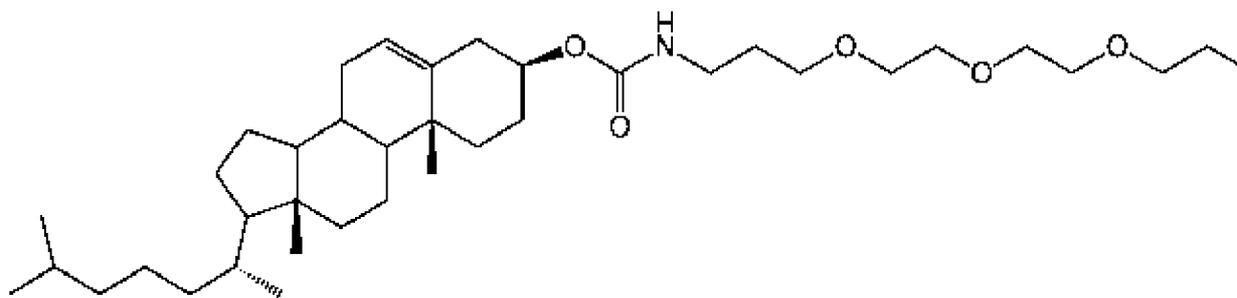
Предпочтительно, С-Lm представляет собой триэтиленгликолевый линкер (10-О-[1-пропил-3-N-карбамоилхолестерил]-триэтиленгликолевый радикал).

В специальном варианте осуществления молекулы Dbait или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие структуру в виде «шпильки», формул (I), (II), (III), (Ia), (IIa), (IIIa), (Ib), (IIb), (IIIb), (Ic), (IIc), (IIIc), (Id), (IId), (IIId), (Ie), (IIe) и (IIIe), предпочтительно формул (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe), L' предпочтительно выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана.

В конкретном варианте осуществления молекулы Dbait или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей структуру в виде «шпильки», формул (I), (II), (III), (Ia), (IIa), (IIIa), (Ib), (IIb), (IIIb), (Ic), (IIc), (IIIc), (Id), (IId), (IIId), (Ie), (IIe) и (IIIe), предпочтительно формул (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) и (IIe), с С являющимся холестерином, С-L_m представляет собой радикал

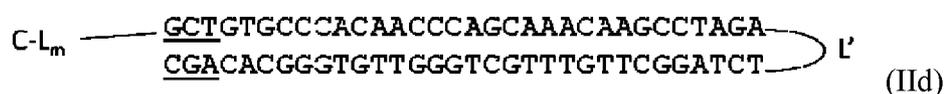


В предпочтительном варианте осуществления конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», выбирают из группы, состоящей из (II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId), и (IIe), где С-L_m является радикалом

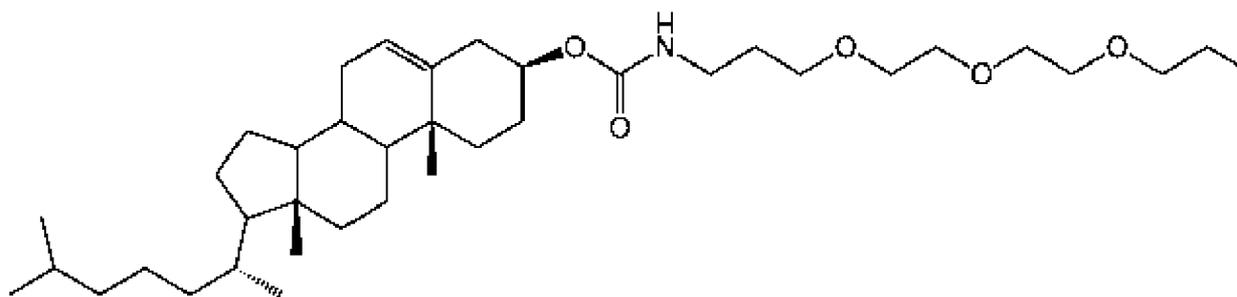


и где L' предпочтительно выбирают из группы, состоящей из гексаэтиленгликоля, тетрадезокситимидилата (Т4) и 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана, более предпочтительным является 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекан.

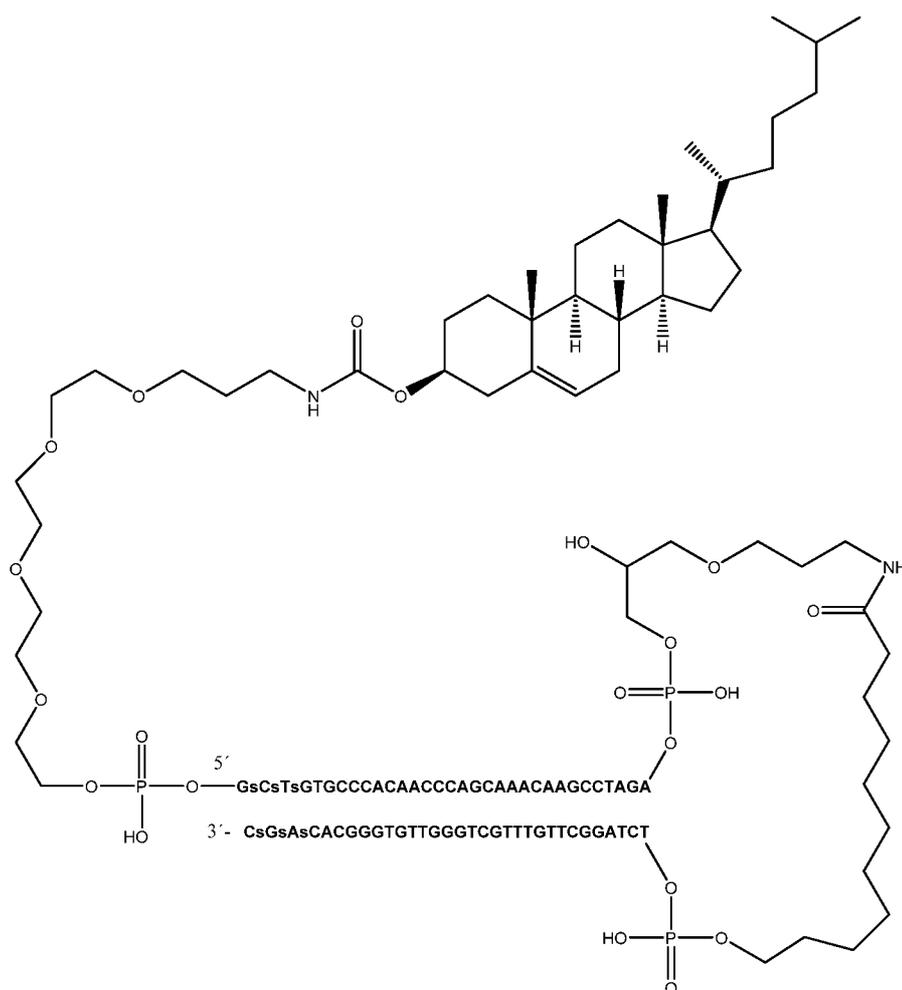
В особенном варианте осуществления молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», имеет следующую формулу



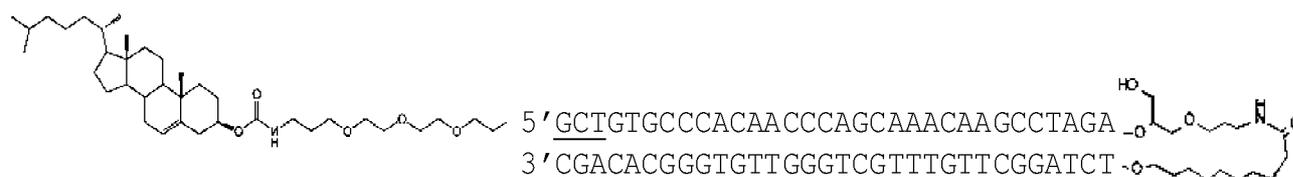
где C-L_m представляет собой радикал



где L' представляет собой 2,19-бис(фосфор)-8-гидразо-1-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекан и где неподчеркнутые нуклеотиды имеют фосфортиоатный остов. Соответственно, молекула имеет следующую структуру и называется в разделе Примеры как «coDbait».



Один из конъюгатов холестерин-Dbait, названный DT01, представляет собой состоящий из 64 нуклеотидов олигодезоксирибонуклеотид, состоящий из двух 32-нуклеотидных цепей комплементарной последовательности, соединенных через линкер 1,19-бис(фосфо)-8-гидразо-2-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекан, с холестерил-тетраэтиленгликолем на 5' конце и 3 фосфортионатными межнуклеотидными связями на каждом 5' и 3' концах. В растворе в молекуле образуется внутримолекулярная «шпилька» в виде двойной спирали из 32 п.о. Эта двухцепочечная (ds) DNA структура является необходимой для биологической активности, и является активным фармацевтическим ингредиентом (API). Молекулярная формула натриевой соли: $C_{678}H_{820}N_{244}Na_{65}O_{392}P_{65}S_6$; молекулярный вес натриевой соли: 22359.2 Да; молекулярный вес свободной кислоты: 20931.4 Да. Молекула может быть такой, как представлено ниже:



Неожиданным аспектом настоящего изобретения в отношении молекул формулы

(II), (IIa), (IIb), (IIc), (IId) или (IIE) является то, что хотя для активности молекулы Dbait необходимо наличие, по меньшей мере, одного свободного конца, способствующие эндоцитозу молекулы, связанные с 5' концом, не уменьшают активность.

В соответствии с этим настоящее изобретение также имеет отношение к конъюгированной молекуле Dbait, фармацевтической композиции, содержащей эту молекулу и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, конъюгированной молекуле Dbait, раскрытой выше, предназначенной для использования при лечении рака, отдельно или в комбинации с радиотерапией и/или химиотерапией повреждающим ДНК противоопухолевым средством, способу лечения рака, включающему введение терапевтически эффективного количества конъюгированной молекулы Dbait, раскрытой выше, и применению конъюгированной молекулы Dbait, раскрытой выше, для приготовления медикамента, предназначенного для лечения рака, как подробно описано далее.

Эндосомолитическое средство

Конъюгированная молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», предпочтительно используется в комбинации с эндосомолитическим средством (например, хлорохином, фузогенными липидами или пептидами и т.д.). Действительно, обработка эндосомолитическим средством способствует высвобождению конъюгированных молекул Dbait из эндосом. Кроме того, такая комбинация дает возможность получения дополнительных неожиданных эффектов, включая необычные результаты в отношении низкой токсичности *in vivo*, а также замедленной и длительной активности, опосредованной Dbait.

В частности, эндосомолитические средства способны воздействовать на лизис эндосомы в ответ на изменение значения pH, а инкапсулирующий или упаковывающий, компонент, способный «упаковать» терапевтическое средство должен доставляться в клеточные и субклеточные компоненты. Эндосомолитическое средство включает, но не ограничивается этим, хинолиновые соединения, в частности, 4-аминохинолиновые и 2-фенилхинолиновые соединения и их аминокпроизводные, тиоловые производные, фенильные, алкильные, виниловые и галогеновые производные, фузогенные липиды, пептиды или белки.

В предпочтительном варианте осуществления эндосомолитическое средство представляет собой небольшую молекулу. Основное эндосомолитическое средство можно выбрать из группы, состоящей из хинина, хлорохина, гидроксихлорохинов, амодиахинов (камохинов), амопирохинов, примахинов, мефлохинов, нивахинов, галофантринов,

хинониминов и их комбинации. Предпочтительно эндосомолитические средства являются хинолиновыми эндосомолитическими средствами, включая, но не ограничиваясь этим, перечисленные ниже соединения с химическими названиями: 7-хлор-4-(4-диэтиламино-1-метилбутил-амино)хинолин (хлорохин); 7-хлор-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутил-амино)хинолин (гидроксихлорохин); 7-фтор-4-(4-диэтиламино-1-метилбутил-амино)хинолин; 4-(4-диэтиламино-1-метилбутиламино) хинолин; 7-гидрокси-4-(4-диэтил-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-хлор-4-(4-диэтиламино-1-бутиламино)хинолин (дезметилхлорохин); 7-фтор-4-(4-диэтиламино-1-бутиламино)хинолин); 4-(4-диэтил-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-гидрокси-4-(4-диэтиламино-1-бутиламино)хинолин; 7-хлор-4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-бутиламино)хинолин; 7-фтор-4-(1-карбоксо-4-диэтил-амино-1-бутиламино)хинолин; 4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-бутиламино) хинолин; 7-гидрокси-4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-бутиламино)хинолин; 7-хлор-4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-фтор-4-(1-карбоксо-4-диэтил-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-метилбутиламино) хинолин; 7-гидрокси-4-(1-карбоксо-4-диэтиламино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-хлор-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-фтор-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-гидрокси-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино) хинолин; гидроксихлорохин фосфат; 7-хлор-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил-1)-амино-1-бутиламино)хинолин (дезметилгидроксихлорохин); 7-фтор-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-гидрокси-4-(4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино) хинолин; 7-хлор-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-фтор-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-гидрокси-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-бутиламино)хинолин; 7-хлор-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-фтор-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 7-гидрокси-4-(1-карбоксо-4-этил-(2-гидроксиэтил)-амино-1-метилбутиламино)хинолин; 8-[(4-аминопентил)амино-6-метоксидигидрохлорид хинолин; 1-ацетил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин; 8-[(4-аминопентил)амино]-6-метоксихинолин дигидрохлорид; 1-бутирил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин; 3-хлор-4-(4-гидрокси-альфа, альфа'-бис(2-метил-1-пирролидинил)-2,5-ксилидинхинолин, 4-[(4-диэтил-амино)-1-метилбутил-амино]-6-метоксихинолин; 3-фтор-4-(4-гидрокси-альфа, альфа'-бис (2-метил-1-пирролидинил)-2,5-ксилидинхинолин, 4-

[(4-диэтиламино)-1-метилбутил-амино]-6-метоксихинолин; 4-(4-гидрокси-альфа, альфа'-бис(2-метил-1-пирролидинил)-2,5-ксилидинхинолин; 4-[(4-диэтиламино)-1-метилбутил-амино]-6-метоксихинолин; 3,4-дигидро-1-(2Н)-хинолинкарбоксихальдегид; 1,1'-пентаметилен diquinoleinium диодид; 8-хинолинолсульфат и амин, альдегид, карбоксильные, гидроксильные, галогеновые, кето-, сульфгидрильные и виниловые производные или их аналоги. Другие средства раскрываются в Naisbitt et al (1997, *J Pharmacol Exp Therapy* 280:884-893) и в США 5,736,557. В более предпочтительном варианте осуществления эндосомолитическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из хлорохина, гидроксихлорохина, дезметилхлорохина, гидроксихлорохин фосфата и дезметил-гидроксихлорохина, предпочтительно представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин.

В другом варианте осуществления эндосомолитическое средство представляет собой фузогенный липид, пептид или белок. Действительно, в данной области техники известны многочисленные фузогенные липиды, пептиды или белки. Например, фузогенные липиды, пептиды или белки раскрываются в следующих патентных заявках: WO10057160, US2007/0293449, US2006/0051405, WO10053489, WO09126933. В частности, WO09/126933 предоставляет фузогенные липиды, пептиды или белки на стр. 23-29.

Изобретатели продемонстрировали высокую противоопухолевую терапевтическую активность комбинации конъюгированной молекулы Dbait с хлорохином, в то время как они не наблюдали какой-либо противоопухолевой активности при использовании такого же количества хлорохина в отдельности или в комбинации с облучением.

Соответственно, настоящее изобретение имеет отношение к фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», изобретения и эндосомолитическое средство, в частности, для применения при лечении рака. Настоящее изобретение также имеет отношение к продукту, содержащему конъюгированную молекулу Dbait или молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую структуру в виде «шпильки», изобретения и эндосомолитическое средство, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения, в частности для применения при лечении рака. Предпочтительно, эндосомолитическое средство выбирают из группы, состоящей из хлорохина или гидроксихлорохина, еще более предпочтительно средство является хлорохином. Предпочтительно, конъюгированная молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», изобретения представляет собой какую-либо конъюгированную молекулу Dbait, описанную выше. В одном варианте

осуществления молекула Dbait или молекула нуклеиновой кислоты, имеющая структуру в виде «шпильки», является ковалентно связанной с эндосомолитическим средством, предпочтительно хлорохином или гидроксихлорохином, еще более предпочтительно средство является хлорохином, в частности, как раскрыто в WO2007/040469. В другом предпочтительном варианте осуществления эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин, не является конъюгированным (т.е., ковалентно связанным) с конъюгированной молекулой Dbait или молекулой нуклеиновой кислоты, имеющей структуру в виде «шпильки».

Фармацевтические композиции, рассматриваемые в описании, в дополнение к активному ингредиенту(ам) могут включать фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой носитель (например, основу, субстрат, растворитель и т.д.), не препятствующий эффективности биологического действия активного ингредиента(ов) и являющийся нетоксичным для хозяина, которому вводится. Например, для парентерального введения активное соединение(я) может быть включено в состав стандартной лекарственной формы для введения в таком разбавителе, как физраствор, раствор декстрозы, сывороточный альбумин и раствор Рингера.

Фармацевтическая композиция может быть создана известным в данной области техники способом в виде растворов в фармацевтически совместимых растворителях или в виде эмульсий, суспензий или дисперсий в фармацевтически подходящих растворителях или разбавителях или в виде пилюль, таблеток или капсул, содержащих твердые носители. Композиции настоящего изобретения, пригодные для перорального введения, могут иметь форму отдельных единиц, таких как капсулы, пакетики, таблетки или пастилки, каждая из которых содержит заранее определенное количество активного ингредиента; форму порошка или гранул; форму раствора или суспензии в водосодержащей жидкости или неводной жидкости; или форму эмульсии масло-в-воде или эмульсии вода-в-масле. Композиции, пригодные для парентерального введения, содержат стерильный масляный или водный препарат активного ингредиента, который предпочтительно является изотоничным крови реципиента. Каждая подобная композиция также может содержать другие фармацевтически совместимые и нетоксичные вспомогательные средства, такие как, например, стабилизирующие вещества, антиоксиданты, связывающие вещества, красители, эмульгаторы или вкусоароматические вещества. Композиции настоящего изобретения содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно другими терапевтическими ингредиентами. Носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что является сочетаемым (совместимым) с другими

ингредиентами композиций и безвредным для реципиента. Фармацевтические композиции преимущественно употребляются путем инъекции или внутривенного вливания подходящих стерильных растворов или в виде лекарственных форм для перорального применения. Способы безопасного и эффективного введения большинства химиотерапевтических средств известны специалистам в данной области техники. В дополнение к этому способы их введения описаны в общепринятой литературе.

Фармацевтическая композиция изобретения не является липосомальной композицией. В частности, конъюгированная молекула Dbait продукта изобретения не заключается в состав липосомальной композиции.

В частности, настоящее изобретение также имеет отношение к продукту, набору или комбинированному препарату, содержащему (а) одну или более стандартных лекарственных форм молекулы Dbait или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей структуру в виде «шпильки», раскрытой ранее, (b) одну или более стандартных лекарственных форм эндосомолитического средства, как раскрыто ниже, и необязательно (с) одну или более стандартных лекарственных форм повреждающего ДНК противоопухолевого средства, как раскрыто ниже.

Лечение, повреждающее ДНК

В дополнение к конъюгированной молекуле Dbait и эндосомолитическому средству лечение может дополнительно включать противоопухолевое лечение, предпочтительно лечение повреждающим ДНК средством или радиотерапией. Лечение, повреждающее ДНК, может представлять собой радиотерапию или химиотерапию повреждающим ДНК противоопухолевым средством или их комбинацию.

Разрыв цепи ДНК может достигаться с помощью ионизирующего облучения (радиотерапии). Радиотерапия включает, но не ограничивается этим, γ -излучение, рентгеновское излучение и/или направленную доставку радиоизотопов в опухолевые клетки. Другие виды радиотерапии включают микроволны и ультрафиолетовое облучение. В настоящем изобретении также возможно использование других методов радиационной терапии.

Повреждающее ДНК противоопухолевое средство предпочтительно выбирают из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I или II, ДНК-кросслинкера, препарата, алкилирующего ДНК, антиметаболического средства и ингибиторов митотического веретена.

Ингибиторы топоизомеразы I и/или II включают, но не ограничиваются этим, этопозид, топотекан, камптотecin, иринотекан, амсакрин, интоплицин, антрациклины,

такие как доксорубин, эпирубин, даунорубин, идарубин и митоксантрон. Ингибиторы топоизомеразы I и II включают, но не ограничиваются этим, интоплицин.

ДНК-кросслинкеры (агенты, сшивающие ДНК) включают, но не ограничиваются этим, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

Антиметаболические препараты блокируют ферменты, ответственные за синтез нуклеиновых кислот, или встраиваются в ДНК, нарушая правильный генетический код и приводя к апоптозу. Неограничивающие примеры включают, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы, и конкретнее метотрексат, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин, 5-фторурацил, гемцитабин и капецитабин.

Повреждающее ДНК противоопухолевое средство может представлять собой алкилирующее средство, включая, без ограничения, азотистый иприт, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины, соли металлов и триазены. Неограничивающие примеры включают урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN(R)), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамид, бусульфан, кармустин, ломустин, фотемустин, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, тиотепу, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Ингибиторы митотического веретена включают, но не ограничиваются этим, паклитаксел, доцетаксел, винорельбин, ларотаксел (также называемый XRP9881; Sanofi-Aventis), XRP6258 (Sanofi-Aventis), BMS-184476 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-188797 (Bristol-Meyer-Squibb), BMS-275183 (Bristol-Meyer-Squibb), ортатаксел (также называемый IDN 5109, BAY 59-8862 или SB-T-101131; Bristol-Meyer-Squibb), RPR 109881A (Bristol-Meyer-Squibb), RPR 116258 (Bristol-Meyer-Squibb), NBT-287 (TAPESTRY), PG-паклитаксел (также называемый CT-2103, PPX, паклитаксел полиглюмекс, паклитаксел полиглутамат или ХуотакTM), ABRAXANE® (также называемый Nab-Paclitaxel; ABRAXIS BIOSCIENCE), тесетаксел (также называемый DJ-927), IDN 5390 (INDENA), таксопрексин (также называемый докозагексаеновая кислота-паклитаксел; PROTARGA), ДНА-паклитаксел (также называемый Тахорепрексин®) и MAC-321 (WYETH). Смотри также обзор Hennenfent & Govindan (2006, *Annals of Oncology*, 17, 735-749).

Раковые заболевания или опухоли, которые можно лечить

Описанные в изобретении фармацевтические композиции и продукты, наборы или комбинированный препарат могут использоваться для лечения рака у субъекта.

Термины "рак", "раковый" или "злокачественный" относятся к или описывают

физиологическое состояние у млекопитающих, отличающееся в большинстве случаев нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают, например, лейкоз, лимфому, бластому, карциному и саркому. Конкретные примеры таких заболеваний включают хроническую миелоидную лейкемию, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с филадельфийской хромосомой (Ph+ ALL), плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак яичника, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак простаты, рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак головы и шеи, герминогенные опухоли, детскую саркому, синоназальную опухоль (sinonasal natural killer), множественную миелому, острый миелоцитарный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз, мастоцитоз и любые симптомы, связанные с мастоцитозом.

"Лейкоз" относится к прогрессирующим, злокачественным заболеваниям органов кроветворения и, как правило, характеризуется неправильной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. В большинстве случаев лейкоз клинически классифицируют на основе (1) продолжительности и характера заболевания: острый и хронический; (2) типа затронутых клеток: миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный) или моноцитарный; и (3) увеличения или отсутствия увеличения числа аномальных клеток в крови: лейкемический или алейкемический (сублейкемический). Лейкоз включает, например, острый нелимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острую гранулоцитарную лейкемию, хроническую гранулоцитарную лейкемию, острый промиелоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, алейкемический лейкоз, лейкоцитемическую лейкемию, базофильную лейкемию, недифференцируемый лейкоз, коровий лейкоз, хроническую миелоцитарную лейкемию, поражение кожи при лейкозе, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, лейкоз ворсистых клеток, гемобластическую лейкемию, гемоцитобластическую лейкемию, гистиоцитарный лейкоз, недифференцируемый лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфолейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидную лейкемию, лимфосаркому, тучноклеточный лейкоз, мегакароцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Негели, плазмоклеточный лейкоз, плазмоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз клеток Ридера, лейкоз Шиллинга, сублейкемический лейкоз и лейкоз

недифференцированных клеток. В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает лечение хронического миелоидного лейкоза, острой лимфобластной лейкемии и/или острого лимфобластного лейкоза с филадельфийской хромосомой (Ph+ ALL).

Различные виды рака также рассматриваются в рамках изобретения, включая, но не ограничиваясь этим, следующие: карциному, включая карциному мочевого пузыря (включая прогрессирующий и метастатический рак мочевого пузыря), карциному молочной железы, толстой кишки (включая колоректальный рак), почки, печени, легкого (включая мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого и аденокарциному легкого), яичника, простаты, яичка, мочеполового тракта, лимфатической системы, прямой кишки, гортани, поджелудочной железы (включая экзокринную карциному поджелудочной железы), пищевода, желудка, желчного пузыря, шейки матки, щитовидной железы и кожи (включая плоскоклеточную карциному); гематопозитические опухоли лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз ворсистых клеток, гистиоцитарную лимфому и лимфому Беркитта; гематопозитические опухоли миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, миелоидный лейкоз и промиелоцитарный лейкоз; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы, тератокарциному; меланому, неоперабельные стадии III или IV злокачественной меланомы, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак яичника, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак простаты, рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки, рак головы и шеи, ретинобластому, рак желудка, герминогенные опухоли, рак кости, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости у взрослых; злокачественную фиброзную гистиоцитому кости у детей, саркому, детскую саркому, sinonasal natural killer, новообразования, новообразование плазматической клетки; миелодиспластический синдром; нейробластому; опухоль мужских половых клеток, внутриглазную меланому, миелодиспластические синдромы; миелодиспластические/миелопролиферативные

заболевания, синовиальную саркому. Кроме того, заболевания включают пигментную крапивницу, мастоцитозы, такие как диффузный кожный мастоцитоз, солитарная мастоцитома людей, а также мастоцитома собак, и некоторые редкие подтипы, такие как буллезный, эритродермический и телеангиэктатический мастоцитоз, мастоцитоз, связанный с гематологическим нарушением, такой как миелопролиферативный или миелодиспластический синдром, или острый лейкоз, миелопролиферативное заболевание, связанное с мастоцитозом, тучноклеточный лейкоз, в дополнение к другим видам рака. Также рассматриваются другие раковые заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, перечисленные ниже: карциному, включая карциному мочевого пузыря, уротелиальную карциному, карциному молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легкого, яичника, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, яичка, в частности семиному яичка, карциному кожи, включая плоскоклеточную карциному; гастроинтестинальные стромальные опухоли ("GIST"); гематопозитические опухоли лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лейкоз ворсистых клеток и лимфому Беркитта; гематопозитические опухоли миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелогенный лейкоз и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы, тератокарциному, устойчивые к химиотерапии несеминозные опухоли половых клеток, саркому Капоши и их метастазы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой солидную опухоль. Термин "солидная опухоль" означает, в частности, рак молочной железы, рак яичника, рак толстой кишки и в целом желудочно-кишечного тракта, рак шейки матки, рак легкого, в частности, мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого, рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак простаты или саркому Капоши.

Фармацевтические композиции и продукты, наборы или комбинированные препараты, описанные в изобретении, можно использовать для ингибирования роста солидных опухолей, уменьшения объема опухолей, предотвращения метастатического

распространения опухолей и роста или развития микрометастазов. В частности, описанные в изобретении фармацевтические композиции и продукты, наборы или комбинированные препараты пригодны для лечения пациентов с неблагоприятным прогнозом или пациентов, радиорезистентных или устойчивых к химиотерапии опухолей.

Изобретатели протестировали большое количество различных типов опухолей (включая меланому, глиобластому, карциному), существующих в виде клеточных линий, или опухолей из образцов биопсии, взятых у пациентов. Более чем 80% из них хорошо отвечало на лечение. В частности, наблюдалась эффективность в отношении следующих типов опухолей: меланомы, глиобластомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени и рака головы и шеи.

В предпочтительном варианте осуществления рак выбирают из числа меланомы, глиобластомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени и рака головы и шеи.

Режимы, дозировки и способы введения

Эффективная дозировка каждого из компонентов комбинации, использованных в комбинированном препарате изобретения, может изменяться в зависимости от конкретного используемого соединения или фармацевтической композиции, способа введения, состояния, которое следует лечить, тяжести состояния, которое подвергается лечению. Таким образом, режим дозировки комбинированного препарата изобретения выбирают в соответствии с целым рядом факторов, включая способ введения и статус пациента. Врач, клиницист или ветеринар средней квалификации может легко определить и назначить эффективное количество отдельных активных ингредиентов, необходимых для предотвращения, оказания противодействия или остановки развития состояния. Оптимальная точность достижения концентрации активных ингредиентов в пределе, обеспечивающем эффективность без токсичности, требует режима, основанного на кинетике наличия активных ингредиентов в местах-мишенях.

Эндосомолитическое средство и конъюгированная молекула Dbaits могут вводиться одним и тем же способом или разными способами. Способом введения эндосомолитического средства, предпочтительно хлорохина или гидроксихлорохина, более предпочтительно хлорохина, и/или конъюгированных молекул Dbaits может быть пероральный, парентеральный, внутривенный, внутриопухолевый, подкожный, внутричерепной, внутриартериальный, местный, ректальный, чрескожный, внутрикожный, назальный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутрикостный и т.п. В предпочтительном варианте осуществления конъюгированные молекулы Dbaits следует

вводить или инъектировать рядом с местоположением опухоли(ей), которую необходимо лечить.

В отдельном варианте осуществления эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, должно вводиться пероральным путем или внутрибрюшинным путем, предпочтительно пероральным путем, а конъюгированные молекулы Dbaits могут вводиться при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции, внутривенной инъекции или пероральным путем, более предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной или внутривенной инъекции, еще более предпочтительно посредством подкожной инъекции.

В другом отдельном варианте осуществления эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, и конъюгированные молекулы Dbaits должны вводиться при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции или пероральным путем, более предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной инъекции или пероральным путем, еще более предпочтительно пероральным путем. В случае, когда эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, и конъюгированные молекулы Dbaits вводятся совместно, чем выше количество эндосомолитического средства, предпочтительно хлорохина, тем лучше терапевтический эффект, в пределах, ограниченных его токсичностью. Преимущество совместной инъекции или локальной инъекции заключается в том, что нет необходимости согласования с фармакокинетическим профилем в плазме. В очень специальном варианте осуществления эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин, вводится пероральным путем, а конъюгированные молекулы Dbaits вводятся при помощи подкожной инъекции. Изобретатели демонстрируют исключительные результаты при использовании этой комбинации способов введения, обеспечивающей предварительную обработку хлорохином, для того, чтобы установить постоянный режим (уровень) хлорохина в плазме.

Эндосомолитическое средство, предпочтительно хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, вводится за 2 часа до и/или одновременно с и/или после конъюгированных с холестерином молекул Dbaits или молекул нуклеиновой кислоты, имеющих структуру в виде «шпильки», более предпочтительно за 2 часа до введения coDbait.

В первом предпочтительном варианте осуществления режим лечения включает

этап предварительной обработки пациента эндосомолитическим средством, предпочтительно хлорохином, до начала лечения конъюгированными с холестерином молекулами Dbaits или молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими структуру в виде «шпильки». Например, когда эндосомолитическое средство вводится близко к местоположению опухоли, которую следует лечить, (например, локальное введение), оно должно вводиться вместе или по меньшей мере или примерно за 1, 2, 3, 4 или 5 часов до введения конъюгированных молекул Dbaits или молекул нуклеиновой кислоты, имеющих структуру в виде «шпильки», предпочтительно в пределах от одного до трех часов до, более предпочтительно примерно за два часа до введения. Альтернативно, когда эндосомолитическое средство вводится системным путем, оно может быть введено задолго до введения конъюгированных молекул Dbaits или молекул нуклеиновой кислоты, имеющих структуру в виде «шпильки» и более длительно, предпочтительно в течение периода примерно от одной до трех недель до введения конъюгированных с холестерином молекул или молекул нуклеиновой кислоты, имеющих структуру в виде «шпильки», более предпочтительно в течение периода около двух недель.

Если конъюгированные с холестерином молекулы Dbaits или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие структуру в виде «шпильки» вводятся или введены, обработка эндосомолитическим средством может продолжаться в течение всего времени, пока вводятся конъюгированные с холестерином молекулы Dbaits или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие структуру в виде «шпильки». Альтернативно, обработка эндосомолитическим средством также может закончиться.

При использовании ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата в комбинации с конъюгированными молекулами Dbait и эндосомолитическим средством, ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат и конъюгированные с холестерином молекулы Dbaits могут вводиться одним и тем же способом или разными способами. Способом введения ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата может быть пероральный, парентеральный, внутривенный, внутриопухолевый, подкожный, внутричерепной, внутриартериальный, местный, ректальный, чрескожный, внутрикожный, назальный, внутримышечный, внутрикостный и тому подобный.

В отдельном варианте осуществления ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат и эндосомолитическое средство вводятся пероральным путем, одновременно, отдельно или последовательно, а конъюгированные молекулы Dbaits могут быть введены при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции или пероральным путем, предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной или внутрибрюшинной инъекции или

пероральным путем, еще более предпочтительно при помощи внутриопухолевой или подкожной инъекции.

В другом отдельном варианте осуществления ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат вводится пероральным путем, а конъюгированные молекулы Dbaits и эндосомолитическое средство могут вводиться одновременно, отдельно или последовательно при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции или пераральным путем, предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной или внутрибрюшинной инъекции или пероральным путем, еще более предпочтительно при помощи внутриопухолевой или подкожной инъекции.

В следующем варианте осуществления эндосомолитическое средство вводится пероральным путем, а конъюгированные молекулы Dbaits и ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат могут вводиться одновременно, отдельно или последовательно при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции или пераральным путем, предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной или внутрибрюшинной инъекции или пероральным путем, еще более предпочтительно при помощи внутриопухолевой или подкожной инъекции.

В дополнительном варианте осуществления ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат, эндосомолитическое средство и конъюгированные молекулы Dbaits вводятся одновременно, отдельно или последовательно при помощи внутриопухолевой инъекции, подкожной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутривенной инъекции или пераральным путем, предпочтительно при помощи внутриопухолевой, подкожной или внутрибрюшинной инъекции или пераральным путем, еще более предпочтительно при помощи внутриопухолевой или подкожной инъекции.

Эндосомолитическое средство и конъюгированные молекулы Dbaits или молекулы нуклеиновой кислоты, имеющие структуру в виде «шпильки», вводятся до и/или одновременно с и/или после облучения и/или введения ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата, более предпочтительно до и/или одновременно с облучением и/или введением ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата. Облучение и/или введение ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата осуществляется так, чтобы конъюгированные молекулы Dbaits присутствовали в опухолевых клетках, когда проводится облучение или когда ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат достигает опухолевых клеток. Врач, клиницист или ветеринар среднего уровня может установить режим, исходя из активных ингредиентов,

их кинетики наличия в местах-мишенях или их фармакокинетических профилей в плазме. Предварительные результаты показывают, что конъюгированные молекулы Dbaits остаются активными в течение одного дня. В первом предпочтительном варианте осуществления режим лечения включает этап предварительной обработки пациента эндосомолитическим средством, предпочтительно хлорохином или гидроксихлорохином, более предпочтительно хлорохином, до начала обработки конъюгированными молекулами Dbaits или молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими структуру в виде «шпильки». При этом облучение должно проводиться или должен вводиться ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат в начале обработки конъюгированными молекулами Dbaits или молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими структуру в виде «шпильки» или после обработки конъюгированными молекулами Dbaits или молекулами нуклеиновой кислоты, имеющими структуру в виде «шпильки». Например, следует применять облучение или вводить ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат через 3-24 часа после начала обработки конъюгированными молекулами Dbaits. ДНК-повреждающий противоопухолевый препарат и конъюгированные молекулы Dbaits также могут вводиться одновременно.

Если лечение радиотерапией или ДНК-повреждающим противоопухолевым препаратом началось, обработка эндосомолитическим средством и/или конъюгированными молекулами Dbaits может продолжаться в течение всего времени, пока используется радиотерапия или вводится ДНК-повреждающее противоопухолевое средство. Альтернативно, обработка эндосомолитическим средством и/или конъюгированными молекулами Dbaits также может заканчиваться.

В случае конъюгированных молекул Dbaits эффективная дозировка ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата в комбинированном препарате, наборе или продукте изобретения может варьировать в зависимости от способа введения, состояния, которое необходимо лечить, тяжести состояния, которое подвергается лечению. Таким образом, режим дозирования конъюгированных молекул Dbaits выбирают в соответствии с целым рядом факторов, включая способ введения и статус пациента. Врач, клиницист или ветеринар среднего уровня может легко определить и назначить эффективное количество конъюгированных молекул Dbaits, необходимое для предотвращения, оказания противодействия или задержки развития рака, в частности, в комбинации с выбранным лечением, повреждающим ДНК.

Например, в случае локального введения (например, при использовании внутриопухолевого или подкожного введения), эффективное количество конъюгированных молекул Dbaits составляет, по меньшей мере, 0,01 мг на 1 см³ опухоли,

предпочтительно 0,1- 40 мг на 1 см³ опухоли, наиболее предпочтительно 1 - 20 мг на 1 см³ опухоли. Эффективное количество может вводиться в виде протокола ежедневного лечения (например, 5 дней в неделю в течение 3-6 последовательных недель или 3 раза в неделю в течение 3-6 последовательных недель). Альтернативно, эффективное количество, по меньшей мере, 0,1 мг на 1 см³ опухоли, предпочтительно 0,1-40 мг на 1 см³ опухоли, наиболее предпочтительно 1-20 мг на 1 см³ опухоли, может вводиться в виде протокола еженедельного лечения в течение 3-6 последовательных недель, например. При использовании других способов введения специалист в данной области может подобрать количество, необходимое для обеспечения эффективного количества конъюгированных молекул Dbaits в опухоли, по меньшей мере, 0,01 мг на 1 см³ опухоли, предпочтительно 0,1-40 мг на 1 см³ опухоли, наиболее предпочтительно 1-20 мг на 1 см³ опухоли, в частности, в виде протокола ежедневного или еженедельного лечения. Например, для системного способа введения эффективное количество или единица дозировки конъюгированных молекул Dbaits может составлять от 0,1 до 100 мг, предпочтительно от 4 до 40 мг. Соответственно, для системного способа введения эффективное количество или единица дозировки конъюгированных молекул Dbaits может составлять от 0,06 до 0,6 мг/кг веса пациента. Разумеется, дозировка и режим могут регулироваться специалистом в данной области с учетом режима химиотерапии и/или радиотерапии.

Для эндосомолитического средства, в частности, хлорохина или гидроксихлорохина, более предпочтительно хлорохина, эффективная дозировка эндосомолитического средства, используемая в комбинированном препарате, наборе или продукте изобретения, может варьировать в зависимости от способа введения, состояния, которое необходимо лечить, тяжести состояния, которое подвергается лечению. Таким образом, режим дозировки эндосомолитического средства выбирают в соответствии с целым рядом факторов, включая способ введения и статус пациента. Врач, клиницист или ветеринар среднего уровня может легко определить и назначить эффективное количество эндосомолитического средства, необходимое для предотвращения, оказания противодействия или остановки прогрессирования рака, в частности, в комбинации с конъюгированными молекулами Dbaits и выбранным ДНК-повреждающим лечением.

В отдельном варианте осуществления, когда используется пероральный способ введения, и если известно, что выбранное эндосомолитическое средство является пригодным для лечения или предотвращения малярии, эндосомолитическое средство, в частности хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, используется в той же самой дозе и в том же режиме, как для лечения или предотвращения малярии. Например, если выбранное эндосомолитическое средство

является хлорохином или гидроксихлорохином, более предпочтительно хлорохином, хлорохин или гидроксихлорохин можно вводить в дозе 100-600 мг в день, предпочтительно 200-400 мг в день, более предпочтительно около 300 мг в день, один, два, три раза или четыре раза в неделю. В отдельном варианте осуществления, хлорохин или гидроксихлорохин могут вводиться в дозе около 100 мг в день в течение одной или двух недель или около 300 мг дважды в неделю в течение одной или двух недель.

В другом отдельном варианте осуществления, когда используется способ локального введения, например, подкожный или внутриопухолевый способ, эндосомолитическое средство, в частности хлорохин или гидроксихлорохин, более предпочтительно хлорохин, может использоваться в дозе 100-300 мг.

Для радиотерапии может использоваться любой режим радиотерапии, известный в данной области, в частности стереотаксическое облучение (например, 15 Грэй) или фракционированное облучение. Использование фракционированного облучения может быть особенно эффективным, например, облучение может применяться каждый день или каждые 2-5 дней, предпочтительно каждые 3-4 дня, в течение периода одной, двух, трех, четырех, пяти или шести недель. Облучение может составлять от 1 до 10 Грэй, предпочтительно от 2 до 5 Грэй, в частности, 2, 3, 4 или 5 Грэй. Например, может предусматриваться фракционированное облучение 15x2Грэй за шесть недель, или от 4 до 6x5Грэй за две недели. В предпочтительном варианте осуществления рассматривается протокол радиотерапии, включающий 4 облучения по 5 Грэй за две недели. Были проверены различные режимы или условия комбинированного лечения рака облучением и молекулами Dbait, что позволило продемонстрировать радиосенсибилизацию опухолей молекулами Dbait в зависимости от дозы молекул Dbait, но не от дозы облучения.

В случае химиотерапии, эффективная дозировка ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата, используемая в комбинированном препарате, наборе или продукте изобретения или в комбинации с композицией изобретения, может варьировать в зависимости от конкретного используемого ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата, способа введения, состояния, требующего лечения, тяжести состояния, которое необходимо лечить. Таким образом, режим дозирования ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата выбирают в соответствии с целым рядом факторов, включая способ введения и статус пациента. Врач, клиницист или ветеринар среднего уровня может легко определить и назначить эффективное количество ДНК-повреждающего противоопухолевого препарата, необходимое для предотвращения, оказания противодействия или остановки развития рака.

Лечение может включать один или несколько циклов, например от двух до десяти циклов, в частности, два, три, четыре или пять циклов. Циклы могут быть непрерывными или отдельными. Например, каждый цикл может отделяться периодом времени от одной до восьми недель, предпочтительно от трех до четырех недель.

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения будут раскрыты в следующем экспериментальном разделе, который следует рассматривать как иллюстративный, но не ограничивающий рамки настоящей заявки. В настоящем подробном описании приведено некоторое количество ссылок, каждая из этих приведенных ссылок включается в описание путем ссылки.

Примеры

Сравнение распределения и активности коротких ДНК (Dbait), образовавших комплекс с полиэтиленимином (PEI) или связанных с холестерином.

Исследование комплексов Dbait/вектор и поглощения клетками

Было показано, что PEI способен образовывать нековалентные межполиэлектrolитные комплексы с ДНК, олигонуклеотидами и РНК. Длинные PEI цепи являются высокоэффективными при трансфекции генов, но более цитотоксичными. Изобретатели протестировали некоторые частицы PEI, образующие комплексы с Dbait, и сравнили их активность с модифицированными Dbait, ковалентно связанными с холестерином (названные coDbait). Молекула coDbait представляла собой молекулу Dbait, ковалентно связанную с жирной цепью холестерина, который использовался без дополнительного вектора. В отношении каждого проверенного вектора главной целью изобретателей было создание композиции с наиболее гомогенным распределением размера частиц при самой высокой концентрации Dbait. Диаметр и поверхностный заряд частиц измеряли с помощью метода динамического рассеяния лазерного излучения (DLS). Используя мультимодальный анализ, изобретатели обнаружили, что разветвленный PEI (bPEI25K) со средним размером 25Kd и линейный PEI с размером 22Kd (PEI22K) или 11Kd (PEI11K) образовывал комплексы с Dbait с похожими свойствами (таблица 1).

Таблица 1. Флуоресценция и поглощение клетками созданной Dbait

Молекулы/Методы	Хлорохин (100 мг/мл)	Dbait (мкг/мл)	флуоресценция ^a x10e-6 /мкг/мл	MCC ^b 5 час	cor MCC ^c 5 час	MCC ^b 24час	cor MCC ^c 24 час
-	-		0	2,78	ND	3,2	ND
хлорохин	+		0	3,12			
Электропорация	-	1.6	6,17	8,72	1,41	10,79	1,75
Электропорация	+	16	6,17	8,6	1,39	ND	ND
Dbait	-	1.6	6	2,65	0,43	3,45	0,56
Dbait/PEI11K	-	1.6	1,92	26,46	13,78	13,26	6,91
Dbait/bPEI25K	-	1.6	3,04	51,62	16,98	57,98	19,07
Dbait/PEI22K	-	1.6	3,32	54,49	16,41	42,74	12,87
Dbait/superfect	-	1.6	6,41	220	34,32	203,78	31,79

Молекулы/Методы	Хлорохин (100 мг/мл)	Dbait (мкг/мл)	флуоресценция ^a x10e-6 /мкг/мл	MCC ^b 5 час	cor MCC ^c 5 час	MCC ^b 24час	cor MCC ^c 24 час
Dbait/superfect + CQ	+	1.6	6,41	218	34,01	ND	ND
coDbait	-	1.6	3,47	10,02	2,89	ND	ND
coDbait + CQ	+	1.6	3,47	20,71	5,97	ND	ND
coDbait	-	16	3,47	65,74	18,95	64	18,44
coDbait + CQ	+	16	3,47	236,43	68,14	214,3	61,76
coDbait	-	32	3,47	145	41,79	ND	ND
coDbait + CQ	+	32	3,47	390,38	112,50	ND	ND

флуоресценция при FL2 значении; ^bMCC= среднее клеточное содержимое FL2 значение (>3 экспериментов); ^ccor MCC= скорректированное клеточное содержимое FL2/флуоресценция

Были проверены различные соотношения PEI на Dbait. Самое низкое соотношение, приводящее к 100% образованию комплекса Dbait, было определено с помощью метода сдвига геля (gel shift assay). Для дальнейших исследований были выбраны соотношения N/P 6, 6 и 9, соответственно для PEI11K, PEI22K и bPEI25K. Комплексные частицы Dbait-PEI были пригодны в течение 1 часа в сахарозе 10%. Высокооднородная структура сферических частиц в популяции (с размером в пределах от 125 до 140 нм) была подтверждена с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (фиг. 1А). Присутствие соли в буфере для разведения с концентрацией, превышающей 0,8 мг/мл, или длительное хранение, вызывало агрегацию PEI комплексов. Комплексы Superfect (60 мкг Superfect/мкг Dbait), дающие более крупные и полидисперсные агрегаты (>2 мкм), использовали в качестве положительного контроля. Незаряженный амфифильный сополимер Lutrol не образовывал устойчивого взаимодействующего комплекса с Dbait и был использован в качестве отрицательного контроля в некоторых экспериментах.

Изобретатели контролировали поглощение клетками различных комплексов с помощью флуоресцентной су3-модифицированной Dbait. Исходную флуоресценцию комплекса су3-Dbait измеряли непосредственно перед трансфекцией. В комплексах PEI флуоресценция Dbait была в 2-3 раза понижена, показывая, что уплотнение молекул с PEI может тушить флуоресценцию (таблица 1). Молекулы coDbait также были менее флуоресцентными, чем «голые» Dbait, показывая, что холестерин может взаимодействовать с цианином на той же самой молекуле. Superfect или Lutrol не влияли на флуоресценцию. Клеточное содержимое трансфицированных фибробластов человека измеряли методом проточной цитометрии. Распределение флуоресценции клеток, обработанных «голыми» Dbait или смесью Dbait-Lutrol, не отличалось от необработанного контроля, указывая, что молекулы Dbait не входят в клетки спонтанно. Электропорация была относительно неэффективной, а увеличивающаяся концентрация Dbait не улучшала эффективность трансфекции. Все поликатионные полимеры (PEI и superfect)

содействовали эффективному поглощению клетками, однако линейные PEI показали более широкое распределение, чем Dbait/superfect или комплексы Dbait/PEIb25K. Молекулы соDbait входили в клетки без помощи факторов трансфекции, но с эффективностью в 10 раз более низкой, чем Dbait/PEI. Увеличение в 10-15 раз концентрации соDbait обеспечивало возможность эффективной трансфекции (фиг. 1B).

Одним ограничением эффективности переноса ДНК является удержание в эндосомах, которое предотвращает взаимодействие с мишенью или транскрибирование. В клетке ДНК должна избежать обычных эндосомальных путей, приводящих к деградации. Следовательно, эффективность доставки ДНК коррелирует не только с поглощением клетками, но также с дестабилизацией и избеганием эндосом. Известно, что PEI имеет высокую буферную емкость, которая облегчает высвобождение ДНК из эндосом и лизосом (“гипотеза протонной губки”). В противоположность этому, соDbait будут нуждаться в помощи фузогенных средств, таких как хлорохин (CQ), для эффективного высвобождения из эндосом. Чтобы улучшить эффективность трансфекции, мы добавили 100 мкМ CQ к клеткам за полчаса до трансфекции. CQ увеличивал в 2-4 раза поглощение клетками соDbait (фиг. 1). Количество Dbait, высвобожденное из клеток, отслеживали посредством активации DNA-ПКcs, запускаемой связыванием с молекулами Dbait (Quanz et al., 2009, *выше*). Добавление холестерина не влияло на способность Dbait активировать очищенную DNA-ПК (фиг. 2A). В клетке активацию DNA-ПКcs контролировали с помощью количества фосфорилирования H2AX, которое, как было показано, является строго зависимым от DNA-ПК. И Dbait/PEI и соDbait индуцировали фосфорилирование H2AX в обработанных клетках (фиг. 2B). Разветвленные и линейные комплексы PEI/Dbait оперативно содействовали фосфорилированию H2AX (фиг. 2C), которое достигало максимума через 6 часов после начала трансфекции и не прекращалось через 24 часа после трансфекции. Киназная активность, индуцированная Dbait, была очень низкой после электропорации в любое время (фиг. 2). Высокие концентрации соDbait были очень неэффективными для фосфорилированного H2AX, и требовалось, по меньшей мере, 24 часа для достижения максимального значения. Добавление CQ во время трансфекции увеличивало активацию DNA-ПКcs в соDbait-трансфицированных клетках до значения, наблюдаемого при использовании в 10 раз меньшего количества Dbait/PEI (фиг. 2C). CQ не увеличивал активность в Dbait/PEI-трансфицированных клетках, указывая, что Dbait эффективно высвобождается из эндосом, когда он образует комплекс с PEI. Так как поглощение клетками соDbait не увеличивалось между 5 часами и 24 часами после трансфекции, медленная активация DNA-ПК соDbait показывает его медленное высвобождение из эндосом.

Поглощение клетками и общая токсичность на ранних эмбрионах данио

Исследование поглощения и активности Dbait на культуре клеток не позволяет делать заключение о диффузии лекарственного средства, поглощении клетками и активности в целом организме. Оценку этих вопросов изобретатели осуществляли с помощью введения Dbait-су3, или «голых» или с адьювантом, в межклеточное пространство 1000-клеточной стадии (стадия 1К) эмбрионов данио (Kimmel et al., 1995, *Dev Dyn* **203**:253-310). Этот протокол дает возможность наблюдения *in vivo* с помощью конфокальной микроскопии распределения Dbait-су3 на клеточном и субклеточном уровне, а также их активности на быстро делящихся клетках эмбриона данио. «Голые» Dbait-су3, инъецированные в анимальный полюс эмбрионов на стадии 1К, быстро распространяются по всей бластодерме и больше не обнаруживаются через 15 минут после инъекции. Добавление Lutrol позволило удерживать Dbait во внеклеточном пространстве вокруг точки инъекции, но не способствовало поглощению клетками. В присутствии Superfect или PEI наблюдались многочисленные флуоресцентные «очажки» внутри клеток, показывающие эффективное поглощение клетками. соDbait су3 показали другой тип поведения - сильное и устойчивое окрашивание плазматических мембран вместе с «очажками» внутриклеточной флуоресценции. Инкубация эмбрионов с CQ до введения трансформировала большие флуоресцентные «очажки» соDbait в диффузное внутриклеточное распространение.

Исследование фенотипических результатов через 20 часов после инъекции позволило оценить активность Dbait и общую токсичность обработки. Флуоресценцию Dbait обнаруживали через 24 часа после инъекции в клетках головы личинки (фиг. 3A-C), которые согласно карте зачатков развития данио (Woo et al., 1995, *Curr Opin Genet Dev* **5**:439-443) происходят из инъецированного участка на анимальном полюсе эмбриона на стадии перед гастрულიей. Введение Dbait без адьюванта (NA) или в комбинации с Lutrol (Lu) показало отсутствие воздействия на развитие (фиг. 3D), коррелируя с плохим внутриклеточным поглощением Dbait, описанным выше. Добавление адьюванта приводило к гибели клеток в голове и корреляции с инъецированным объемом, можно было наблюдать обширную гибель клеток и тератогенез. Через 24 часа фенотипы были классифицированы, как описано (фиг. 3), позволяя количественно определять токсичность инъецированной смеси. При одной и той же концентрации Dbait возникли явные различия в показателях гибели клеток и развития аномалий, зависящие от адьюванта. Добавление Superfect (sup) было очень токсичным для эмбриональных клеток, а обширная смерть клеток на ранних стадиях приводила в результате к высокому проценту фенотипов 2 типа. Подобным образом, добавление PEI (25K, 22K, 11K) оказалось токсичным для

бластомеров данио. Введение соDbait приводило к значительной гибели клеток, хотя было менее эффективным, чем добавление PEI. Предварительная инкубация эмбрионов с CQ не увеличивала токсичность значительно. В целом, оценка гибели ранних эмбриональных клеток и последующих аномалий, связанных с развитием, является быстрым и надежным способом оценки общей токсичности Dbait +/-адыювант на эмбрионах данио. Корреляция клеточной гибели с поглощением клетками означает, что противоопухолевая активность Dbait в клетках эмбриона играет важную роль в токсическом воздействии.

Местная и системная токсичность у мышей

Для оценки сопоставимости результатов, полученных на культуре клеток, эмбрионах данио и на мышах, изобретатели исследовали толерантность (переносимость) кожи бестимусных мышей к повторному введению Dbait/PEI1K, Dbait/PEI22K, Dbait/bPEI25K, и соDbait. Токсичность различных Dbait проанализировали после 3 ежедневных подкожных (SC) инъекций. Все Dbait/PEI показали высокую токсичность при инъекциях, причем они были переносимы при дозе 3,75 мг/кг, но, начиная с дозы 5 мг/кг, вызывали местное воспаление, связанное с локальным некрозом и ишемией, которые быстро исчезали при прекращении лечения. Токсичность при внутривенной инъекции (IV) давала сходные результаты: внутривенные инъекции Dbait/PEI были летальными при дозе 3 мг/кг, причем смерть происходила во время инъекции, возможно в результате закупорки кровотока. Медленное введение при помощи перфузии (0,4 мкл/мин) увеличивало переносимость до 6 мг/кг Dbait/PEI (6 нмоль/инъекцию), подтверждая, что самая большая токсичность при IV является результатом локальной концентрации в месте болюсной инъекции. соDbait с или без CQ не показали какой-либо токсичности во всех проверенных дозах (до 800 мг/кг/инъекцию; 800 нмоль/инъекцию) вне зависимости от способа введения: SC, IV болюсной инъекции или IV перфузии.

Противоопухолевая активность на ксенотрансплантатах опухолей

Противоопухолевое действие созданных молекул Dbait было проверено в комбинации с радиотерапией на ксенографтах SK28 меланомы человека. Комплексы Dbait/вектор вводили за 5 часов до каждого облучения с помощью внутриопухолевых инъекций.

Хотя введение лекарственных средств при помощи внутриопухолевой инъекции (IT) использовалось во многих исследованиях, в настоящее время рекомендовано избегать этого способа доставки в клинических исследованиях. Изобретатели изучили, как Dbait/PEI1k или соDbait могут быть введены посредством подкожной инъекции (SC) в участок рядом с опухолью. В некоторых клинических испытаниях этот способ введения успешно использовался. Сначала изобретатели сравнили диффузию молекул в опухолях,

которые лечили с помощью одной внутриопухолевой инъекции или двух подкожных инъекций, осуществленных на противоположных сторонах опухоли (фиг. 4). Комплекс, образованный флуоресцентными Dbait с PEI11k, имеет склонность к образованию агрегатов в месте инъекции и неуклонно распространяется к границе опухоли. В противоположность этому, coDbait показали более равномерное распределение вокруг инъекции или внутри опухоли или около нее. SC инъекции Dbait/PEI11k или coDbait были немного менее эффективными, чем IT инъекции, в отношении контроля роста опухоли (таблица 2). Однако, увеличение количества мест инъекций должно позволить значительно улучшить контроль за ростом опухоли без увеличения локальной токсичности.

Таблица 2. Выживаемость мышей с ксенотрансплантатами после облучения на фоне различных вариантов лечения

комплексы Dbait/вектор	Dbait концентрация	Способ введения ^a	Кол-во мышей	Излеченные мыши ^b	Среднее время выживания	Относительный риск (р значение)	Среднее TGD	SD TGD	Среднее % TGD ^c
Mock	-	IT	79	2	72	-	11	15	160
Dbait	6 x 60мкг (3 нмоль)	IT	6	0	63	1.40 (p<0.41)	3	8	114
Dbait/PEI11k	6 x 60мкг (3 нмоль)	IT	38	3	123	0.26 (p<2.69.10-8)	>40	27	313
Dbait/PEI22k	6 x 60мкг (3 нмоль)	IT	10	2	>150	0.09 (p<4.62.10-6)	>63	40	436
Dbait/PEIb25k	6 x 60мкг (3 нмоль)	IT	19	4	>150	0.13 (p<3.73.10-8)	>60	35	419
Dbait/Lutrol	6 x 60мкг (3 нмоль)	IT	10	0	72	1.2 (p<0.56)	5	5	128
Dbait/PEI11k	6 x 150мкг (7.5 нмоль)	SC	12	0	135	0.34 (p<1.05.10-3)	22	15	216
CQ	-	IT	6	0	68	-	8	6	142
coDbait+CQ	6 x 600мкг (30нмоль)	IT	13	0	98	0.23 (p<4.02.10-4)	42	25	323
coDbait+CQ	6 x 1.2мг (60нмоль)	SC	16	0	101	0.22 (p<1.05.10-3)	>22	23	218

^a способ введения: IT, внутриопухолевый; SC, подкожный

^b излеченные мыши – это животные без рецидива в пределах 300 дней после лечения

^c TGD, вычисление и статистический анализ описаны в разделе Материалы и Методы SD –среднеквадратическое отклонение (прим. переводчика)

Была исследована выживаемость пяти групп бестимусных мышей с ксенотрансплантатами меланомы SK28. Группа 1) нелеченные мыши (n=16); группа 2) облученные мыши (IR, n=12); группа 3) облученные мыши с внутрибрюшинным введением 1мг хлорохина (CQ, IR, n= 10); группа 4) мыши, леченные внутриопухолевой инъекцией 0,6 мг DT01 (также называемые coDbait) и через 5 часов облученные (DT01, IR, n=11); и группа 5) мыши, предварительно леченные внутрибрюшинной инъекцией 1 мг

хлорохина за 2 часа до внутриопухолевой инъекции 0,6 мг DT01 (также называемые voDbait) и через 5 часов облученные (DT01, CQ, IR, n=13).

Результаты представлены на фиг. 5.

При внутриопухолевом введении 0,6 мг соDbait предварительная обработка хлорохином вызывала существенную радиосенсибилизацию и увеличивала выживаемость (группа 5) по сравнению с радиотерапией отдельно (группа 2), тогда как ни соDbait (группа 4) ни CQ (группа 3) не показали значительной радиосенсибилизации. Степень радиосенсибилизации группы 5 была сходна с полученной при лечении 0,06 мг Dbait, заключенными в состав с полиэтиленгликолем (PEG) при соотношении N/P=6.

Режим введения, основанный на подкожной инъекции соDbait, также был оценен на бестимусных мышцах с ксенотрансплантатом SK28 меланомы. Этот режим схематически представлен на фиг. 6. Коротко, этот режим включает четыре комбинированных лечения соDbait и облучением за две недели. В частности, 4 мг соDbait подкожно вводили в двух противоположных точках на расстоянии 5 мм от границы опухоли. Кроме того, животных предварительно лечили 1 мг хлорохина (CQ) и дополнительно лечили CQ в той же самой дозировке во время лечения соDbait и облучения. Рост опухоли оценивали после этого режима введения, результаты показаны на фиг. 6.

Было показано, что самый низкий рост опухоли наблюдался при комбинированном лечении соDbait и облучением с хлорохином, после предварительной обработки хлорохином. Кроме того, в группе, которую совместно лечили хлорохином, были получены более однородные результаты, чем в группе без обработки хлорохином.

Заключение

В настоящем исследовании изобретатели использовали набор методов, чтобы разработать протоколы введения и приготовления лекарственного средства. Эти методы анализа обеспечили возможность сравнения различных композиций Dbait до проведения предклинических исследований на мышцах. Исследования на клетках и эмбрионах данио использовали для оценки эффективности поглощения клетками Dbait, необходимого предварительного условия для воздействия противоопухолевого лекарственного средства, и для подбора наиболее подходящих протоколов и композиций для предклинических исследований на млекопитающих. Общая токсичность на эмбрионах данио не коррелировала с токсичностью на коже мышей или после системного введения. В частности, высокая токсичность соDbait на эмбрионах данио показала, что большая часть клеток, контактировавших с лекарственным препаратом погибла, в то время как кожа мышей не показала какой-либо реакции на инъекции высоких доз соDbait. Это отличие

означает, что токсичность на ранних эмбрионах данио является индикатором чувствительности опухоли, а не чувствительности здоровой ткани. На самом деле, было показано, что молекулы Dbait являются специфически токсичными для опухолей, но не для нормальной кожи (Quanz et al., 2009, *выше*). Dbait/PEI (5 мкМ) и соDbait (50 мкМ) + CQ, инициировавшие сопоставимую активацию DNA-РКcs в культуре клеток, оказывали похожее токсическое действие на эмбрионы данио (фиг. 3D) и проявляли значительную противоопухолевую активность на опухолях мышей (таблица 2, фиг. 5 и 6). Это наблюдение находится в соответствии с чувствительностью к противоопухолевой активности клеток эмбрионов данио, которые имеют общие характерные свойства с опухолевыми клетками, включая митотический индекс и биохимические и фенотипические особенности. В соответствии с этой гипотезой изобретатели недавно продемонстрировали антипролиферативную активность Dbait с помощью прямой внутриклеточной инъекции «голых» Dbait в бластомеры данио на стадии между 1 и 16-клетками.

Из числа всех проверенных адьювантных молекул PEI полимеры были наиболее эффективными при формировании комплексов Dbait. Однако, их использование было ограничено токсичностью на ткани, а также кровеносную систему. Локальная токсичность частично преодолевалась медленным введением (перфузией) и разделением вводимых доз введением в разных местах. Однако, ковалентная комбинация холестерина и Dbait обеспечила самую лучшую возможность доставки Dbait в клетки без добавления адьюванта. Действительно, отсутствие токсичности в пределах проверенных доз означает, что эта молекула может найти себе применение, несмотря на самые высокие дозы, необходимые для противоопухолевого действия. Дозы 3 нмоль и 30 нмоль на инъекцию, соответственно Dbait/PEI11K и соDbait, удваивали задержку роста опухоли, вызванную только облучением. Соответствующая токсичность обеих композиций (6 нмоль и >800нмоль) давала относительный показатель эффективная доза/токсичная доза 0,5 для Dbait/PEI11K и < 0,037 для соDbait, указывая, что соDbait является очень хорошим кандидатом для клинических испытаний.

Материалы и методы

Dbait и образование частиц

Молекулы Dbait и соDbait были получены с помощью автоматического твердофазного олигонуклеотидного синтеза и куплены у компании Eurogentec (Seraing, Бельгия) или Agilent Technologies Nucleic Acid Solution Division (Boulder, США) как описано ранее (Quanz et al., 2009, *выше*). Молекулы были очищены с помощью денатурирующей обращенно-фазовой ВЭЖХ и/или ионообменной ВЭЖХ. Некоторые

производные Dbait были помечены флуорофорами Cy3 (λ возбуждения = 540 нм; λ излучения = 560 нм) или Cy5.5 (λ возбуждения = X нм; λ излучения = X нм). Использовали линейные PEI (11kDa и 22kDa) от Polyplus-Transfection (Illkirch, Франция), предоставляемые в виде готовых для использования растворов с концентрацией азота 300 мМ. Разветвленные bPEI25kd были куплены у SIGMA-Aldrich (Saint Quentin, Франция). Lutrol был куплен у In Cell Art (Nantes, Франция). Dbait и PEI растворы (стоковый PEI) разводили в 10% сахарозе или 150 мМ NaCl (для in vitro экспериментов с трансфекцией) для получения разных соотношений вектор/Dbait. Отношение PEI/Dbait (или отношение N/P) определяли в соответствии с количеством аминного азота для PEI и фосфата для Dbait. Как правило, 300 мкл комплексов при 0,6 мг/мл и N/P 6, Dbait (180 мкг, 0,54 мкмоль фосфата) и необходимое количество раствора полимера (11,4 мкл PEI стокового раствора содержит 0,3 мкмоль аминного азота) каждый разводили в 150 мкл (10% сахароза). Superfect/Dbait частицы подготавливали согласно производителю (Qiagen, Courtaboeuf, Франция) в соотношении 10 мкл Superfect на мкг ДНК. Комплексообразование вектор/Dbait исследовали с помощью электрофореза в агарозном геле. Образцы (18 мкл) смешивали с красителем бромфеноловым синим (1 мкл) и затем загружали на 1,5% агарозный гель в камеру для электрофореза, содержащую TAE буфер 1X (40мМ трис-ацетат; pH 8,3; 1 мМ EDTA). Электрофорез проходил при 100 вольт за 30 минут. Затем гель окрашивали бромистым этидием (EtBr) в течение 15 минут и полосы исследовали при УФ свете.

Культура клеток, молекулы Dbait и трансфекция

Молекулы Dbait получали с помощью автоматического твердофазного олигонуклеотидного синтеза. Последовательность представляет собой 5'-GCTGTGCCCAACAACCCAGCAAACAAGCCTAGA-(H)-TCTAGGCTTGTTTGCTGGGTTGTGGGCACAGC (SEQ ID № 4), где H представляет собой линкер гексаэтиленгликоль. Исследования на культуре клеток проводились на SV40 трансформированных фибробластах MRC-5. Клетки выращивали при 37°C в монослойных культурах в полной среде DMEM (Gibco, Cergy Pontoise, Франция) с 10% FCS и антибиотиками (100 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл пенициллина) в условиях 100% влажности, 95% воздуха и 5% CO₂. Если не указано иначе, трансфекции проводили в 1,2мл среды MEM без сыворотки в чашках диаметром 60 мм. Трансфекцию с jetPEI (Polyplus-transfection, Illkirch, Франция) проводили при отношении N/P 6 в соответствии с инструкциями производителя. Коротко, Dbait разводили в 150 мМ NaCl и осторожно смешивали с равным объемом PEI в 150мМ NaCl и добавляли к среде DMEM без сыворотки. соDbait непосредственно добавляли к среде DMEM без сыворотки. Трансфекцию молекул Dbait осуществляли с помощью реактива Superfect в 1,2 мл среды

DMEM без сыворотки (в чашках диаметром 60 мм) в течение 5 часов, а затем клеткам давали возможность восстановиться в течение 1 часа, если не указано иначе. Для электропорации $1,2 \times 10^6$ клеток было трансфицировано 2 мкг Dbait с использованием Gene Pulser II (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Франция). В конце 5 часовой трансфекции (точка времени ноль), среду заменяли полной средой, и клетки росли в течение указанного времени до проведения исследования. Хлорохин (50 мкМ) добавляли за 30 мин до трансфекции.

Проточная цитометрия

Клетки трансфицировали разным комплексом с Dbait-су3 в течение 5 часов и давали им расти 5 часов или 24 часа, быстро промытые PBS клетки непосредственно исследовали методом проточной цитометрии. Для обнаружения иммунофлуоресценции с помощью проточной цитометрии клетки фиксировали в 2% параформальдегиде в течение 10 минут до иммунологического анализа. Следует отметить, что пермеабиллизация удаляла большую часть Dbait, ухудшая обнаружение иммунофлуоресценции и обнаружение Dbait в тех же самых клетках. Клетки фиксировали в течение 15 мин в 4% формальдегиде, пермеабиллизировали 0,2% Тритон X-100 в течение 1 часа, блокировали 2% BSA и инкубировали с первичным антителом в течение 2 часов на льду вместе с мышинными моноклональными антителами анти γ -H2AX (Upstate Biotechnology, Temecula, Калифорния, США) и обнаруживали с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, Орегон, США), техасским красным (Rockland, Gilbertsville, Пенсильвания, США) при разведении 1/200 в течение 30 мин при RT (комнатной температуре). Клетки промыли PBS и ресуспендировали в PBS вместе с 50 мкг/мл йодистого пропидия, 25U/мл РНК-азыА. Клетки исследовали на проточном цитометре FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, Нью-Джерси, США) и данные анализировали с помощью BD CellQuest Pro (BD Biosciences) и программного обеспечения WinMDI 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, Калифорния, США).

Исследование на эмбрионах данио

Икру данио получали от естественного нереста рыб дикого типа или трансгенных (*β actin:egfp-ras*) линий рыб. Чтобы осуществить введение Dbait на клеточной стадии 1К, использовали микроманипулятор Narishige (MN 153), закрепленный на dissecting scope, с эпифлуоресцентным освещением (Leica MZ16F) и воздушным инжектором (Eppendorf FemtoJet). С помощью вертикального приспособления для вытягивания пипеток КорF (КорF 720) вытягивали стеклянные капилляры (Harvard Apparatus GC100-10), чтобы сделать инъекционные иглы. От 2 до 5 нл раствора Dbait инъецировали в анимальный полюс эмбрионов на 10 клеточном цикле, немедленно обрабатывали для визуализации с

помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (upright Leica SP2) с водным объективом 40x/0.8 NA. Изображение получали одновременно при 480нм (eGFP) и 561 нм (су3) возбуждения. Затем эмбрионы росли при 28,5°C до 24 hpf. Однодневную личинку наблюдали при dissecting stop и фенотипы распределяли по категориям, как описано на фиг. 3. Обработка хлорохином до инъекции заключалась в 2 часах инкубации в эмбриональной среде (The Zebrafish Book) с 50 мкМ хлорохина. Dbait (coDbait)-су3 50 мкМ вводили или отдельно или в комбинации с PEI25K (отношение N/P=9), PEI11K (отношение N/P=6), Superfect (10 мкл/1 мкг Dbait).

Лечение мышей Dbait и облучением

Ксенотрансплантаты опухолей SK28 или U87G были получены путем инъектирования 10^6 клеток опухоли в бок взрослых самок бестимусных мышей (штамм Charles River; L'arbresle, Франция). Животных содержали в лаборатории, по меньшей мере, в течение одной недели до начала экспериментов. Содержали по 5-6 животных в клетке в условиях контролируемого цикла день-ночь (12час:12час) при относительной влажности 55% и температуре 21°C. Пища и водопроводная вода были доступны для животных в свободном режиме. Приблизительно через 12 дней, когда подкожные опухоли достигали размера 150–200 мм³, животных разбили на однородные группы (самое большее по 12 в каждой) для проведения разных вариантов лечения. Облучение проводилось изотопами цезия ¹³⁷Cs (0,5 Грэй/мин), при этом использовали защитный экран для защиты двух третей тела животного. Дозы контролировали с помощью термолюминесцентной дозиметрии. Общую дозу 30 Грэй доставляли за 6 сеансов с интервалами, три сеанса по 5 Грэй за неделю в течение двух недель. Молекулы Dbait приготавливали в 100 мкл 10% сахарозы, как описано ранее для исследований in vitro, за исключением того, что смесь PEI получали без использования NaCl (Polyplus Transfection, Strasbourg, Франция). Смеси Dbait инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре перед введением. CoDbait разводили в 10% сахарозе до необходимой концентрации. Внутриопухолевые инъекции указанного количества Dbait выполняли за 5 часов до каждого сеанса радиотерапии. «Ложное лечение» животных осуществляли с помощью введения 100 мкл 10% глюкозы в соответствии с протоколом соответствующих исследований. Размер опухоли оценивали, проводя измерения штангенциркулем каждые три дня и вычисляя размер по формуле (2 x длина x ширина²). Каждую неделю мышей взвешивали и делали снимки опухолей. По этическим причинам животных забивали, когда размер их опухолей достигал 2 000 мм³. Эта конечная точка считалась днем смерти при анализе выживаемости. Местный комитет по этике экспериментирования на животных (Orsay, Франция) утвердил проведение всех экспериментов.

Статистический анализ

Дескриптивный анализ ответа опухоли проводили для каждого вида лечения и каждого типа опухоли. День 1 был днем первого сеанса лечения. За всеми животными наблюдали, по меньшей мере, 150 дней. Медиану продолжительности жизни оценивали по методу Каплана-Мейера. Задержку роста опухоли (TGD) вычисляли вычитанием среднего объема опухоли, умноженного на четыре, контрольной группы из объема опухоли, умноженного на четыре, отдельной мыши в каждой леченой группе. Среднее значение TGD было вычислено для каждой леченой группы с использованием индивидуальных измерений. Кривые общей выживаемости оценивали по методу Каплана-Мейера и сравнивали при помощи непараметрического логрангового критерия (LogRank test), так как данные не подчинялись нормальному распределению. Анализ проводили с помощью программного обеспечения statEL (ad Science, Париж, Франция). Общий LogRank был сначала проведен для каждой группы с одинаковым типом опухоли. Затем варианты лечения с помощью Dbait сравнили с «ложнолеченым» контролем. Количество животных (n), относительный риск (RR) и значение p представлены в таблице 2. Все тесты считались значимыми при уровне значимости 0,05.

Физико-химические свойства созданных частиц Dbait

Размер частиц вектор/Dbait определяли при помощи динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zetasizer nano series, (Malvern instruments, Париж, Франция) при следующих параметрах: средняя вязкость: 1.150 cP, рефракционный индекс: 1.45, угол рассеяния: 90°, температура: 25°C. Данные являются средним значением 3-5 измерений на образец, при этом каждое измерение усредняет данные 10-15 подсерий. Данные были проанализированы с помощью дистрибутивного программного обеспечения. Для измерения дзета-потенциала частицы разводили в 10% сахарозе/10 mM NaCl с получением окончательной концентрации Dbait 0,1 мг/мл и измеряли при следующих условиях: 3 измерения, средняя вязкость: 1.054 cP, средняя диэлектрическая постоянная: 79, температура: 25°C.

Катионные полимеры	Отношение ^a (вес/вес)	Размер ^b (нм)	Дзета ^c (мВ)	Pdl	[C] _{max} (мг/мл)	поставщик
Superfect	-	>1000	-	1	nd	Qiagen
бPEI25K	2,1	175±51	+ 40	0,11	1,5	Sigma-Aldrich
PEI22K	1,4	133±25	+ 46	0,17	1.0	Polyplus Transfection
PEI11k	1,4	125±13	+ 30	< 0.2	0,8	Polyplus Transfection

^a весовое соотношение, при котором наблюдается максимальная активность Dbait

^b Средний диаметр (+/- SD), определенный с помощью динамического рассеяния света (см. дополнительно Материалы и Методы).

^c Частицы в сахарозе 1%, 10mM NaCl

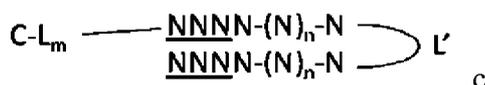
Трансмиссионная электронная микроскопия

Образцы для трансмиссионной электронной микроскопии подготавливали негативным окрашиванием уранилацетатом. Каплю образца (10 мкл) размещали на сетке (200-ячеечная медная сетка с подложкой формвар/углерод, AGAR scientific) и оставляли на 3 минуты до удаления избытка жидкости с помощью фильтровальной бумаги. Затем комплексы окрашивали 10 мкл водного уранилацетата (2%) в течение 2 мин и избыток удалили с помощью фильтровальной бумаги. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа Jeol JEM-100S.

Альтернативные конъюгированные молекулы Dbaits

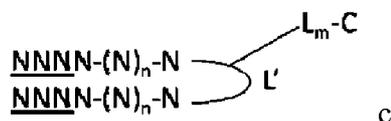
Были получены альтернативные конъюгированные молекулы Dbaits, описанные ниже:

Конъюгированные молекулы формулы (IIe)



Соединение	C-Lm	L'	Измеренная масса (MALDI-TOF)
0902	Холестерин-триэтиленгликоль	гексаэтиленгликоль	20830,5
0903	1,2-ди-(9Z-октадеценил)-сн-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[4-(p-фенил-3-((6-фосфогексилтио)-сукцинимидо))бутирамид]-	гексаэтиленгликоль	21306,9
0904	N-октадецил-гексилтиоамид-	гексаэтиленгликоль	20411,6
0905	N-гексил- фолиевая кислота-амид-	гексаэтиленгликоль	20739.2

Конъюгированные молекулы формулы (IIe)



Соединение	C-Lm	L'	Измеренная масса (MALDI-TOF)
0813	Холестерин-триэтиленгликоль	N-(5-гидроксиметил-6-фосфогексил)-11-(3-(6- фосфогексилтио) сукцинимидо))ундекамид	21127,7
0815	Холестерин-дигексилсульфид	1,3-бис[5-гидроксипентиламидо]пропил-2-(6-фосфогексил)	21454,0

Активность этих альтернативных конъюгированных молекул Dbait's измеряли за счет использования ингибирования DNA-ПК, как подробно описано выше (фиг. 7). Согласно наблюдениям конъюгированные молекулы сохраняют свою активность. В частности, конъюгация различных липидов и лиганда или на 5' конце или в петле оказывает небольшое воздействие на способность этих молекул инициировать активность DNA-ПК.

Кроме того, их активность также была определена на линиях клеток, с хлорохином или без хлорохина, методом определения количества фосфорилирования H2AX, как подробно описано выше (фиг. 8). В первую очередь, в отношении проверенных конъюгированных молекул Dbait's было отмечено, что их активность является более высокой в сочетании с предварительной обработкой хлорохином. В дополнение к этому, было отмечено, что конъюгация холестерина к 5' концу неожиданно дает в результате более эффективные молекулы, чем конъюгация холестерина в петле «шпильки» (см. 0902 в сравнении с 0813 и 0815).

Поглощение клетками конъюгированных молекул Dbait's

Поглощение клетками Dbait, конъюгированных с холестерином, в частности CoDbait, в сравнении с Dbait, изобретатели измеряли методом проточной цитометрии.

Результаты представлены в следующей таблице.

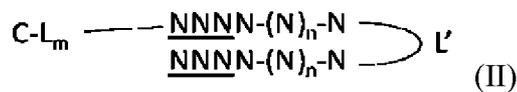
Условия трансфекции	интенсивность флуоресценции @ 5 часов	
	медиана	среднее
Dbait-Cy3 79 нМ	3	3
Dbait-Cy3 79 нМ + Superfect	426	327
CoDbait-Cy3 79 нМ	10	10
CoDbait-Cy3 79 нМ + CQ 50 мкМ	20	21
CoDbait-Cy3 986 нМ	63	66
CoDbait-Cy3 986 нМ + CQ 50 мкМ	239	236
Co_si RNA_H2AX-Cy3 79 нМ	53	56
Co_si RNA_H2AX-Cy3 79 нМ + CQ 50 мкМ	60	63
Co_si RNA_H2AX-Cy3 986 нМ	661	710
Co_si RNA_H2AX-Cy3 986 нМ+ CQ 50 мкМ	1144	1214

Исследование поглощения клетками линии MRC5 с помощью проточной цитометрии проводили через 5 часов после начала воздействия разных условий трансфекции, как описано в таблице. Все олигонуклеотиды были помечены красителем цианином 3 (Cy3): Dbait (Dbait-Cy3), холестерин-Dbait (0813)(CoDbait-Cy3) и siRNA, нацеленные на H2AX, с цианином 3 и с холестерином на 5' и 3' кодирующей нити (Co_siRNA_H2AX: Cy3-5'-CAACAAGAAGACGCGAAUCTT-3'-холестерин (SEQ D № 6);

5'-GAUUCGCGUCUUCUUGUUGTT-3' (SEQ ID № 7). Когда указано, 50 мкМ хлорохина (CQ) было добавлено до трансфекции.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, имеющую, по меньшей мере, один свободный конец и двухцепочечный участок ДНК, состоящий из 20-200 п.о. с менее, чем 80% идентичностью последовательности к любому гену в геноме человека, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты является ковалентно связанной с молекулой, способствующей эндоцитозу, выбранной из липофильной молекулы или лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, опосредующий эндоцитоз, и хинолиновое эндосомолитическое средство, в которой эта конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет формулу



где N представляет собой нуклеотид, n является целым числом от 15 до 195, неподчеркнутое N относится к нуклеотиду, имеющему или не имеющему модифицированный фосфодиэфирный остов, L' представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из 1,19-бис(фосфо)-8-гидраза-2-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; m представляет собой целое число равное 1, L представляет собой карбоксамидо-олигоэтилен гликоль, C выбран из группы, состоящей из одноцепочечных или двухцепочечных жирных кислот, таких как октодециловая и диолеиловая, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахаридов, пептидов, таких как RGD и бомбезина, и белка, такого как интегрин, предпочтительно диолеила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина, более предпочтительно холестерина.

2. Продукт, содержащий конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в п. 1, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты является ковалентно связанной с молекулой, способствующей эндоцитозу, выбранной из липофильной молекулы или лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, опосредующий эндоцитоз, и хинолиновое эндосомолитическое средство, в виде комбинированного препарата для одновременного, совместного или последовательного использования.

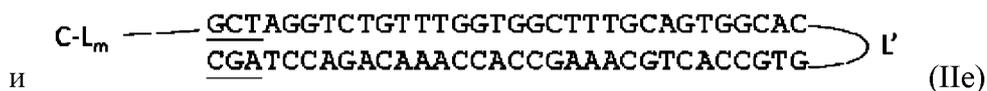
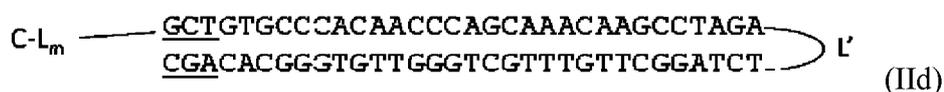
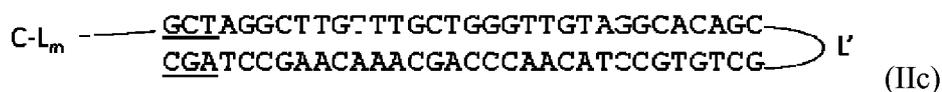
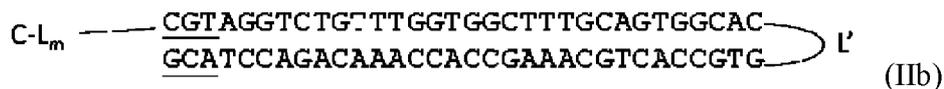
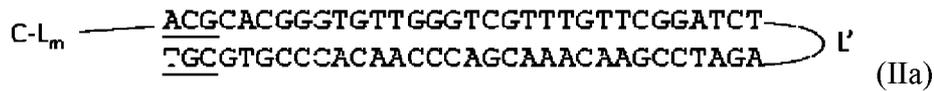
3. Продукт по п. 2, в котором хинолиновое эндосомолитическое средство вводится до и/или одновременно с конъюгированной молекулой нуклеиновой кислоты.

4. Продукт по п. 2 или 3, в котором хинолиновое эндосомолитическое средство вводится в качестве предварительной обработки, по меньшей мере, за одну неделю пероральным путем, а затем вводятся конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты и

хинолиновое эндосомолитическое средство в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного использования.

5. Композиция или продукт по любому из пунктов 1-4, где n равен 27.

6. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-5, в которых конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет одну из следующих формул:



где эти неподчеркнутые нуклеотиды относятся к нуклеотидам имеющим или не имеющим фосфоротиоатный или метилфосфонатный остов, L' выбран из группы, состоящей из 1,19-бис(фосфо)-8-гидраза-2-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; m представляет собой целое число равное 1, L представляет собой карбоксамидо-олигоэтилен гликоль, C выбран из группы, состоящей из одноцепочечных или двухцепочечных жирных кислот, таких как октодециловая и диолеиловая, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахаридов, пептидов, таких как RGD и бомбезина, и белка, такого как интегрин, предпочтительно диолеила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина, более предпочтительно холестерина.

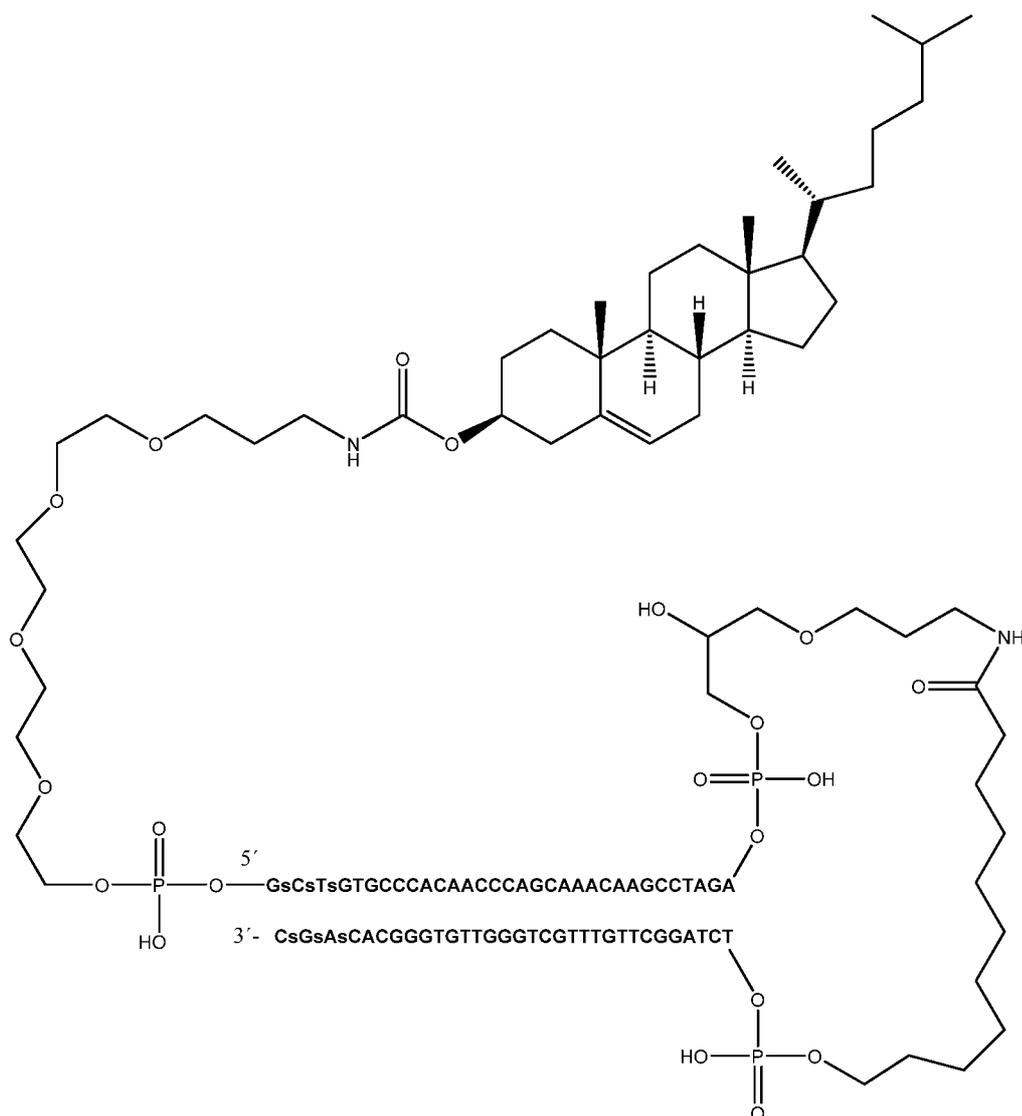
7. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-6, дополнительно содержащие повреждающее ДНК противоопухолевое средство.

8. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-7, в которых хинолиновое эндосомолитическое средство представляет собой хлорохин или гидроксихлорохин, предпочтительно хлорохин.

9. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-8, в которых молекула, способствующая эндоцитозу выбрана из группы, состоящей из токоферола и холестерина.

10. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-9, в которых молекула, способствующая эндоцитозу представляет собой холестерин.

11. Композиция или продукт по любому из п.п. 1-10, в которых конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет формулу



где неподчеркнутые нуклеотиды относятся к нуклеотидам, имеющим фосфоротиоатный остов.

12. Применение композиции или продукта по любому из п.п. 1-11 для производства медикамента для лечения рака.

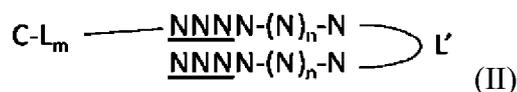
13. Применение по п. 12, при котором лечение дополнительно включает радиотерапию или химиотерапию, предпочтительно в сочетании с повреждающим ДНК противоопухолевым средством.

14. Применение по п. 13, при котором повреждающее ДНК противоопухолевое средство выбирают из группы, состоящей из ингибитора топоизомеразы I или II, ДНК-кросслинкера, препарата, алкилирующего ДНК, антиметаболического препарата и ингибиторов митотического веретена.

15. Композиция или продукт по любому из пунктов 1-8, отличающиеся тем, что хинолиновое эндосомолитическое средство представляет собой хлорохин или

гидроксихлорохин, предпочтительно хлорохин.

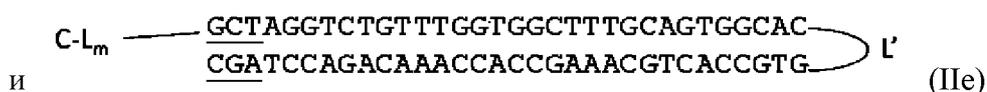
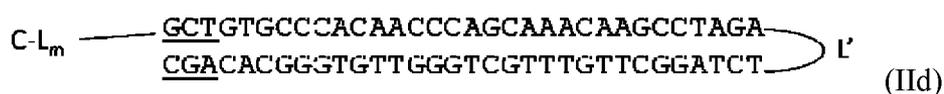
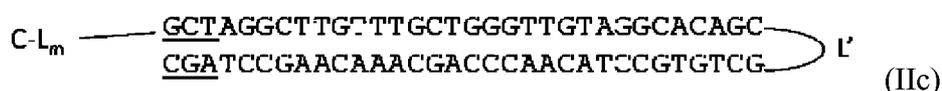
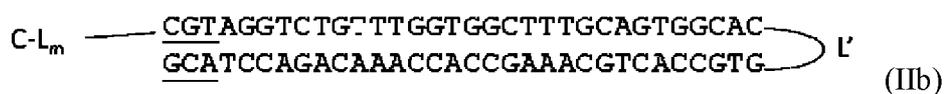
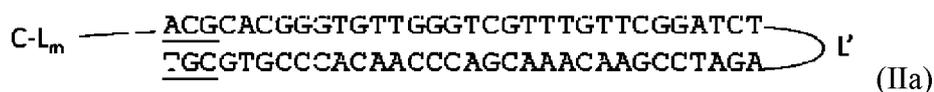
16. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты, имеющая следующую формулу:



где N представляет собой нуклеотид, n является целым числом от 15 до 195, неподчеркнутое N относится к нуклеотиду, имеющему или не имеющему модифицированный фосфодиэфирный остов, L' представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из 1,19-бис(фосфо)-8-гидраза-2-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; m представляет собой целое число равное 1, L представляет собой карбоксамидо-олигоэтилен гликоль, C выбран из группы, состоящей из одноцепочечных или двухцепочечных жирных кислот, таких как октодециловая и диолеиловая, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахаридов, пептидов, таких как RGD и бомбезина, и белка, такого как интегрин, предпочтительно диолеила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина, более предпочтительно холестерина.

17. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 16, в которой n равно 27.

18. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 16 или 17, имеющая одну из следующих формул:

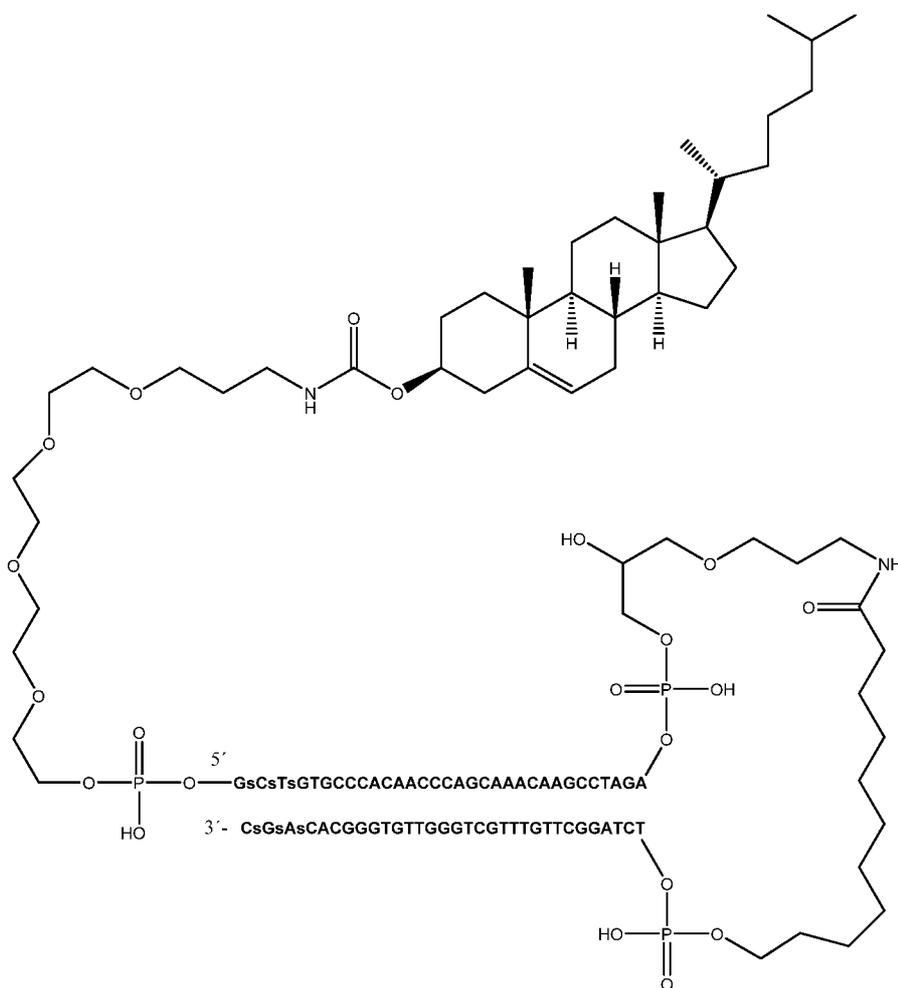


где эти неподчеркнутые нуклеотиды относятся к нуклеотидам имеющим или не имеющим фосфоротиоатный или метилфосфонатный остов, L' выбран из группы, состоящей из 1,19-бис(фосфо)-8-гидраза-2-гидрокси-4-окса-9-оксо-нонадекана; m

представляет собой целое число равное 1, L представляет собой карбоксамидо-олигоэтилен гликоль, С выбран из группы, состоящей из одноцепочечных или двухцепочечных жирных кислот, таких как октодециловая и диолеиловая, токоферола, фолатов или фолиевой кислоты, холестерина, сахара, такого как галактоза и манноза и их олигосахаридов, пептидов, таких как RGD и бомбезина, и белка, такого как интегрин, предпочтительно диолеила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина, более предпочтительно холестерина.

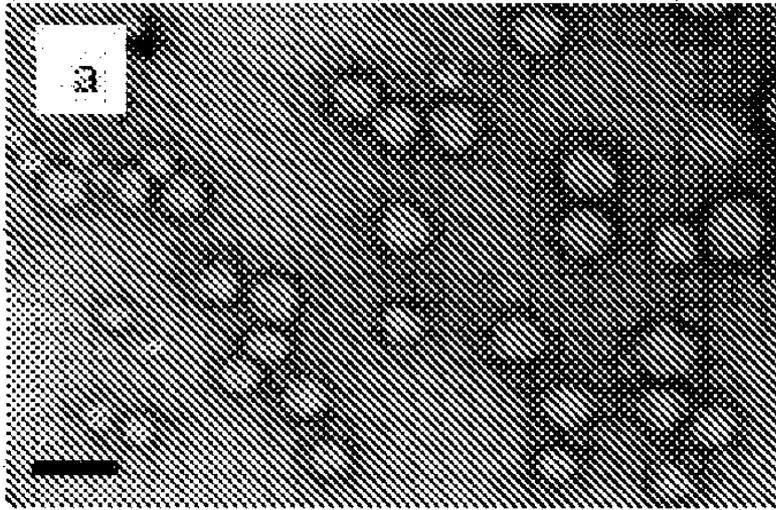
19. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 16-18, где молекула, способствующая эндоцитозу выбрана из группы, состоящей из токоферола и холестерина.

20. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 16-19, имеющая формулу

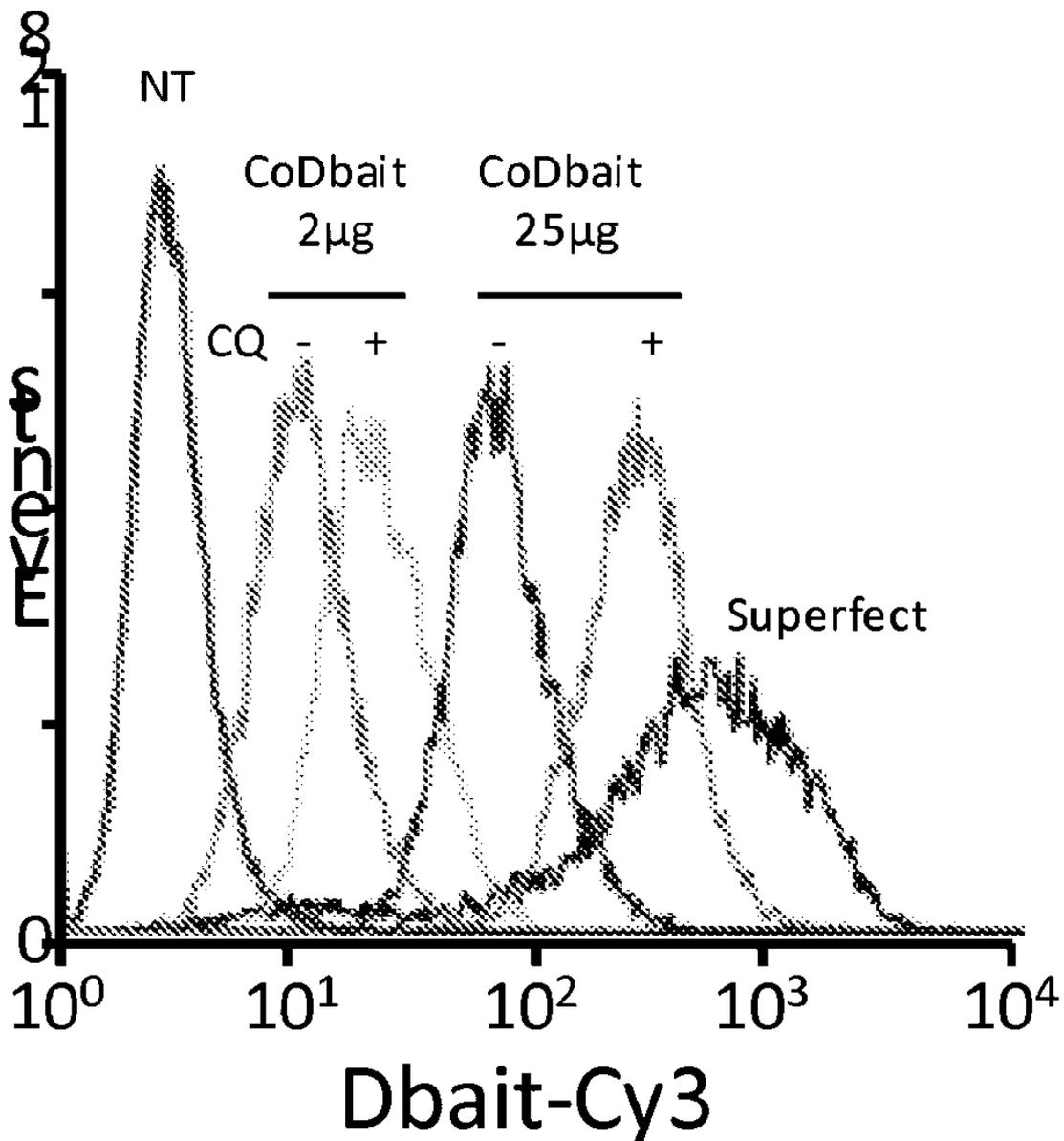


где неподчеркнутые нуклеотиды относятся к нуклеотидам, имеющим фосфоротиоатный остов.

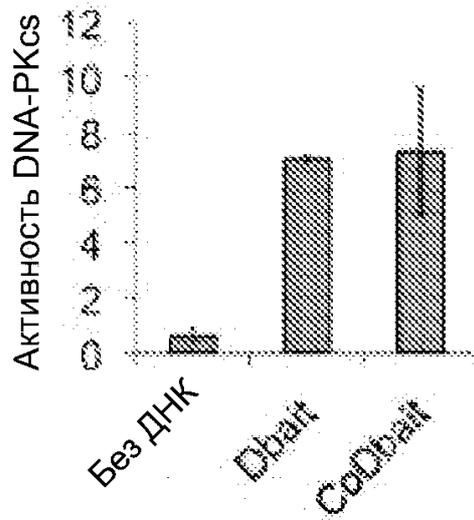
Фиг. 1А



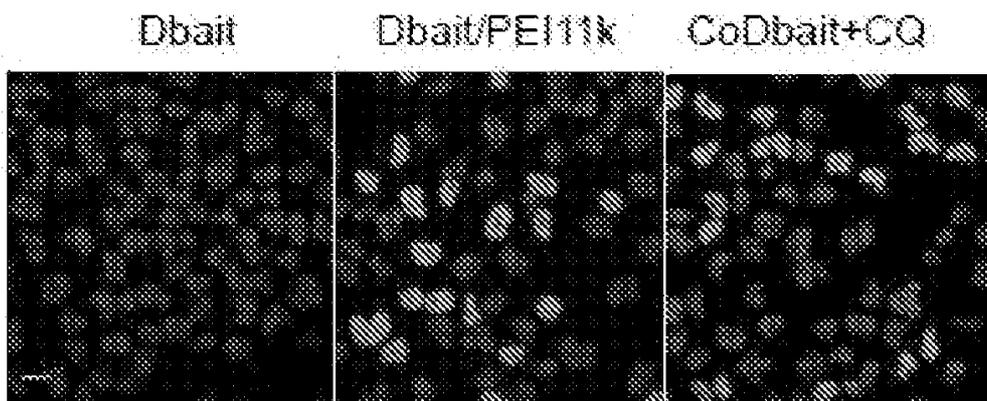
Фиг. 1В



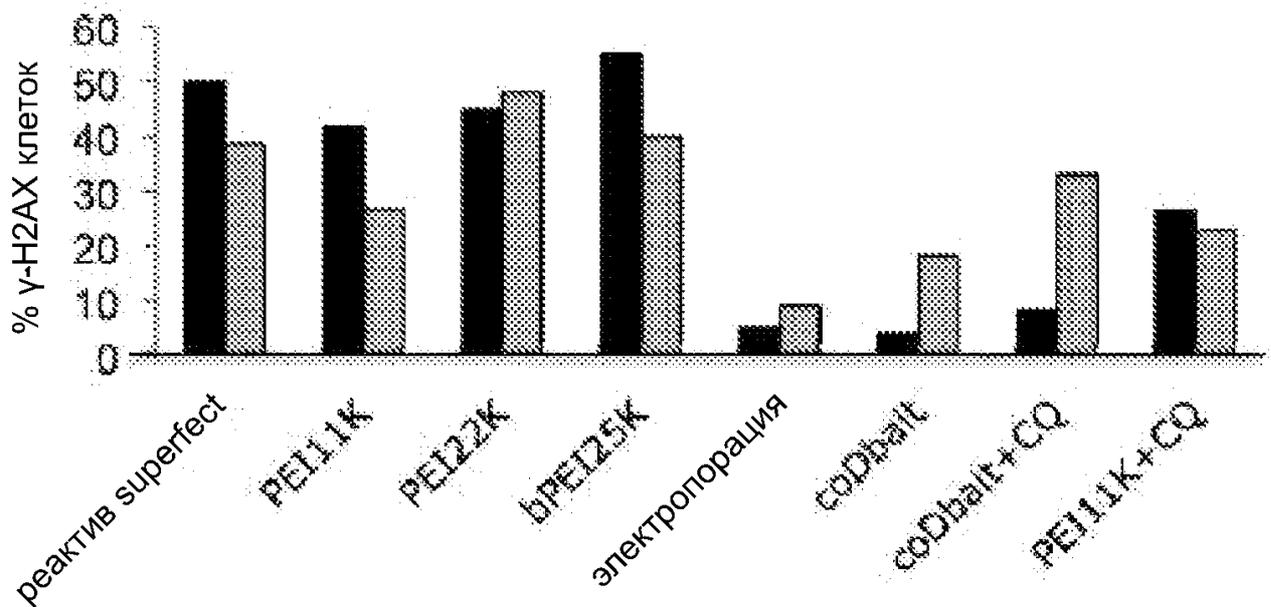
Фиг. 2А



Фиг. 2В



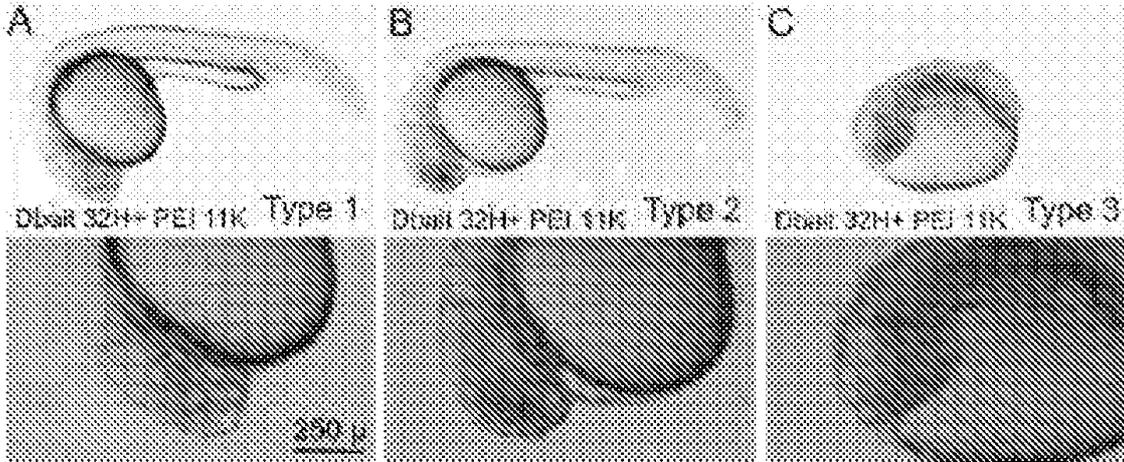
Фиг. 2С



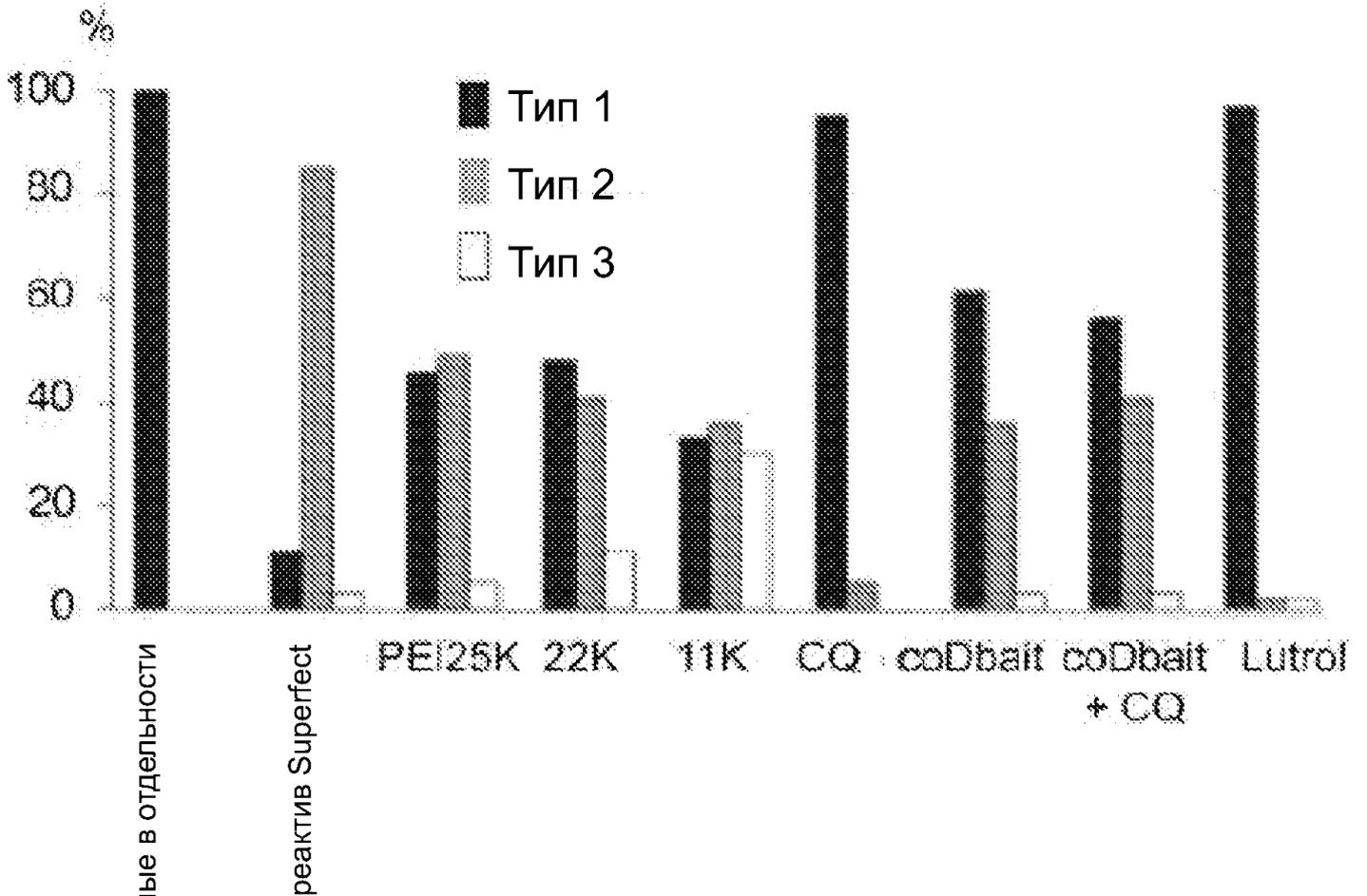
Фиг. 3А

Фиг. 3В

Фиг. 3С



Фиг. 3D



NA: Dbait, введенные в отдельности

реактив Suprefect

PEI25K

22K

11K

CQ

coDbait

coDbait

+ CQ

Lutrol

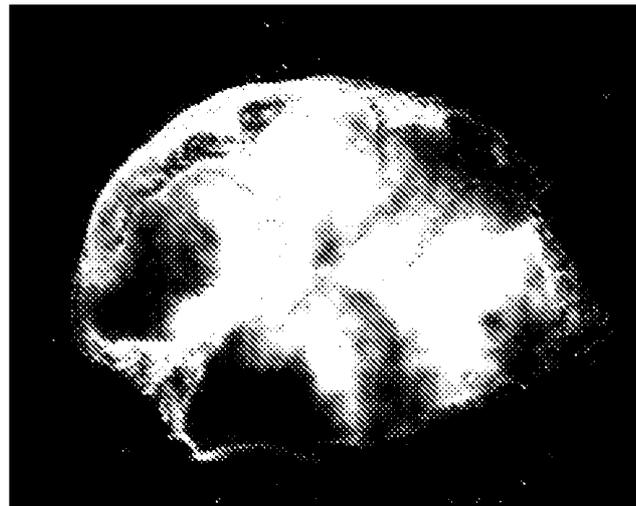
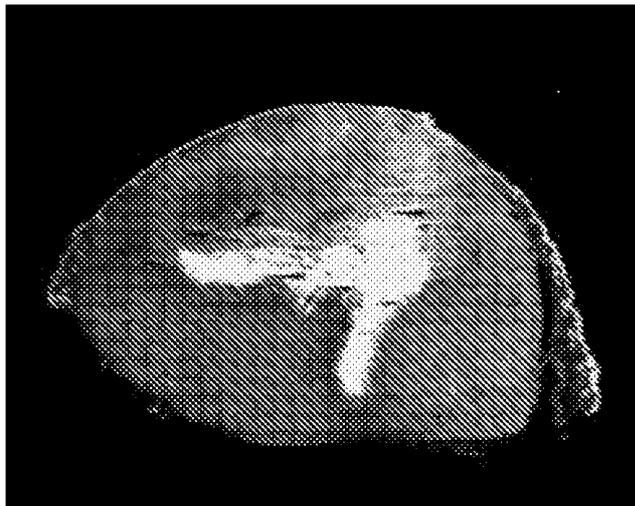
Фиг. 4

Внутриопухолевое введение

Dbait 32Hc PEI Cy5

CoDbait Cy5.5

Су5 или Су5.5 красный

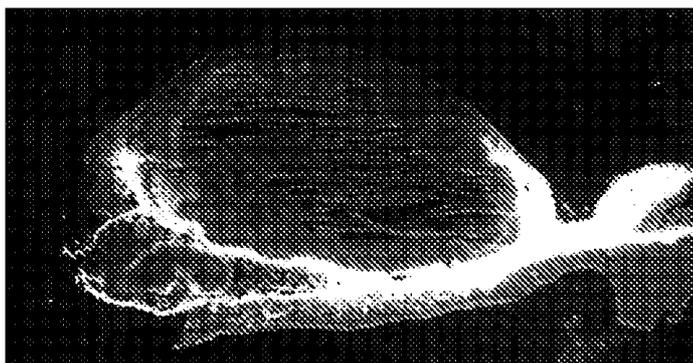
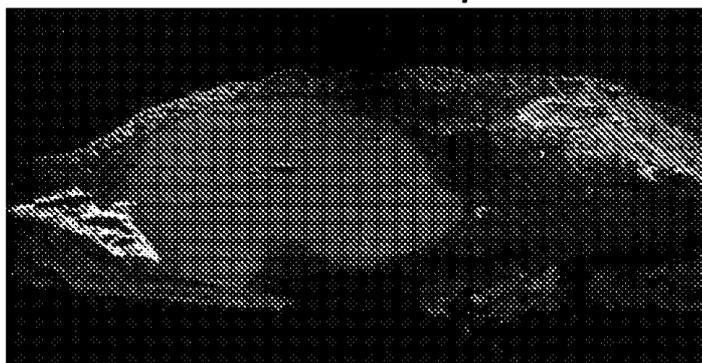


Подкожное введение в 2 точках

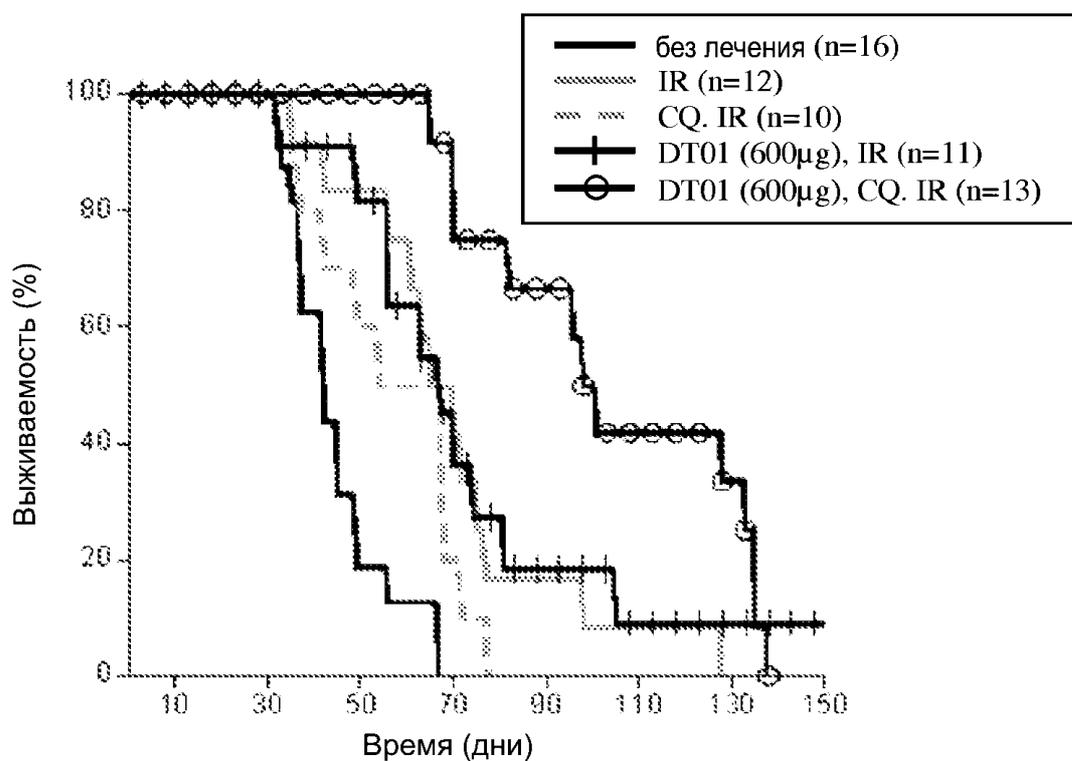
Dbait 32Hc PEI Cy5

CoDbait Cy5.5

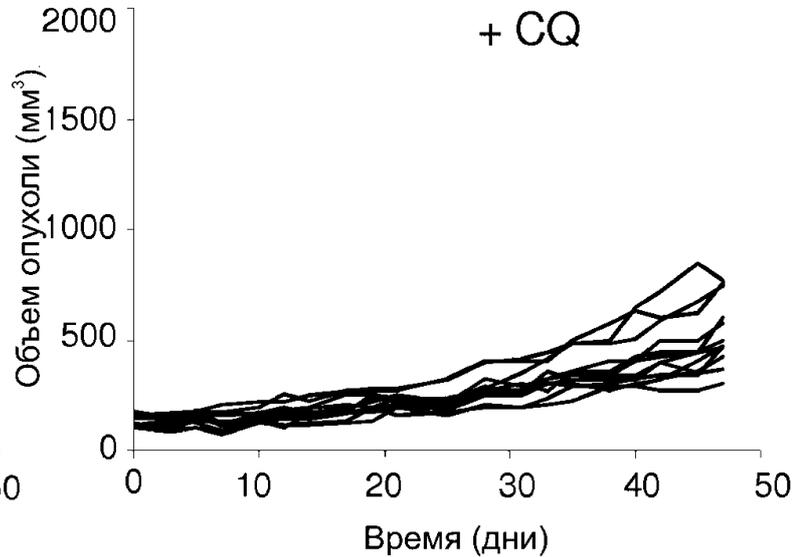
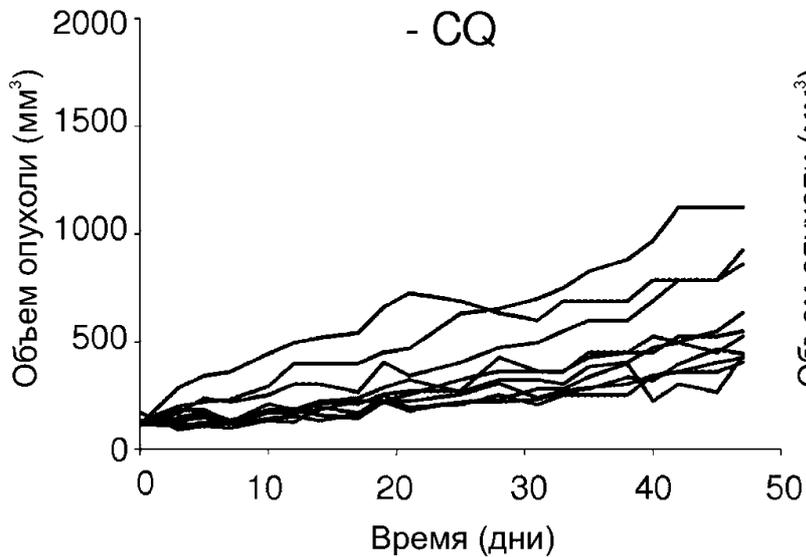
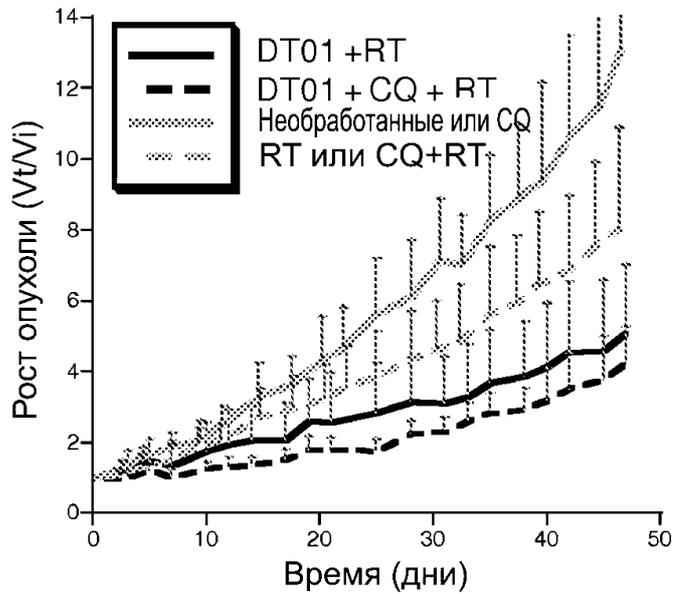
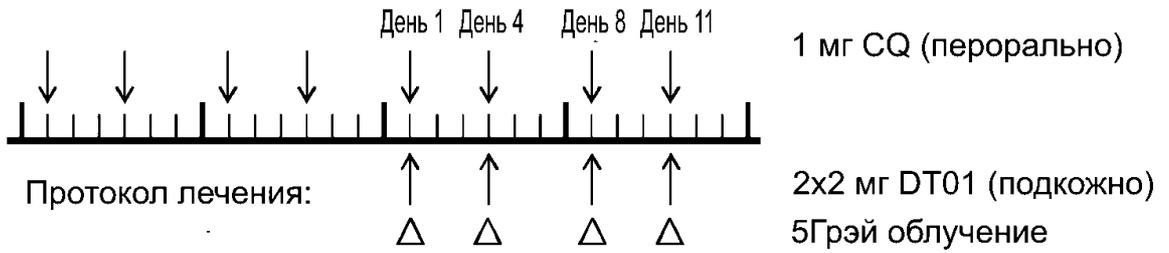
Су5 или Су5.5 красный



Фиг. 5

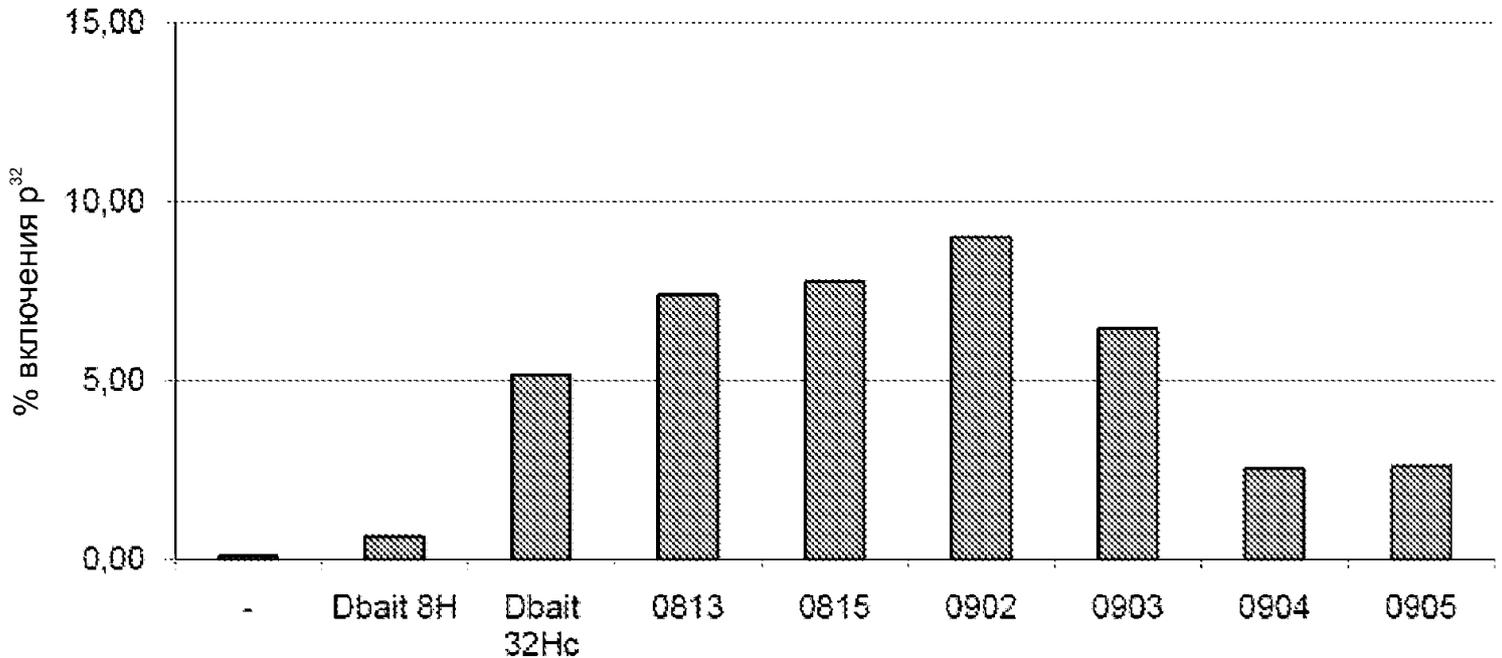


Фиг. 6



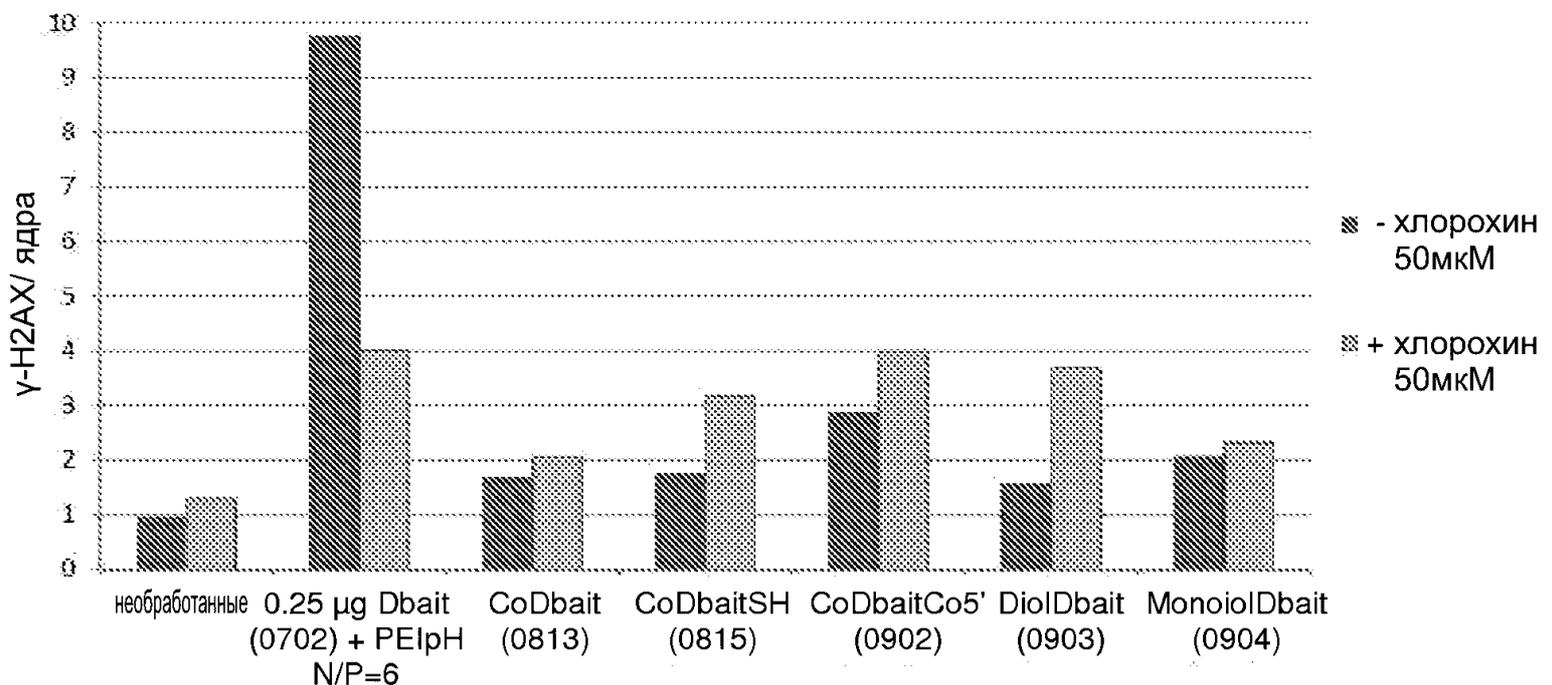
Фиг. 7

Фосфорилирование p53 DNA-ПК



Фиг. 8

Активность 6, 25 мкг CoDbait (0813), CoDbaitSH (0815), CoDbaitCo5' (0902), DiolDbait (0903) или MonoioDbait (0904) через 24 часа



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/060280

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/060280

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **1-11, 13(all partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/060280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/48
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/060499 A1 (KOSAK KENNETH M [US]) 15 March 2007 (2007-03-15) Paragraphs 18 and 19; Example 16 paragraphs 519-534. -----	1-11,13
A	CHEN Q ET AL.: "Lipophilic siRNAs mediate efficient gene silencing in oligodendrocytes with direct CNC delivery", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 144, 17 February 2010 (2010-02-17), pages 227-232, XP002601402, cited in the application Abstract; page 229 figure 1 -----	1-14
Y	US 6 420 176 B1 (LISZIEWICZ JULIANNA [US] ET AL) 16 July 2002 (2002-07-16) Column 12 line 55-column 16 line 15 -----	1-11,13
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

20 July 2011

26/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bettio, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/060280

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/32815 A1 (RATNER PAUL L [US]) 8 June 2000 (2000-06-08) Fig 1, Fig 3, page 12 lines 14-32, page39 line 24-page 40 line 8; abstract -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/060280

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2007060499	A1	15-03-2007	WO	2007040469 A2		12-04-2007
US 6420176	B1	16-07-2002	US	2002193333 A1		19-12-2002
			US	2002022034 A1		21-02-2002
WO 0032815	A1	08-06-2000	AU	1609999 A		19-06-2000

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-11, 13(all partially)

Present claims 1-10, 13 relate to an extremely large number of possible compounds, namely "a DNA double stranded portion of 20-200 bp with less than 80% sequence identity to any gene in a human genome" (present claim 1), "lipophilic molecule" (present claims 1, 2), "ligand which targets cell receptor enabling receptor mediated endocytosis" (present claims 1 and 2), "DNA damaging antitumoral agent" (present claims 5 and 7), "inhibitor of topoisomerases I or II, DNA crosslinker, DNA alkylating agent, anti-metabolic agent and inhibitors of the mitotic spindles"(present claim 8). Support and disclosure can only be found for the compounds of present claims 9 and 10 and the nucleic acid molecules of present claims 12 and 14. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). The search of claim 1-11, 13 was restricted to the compounds of present claims 9 and 10 and the nucleic acid molecules of present claims 12 and 14.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.