

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490081** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.04.04

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.23

(54) **G-КВАДРУПЛЕКС-СОДЕРЖАЩИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ**

(31) **21181596.4**

(32) **2021.06.24**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/067290**

(87) **WO 2022/269013 2022.12.29**

(71) Заявитель:

**ЙОГАНН ВОЛЬФГАНГ ГЁТЕ-
УНИВЕРСИТЕТ ФРАНКФУРТ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Киппенбергер Штефан, Штайнхорст
Катя, Цинатл Йиндрих, Бойкова
Дениса, Кёниг Вероника, Клеманн
Йоханнес (DE)**

(74) Представитель:

Нагорных И.М. (RU)

(57) Изобретение относится к молекуле олигонуклеотида длиной от 10 до 50 нуклеотидов, содержащей по меньшей мере один G-квартет-образующий мотив, содержащий от 10 до 20 нуклеотидных остатков, при этом по меньшей мере 60% указанных остатков G-квартет-образующего мотива представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина, и при этом молекула ингибирует рост опухоли и/или вирусную или бактериальную репликацию и/или оказывает противовоспалительное действие в клетках млекопитающих.

A1

202490081

202490081

A1

G-квадруплекс содержащие олигонуклеотиды для профилактического и терапевтического лечения

Область техники

Изобретение относится к молекуле олигонуклеотида согласно объекту пп. 1 и 2. Изобретение также относится к фармацевтической композиции по п. 10, набору, содержащему молекулу олигонуклеотида согласно настоящему изобретению по п. 11, и к терапевтическим применениям молекулы олигонуклеотида согласно настоящему изобретению.

Уровень техники

Опухолевые клетки часто уклоняются от иммунной защиты организма за счет экспрессии лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1). После связывания рецептора (PD1), который присутствует на поверхности Т-клеток, возникает ослабленный иммунный ответ. Ингибирование этого взаимодействия блокирующими антителами (например, пембролизумаб, Кейтруда®; нивуломаб, Опдиво®; авелумаб, Бавенσιο®) приводит к активации Т-клеток. Активированные Т-клетки опосредуют усиление аутоиммунитета, который особенно эффективен в отношении опухолевых клеток. Клиническая эффективность этого подхода была убедительно продемонстрирована в крупных исследованиях, особенно при метастатической меланоме (Robert C, Schachter J, Long GV, et al. (2015) *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med 372:2521-32; Schachter J, Ribas A, Long GV, et al. (2017) *Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006)*. Lancet 390:1853-62).

Инфекционные заболевания, такие как заболевания, вызываемые вирусами или бактериями, создают серьезные проблемы для здоровья пациентов и систем здравоохранения. Например, сезонные респираторные вирусные заболевания известны уже тысячи лет, поскольку ежегодные эпидемии обычной простуды и гриппа регулярно поражают людей, живущих в регионах с умеренным климатом, в течение зимнего сезона. Вновь

появляющиеся вирусные инфекции продолжают представлять серьезную угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. Недавно было обнаружено, что высокопатогенные вирусы птичьего гриппа типа А (H5N1), а также другие подтипы вируса птичьего гриппа типа А (H7N9, H9N2 и H7N3) ассоциированы с заболеванием человека, что вызывает обеспокоенность в отношении пандемических условий из-за потенциального распространения подтипов вируса гриппа типа А, циркулирующих среди домашних и диких птиц и домашнего скота, на людей. Тяжелый острый респираторный синдром, вызванный коронавирусом (SARS-CoV), ответственен за атипичную пневмонию, который впервые был зафиксирован в 2002 и 2003 годах в провинции Гуандун (Китай), что привело к 800 смертям во всем мире в 2003 году. Было установлено, что летучие мыши представляют собой естественный резервуар SARS-CoV-подобных вирусов. В 2012 году в Саудовской Аравии был выявлен ближневосточный респираторный синдром, вызванный коронавирусом, относящимся к той же группе коронавирусов. В конце 2019 года у пациентов в городе Ухань (Китай) возникла пневмония, ассоциированная с инфекцией SARS-CoV2, что привело к пандемии COVID-19, затронувшей миллионы людей и ставшей причиной миллионов смертей по всему миру.

Вирусы SARS-CoV принадлежат к семейству бетакоронавирусов и представляют собой вирусы с положительной одноцепочечной (оц) РНК с большим РНК-геномом размером приблизительно 30 Kb. Как и у других коронавирусов, геном SARS-CoV2 содержит 14 открытых рамок считывания (ORF), кодирующих 27 белков. ORF1 и ORF2 в 5'-концевой области генома кодируют 15 неструктурных белков, которые имеют важное значение для репликации вируса. 3'-концевая область генома кодирует структурный белок, в частности спайковый (S) белок, оболочечный (E) белок, мембранный (M) белок и нуклеокапсидный (N) белок, а также восемь различных аксессуарных белков.

Существует потребность в эффективных препаратах или вакцинах, доступных для лечения возникающих вирусных заболеваний, в частности для лечения коронавирусных инфекций. Низкомолекулярные ингибиторы могут быть легко идентифицированы из библиотек соединений. Однако их действие ограничено небольшой площадью поверхности конкретной мишени, так что изменения одной аминокислоты в мишени могут привести к значительному снижению эффективности данного низкомолекулярного ингибитора. Молекулы олигонуклеотида, которые связываются со специфическими молекулами-мишенями (“аптамеры”), могут быть выделены с использованием систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) и могут служить в качестве аффинных зондов или элементов молекулярного распознавания для диагно-

стических или терапевтических целей. Эти аптамеры представляют собой синтетические одноцепочечные ДНК или РНК, которые связываются с молекулами-мишенями с высокой аффинностью в трехмерных формах и которые широко применяются в аналитической, биоаналитической, визуализирующей, диагностической и терапевтической областях. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение потребности в эффективных лекарственных средствах для лечения заболеваний, вызванных вирусными или бактериальными инфекциями, с использованием молекул олигонуклеотида.

Раскрытие сущности изобретения

В первом аспекте изобретение относится к молекуле олигонуклеотида длиной от 10 до 50 нуклеотидов, содержащей по меньшей мере один G-квартет-образующий мотив, содержащий от 10 до 20 нуклеотидных остатков, при этом по меньшей мере 60% остатков представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина, и при этом молекула способна ингибировать вирусную или бактериальную репликацию и/или способна оказывать противовоспалительное действие в клетке млекопитающего.

Согласно изобретению под термином “молекула олигонуклеотида” подразумевается короткая молекула ДНК или РНК, также известная как олигомер. Чаще всего ДНК-олигонуклеотиды синтезируются в виде одноцепочечных молекул методом твердофазного химического синтеза и используются для искусственного синтеза генов, полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирования ДНК, молекулярного клонирования и в качестве молекулярных зондов. РНК-олигонуклеотиды встречаются в виде малых молекул РНК *in vivo*, где они участвуют в регуляции экспрессии генов (например, микроРНК) или представляют собой промежуточные продукты деградации, образуемые в результате распада более крупных молекул нуклеиновых кислот. Олигонуклеотиды, которые связываются со специфическими молекулами-мишенями, называются “аптамерами”, при этом в качестве аптамеров могут выступать молекулы олигонуклеотидов, но также и молекулы пептидов. В контексте настоящего изобретения термин “аптамер” относится к молекуле олигонуклеотида; термины “молекула олигонуклеотида” и “аптамер” используются взаимозаменяемо и к ним следует относиться как к синонимам во всей настоящей заявке.

В контексте настоящего изобретения “G-квартет-образующий мотив” представляет собой структуру нуклеиновой кислоты высшего порядка, обогащенную остатками гуанина. G-квартеты образованы из четырех G-оснований, которые связаны за счет Хугсти-

новских водородных связей с образованием плоской квадратной структуры, так что каждое G-основание образует две водородные связи со своим прилегающим G-основанием. Для образования G-квадруплекса (G4) два или более G-квартетов укладываются в стопки, образуя таким образом полиморфные структуры. Таким образом, сформированный внутримолекулярный G-квадруплекс состоит из двух основных элементов: ядра и петель, при этом ядро содержит один или несколько уложенных в стопки слоев G·G·G·G-тетрад (или G-квартетов), а петли представляют собой последовательности линкеров, соединяющие нити ядра G-тетрады. Следовательно, структуры G-квадруплекса очень полиморфны, в зависимости от относительной ориентации нитей и типов петель. В зависимости от последовательности G-обогащенных олигонуклеотидов стабильность этих G-квартетов связана с несколькими факторами, включая присутствие одновалентных катионов, таких как K⁺ и Na⁺, концентрацию присутствующих G-обогащенных олигонуклеотидов и последовательность используемых G-обогащенных олигонуклеотидов.

Молекула олигонуклеотида по изобретению способна ингибировать вирусную или бактериальную репликацию, при этом репликация вирусных или бактериальных геномов приводит к продуцированию множества копий вируса в инфицированных клетках или бактерии. Предпочтительно, молекула олигонуклеотида по изобретению направлена на вирусную или бактериальную геликазу. Геликазы представляют собой ферменты, которые разделяют нити в дуплексной нуклеиновой кислоте, обычно используя гидролиз АТФ для получения необходимой энергии. В дополнение к геликазам, которые воздействуют на двухцепочечную ДНК, некоторые геликазы разматывают ДНК-РНК или РНК-РНК-дуплексы. В отношении бактериальной репликации также предпочтительно молекула олигонуклеотида по изобретению может быть направлена на холофермент ДНК-полимеразы III бактерий, который представляет собой главный ферментативный комплекс, участвующий в репликации прокариотической ДНК. Поскольку репликация вируса в первую очередь зависит от метаболических функций клетки-хозяина, молекула олигонуклеотида по изобретению преимущественно направлена на вирусоспецифическую стадию в механизме репликации вируса и оставляет функции клетки-хозяина нетронутыми. Различные вирусные полимеразы, т.е. РНК-зависимая РНК-полимераза, РНК-зависимая ДНК-полимераза, ДНК-зависимая РНК-полимераза и ДНК-зависимые ДНК-полимеразы, играют центральную роль в вирусной репликации и транскрипции вирусного генома и обычно действуют как единый белок, способный выполнять множество функций, связанных с репликацией вируса. Также предпочтительно молекула

олигонуклеотида по изобретению, когда она используется для ингибирования репликации вируса, может быть направлена на одну или несколько вирусных полимераз.

Термин “воспаление” относится к сложной биологической ответной реакции одной или нескольких тканей на вредные раздражители, такие как, например, вирусные или бактериальные патогены. Ответная реакция служит для устранения первоначальной причины повреждения клеток с целью защиты клеток ткани. У млекопитающих острая воспалительная реакция представляет собой немедленный адаптивный ответ с ограниченной специфичностью, который обычно считается полезным. Однако он может стать пагубным при нарушении его регуляции, как, например, при септическом шоке. Воспалительный путь состоит из последовательности событий с участием индукторов, сенсоров, медиаторов и эффекторов. Под “противовоспалительным эффектом” молекулы или вещества понимаются свойства, уменьшающим воспаление, например, путем специфического взаимодействия указанной молекулы с одним или несколькими из указанных индукторов, сенсоров, медиаторов и эффекторов.

Неожиданно было обнаружено, что молекула олигонуклеотида по изобретению, в которой по меньшей мере 80% остатков представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина, проявляет сильную противовирусную или антибактериальную активность путем ингибирования репликации. Кроме того, было также обнаружено, что данная молекула проявляет противовоспалительное действие в клетках млекопитающих. Преимущественно молекулы олигонуклеотида по изобретению представляют собой короткие молекулы, которые могут быть синтезированы относительно легко методом химического синтеза и при низких затратах. По сравнению с антителами они характеризуются минимальной иммуногенностью и высокой стабильностью. Кроме того, они способны связываться с различными мишенями, содержащими органические молекулы, белки, вирусы, бактерии, целые клетки и ткани.

В другом варианте осуществления молекула олигонуклеотида согласно изобретению может представлять собой молекулу олигонуклеотида, в которой $> 70\%$ остатков представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина. Увеличение числа остатков гуанозина приводит к тому, что олигонуклеотид по изобретению демонстрирует значительное повышение противовирусной или антибактериальной активности по сравнению со скремблированными или смешанными последовательностями. Особенно предпочтительно все остатки в молекуле олигонуклеотида представляют собой остатки гуанозина.

В альтернативном варианте осуществления молекула олигонуклеотида может быть синтезирована из дезокси-нуклеотидов. Отдельный нуклеотид состоит из трех субъединиц: азотистого основания, пятиуглеродного сахара (рибозы или дезоксирибозы) и фосфатной группы, состоящей из от одного до трех фосфатов. Азотистое основание и сахарная группировка вместе образуют нуклеозид. Азотистые основания, которые используются в ДНК, представляют собой гуанин, аденин, цитозин и тимин; в РНК вместо тимина используется урацил. В РНК сахар в составе сахарофосфатного остова представляет собой рибозу, в то время как ДНК представляет собой полимер нуклеиновой кислоты, характеризующийся наличием дезоксирибозы вместо нее. Преимущественно молекула олигонуклеотида представляет собой молекулу ДНК со значительно пониженной восприимчивостью к гидролизу.

В другом предпочтительном варианте осуществления молекулы олигонуклеотида по изобретению по меньшей мере один из остатков гуанозина или дезоксигуанозина может быть химически модифицирован. Молекула олигонуклеотида представляет собой молекулу ДНК или молекулу РНК, которая может быть химически модифицирована в остове или в положении 2' сахара для достижения различных эффектов, таких как повышение аффинности и/или специфичности связывания, снижение чувствительности к деградации нуклеазами, повышение стабильности *in vivo*, увеличение периода полураспада *in vivo*, снижение подверженности к экскреции посредством почечной фильтрации. Традиционные химические модификации включают модификации концов нуклеиновых кислот, такие как кэпирование 3'-конца инвертированным тимидином и пегилирование с целью улучшения устойчивости к нуклеазам (которые сначала связываются на соответствующих концах) и почечного клиренса, соответственно. Дополнительные модификации затрагивают фосфодиэфирную связь, сахарное кольцо (замещение, например, положения 2'О рибофуранозного кольца фтор- (-F), амино- (-NH₂), азидо- (-N₃) или метокси/ОМе (-OCH₃) группами) и нуклеиновые основания (такие как, например, модификации пурина 2,6-диаминопурин, 3-дезаза-аденин, 7-дезаза-гуанин и 8-азидоаденин или модификации пиримидина 2-тио-тимидин, 5-карбоксамид-урацил, 5-метилцитозин и 5-этинил-урацил).

В особенно предпочтительном варианте осуществления молекулы олигонуклеотида химическая модификация может представлять собой модификацию фосфатного остова. Модификация фосфатного остова по существу влияет на фосфодиэфирную связь, при этом фосфатная группа изменяется путем атомных замещений, что приводит к нейтральным, анионным или катионным модификациям. Например, замена/замещение

одного или двух атомов кислорода на один или два атома серы приводит к образованию соответственно фосфоротиоатной или фосфородитиоатной групп. Замещение одного атома кислорода фосфатной группы незаряженной метильной группой приводит к образованию метилфосфатного остова. Катионная модификация подразумевает замещение одного атома кислорода на положительно заряженную группу, такую как гуанидинопропил фосфорамидат. Предпочтительно фосфодиэфирную связь молекулы олигонуклеотида замещают на метилфосфонат или аналог фосфоротиоата, так что атом О остова замещается либо метильной группой, либо один или более атомов О остова замещаются одним или более атомов серы. Предпочтительно модификация приводит к повышению устойчивости к внеклеточным или внутриклеточным нуклеазам, повышению термостабильности, повышению аффинности связывания с мишенью и/или улучшению доставки через плазматическую мембрану внутрь клетки.

Особенно предпочтительно тиофосфорильные заместители выбираются из фосфоротиоата или фосфородитиоата, при этом тиофосфорильные заместители замещают по меньшей мере 35% фосфодиэфирных связей в сахарофосфатном остове молекулы олигонуклеотида. Замещение всех фосфодиэфирных связей в олигонуклеотиде тиофосфорильными группами приводит к значительному повышению устойчивости к нуклеазе. Для получения молекул олигонуклеотида с повышенной специфичностью связывания с мишенью тиофосфорильные замещения фосфодиэфирных связей могут быть титрованы в диапазоне от 35% до полного замещения. Кроме того, путем частичного замещения и, таким образом, сохранения некоторых фосфодиэфирных связей внутри молекулы можно избежать повышенной токсичности, которая, как иногда обнаруживается, связана с полным замещением. Когда в молекуле олигонуклеотида, в которой тиофосфорильные заместители замещают по меньшей мере 35% фосфодиэфирных связей в сахарофосфатном остове, увеличивается количество остатков гуанозина, молекула олигонуклеотида по изобретению проявляет значительно повышенную противовирусную или антибактериальную активность по сравнению со скремблированными или смешанными последовательностями. Особенно предпочтительно все остатки в указанной молекуле фосфоротиоатного (РТО) олигонуклеотида представляют собой остатки гуанозина.

В дополнительном варианте осуществления молекула олигонуклеотида может содержать по меньшей мере четыре последовательных триплета остатков гуанозина или дезоксигуанозина. Было обнаружено, что молекулы олигонуклеотидов, содержащие по

меньшей мере четыре последовательных триплета остатков гуанозина, обеспечивают преимущество, заключающееся в том, что они проявляют более сильный противовирусный эффект по сравнению с более короткими молекулами олигонуклеотида, что позволяет предположить, что эффективность блокирования репликации вируса зависит от длины молекулы.

Олигонуклеотид по изобретению может преимущественно содержать последовательность, представленную в SEQ ID NO. 1–4, где SEQ ID NO. 1: 5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG -3', SEQ ID NO. 2: 5'- GGG GGG GGG GGG GG -3', SEQ ID NO. 3; 5' GGg gtc aag ctt gaG GGG Gg и SEQ ID NO4: GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG. Заглавные буквы обозначают фосфоротиоатные (PTO) связи, строчные — классические фосфодиэфирные связи. Более короткие последовательности часто связывают со слегка сниженным блокированием репликации. Олигонуклеотиды, содержащие эти последовательности, спонтанно образуют G-квартеты и G-квадруплексы (G4).

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну молекулу олигонуклеотида в сочетании с по меньшей мере одним из фармацевтически приемлемого эксципиента, носителя, адьюванта или их комбинации.

Фармацевтически приемлемый эксципиент согласно настоящему изобретению включает любые растворители, дисперсионные среды, разбавители или другие жидкие носители, вспомогательные вещества для диспергирования или суспендирования, поверхностно-активные вещества, изотонические агенты, консерванты, твердые связующие вещества и т.п., подходящие для конкретной желаемой лекарственной формы. В Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 23rd Edition, A. Adejare, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2020) раскрыты различные эксципиенты, используемые для изготовления фармацевтических композиций, и известные способы их получения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% чистым. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, используемые при изготовлении фармацевтических композиций, включают, но не ограничиваются ими, инертные разбавители, диспергирующие и/или гранулирующие агенты, поверхностно-активные вещества и/или эмульгаторы, измельчители, связующие агенты, консерванты, буферные агенты, лубриканты и/или масла.

В третьем аспекте изобретение относится к набору, содержащему по меньшей мере одну описанную выше молекулу олигонуклеотида.

В четвертом аспекте изобретение относится к вышеописанной молекуле олигонуклеотида, фармацевтической композиции или набору, содержащему молекулу олигонуклеотида, для применения при лечении заболевания, вызванного вирусной или бактериальной инфекцией, и/или связанного с ней воспаления.

В предпочтительном варианте осуществления молекула олигонуклеотида может вызывать ингибирование репликации вируса в клетке млекопитающего.

В другом предпочтительном варианте осуществления вирусная инфекция может быть вызвана вирусом, выбранным из группы, включающей вирус HS-1, вирус HCN, аденовирус, вирус Зика, вирус гепатита В или С, вирус лихорадки Западного Нила, вирус гриппа, вирус RSV, парамиксовирус, вирус ВИЧ и коронавирусы, такие как SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

В альтернативном варианте осуществления заболевание может представлять собой вирусную инфекцию дыхательных путей.

В другом варианте осуществления лечение воспаления, связанного с вирусным или бактериальным заболеванием, может быть результатом вмешательства в путь интерферона (IFN) типа I и/или IFN типа II или подавления интерлейкин-опосредованного сигналинга. В контексте настоящего изобретения интерфероны (IFN) типа I относятся к полипептидам, секретируемым инфицированными клетками. С IFN типа I ассоциированы следующие функции: индукция клеточных внутренних антимикробных состояний в инфицированных и соседних клетках с целью ограничения распространения инфекционных агентов, в частности вирусных патогенов; модуляция врожденных иммунных реакций сбалансированным образом с целью стимулирования представления антигена и функций естественных киллеров при одновременном сдерживании провоспалительных путей и выработке цитокинов; активация адаптивной иммунной системы, чтобы способствовать развитию высокоаффинных антигенспецифических T- и B-клеточных ответных реакций и иммунологической памяти. IFN типа I состоят из группы структурно сходных цитокинов и включают 13–14 подтипов IFN- α наряду с IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ , IFN- ζ и IFN- τ . Сигнал от IFN типа II, известного как IFN- γ , проводится через другой рецептор, и IFN типа II оказывает действие, независимое от IFN типа I. Сигналинг IFN- γ играет ключевую роль в защите хозяина, способствуя активации макрофагов, повышая уровень экспрессии антиген-процессирующих и представляющих молекул, стимулируя развитие и активацию Th1-клеток, усиливая активность естественных киллеров, регулируя функции B-клеток и индуцируя выработку хемокинов, которые способствуют транспортировке эффекторных клеток к местам вос-

паления. Преимущественно молекула олигонуклеотида может быть использована для лечения на различных стадиях вирусного заболевания, например, в подостром состоянии инфекции SARS-Cov2 (“постковидный синдром”).

В дополнительном варианте осуществления в молекуле олигонуклеотида, используемой для целей лечения, по меньшей мере один из остатков гуанозина или дезоксигуанозина может быть химически модифицирован, при этом химическая модификация представляет собой модификацию фосфатного остова, и при этом олигонуклеотид содержит по меньшей мере четыре последовательных триплета остатков гуанозина или дезоксигуанозина.

В альтернативном варианте осуществления молекула может быть введена фармацевтически приемлемым способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, парентерального, энтерального, офтальмологического или назального пути, или местно и их комбинаций. Местное применение включает нанесение в виде крема, пены, геля, лосьона, мази, пасты, порошка, шейк-лосьона, твердого вещества, губки, скотча, настойки, раствора для местного применения, лака для ногтей, трансдермального пластыря, пара.

Следует также отметить, что как применяется в данном документе и в формуле изобретения, формы в единственном числе включают также формы в множественном числе, до тех пор пока иное явно не следует из контекста. Например, термин “молекула олигонуклеотида” относится к одной или более молекулам олигонуклеотида, т.е. к одной молекуле олигонуклеотида и нескольким молекулам олигонуклеотида. Кроме того, предусматривается, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, это заявление предназначено для использования в качестве предшествующей основы для применения такой исключительной терминологии, как “исключительно”, “только” и т.п. в связи с раскрытием пунктов формулы или использованием “отрицательного” ограничения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники, к которому обращено описание изобретения. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы для практической реализации настоящего изобретения, ниже описаны подходящие способы и материалы. Кроме того, материалы, способы и примеры, описанные в данном документе, носят исключительно иллюстративный характер и не являются ограничивающими.

Другие признаки и преимущества изобретения станут понятны из следующего далее подробного описания и пунктов формулы изобретения и охватываются ими

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показано сравнение различных нуклеотидных последовательностей в отношении противовирусного действия в клетках рака легких человека Calu-3, инфицированных SARS-CoV-2. Продемонстрировано, что nCpG-6-PTO ингибирует инфекцию SARS-CoV-2.

На Фиг. 2 показано, что nCpG-6-PTO предотвращает репликацию SARS-CoV-2, но не оказывает влияния на проникновение вируса в клетки-мишени.

На Фиг. 3 показана зависимость противовирусной эффективности от длины молекулы, согласно которой длинные молекулы оказывали более сильное действие на вирусную инфекцию, чем более короткие.

На Фиг. 4 показано, что противовирусное действие зависит от олигодезоксирибонуклеотидного остова путем сравнения олигонуклеотидов равной длины либо с фосфодиэфирным остовом (nCpG-6-PDE), либо с фосфоротиоатным остовом (nCpG-6-PTO).

На Фиг. 5 показано сравнение эффективности nCpG-6-PTO с эффективностью известного аптамера AS1411, используемого в противораковой терапии. Используемый в анализе ингибирования вируса AS1411-PDE не проявил эффективности в отношении SARS-CoV-2; однако AS1411-PTO показал аналогичную CpG-6-PTO эффективность.

На Фиг. 6 показано, что nCpG-6-PTO полностью подавляет цитопатогенное действие, вызываемое ВПГ-1, при концентрации в диапазоне от 0,5, 1, 2, 4 мкМ.

На Фиг. 7 показано образование квадруплексных (G4) структур из nCpG-6-PTO с использованием BG4 — G4-специфичного антитела.

С помощью анализа геликазной активности продемонстрировано, что nCpG-6-PTO ингибирует геликазу SARS-CoV-2; результаты представлены на Фиг. 8.

На Фиг. 9 показано, что G4-образующий PTO-ODN (nCpG-6-PTO и AS1411-PTO) может ингибировать IFN β -опосредованные сигнальные молекулы. На Фиг. 9А схематично показан сигнальный путь интерферона типа I (из Gonzalez-Cao *et al.*, 2018). При помощи анализа методом вестерн-блот (Фиг. 9В) показано сильное снижения уровня фосфорилирования тирозина канонических сигнальных молекул p-Stat1 и pStat2 посредством nCpG-6-PTO и AS1411-PTO.

На Фиг. 10 показано, что G4-образующий PTO-ODN (nCpG-6-PTO и AS1411-PTO) ингибирует IFN γ -опосредованные сигнальные молекулы. На Фиг. 10А схематично пока-

зан сигнальный путь интерферона типа II (из Gonzalez-Cao *et al.*, 2018). При помощи анализа методом вестерн-блот (Фиг. 10В) показано сильное снижения уровня фосфорилирования тирозина канонических сигнальных молекул p-JAK2 и pStat2 посредством nCpG-6-РТО и AS1411-РТО.

На Фиг. 11 показано, что G4-образующий РТО-ODN (nCpG-6-РТО и AS1411-РТО) может ингибировать опосредованное интерлейкином 6 (IL-6) фосфорилирование STAT 3.

На Фиг. 11А схематично показан сигнальный путь IL 6 (из Jin *et al.*, 2017). При помощи анализа методом вестерн-блот (Фиг. 9В) показано сильное снижения уровня фосфорилирования тирозина Stat 3 посредством nCpG-6-РТО и AS1411-РТО. Более того, также наблюдали подавляющее действие в отношении p-Stat1.

На Фигуре 12 данные примера показывают, что nCpG-6-РТО подавляет инфицирование ВПГ-1 на модели расщепленной кожи. В дополнение к примеру 6 (Фиг. 6), в котором nCpG-6-РТО подавляет инфекцию ВПГ-1 в *in vitro* культивируемых фибробластах крайней плоти, что подтверждается снижением цитопатогенного эффекта, противовирусная эффективность также была исследована на образцах расщепленной кожи. Излишки расщепленной кожи с верхней части ноги, которые не были использованы для покрытия раны, были предоставлены из хирургического отделения. Образцы кожи помещали в ФСБ и перфорировали с помощью дермароллера (Segminismart®, Никосия, Кипр), как описано (Tajpara P, Mildner M, Schmidt R, et al. *A Preclinical Model for Studying Herpes Simplex Virus Infection*. The Journal of investigative Dermatology 139:673-82, 2019). Последовательно кожу нарезали на кусочки размером 3x3 мм. Каждый кусочек помещали в одну лунку 24-луночного планшета для МС и покрывали 500 мкл DMEM (10% FBS, 1% P/S). Образцы кожи обрабатывали 10^6 копиями ВПГ-1/мл +/- 4 мкМ nCpG-6-РТО (GQ20-РТО) в течение 2 дней (37°C). Затем образцы ткани фиксировали и разрезали на срезы толщиной 4 мкМ согласно стандартным протоколам. ВПГ-1 детектировали при помощи anti-ВПГ-1 (1:10, Invitrogen: PA1-29210) и HistoGreen (Histo Green Kit, Linaris, E109) в качестве пероксидазного субстрата.

На Фигуре 13 показано, что nCpG-6-РТО эффективен против вируса оспы обезьян.

На Фигуре 14 схематично показано действие молекул контрольной точки в онкогенезе. Вверху: антигенпредставляющие клетки активируют Т-клетки, представляя опухолевые антигены и молекулы В7. Узнавание опухолей Т-клетками приводит к продукции IFN- γ и последующему повышению уровня лигандов PD-1 на опухолевых и антигенпредставляющих клетках. Связывание PD-1 на Т-клетках с лигандами PD-1 приводит к ингибированию активации Т-клеток и, следовательно, ослаблению противоопухолевого иммун-

ного ответа. Внизу: Блокада PD-1 ниволумабом (или другим антителом, таким как пембролизумаб) обращает вспять ингибирование Т-клеток и повторно активирует противоопухолевый иммунный ответ. (взято из: Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) *Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity*. *Future Oncology* 11:1307-26). В изобретении предложен альтернативный подход к блокаде контрольной точки. Добавление G4 приводит к ингибированию IFN γ -сигнального каскада в опухолевых клетках и, следовательно, к ингибированию PD-L1.

На Фигуре 15 показана взаимосвязь между IFN γ -сигналингом и экспрессией PD-L1. IFN γ -сигналинг вызывает "ускользание от иммунного ответа" опухолевых клеток. На схеме показано, что IFN γ активирует каскад медиаторов воспаления (Jak-1, Jak-2, Stat-1), который впоследствии стимулирует экспрессию IRF-1 (регуляторный фактор интерферона 1). Фактор транскрипции IRF1 является центральным элементом промотора PD-L1. Взаимодействие PD-L1 с PD-1 приводит к ингибированию иммунного ответа (взято из: Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. (2017) *Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression*. *Cell reports* 19:1189-201).

Коронавирус SARS corona virus-2 (SARS-CoV-2), как и многие другие вирусы (например, хантавирус и эбола), вызывает массивную индукцию IFN γ , приводящую к деплеции и разрушению Т-клеток посредством экспрессии молекул контрольной точки, таких как PD-L1 и PD-L2 (Aghbash PS, Eslami N, Shamekh A, et al. (2021) *SARS-CoV-2 infection: The role of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 axis*. *Life Sci* 270:119124-). Это впоследствии приводит к снижению иммунного ответа на вирус. В связи с этим считается, что в отношении COVID-19 помимо прочего следует использовать вышеупомянутые ингибиторы контрольных точек. Однако было отмечено, что состояние онкологических больных, которым назначали ингибиторы контрольных точек, становилось более тяжелым после инфицирования SARS-CoV-2 (Robilotti EV, Babady NE, Mead PA, et al. (2020) *Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer*. *Nat Med* 26:1218-23). Возможно, это связано с побочными эффектами лекарственных препаратов (стероидов), или за это ответственны каскады цитокинов, запускаемые ингибиторами. Так, в работе Aghbash et al, 2021, подчеркивается необходимость анти-PD-1 терапии в отношении COVID-19: "*The important point in the treatment of COVID-19 and targeting PD-1 is to adopt a method that can simultaneously reduce and eliminate both the inflammatory cascade and the formation of exhausted T-cells.*" Результаты настоящего изобретения по оценке эффективности G4 показывают, что у последних имеется механизм, который

является одновременно противовирусным, противовоспалительным и иммуностимулирующим.

На Фигуре 16 показано, что олигонуклеотиды подавляют экспрессию белков PD-L1 и PD-L2.

На Фигуре 17 показано подавление PD-L1 и PD-L2 посредством nCpG-6-РТО и CpG-1-РТО, а также влияние концентрации и длины молекул.

На Фигуре 18 показан анализ экспрессии PD-L1 и PD-L2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

На Фигуре 19 показан анализ функции промотора.

На Фигуре 20 показан анализ методом вестерн-блот сигнальных белков рецептора интерферона.

На Фигуре 21 показано, что nCpG-6-РТО образует G-квадруплексы (G4) и связывается с IFNGR2.

Подробное описание изобретения:

Пример 1:

G-обогащенные РТО-ODN обладают противовирусной активностью, особенно эффективным является nCpG-6-РТО

Получение вируса

Получение вируса осуществляли, как описано (Vojkova *et al.*, 2020). Вкратце, варианты SARS-CoV-2 выделяли с использованием клеточной линии карциномы ободочной кишки человека Caco-2. Стоковые SARS-CoV-2, использованные в экспериментах, проходили не более трех пассажей в клетках Caco-2 и хранились при температуре -80°C. Титры вируса определяли в виде TCID₅₀/мл в конфлюэнтных клетках в 96-луночных планшетах для микротитрования.

Противовирусный анализ

Конфлюэнтные слои клеток Calu-3 в 96-луночных планшетах инфицировали SARS-CoV-2 при MOI 0,01. Термин “MOI” обозначает “множественность заражения” и относится к соотношению агентов (например, вирусов, бактерий) к мишеням заражения (например, клеткам). Вирус добавляли одновременно с олигонуклеотидами и инкубировали в MEM с добавлением 1% FBS. Противовирусные эффекты оценивали через 2 дня путем иммуногистохимической детекции вирусспецифического антигена с исполь-

зованием антител против SARS-CoV-2 S (1:1500, Sino Biological, Эшборн, Германия). Количественную детекцию проводили с помощью прибора Bioreader® 7000 -F-Z-I micro (Biosys)

Использованные молекулы олигонуклеотида (ODN)

1. CpG-1-PTO: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3'
2. n-CpG-6-PTO: 5'-GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG-3'
3. n-CpG-3A-PTO: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'
4. n-CpG-5-PTO: 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3'
5. Scramb-CpG-1-PTO: 5'-CTC TAG GAC TCT CTG GAC TT-3'
6. G3139 Genasense (Oblimersen): 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
7. CpG-2118(KonA): 5'-GGg gtc aag ctt gaG GGG Gg-3'

Заглавные буквы обозначают фосфоротиоатные (PTO) связи, строчные буквы обозначают классические фосфодиэфирные связи (CpG-2118). Как используется в настоящем документе, CpG-олиго-дезоксинуклеотиды представляют собой короткие одноцепочечные синтетические молекулы ДНК, которые содержат цитозин трифосфата дезоксинуклеотид ("C"), за которым следует гуанин трифосфата дезоксинуклеотид ("G"), где "p" обозначает фосфодиэфирную связь между соседними нуклеотидами. Акроним "n-CpG" обозначает олигонуклеотиды, которые не являются CpG-ODN. Исследовали различные концентрации (0,25, 0,5, 1, 2 и 4 мМ). Облимерсен (торговое название: Genasense) представляет собой антисмысловый олигодезоксирибонуклеотид, исследуемый как возможное средство для лечения нескольких типов рака, включая хронический лимфолейкоз, В-клеточную лимфому и рак молочной железы. CpG-2118 (KonA); обогащенная гуанином молекула, защищенная на концах фосфоротиоатными (PTO) связями, представляет собой синтетический олигонуклеотид, выступающий в качестве контроля для ODN 1585 — мышинового лиганда TLR9.

Результаты представлены на **Фиг. 1**, свидетельствуя, что nCpG-6-PTO ингибирует инфекции SARS-CoV-2.

Пример 2:

nCpG-6-PTO ингибирует "репликацию", а не "проникновение" SARS-CoV-2.

Для определения способности nCpG-6-PTO предотвращать адсорбцию и интернализацию вируса в клетки (проникновение) или репликацию вируса (репликация) проводили эксперимент с варьированием времени добавления препарата:

Постановка эксперимента с варьированием времени добавления препарата:

Проникновение: Добавляли различные концентрации nCpG-6-PTO (0,25, 1 и 4 мМ) вместе с SARS-CoV-2 (MOI 0,01) и инкубировали в течение 1 ч. Через 1 час вирус и препарат смывали и среду обновляли.

Репликация: Клетки Calu-3 инфицировали SARS-CoV-2 в течение 1 ч (MOI 0,01). Через 1 час вирусный инокулят удаляли и клетки промывали, чтобы избавиться от вирусных частиц, которые не проникли в клетки. Последовательно добавляли различные концентрации nCpG-6-PTO.

В обеих постановках детекцию вирусного белка проводили через 2 дня, как описано выше (иммуногистохимическая детекция вирусспецифического антигена с использованием антител против SARS-CoV-2S).

Результаты представлены на **Фиг. 2**, где показано, что nCpG-6-PTO предотвращает репликацию SARS-CoV-2 (треугольник), но не оказывает влияния на проникновение вируса в клетки-мишени (круги).

Пример 3:

Противовирусный эффект зависит от длины

Сравнение мутантов nCpG-6-PTO с делецией. В примерах 1 и 2 (Фиг. 1 и 2) была продемонстрирована противовирусная эффективность nCpG-6-PTO. В примере 3 продемонстрировано, что существует корреляция между длиной молекулы и противовирусным эффектом. Для этой цели были использованы мутанты nCpG-6-PTO с делецией.

Анализ выполняли по методике согласно примеру 1. Использовали молекулы олигонуклеотида следующих различных длин в концентрациях 0,5, 1, 2, 4 мкМ ODN:

- (a) nCpG-6-PTO: 5' - GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG -3'
- (b) nCpG-6C-PTO: 5' - GGG GGG GGG GGG GG -3'
- (c) nCpG-6G-PTO: 5' - GGG GGG -3'

Как показано на **Фиг. 3**, противовирусная эффективность явно зависит от длины молекулы: длинные молекулы оказывали более сильное воздействие на инфицирование вирусом, чем более короткие. Самое низкое значение IC₅₀ наблюдали при использовании nCrG-6-PTO (0,5 мМ, черные круги), смещение в сторону более низкой эффективности наблюдали при использовании 6G ODN nCrG-6G-PTO (1,5 мМ, светло-серые круги). Обратите внимание, что концентрации показаны в виде логарифмической шкалы.

Пример 4:

Противовирусный эффект зависит от ODN-остова.

Проверку влияния ODN-остова осуществляли путем сравнения nCrG-6 с фосфодиэфирным остовом (nCrG-6-PDE, светло-серые круги) с таковым с фосфоротиоатным остовом (nCrG-6-PTO, черные круги). Схема: nCrG-6-PTO или nCrG-6-PDE применяли в концентрациях 0,5, 1, 2, 4 мкМ соответственно. Анализ выполняли по методике согласно примеру 1.

На **Фиг. 4** показано, что фосфоротиоатные (PTO) связи могут оказывать противовирусное действие.

Пример 5:

Сравнение ингибирования вируса с использованием nCrG-6-PTO, AS1411-PTO и AS1411-PDE

В примере 5 сравнивается ингибирование репликации с использованием nCrG-6-PTO по настоящему изобретению и двух форм известного аптамера AS1411, а именно AS1411-PTO и AS1411-PDE.

AS1411 (также известный как AGRO100) представляет собой G-обогащенный олигонуклеотид с фосфодиэфирными связями (PDE), который давно зарекомендовал себя в качестве эффективного противоракового аптамера. Структурно AS1411 предположительно существует в нескольких различных конформациях G-квадруплекса, служа примером для одиночных олигонуклеотидов, которые могут принимать несколько конформаций G-квадруплекса. Исследование проводили при следующих концентрациях: 0,5, 1, 2, 4 мкМ nCrG-6-PTO (черные круги), AS1411-PTO (серые круги) и AS1411-PDE (светло-серые круги) соответственно. Анализ выполняли по методике согласно примеру 1.

nCrG-6-PTO: GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG

AS1411-PDE (также известный как AGRO100,): ggt ggt ggt ggt tgt ggt ggt ggt gg

AS1411-PTO: GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG

Как показано на **Фиг. 5**, nCrG-6-PTO оказывал высокую противовирусную эффективность. AS1411-PDE, который использовали в исследовании в качестве противовирусного препарата, продемонстрировал отсутствие эффективности против SARS-CoV-2. Противовирусную эффективность наблюдали только когда остов заменяли на фосфоротиоатные (PTO) связи, которая была сопоставима с nCrG-6-PTO.

Пример 6:

nCrG-6-PTO также проявляет противовирусную эффективность против вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1).

nCrG-6-PTO или nCrG-6-PDE наносили на фибробласты крайней плоти человека в сочетании с ВПГ-1. Через два дня с помощью визуальной оценки определяли цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате инфицирования ВПГ-1. Исследование проводили при следующих концентрациях: 0,5, 1, 2, 4 мкМ.

На **Фиг. 6** показано, что nCrG-6-PTO полностью подавляет ЦПЭ, вызываемый ВПГ-1, в исследуемом диапазоне концентраций (черные полосы). Примечательно, было обнаружено, что nCrG-6-PDE также оказывает подавление ЦПЭ вируса ВПГ-1 (серые полосы), однако только при концентрациях ≥ 1 мкМ.

Пример 7:

nCrG-6-PTO образует квадруплексы (G4)

Для определения потенциального механизма действия антител, специфически распознающее G-квадруплексные структуры ДНК и РНК с высокой селективностью при низкой наномолярной аффинности, использовали для исследования на предмет образования вторичной структуры молекулы олигонуклеотида по изобретению в условиях *in vitro*.

nCrG-6-PTO (2 мкг), меченный 5'-Cy5, смешивали с 200 нг или 400 нг BG4 — антителом, специфичным к вторичным структурам G4 (Biozol ABA-AB00174-1.1, Эхинг, Германия) в течение 15 минут при комнатной температуре. После разделения 10% электрофорезом в ПААГ в нативных и денатурирующих условиях (100 В, что соответствует 14,7 В/см) с 0,5x TBE регистрировали флуоресценцию с использованием системы документирования LI-COR Odyssey (Bad Homburg, Германия). Титрование BG4 с G4,

содержащим nCrG-6-РТО, меченный 5'-Cy5, показало, что антитело связывается с G4-образующей ДНК (Фиг. 7А, дорожки 2, 3). В отсутствие антитела BG4 образование комплекса не наблюдали (первая дорожка).

Для отображения структур G4 на клеточном уровне клетки A375 (клеточная линия злокачественной меланомы человека) культивировали на покровных стеклах в присутствии или в отсутствие 4 мкМ nCrG-6-РТО в течение 24 часов. После фиксации в 2% параформальдегиде/ФСБ клетки пермеабелизировали и блокировали 0,1% triton-X100/5% нормальной козьей сывороткой в ФСБ. Первичное антитело — BG4 (0,5 мкг/мл в БСА) — наносили на клетки в течение 90 мин при комнатной температуре; в качестве контроля использовали мышиное антитело класса IgG1 (Dako). После инкубации с Alexa 488 репрезентативные изображения связанного анти-мышиного IgG (Invitrogen) получали при помощи микроскопа Zeiss. Все исследуемые клетки проявляли точечное окрашивание ядер (Фиг. 7В, правая панель, стрелки в условиях эксперимента: 4 мкМ nCrG-6-РТО), которое не наблюдается в отсутствие первичного антитела к BG4 (Фиг. 7, левая панель, контроль).

Пример 8:

nCrG-6-РТО ингибирует геликазу SARS-CoV-2.

Анализ геликазы проводили согласно Adedeji et al. (Adedeji et al., 2012). Вкратце, nsp13 — геликазу из SARS-CoV-2 — инкубировали с гибридованными праймерами, состоящими из Quench2: 5'-CGCAGTCTTCTCCTGGTGCTCGAACAGTGAC-3'-BHQ1 и Flu2: Cy3-5'-GTCACGTGTTTCGAGCACCA-3'. В результате активности геликазы гибриды разделяются таким образом, что флуоресценция праймера Flu2 больше не гасится. Добавление избыточного CaptureQ2: 5'-GTCACGTGTTTCGAGCACCA-3' в качестве зонда для захвата предотвращает повторный отжиг Flu2 при помощи Quench2. На Фиг. 8, верхняя панель, изображена схема, представляющая принцип анализа. Анализ геликазы проводили с использованием возрастающих концентраций (0,2, 1, 4 мМ) nCrG-6-РТО или nCrG-6-PDE для сравнения. Продукты анализировали неденатурирующим электрофорезом в 6% ПААГ (электрофорез в полиакриламидном геле), Фиг. 8, нижняя панель. Добавление возрастающих концентраций nCrG-6-РТО приводит к ингибированию nsp13, на что указывает увеличение количества гашеного гибрида (см. дорожки 5, 6 по сравнению с контролем, дорожка 2). Добавление равных концентраций nCrG-6-PDE не приводило к соизмеримому ингибированию активности геликазы, на что указывает присутствие флуоресцентных одиночных цепей, сравнимых с контролем.

Пример 9:**nCpG-6-PTO подавляет IFN типа I (IFN β)-индуцированное STAT-фосфорилирование**

Схема сигнального пути интерферона типа I изображена на **Фиг. 9А** (из Gonzalez-Cao *et al.*, 2018). Клетки Calu-3 обрабатывали 4 мкМ nCpG-6-PDE, nCpG-6-PTO, AS1411-PTO, AS1411-PDE в течение 1 ч, затем стимулировали IFN β (20 нг/мл). В качестве контроля использовали препарат для лечения ревматоидного артрита барицитиниб, представляющий собой известный ингибитор янус-киназы подтипов JAK1 и JAK2 (1 мМ). Через 10 мин клетки лизировали в буфере Strawn Buffer (20 мМ HEPES [pH7,5], 150 мМ NaCl, 0,2% Triton X 100, 10% глицерина) с добавлением ингибиторов протеазы и фосфатазы (Roche, Мангейм, Германия), обрабатывали ультразвуком, кипятили в течение 5 мин, а затем разделяли на полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (SDS). Белки последовательно подвергали иммуноблоттингу на ПВДФ-мембране. Мембрану блокировали в блокирующем буфере (TBS [pH7,6], 0,1% Твин-20, 5% обезжиренного сухого молока) в течение по меньшей мере 1 ч при кт с последующей инкубацией со следующими первичными антителами: p-Stat-1 (Tyr701), p-Stat-2 (Tyr 690), p-Stat-3 (Tyr705), все от CST (Франкфурт, Германия) и anti-bactin (Santa Cruz, Biotechnology, Гейдельберг, Германия) в качестве контроля равной загрузки. Связанные первичные антитела детектировали с использованием кроличьего анти-козьего IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (Dako, Франкфурт, Германия), и визуализировали с помощью системы для детекции LumiGlo (CST). Результаты, представленные на **Фиг. 9В**, наглядно демонстрируют ингибирование Stat1- и Stat2-фосфорилирования nCpG-6-PTO, но не nCpG-6-PDE; аналогично, PTO-форма G-обогащенного квадруплекс-образующего AS1411 в достаточной степени подавляла фосфорилирование тирозина как Stat1, так и Stat2, в то время как форме PDE это не удалось.

Пример 10:**nCpG-6-PTO подавляет IFN типа II (IFN γ)-индуцированное JAK2- и STAT-фосфорилирование**

Схема сигнального пути интерферона типа II представлена на **Фиг. 10А** (из Gonzalez-Cao *et al.*, 2018). Для постановки эксперимента, см. пример 9 выше: клетки Calu-3 обрабатывали 4 мкМ nCpG-6-PDE, nCpG-6-PTO, AS1411-PTO, AS1411-PDE в течение 1 ч, затем стимулировали IFN γ (20 нг/мл). После анализа методом электрофореза в полиак-

риламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (SDS) детектировали фосфорилирование с использованием антител к p-Stat-1 (Tyr701), p-Stat-2 (Tyr 690), p-Stat-3 (Tyr705) и p-JAK2 (Tyr1007/Tyr1008), все от CST (Франкфурт, Германия) и anti-bactin (Santa Cruz, Biotechnology, Гейдельберг, Германия) в качестве контроля равной загрузки.

В анализе методом вестерн-блот, **Фиг. 10В**, наблюдается сильное снижение уровня фосфорилирования тирозина канонических сигнальных молекул p-JAK2 и pStat1. Также наблюдали подавляющие действия в отношении pStat2/3, подтверждающие частичное перекрытие сигнальных путей типа I и типа II (Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, et al. (2017) *Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression*. Cell reports 19:1189-201.).

Пример 11:

nCpG-6-РТО подавляет интерлейкин 6 (IL-6)-опосредованное фосфорилирование STAT-3

Схема сигнального пути интерлейкина 6 (IL-6) представлена на **Фиг. 11А** (из Jin *et al.*, 2017). Для постановки эксперимента, см. пример 9 выше: клетки Calu-3 обрабатывали 4 мкМ nCpG-6-PDE, nCpG-6-РТО, AS1411-РТО, AS1411-PDE в течение 1 ч, затем стимулировали IL-6 (20 нг/мл). После анализа методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (SDS) детектировали фосфорилирование с использованием антител к p-Stat-1 (Tyr701), p-Stat-2 (Tyr 690), p-Stat-3 (Tyr705), все от CST (Франкфурт, Германия) и anti-bactin (Santa Cruz, Biotechnology, Гейдельберг, Германия) в качестве контроля равной загрузки.

В анализе методом вестерн-блот, **Фиг. 11В**, наблюдается сильное снижение уровня фосфорилирования тирозина pStat3. Также наблюдали подавляющие действия в отношении pStat1.

Пример 12

Далее показано, что олигонуклеотид (ODN) nCpG-6-РТО, состоящий из 20 гуанозинов, связанных посредством фосфоротиоатов, ингибирует экспрессию PD-L1 и PD-L2 в клетках меланомы.

В ходе экспериментов исследовали следующие олигонуклеотиды. Заглавные буквы обозначают фосфоротиоатные связи, строчные — классические фосфодиэфирные связи (CpG-2118):

Таблица 1

CpG-1-PTO:	5'-TCC ATG <u>ACG</u> TTC CTG <u>ACG</u> TT-3'
CpG-14-PTO:	5'-TCC ATG <u>ACG</u> TTC CTG A-3'
CpG-12-PTO:	5'-CAT <u>GAC</u> <u>GTT</u> CCT-3'
CpG-9-PTO:	5'-GAC <u>GTT</u> -3'
CpG-1-PDE:	5'-tcc atg acg ttc ctg acg tt-3'
CpG-1-PTO-rev:	5'-AAC <u>GTC</u> AGG AAC <u>GTC</u> ATG GA-3'
nCpG-1-PTO:	5'-TCC ATG <u>AGC</u> TTC CTG <u>AGT</u> CT-3'
nCpG-3-PTO:	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'
nCpG-5-PTO:	5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC -3'
Scrambled:	5'-CTC TAG GAC TCT CTG GAC TT-3'
Oblimersen (G3139):	5'-TCT CCC <u>AGC</u> <u>GTG</u> CGC CAT-3'
nCpG-6-PTO:	5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG -3'
nCpG-6B-PTO:	5'- GGG GGG GGG GGG GGG G -3'
nCpG-6D-PTO:	5'- GGG GGG GGG GGG -3'
nCpG-6G-PTO:	5'- GGG GGG -3'

На Фигуре 16 показано, что олигонуклеотиды подавляют экспрессию белков PD-L1 и PD-L2.

Клетки меланомы A375, предварительно стимулированные в течение 1 часа IFN γ (20 нг/мл), подвергали воздействию различных олигонуклеотидов (4 мкМ). Олигонуклеотидные характеристики в отношении остова и последовательности представлены в Табл. 1. **(А)** Через 24 часа суммарный белок экстрагировали и разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (SDS). Блоттированные белки исследовали с использованием анти-PD-L1 и анти-PD-L2. В качестве контроля загрузки использовали anti-beta actin. На иллюстрациях представлены репрезентативные результаты. **(В)** Иллюстративный результат FACS-сканирования на PD-L1 и PD-L2 после обработки 4 мкМ CpG-1-PTO и 4 мкМ nCpG-6-PTO в клетках A375. Сводные данные 9 независимых экспериментов FACS с использованием клеток **(С)** A375 и **(D)** SK-Mel-28, обработанных 4 мкМ CpG-1-PTO или nCpG-6-PTO. Указаны стандартные отклонения. Данные были схожими с соответствующим положительным контролем (IFN γ). * $p < 0,05$.

Результат: nCpG-6-PTO ингибирует экспрессию PD-L1/2 на клетках меланомы A375 и SK-Mel-28.

На Фигуре 17 показано подавление PD-L1 и PD-L2 посредством nCpG-6-РТО и CpG-1-РТО — влияние концентрации и длины молекул.

IFN γ -стимулированные клетки A375 обрабатывали возрастающими концентрациями (А) nCpG-6-РТО (1, 2, 4 мкМ) или (В) CpG-1-РТО (4, 6, 8 мкМ). Аналогичным образом, клетки SK-Mel-28 обрабатывали возрастающими концентрациями (С) nCpG-6-РТО или (D) CpG-1-РТО. Кроме того, исследовали влияние длин ODN. IFN γ -стимулированные клетки A375 обрабатывали (Е) 4 мкМ nCpG-6-РТО и соответствующими делеционными мутантами (nCpG-6B/6D/6G-РТО) или (F) 4 мкМ CpG-1-РТО и соответствующими делеционными мутантами (CpG-14/12/9-РТО). Аналогичным образом, клетки SK-Mel-28 обрабатывали (G) nCpG-6-РТО или (H) CpG-1-РТО и их соответствующими делеционными мутантами. Через 24 часа экспрессию PD-L1 и PD-L2 измеряли с помощью FACS. Каждый столбик представляет собой среднее значение по 6 независимым экспериментам. Указаны стандартные отклонения. Данные были схожими с соответствующим положительным контролем (IFN γ). * $p < 0,05$.

Результат: nCpG-6-РТО активен при низких концентрациях (1 мкМ). Эффект зависит от длины, и эффективность проявляет даже один 6-мер (nCpG-6G-РТО).

На Фигуре 18 показан анализ экспрессии PD-L1 и PD-L2 методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Клетки меланомы A375 стимулировали IFN γ в течение 1 ч с последующей инкубацией либо CpG-1-РТО, либо nCpG-6-РТО в течение 3, 6 или 24 ч. Последовательно выделяли общую РНК с последующей количественной ОТ-ПЦР, как описано. Показаны результаты для (А) PD-L1 и (В) PD-L2. В каждом столбце показано среднее значение трех независимых экспериментов. Указаны стандартные отклонения. Проводили статистический анализ в отношении контрольной группы, обработанной только IFN γ . * $p < 0,05$.

Результат: nCpG-6-РТО ингибирует экспрессию РНК PD-L1

На Фигуре 19 показан анализ функции промотора.

Транзientный анализ репортерного гена люциферазы для (А) промотора PD-L1 и (Б) промотора PD-L2. Клетки меланомы A375 трансфицировали промоторными конструкциями PD-L1 и PD-L2, включая делеции соответствующих сайтов связывания фактора транскрипции. После стимуляции 20 нг/мл IFN γ в течение 1 часа клетки обрабатывали

4 мкМ CpG-1-PTO или nCpG-6-PTO в течение 16 часов. **(С)** анализ методом ChIP (иммунопреципитация хроматина) после предварительной обработки 4 мкМ CpG-1-PTO или nCpG-6-PTO в течение 1 часа и последовательной стимуляции IFN γ в течение 6 часов с использованием антитела IRF1 для преципитации. ПЦР проводили с праймерами, специфичными к промоторам PD-L1 или **(D)** PD-L2. Каждый столбец представляет собой среднее значение по 3 экспериментам. Проводили статистический анализ в отношении контрольной группы, обработанной только IFN γ . * $p < 0,05$.

Результат: nCpG-6-PTO ингибирует промоторы PD-L1/2. Действие осуществляется через IRF-1 (ChIP) и Stat-1/3.

На Фигуре 20 показан анализ методом вестерн-блот сигнальных белков рецептора интерферона.

Клетки A375 обрабатывали 4 мкМ CpG-1-PTO или 4 мкМ nCpG-6-PTO без дополнительной стимуляции (базальная активация, ряд 1-3) или с дополнительной стимуляцией IFN γ в течение двух периодов времени (t1 и t2). Экстрагированный белок подвергали анализу методом вестерн-блот и проверяли на экспрессию IRF1 (t1: 60 мин, t2: 3 ч), p-JAK-1 (t1: 10 мин; t2: 30 мин), p-JAK-2 (t1: 10 мин; t2: 30 мин), p-STAT-1 (t1: 10мин; t2: 30мин), p-STAT-2 (t1: 10мин; t2: 30мин) и p-STAT-3 (t1: 10мин; t2: 30мин). Равную загрузку контролировали с помощью антител, направленных против тотальной формы фосфобелка, или, в случае IRF1, с помощью GAPDH (блоты справа). Блоты показывают репрезентативные результаты (n = 3). p-, фосфо.

Результат: nCpG-6-PTO ингибирует сигнальный путь IFN γ .

На Фигуре 21 показано, что nCpG-6-PTO образует G-квадруплексы (G4) и связывается с IFNGR2.

(A) 5'-Cy5-меченные CpG-1-PTO и nCpG-6-PTO (2 мкг) смешивали с 200 и 400 нг BG4 — антителом, которое специфически распознает вторичные структуры G4. На изображении показана флуоресценция после электрофореза в ПААГ. **(B)** Клетки A375, обработанные 4 мкМ CpG-1-PTO, 4 мкМ nCpG-6-PTO или 1 мкМ пиридостатина (стабилизирует G4) в течение 24 часов, фиксировали и окрашивали антителом BG4. BG4-реактивность наблюдали также во внеклеточном пространстве в клетках, обработанных nCpG-6-PTO (см. стрелки). На представленных изображениях показаны репрезентатив-

ные разделы. (С) 5'-Cy5-меченные CpG-1-РТО и nCpG-6-РТО (2 мкг) смешивали с 200 и 400 нг IFNGR1 или IFNGR2 и разделяли методом электрофореза в ПААГ. На изображении показана флуоресценция после электрофореза в ПААГ.

Результаты: nCpG-6-РТО образует G4. nCpG-6-РТО связывается с передающей сигнал субъединицей рецептора IFN γ (IFNGR2]

Вывод:

nCpG-6-РТО образует G4 (Фиг. 21 А,В).

nCpG-6-РТО ингибирует экспрессию PD-L1 и PD-L2 (белок/мРНК/промотор; Фиг. 16-19).

nCpG-6-РТО связывается с передающей сигнал субъединицей IFN γ -рецептора (IFNGR2) (Фиг. 21 С).

nCpG-6-РТО ингибирует IFN γ -зависимые сигнальные молекулы (JAK-1/2, Stat1,2,3 и IRF1) (Фиг. 20).

Ингибирование IRF1 предотвращает активацию промотора PD-L1 (Фиг. 15).

G4-образующие ODN полезны для иммунотерапии в качестве монотерапии или комбинированной терапии для усиления эндогенного противоопухолевого ответа путем активации Т-клеток посредством ингибирования экспрессии PD-L1 (и PD-L2). Это полезно для лечения опухолевых заболеваний, а также заболеваний, связанных с вирусами (например, COVID-19). G4-образующие ODN также полезны для ингибирования медиаторов воспаления (JAK, Stat). Особенно эффективным G4-образующим ODN является nCpG-6-РТО.

Доказано, что нацеливание антител на взаимодействие молекул контрольной точки, таких как PD-L1/PD-1, активирует функцию Т-клеток и, таким образом, устраняет уклонение опухолевых клеток от иммунного распознавания. Клиническая польза ингибиторов контрольных точек хорошо доказана при различных опухолевых образованиях, таких как меланома и немелкоклеточный рак легких. Кроме того, можно успешно лечить рак печени, почек, лимфомы Ходжкина, колоректальный рак, рак молочной железы и другие.

Недавно было обнаружено, что высокопатогенные вирусы птичьего гриппа типа А (H5N1), а также другие подтипы вируса птичьего гриппа типа А (H7N9, H9N2 и H7N3) ассоциированы с заболеванием человека, что вызывает обеспокоенность в отношении пандемических условий из-за потенциального распространения подтипов вируса гриппа типа А, циркулирующих среди домашних и диких птиц и домашнего скота, на людей.

Представленная в настоящем документе терапевтическая концепция снижения уровня экспрессии PD-L1/2 с помощью G4 может быть комбинирована с другими методами лечения, нацеленными на молекулы контрольных точек. Здесь следует упомянуть препараты на основе антител, нацеленные на PD-1 или PD-L1, такие как ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, цемиплимаб и BMS-202. Также включены соединения, нацеленные на другие молекулы контрольных точек, такие как ипилимумаб (против CTLA-4). Кроме того, олигонуклеотиды G4 можно комбинировать с любым другим противоопухолевым методом лечения, таким как химиотерапия, малые молекулы и облучение.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула олигонуклеотида длиной от 10 до 50 нуклеотидов, содержащая по меньшей мере один G-квартет-образующий мотив, содержащий от 10 до 20 нуклеотидных остатков, при этом по меньшей мере 60% указанных остатков G-квартет-образующего мотива представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина, и при этом молекула способна ингибировать рост опухоли и/или ингибировать репликацию вируса оспы обезьян.

2. Молекула олигонуклеотида длиной от 10 до 50 нуклеотидов, содержащая по меньшей мере один G-квартет-образующий мотив, содержащий от 10 до 20 нуклеотидных остатков, при этом по меньшей мере 60% указанных остатков G-квартет-образующего мотива представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина, и при этом молекула способна ингибировать вирусную или бактериальную репликацию и/или оказывать противовоспалительное действие в клетках млекопитающих.

3. Молекула по пп. 1 или 2, в которой > 70% остатков представляют собой остатки гуанозина или дезоксигуанозина.

4. Молекула по пп. 1–3, в которой олигонуклеотид синтезирован из дезоксинуклеотидов.

5. Молекула по любому из предыдущих пунктов, в которой по меньшей мере один из остатков гуанозина или дезоксигуанозина химически модифицирован.

6. Молекула по п. 5, в которой химическая модификация представляет собой модификацию фосфатного остова.

7. Молекула по п. 6, в которой тиофосфорильные заместители выбраны из фосфоротиоата или фосфородитиоата, и в которой по меньшей мере 35% фосфодиэфирных связей в сахаро-фосфатном остове молекулы олигонуклеотида замещены тиофосфорильными заместителями.

8. Молекула по любому из предыдущих пунктов, в которой олигонуклеотид содержит по меньшей мере четыре последовательных триплета остатков гуанозина или дезоксигуанозина.

9. Молекула по любому из предыдущих пунктов, в которой молекула содержит любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO. 1–4, и/или последовательностей SEQ ID NO. 1–4, которые усечены по меньшей мере на 1 нуклеотид.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну молекулу олигонуклеотида по любому из предыдущих пунктов в сочетании с по меньшей мере

одним фармацевтически приемлемым эксципиентом, носителем, адьювантом или их комбинацией.

11. Набор, содержащий по меньшей мере одну молекулу олигонуклеотида по любому из пп. 1–9.

12. Молекула по любому из пп. 1–9, фармацевтическая композиция по п. 10 или набор по п. 11 для применения при лечении заболевания, вызванного опухолью, вирусной или бактериальной инфекцией и/или связанного с ними воспаления.

13. Применение по п. 12, в котором молекула олигонуклеотида индуцирует ингибирование роста опухоли и/или репликации вируса в клетке млекопитающего.

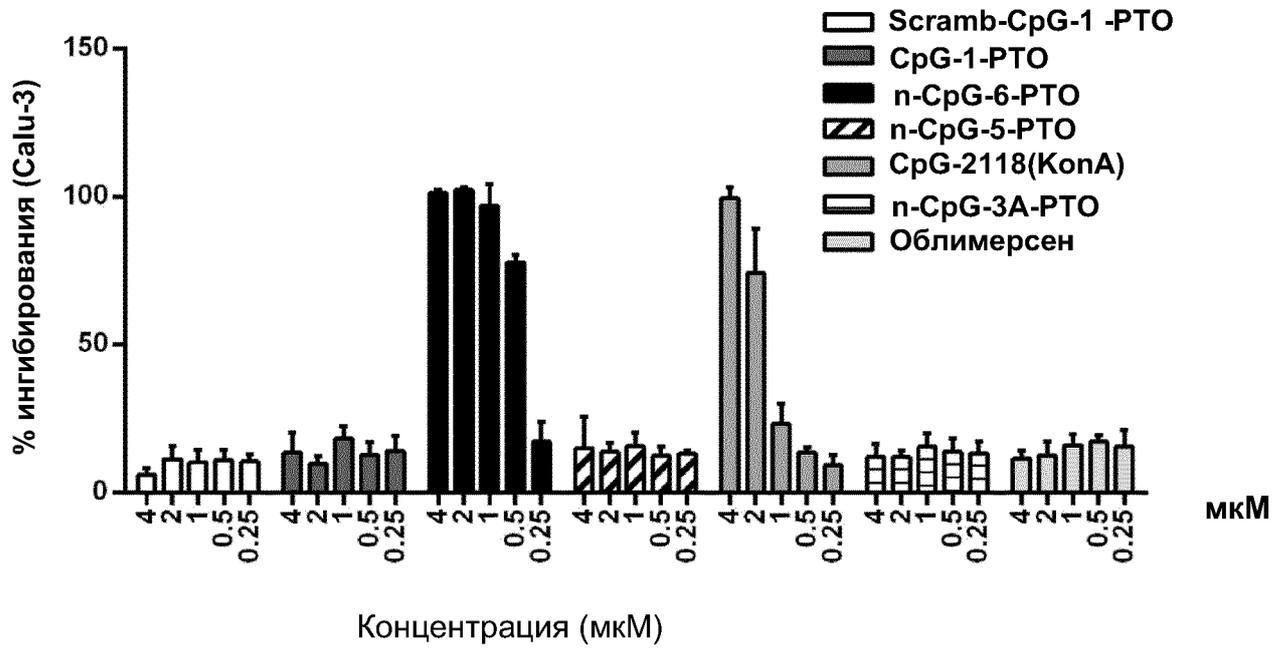
14. Применение по п. 13, в котором вирусная инфекция вызвана вирусом, выбранным из группы, включающей вирус HS-1, вирус HCN, аденовирус, вирус Зика, вирус гепатита С, вирус лихорадки Западного Нила, вирус гриппа, вирус RSV, парамиксовирус, вирус ВИЧ, коронавирусы, такие как SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

15. Применение по п. 13, в котором заболевание представляет собой вирусную инфекцию дыхательных путей.

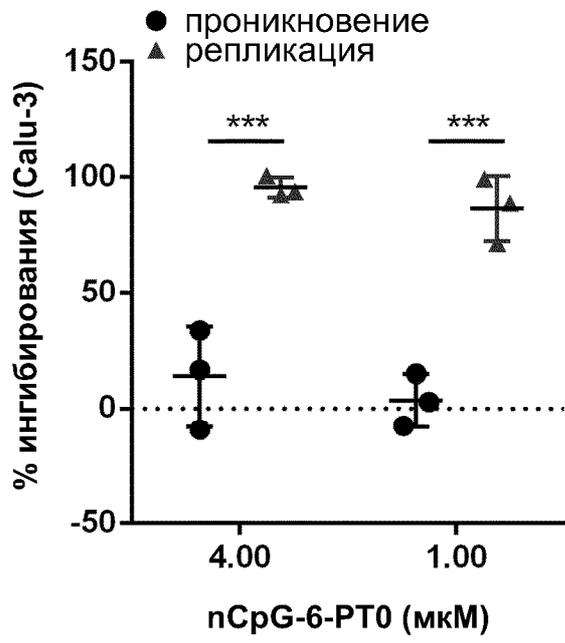
16. Применение по п. 12, в котором лечение воспаления, связанного с вирусным или бактериальным заболеванием, и/или роста опухоли является результатом вмешательства в путь интерферона типа I (IFN) и/или IFN типа II или подавления передачи интерлейкин-опосредованных сигналов.

17. Применение по п. 12, в котором в молекуле олигонуклеотида по меньшей мере один из остатков гуанозина или дезоксигуанозина химически модифицирован, при этом химическая модификация представляет собой модификацию фосфатного остова, и при этом олигонуклеотид содержит по меньшей мере четыре последовательных триплета остатков гуанозина или дезоксигуанозина.

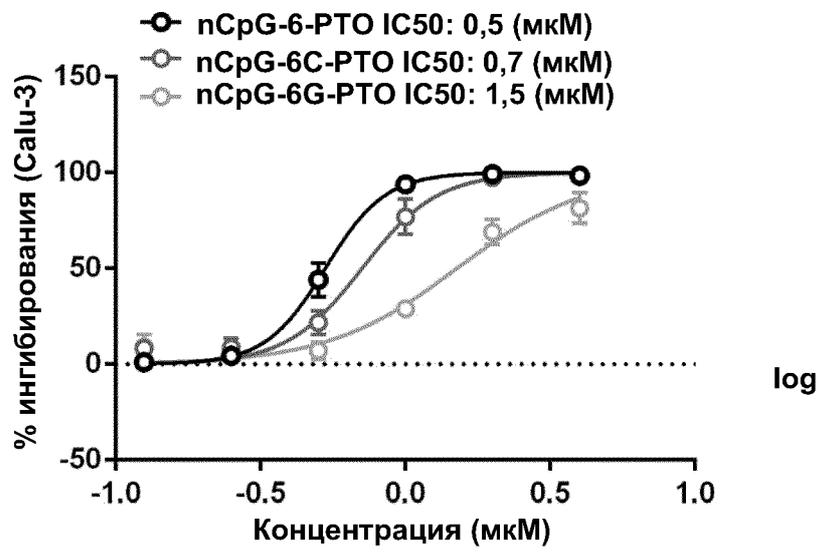
18. Применение по п. 12, в котором молекулу вводят фармацевтически приемлемым способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, парентерального, энтерального, офтальмологического или назального пути, или местно и их комбинаций. (Также следует включить другие способы применения, например, местное в виде крема или лосьона (для лечения инфекций ВПГ), в виде спрея, шампуня, глазных капель, свечей, трансдермального пластыря, лака для ногтей.



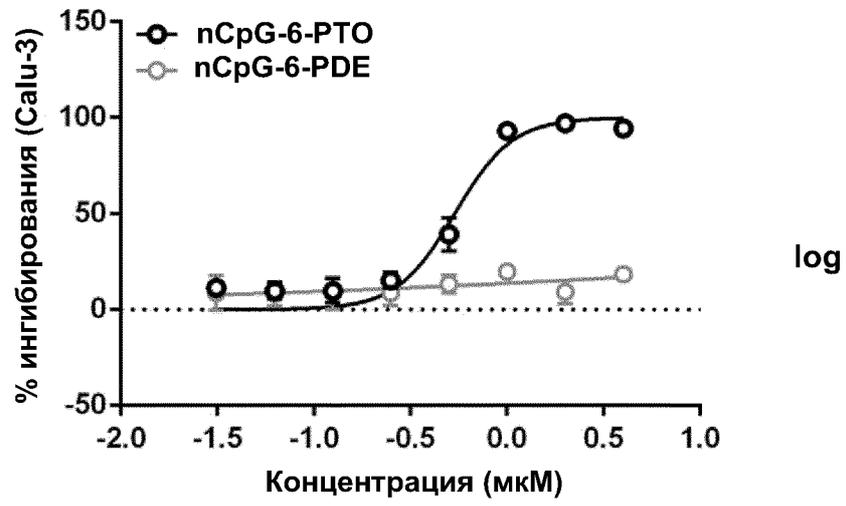
Фиг. 1



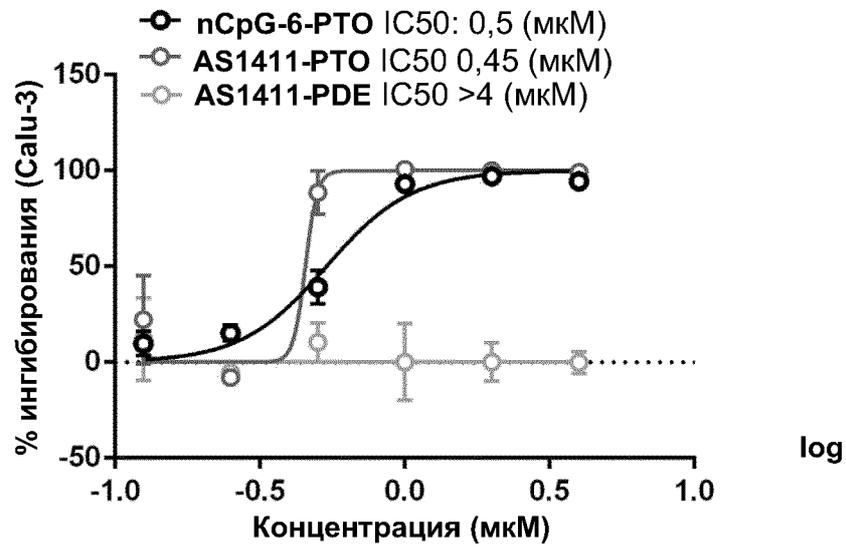
Фиг. 2



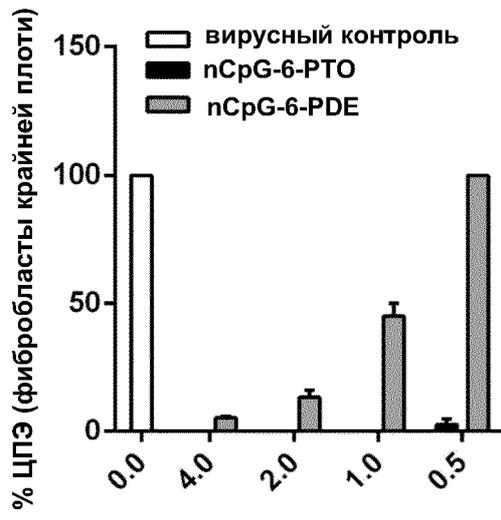
Фиг. 3



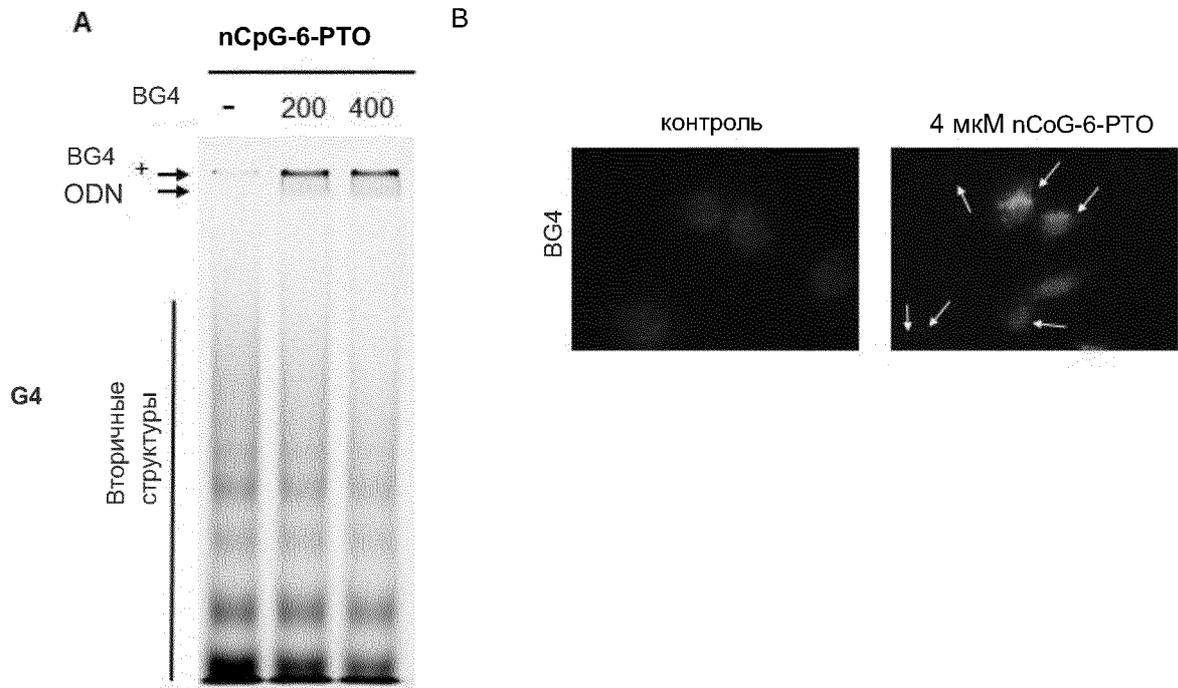
Фиг. 4



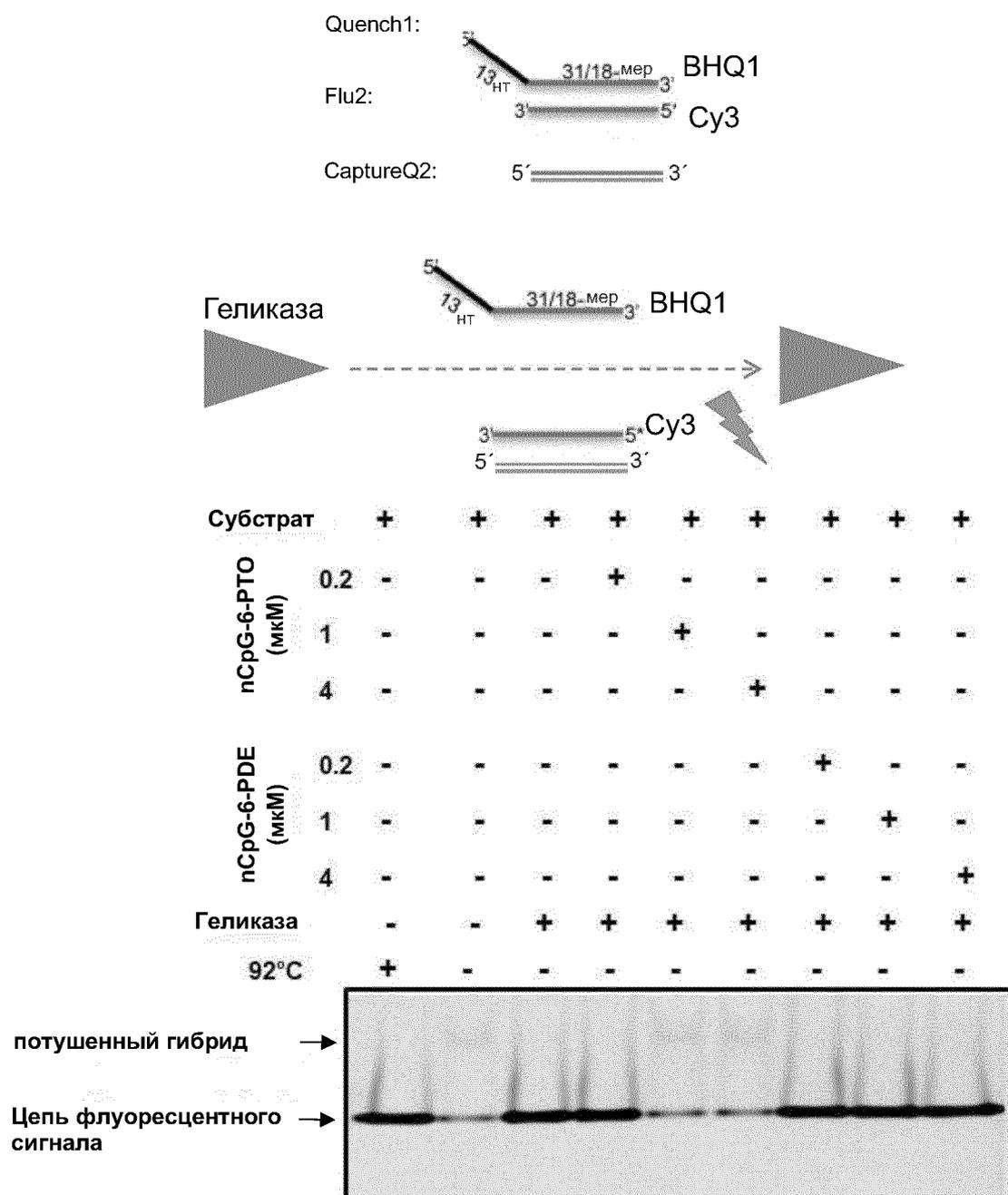
Фиг. 5



Фиг. 6

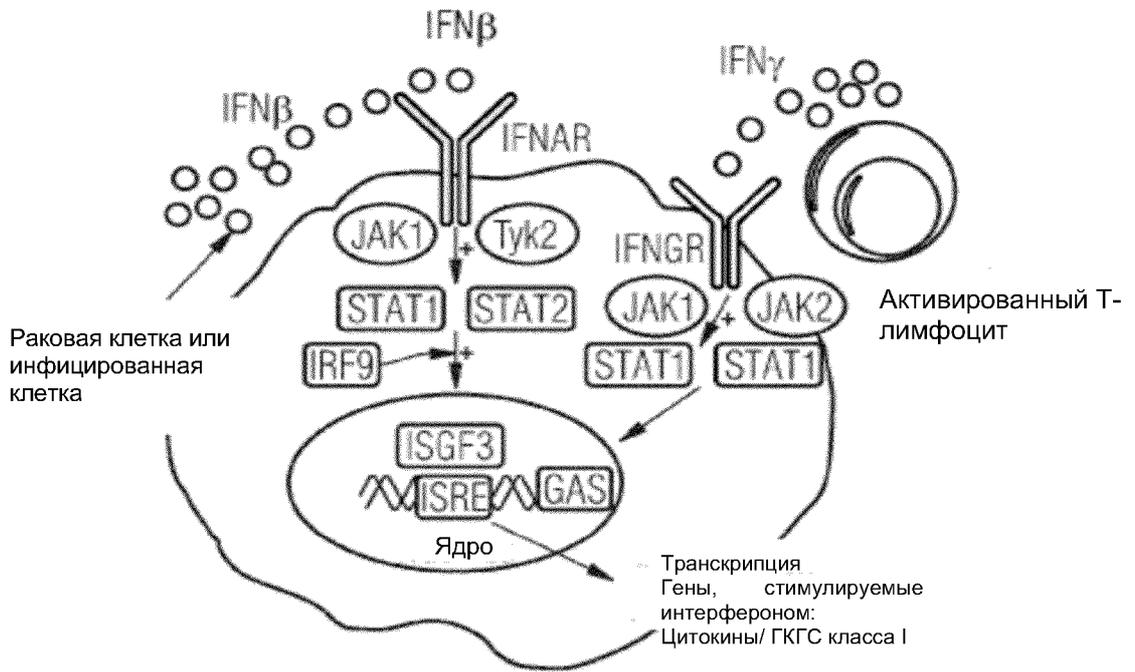


Фиг. 7

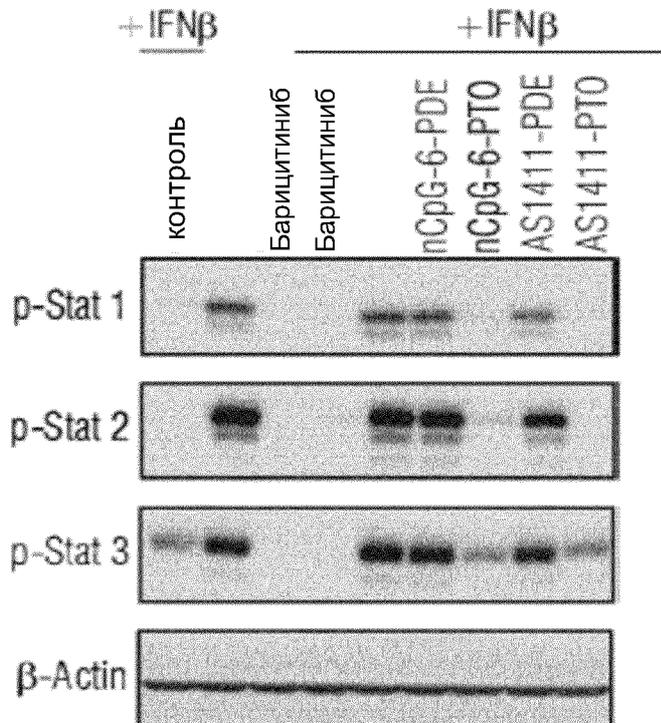


Фиг. 8

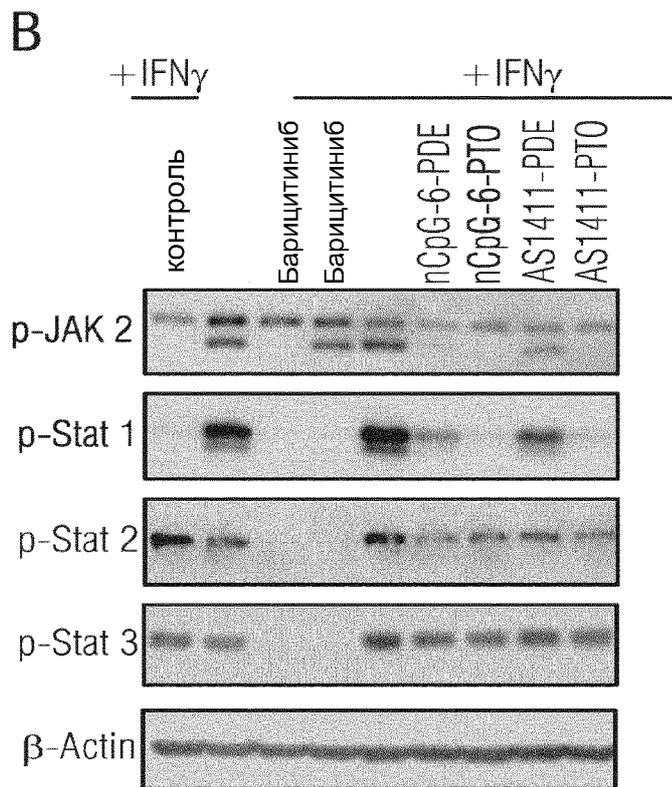
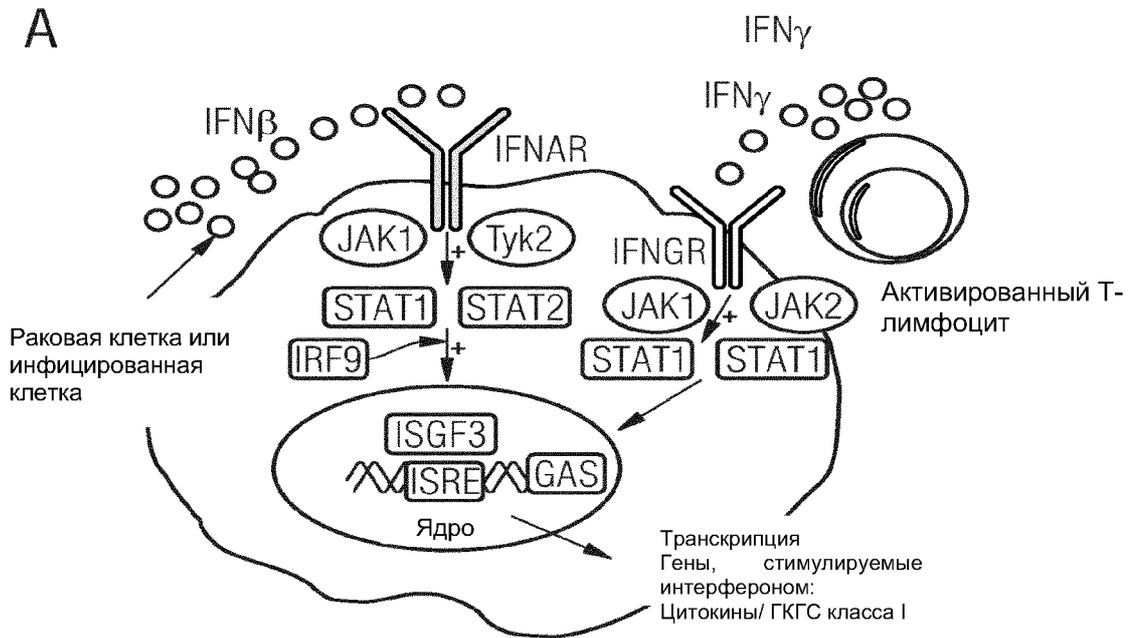
A



B

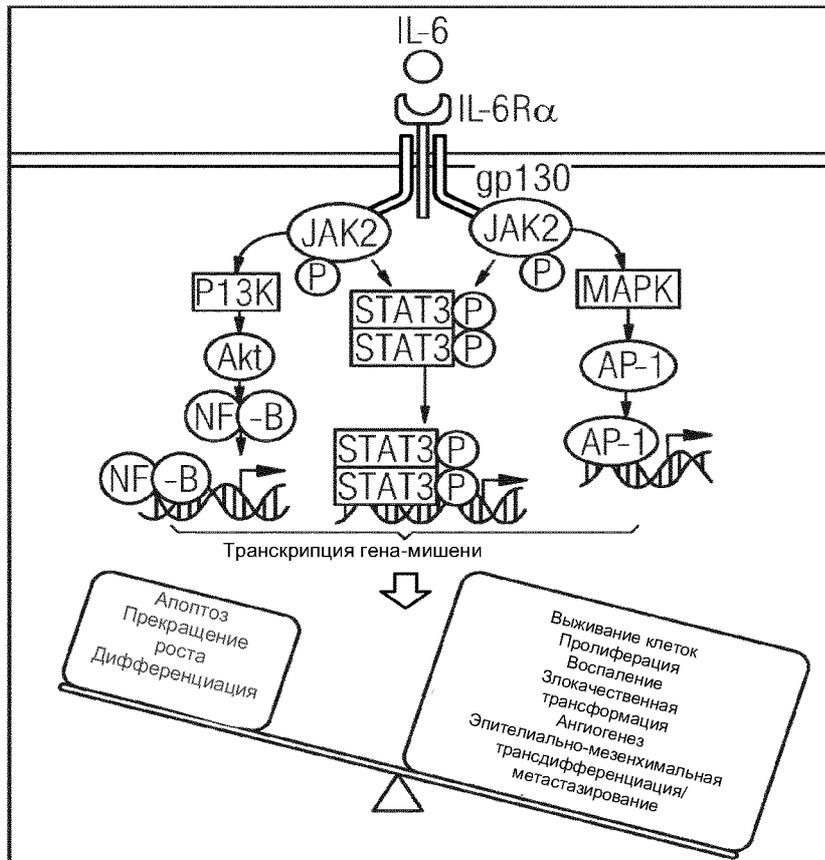


Фиг. 9

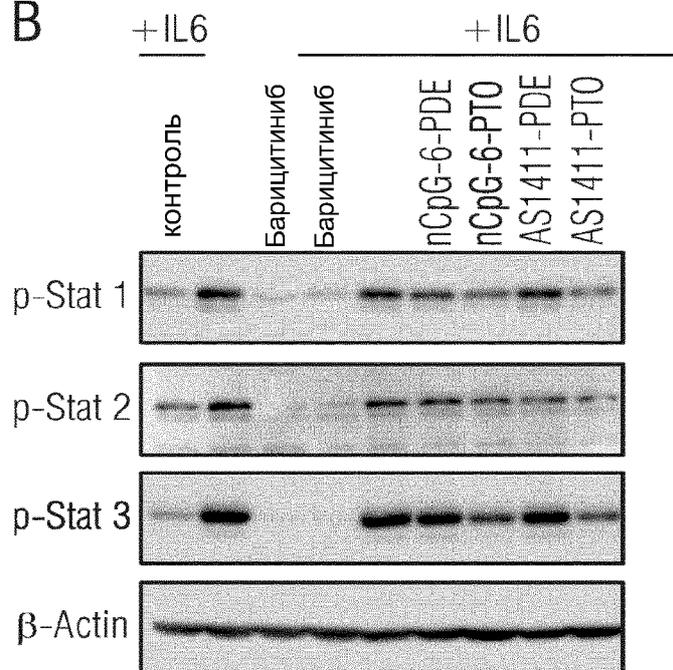


Фиг. 10

A



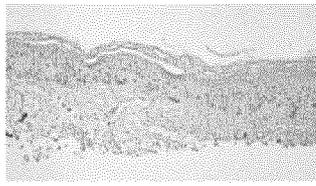
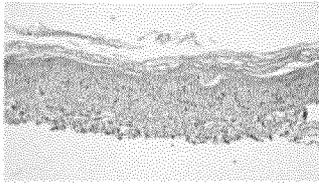
B



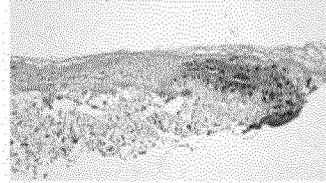
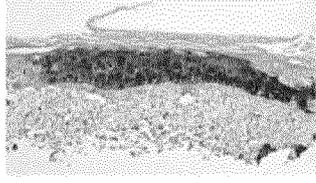
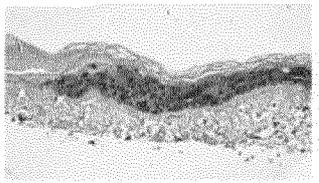
Фиг. 11

12/21

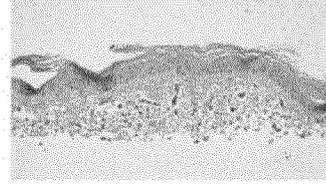
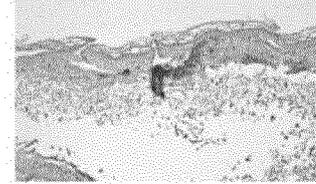
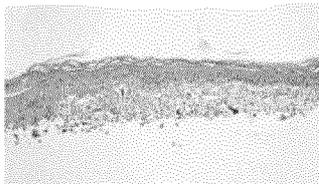
Mock d2



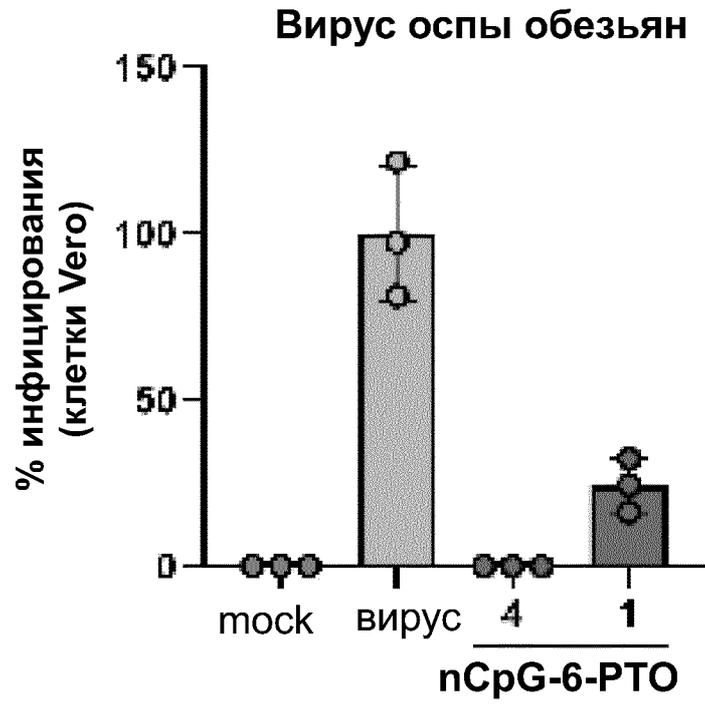
ВПГ-1 d2



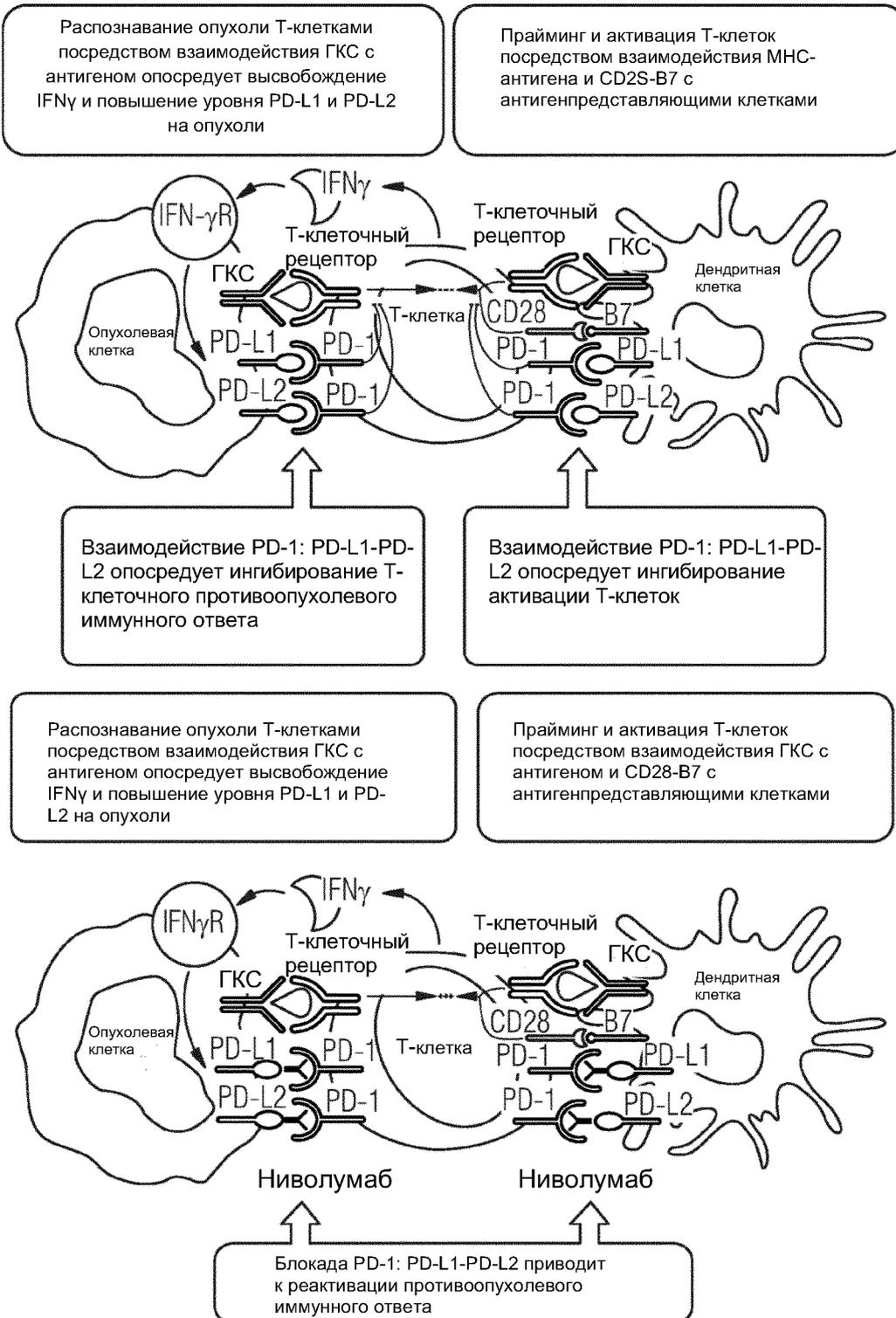
ВПГ1 + nCrG-6-РТО 4мкМ



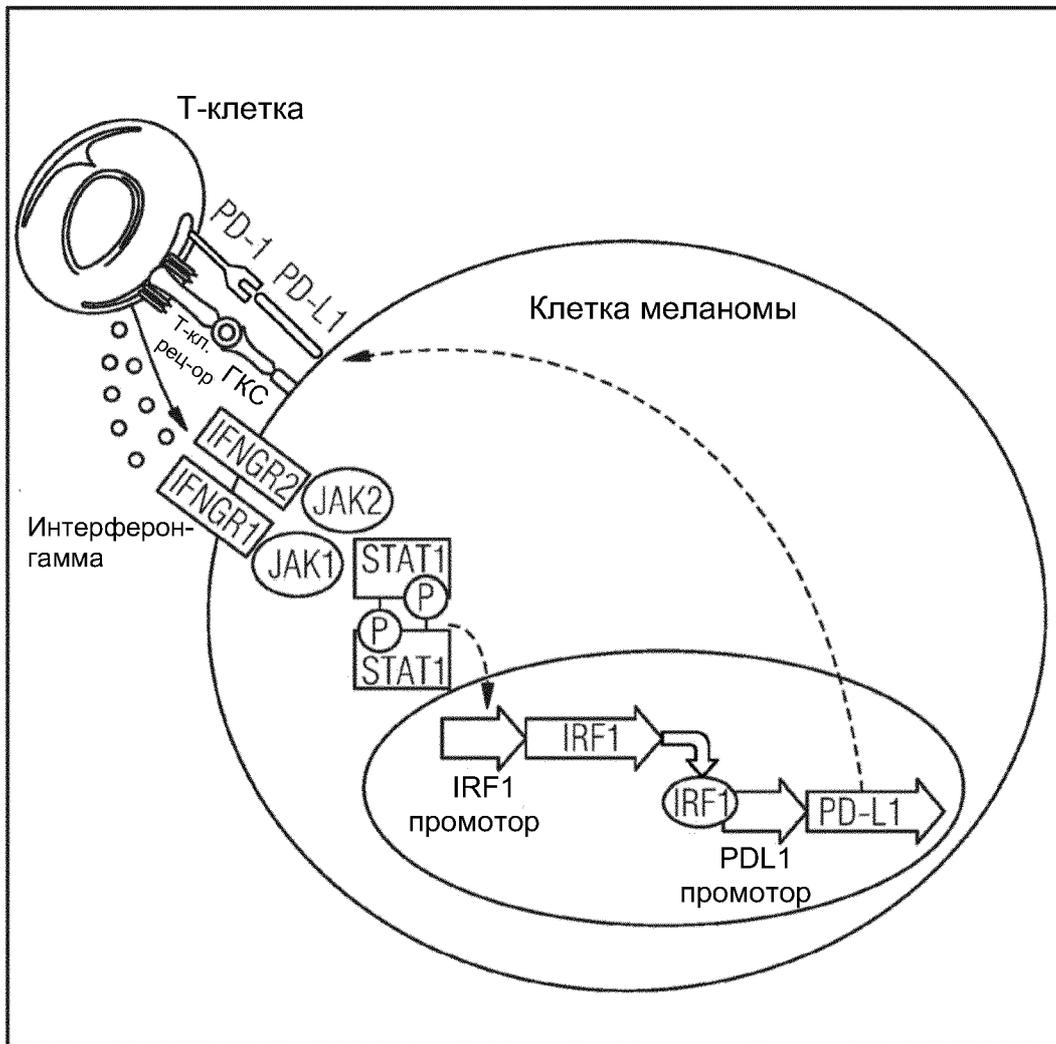
Фиг. 12



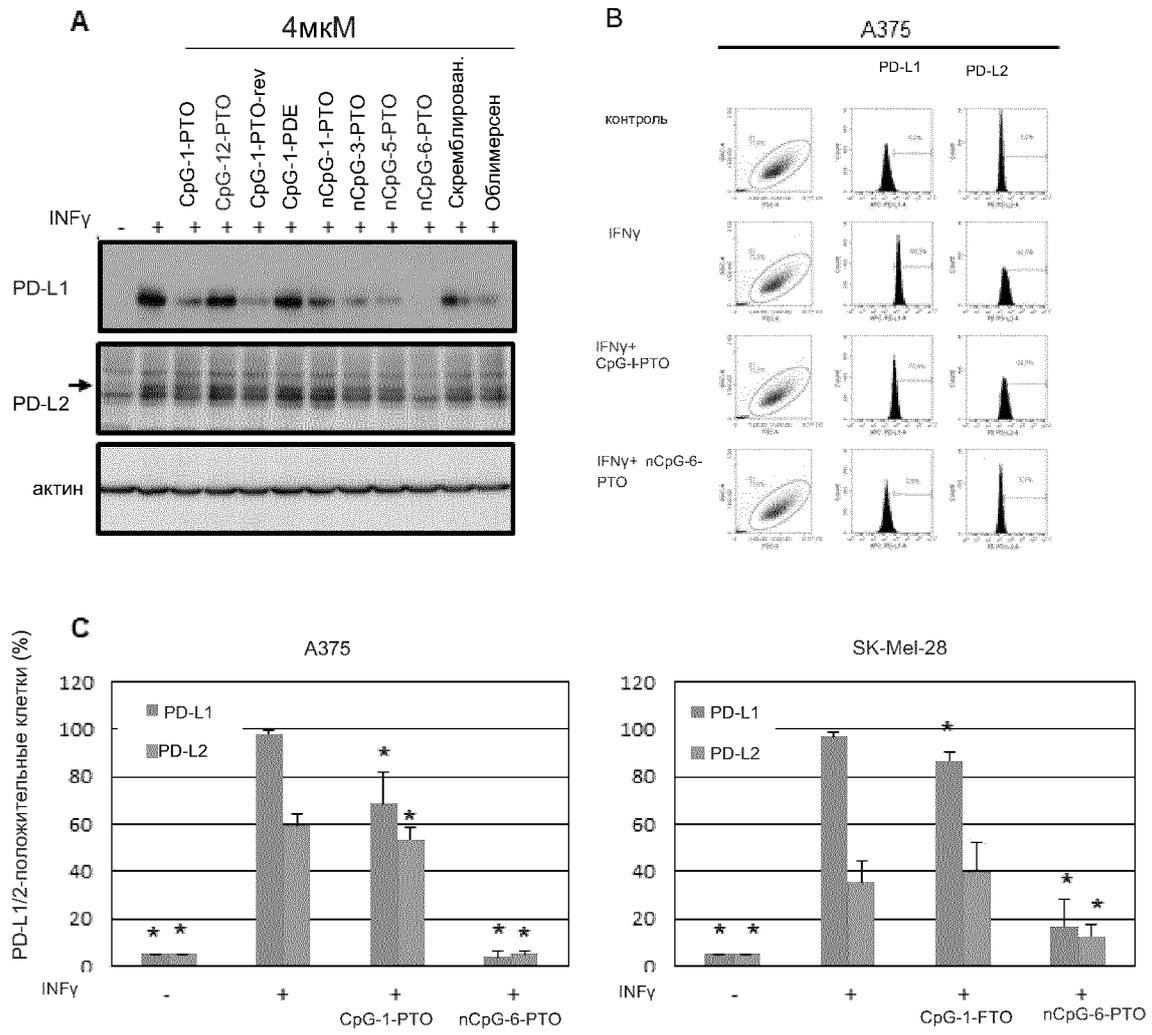
Фиг. 13



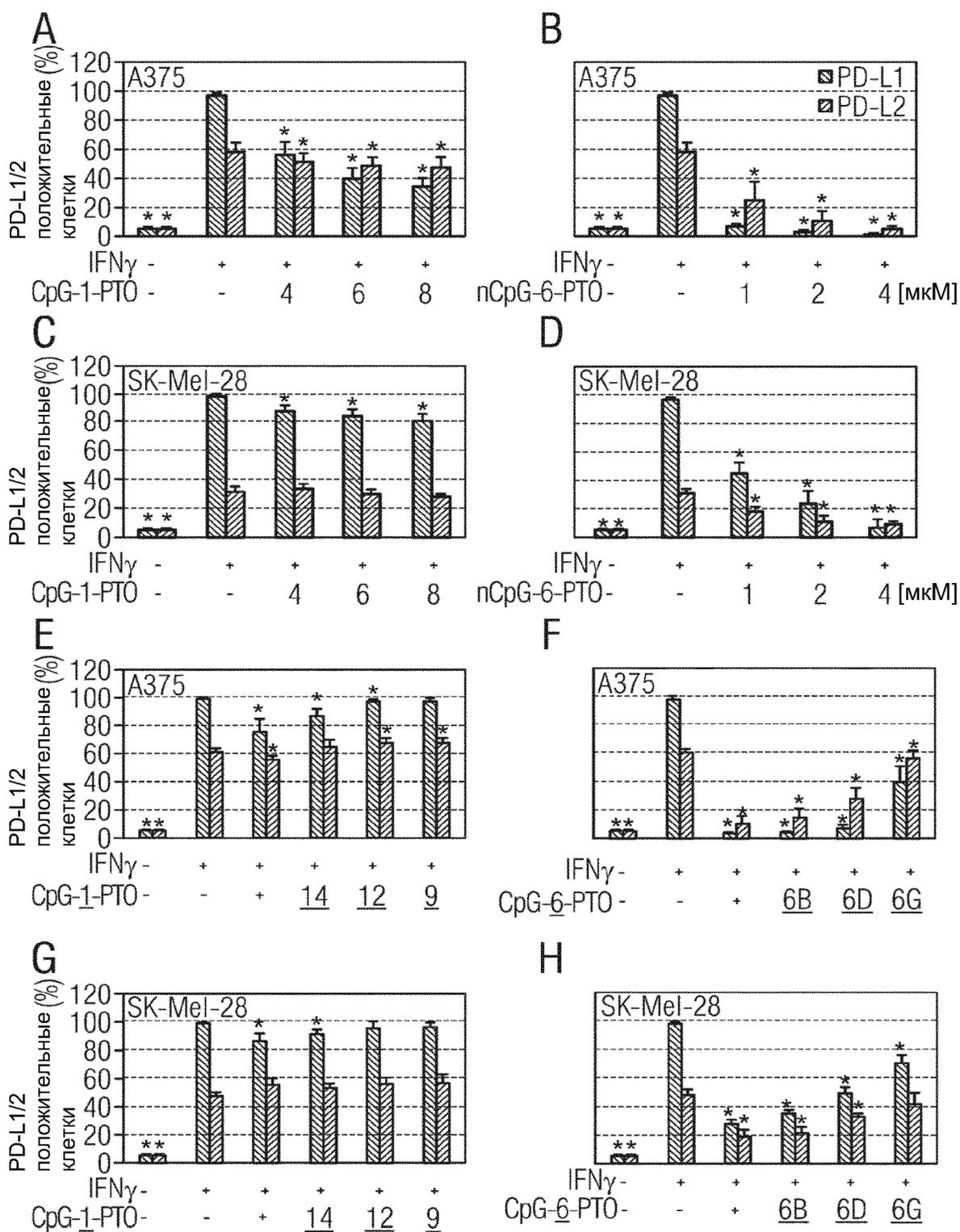
Фиг. 14



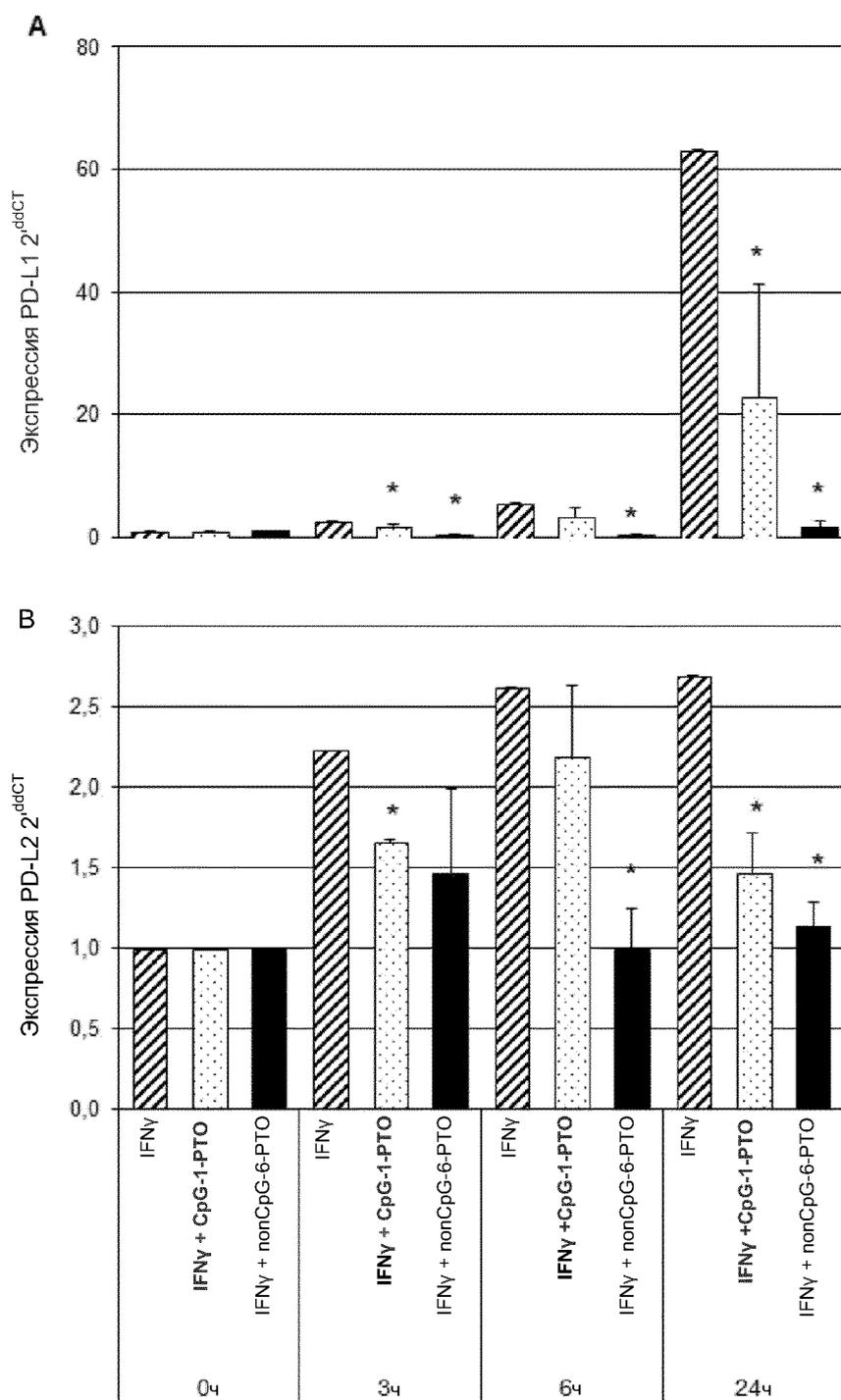
Фиг. 15



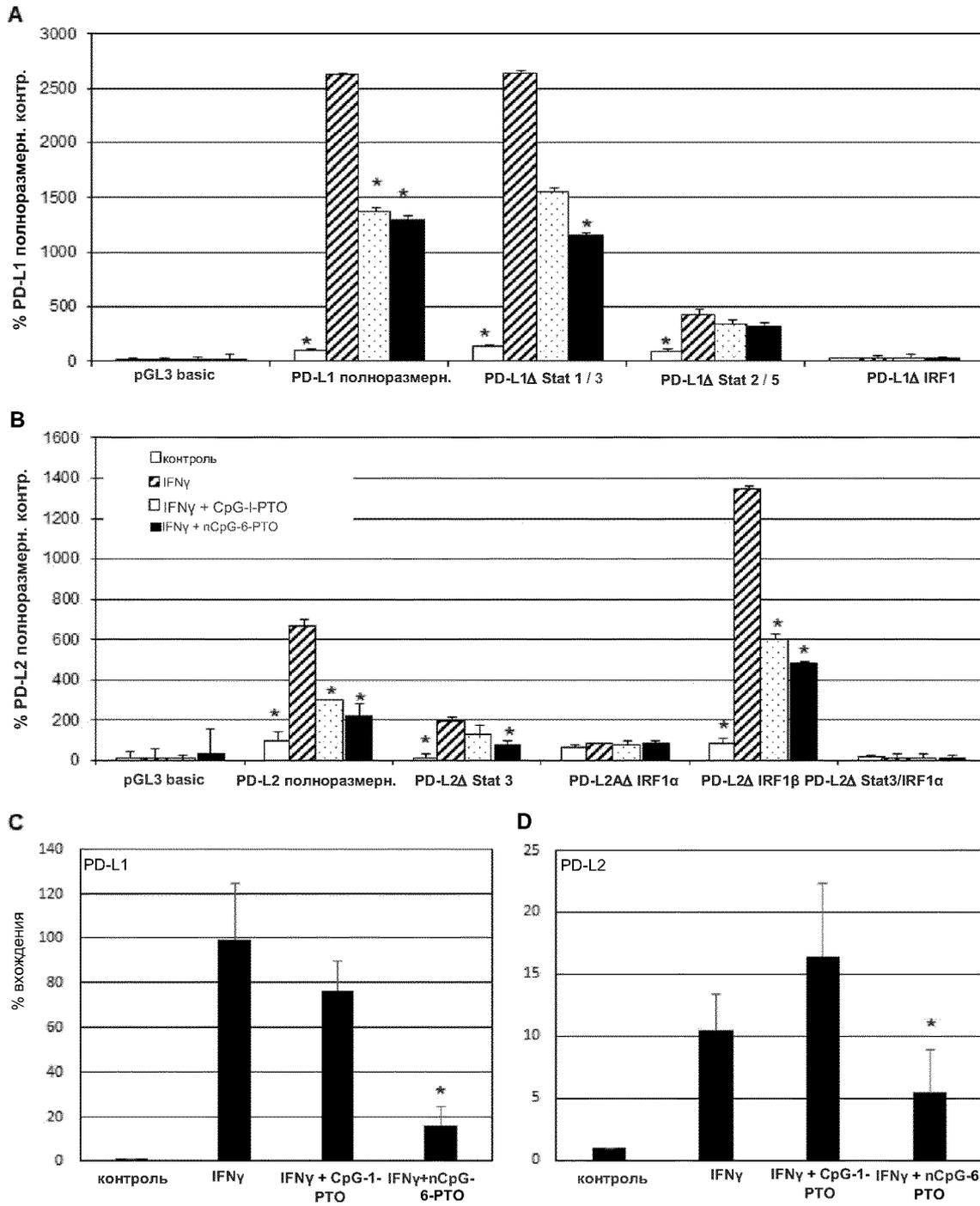
Фиг. 16



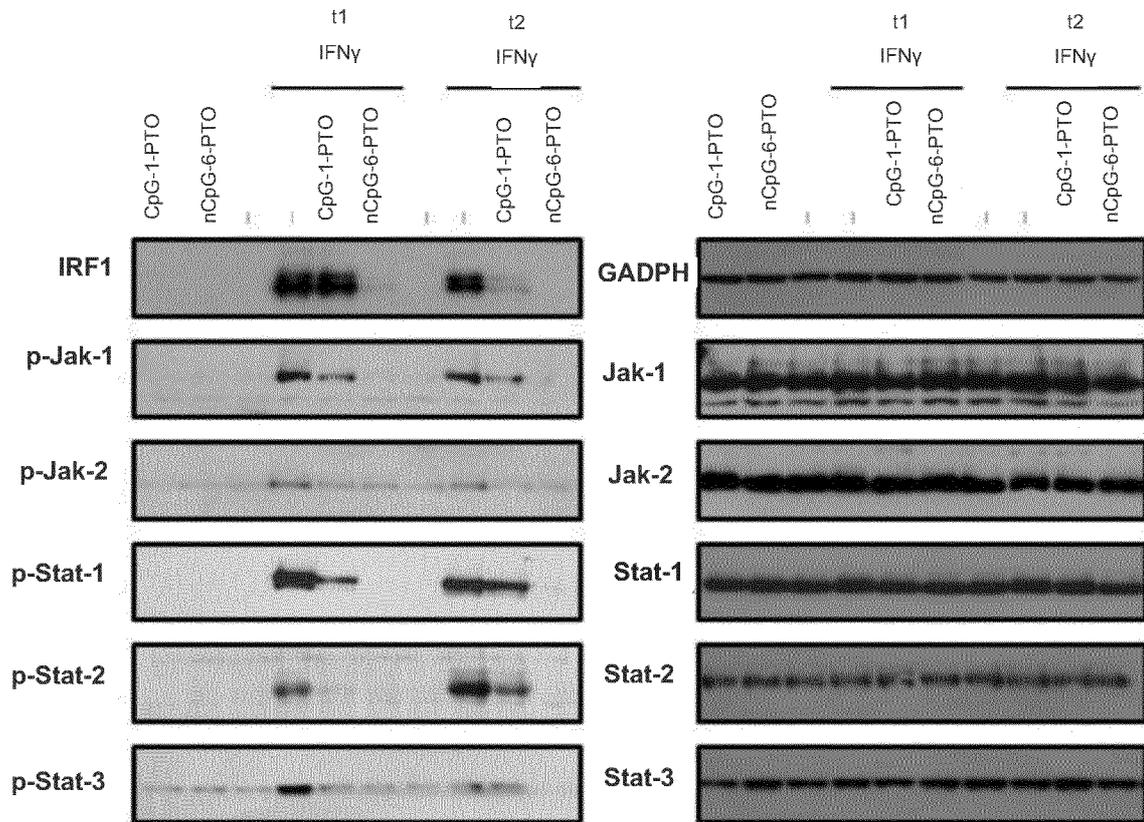
Фиг. 17



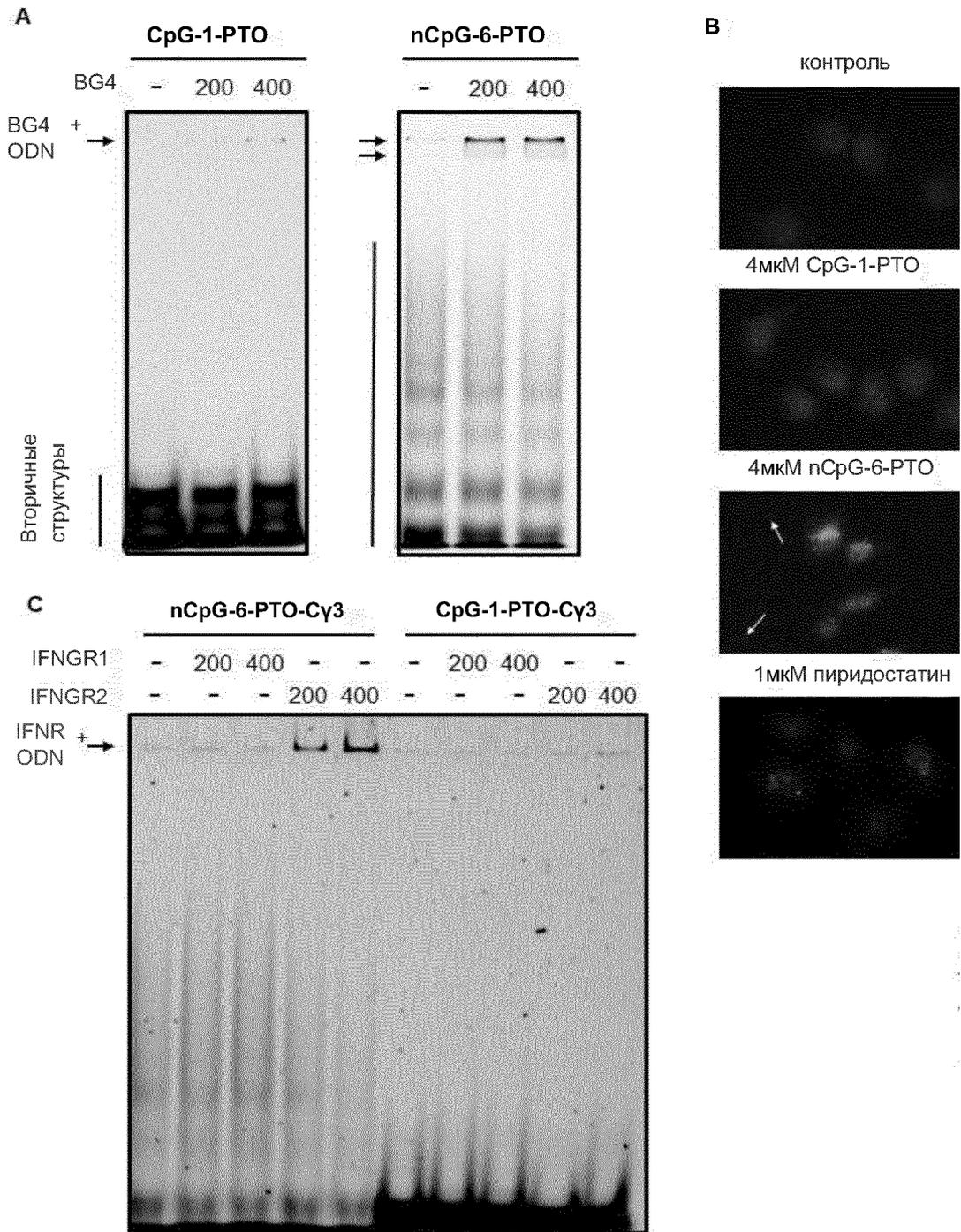
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21