

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491575** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.10.14**

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.12.15**

---

(54) **НОВЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **21306798.6**

(32) **2021.12.16**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2022/086199**

(87) **WO 2023/111203 2023.06.22**

(71) Заявитель:

**ВАЛЕРИО ТЕРАПЬЮТИКС (FR)**

(72) Изобретатель:

**Занданель Кристель (FR), Леметр**

**Марк (US), Ру Лоик (GB)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к новым молекулам нуклеиновых кислот, представляющим терапевтический интерес, в частности для применения при лечении рака.

**202491575**  
**A1**

**202491575**  
**A1**

## НОВЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, к онкологии.

Уровень техники

Ответ на повреждение ДНК (DNA-damage response, DDR) детектирует повреждения ДНК и способствует её восстановлению. Широкое разнообразие типов повреждений ДНК требует множества, в значительной степени различных механизмов репарации ДНК, таких как репарация ошибочного спаривания оснований (MMR), эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (NER), репарация одноцепочечного разрыва (SSB) и репарация двухцепочечного разрыва (DSB). Например, полиаденилрибозополимераза (PARP) по существу участвует в восстановлении SSB, тогда как для восстановления DSB в ДНК используются два основных механизма: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HR). PARP-1 действует как средство первого реагирования, которое детектирует повреждение ДНК, а затем облегчает выбор пути репарации. При NHEJ DSB распознаются белками Ku, которые затем связываются и активируют протеинкиназу DNA-ПКcs, что приводит к рекрутированию и активации ферментов концевое процессирования. Было продемонстрировано, что способность опухолевых клеток восстанавливать терапевтически вызванные повреждения ДНК влияет на терапевтическую эффективность.

Это привело к попытке направленного воздействия на пути и белки репарации ДНК при разработке противораковых агентов, которые повысят чувствительность к традиционным генотоксическим способам лечения (химиотерапия, лучевая терапия). Синтетические летальные подходы в терапии рака обеспечили новые механизмы, нацеленные на раковые клетки, сохраняя при этом здоровые клетки и тем самым снижая токсичность, связанную с лечением.

Среди этих синтетических летальных подходов молекулы Dbait представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, которые имитируют повреждения двухцепочечной ДНК. Они действуют как приманка для ферментов, сигнализирующих о повреждении ДНК, PARP и DNA-ПК, индуцируя «ложный» сигнал повреждения ДНК и существенно ингибируя рекрутирование в месте повреждения множества белков, участвующих в путях DSB и SSB.

Молекулы Dbait подробно описаны в патентных заявках PCT WO2005/040378, WO2008/034866, WO2008/084087, WO2011/161075, WO2017/013237, WO2017/148976 и

WO2019/175132. Молекулы Dbait можно определить по ряду характеристик, необходимых для их терапевтической активности, таких как их минимальная длина, которая может быть переменной, пока эта длина достаточна для обеспечения соответствующего связывания белкового комплекса Ku, содержащего белки Ku и ДНК-РКcs. Таким образом, было показано, что длина молекул Dbait должна быть больше 20 п.о., предпочтительно около 32 п.о., чтобы обеспечить связывание с таким комплексом Ku и сделать возможным активацию ДНК-РКcs.

Были охарактеризованы потенциальные прогностические биомаркеры для лечения с использованием таких молекул Dbait. Чувствительность к молекулам Dbait действительно была связана с высокой спонтанной частотой встречаемости клеток с микроядрами (MN), как описано в патентной заявке РСТ WO2018/162439. Высокий базальный уровень MN был предложен в качестве прогностического биомаркера для лечения молекулами Dbait после проверки на 43 клеточных линиях солидных опухолей из различных тканей и 16 моделях ксенотрансплантатов, полученных из клеток и пациентов.

Более того, недавно было высказано предположение, что микроядра (MN) могут стать ключевой платформой в рамках иммунного ответа, вызванного повреждением ДНК (Gekara J Cell Biol. 2017 Oct 2;216(10):2999-3001). Недавние исследования демонстрируют роль образования MN в иммунной активации, вызванной повреждением ДНК. Интересно, что цитозольный путь обнаружения ДНК действительно оказался основным связующим звеном между повреждением ДНК и врожденным иммунитетом. ДНК обычно находится в ядре и митохондриях; следовательно, ее присутствие в цитоплазме служит молекулярным фрагментом, ассоциированным с опасностью (DAMP), запускающим иммунные реакции. Циклическая гуанозинмонофосфат (ГМФ)-аденозинмонофосфат (АМФ)синтаза (сGAS) представляет собой сенсор, который обнаруживает ДНК как DAMP и индуцирует IFN типа I и другие цитокины. ДНК связывается с сGAS независимым от последовательности способом; это связывание вызывает конформационное изменение каталитического центра сGAS, так что этот фермент может превращать гуанозинтрифосфат (ГТФ) и АТФ во вторичный переносчик информации в виде циклического ГМФ-АМФ (цГАМФ). Эта молекула цГАМФ является эндогенным высокоаффинным лигандом адаптерного белка-стимулятора гена IFN, STING. Активация пути STING может затем включать, например, стимуляцию воспалительных цитокинов IP-10 (также известных как CXCL10) и CCL5 или рецепторов NGK2 и PD-L1.

Недавние данные указывают на участие пути STING (стимулятор генов интерферона) в индукции противоопухолевого иммунного ответа. Поэтому агонисты STING в настоящее время активно разрабатываются как новый класс противоопухолевых

лекарственных средств. Показано, что активация STING-зависимого пути в опухолевых клетках может приводить к инфильтрации опухоли иммунными клетками и модуляции противоопухолевого иммунного ответа.

STING представляет собой адаптер эндоплазматической сети, который способствует передаче сигналов врожденного иммунитета (быстрый неспецифический иммунный ответ, который борется с воздействиями окружающей среды, включая, помимо прочего, патогены, такие как бактерии или вирусы). Сообщалось, что STING способен активировать пути транскрипции NF- $\kappa$ B, STAT6 и IRF3, чтобы индуцировать экспрессию интерферона I типа (например, IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$ ) и после экспрессии оказывает мощное противовирусное действие. Однако разработанные к настоящему времени агонисты STING способны активировать путь STING во всех типах клеток и могут вызывать серьезные побочные эффекты, связанные с их активацией в дендритных клетках. Поэтому агонисты STING применяются местно.

Раковые клетки обладают уникальным энергетическим метаболизмом, обеспечивающим быструю пролиферацию. Предпочтение анаэробного гликолиза в нормальных кислородных условиях является уникальной чертой метаболизма рака и обозначается как эффект Варбурга. Усиленный гликолиз также поддерживает выработку нуклеотидов, аминокислот, липидов и фолиевой кислоты в качестве строительных блоков для деления раковых клеток. Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) представляет собой кофермент, который опосредует окислительно-восстановительные реакции в ряде метаболических путей, включая гликолиз. Повышенные уровни НАД усиливают гликолиз и питают раковые клетки. В этом контексте истощение уровней НАД впоследствии подавляет пролиферацию раковых клеток посредством ингибирования путей производства энергии, таких как гликолиз, цикл трикарбоновых кислот (ТКК) и окислительное фосфорилирование. НАД также служит субстратом для нескольких ферментов, тем самым регулируя репарацию ДНК, экспрессию генов и ответ на стресс посредством этих ферментов. Таким образом, метаболизм НАД участвует в патогенезе рака, помимо энергетического метаболизма, и считается многообещающей терапевтической мишенью для лечения рака, в частности, на раковых клетках, которые демонстрируют дефицит НАД, обусловленный дефицитом генов репарации ДНК (например, дефицитом ERCC1 и ATM) или мутациями IDH (изоцитратдегидрогеназы).

Были созданы продукты нового поколения OX400, спроектированные с использованием олигонуклеотидов запатентованной платформы PlatON™, разработанной для улавливания белков PARP. Было показано, что соединения OX400 специфически

активируют путь STING в опухолевых клетках. Соединения OX400, в частности, соединение OX401, подробно описаны в патентной заявке PCT WO 2020/127965.

Сохраняется потребность в способах лечения рака, особенно в лекарственных средствах на основе нескольких механизмов, в частности на основе путей репарации ДНК и активаторов пути STING, а также в лекарственных средствах, которые могут помочь ингибиторам контрольных точек работать у большего числа пациентов и при более широком спектре видов рака.

Также сохраняется потребность в новых способах лечения, позволяющих успешно воздействовать на популяции раковых клеток без появления раковых клеток, устойчивых к терапии.

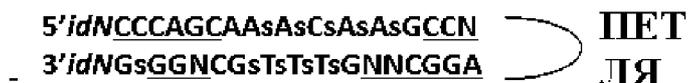
#### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым конъюгированным молекулам нуклеиновой кислоты, которые нацелены на пути репарации ДНК и стимулируют путь STING, в частности, в раковых клетках. Более конкретно, молекула нуклеиновой кислоты способна активировать PARP без какой-либо активации DNA-ПК.

Настоящее изобретение относится к конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей фрагмент двухцепочечной нуклеиновой кислоты длиной от 16 до 17 пар оснований (п.о.), причем 5'-конец первой цепи и 3'-конец комплементарной цепи соединены вместе посредством петли и, необязательно, связанную с петлей молекулу, облегчающую эндоцитоз,

где:

- двухцепочечная нуклеиновая кислота длиной от 16 до 17 пар оснований (п.о.) имеет следующую последовательность



SEQ ID NO: 1 и 2

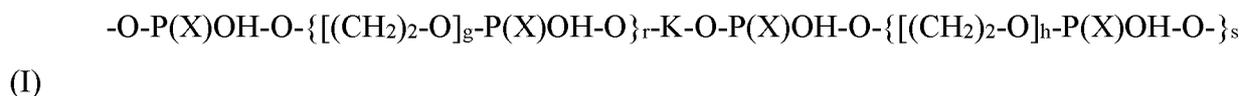
где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где idN представляет собой инвертированные нуклеотиды и присутствует или отсутствует;

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

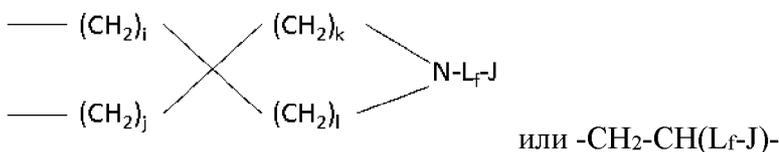
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды,

- петля имеет структуру, выбранную из одной из следующих формул:



где  $r$  и  $s$  независимо представляют собой целое число 0 или 1;  $g$  и  $h$  независимо представляют собой целое число от 1 до 7, а сумма  $g+h$  составляет от 4 до 7;

где  $K$  представляет собой



где  $i$ ,  $j$ ,  $k$  и  $l$  независимо представляют собой целое число от 0 до 6, предпочтительно от 1 до 3,  $L$  представляет собой линкер,  $f$  представляет собой целое число, равное 0 или 1, и  $J$  представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой  $H$ ;

или

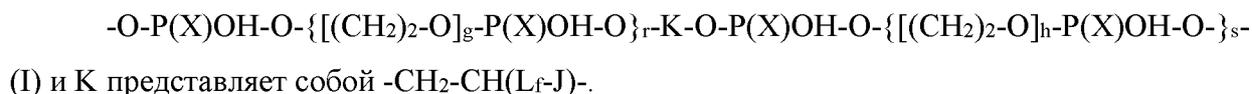


где  $b$  и  $c$  независимо представляют собой целое число от 0 до 4, а сумма  $b+c$  составляет от 3 до 7;

$d$  и  $e$  независимо представляют собой целое число от 1 до 3, предпочтительно от 1 до 2; и где  $R$  равно  $\text{-L}_f\text{-J}$ ,

$X$  представляет собой  $O$  или  $S$  в каждом случае  $\text{-O-P(X)OH-O-}$ ,  $L$  представляет собой линкер, и  $f$  представляет собой целое число, равное 0 или 1, и  $J$  представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой  $H$ ; и

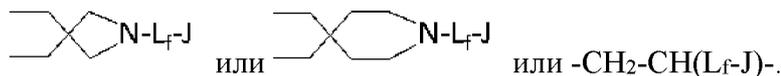
где молекула содержит 1) по меньшей мере один  $N$ , который представляет собой  $U$ , и/или 2) по меньшей мере один присутствующий  $idN$ ; и/или 3) петля представляет собой



В конкретном аспекте  $J$  представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, и молекула, облегчающая эндоцитоз, может быть выбрана из группы, состоящей из холестерина, одно- или двухцепочечных жирных кислот, лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, обеспечивающий опосредованный рецептором эндоцитоз, или трансферрина. Более конкретно, молекулой, облегчающей эндоцитоз, является холестерин.

Необязательно, петля имеет формулу (I) и  $r$  равно 1,  $s$  равно 0 и  $g$  представляет собой целое число от 5 до 7, предпочтительно 6.

Петля может иметь формулу (I), и когда  $i$  и  $j$  равны 1, а  $k$  и  $l$  оба равны 1 или 2,  $K$  представляет собой



Необязательно,  $f$  равно 1, а  $\text{L-J}$  представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ , или  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[\text{C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}]_t\text{-(CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{[C}(\text{O})]_v\text{-J}$  или  $-\text{CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 6; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 2;  $t$  и  $v$  представляют собой целое число 0 или 1, причем по меньшей мере один из  $t$  и  $v$  равен 1.

Необязательно,  $f$  равно 1, и  $\text{L-J}$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$   $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$  и  $-\text{CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 15; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 3.

Необязательно,  $m$  представляет собой целое число от 4 до 6, предпочтительно 5.

Необязательно, петля имеет формулу (I)



(I)

где  $\text{X}$  равно  $\text{S}$ ,  $r$  равно 1,  $g$  равно 6,  $s$  равно 0, а когда  $i$  и  $j$  равны 1, а  $k$  и  $l$  равны 2,  $\text{K}$

представляет собой

где  $f$  равно 1, а  $\text{L-J}$  представляет собой  $\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_3\text{-(CH}_2)_2\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_3\text{-(CH}_2)_3\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_5\text{-CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_9\text{-CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{13}\text{-CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C}(\text{O})\text{-J}$  или  $-\text{CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ .

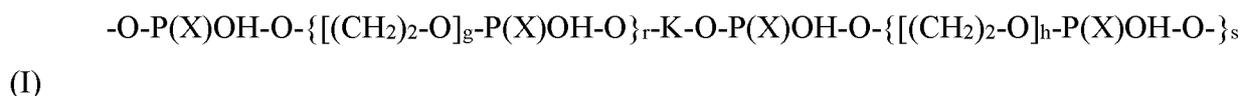
Необязательно,  $f$  равно 1, а  $\text{L-J}$  представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[\text{C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}]_t\text{-(CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{[C}(\text{O})]_v\text{-J}$  или  $-\text{CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 6; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 2;  $t$  и  $v$  представляют собой целое число 0 или 1, причем по меньшей мере один из  $t$  и  $v$  равен 1. В одном аспекте  $m$  представляет собой целое число от 4 до 6, предпочтительно 5.

Необязательно,  $f$  равно 1, и  $\text{L-J}$  выбран из группы, состоящей из  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$   $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C}(\text{O})\text{-J}$ , и  $-\text{CH}_2\text{-O}-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-}$

$(\text{CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 15; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 3. В одном аспекте  $m$  представляет собой целое число от 4 до 6, предпочтительно 5.

В особенно конкретном аспекте L-J может быть выбран из группы, состоящей из -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>9</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>13</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-J или -CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-C(O)-J.

В другом конкретном аспекте петля имеет формулу (I)



где X равно S, r равно 1, g равно 6, s равно 0, i и j равно 1, а k и l равно 2,

где f равно 1, а L-J представляет собой C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>9</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>13</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)-J, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-C(O)-J или -CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-C(O)-J.

Необязательно, петля имеет формулу (I)

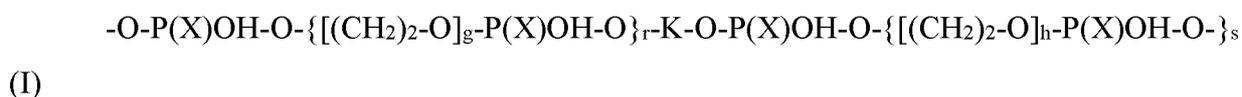


X представляет собой O или S в каждом случае -O-P(X)OH-O-, r равно 1, g равно 6, s равно 0 и K представляет собой CH<sub>2</sub>-CH-(L<sub>f</sub>-J).

В предпочтительном объекте петля представляет собой -O-P(S)OH-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>6</sub>-P(O)OH-O-K-(O-P(S)OH-O)-, где K представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH-(L<sub>f</sub>-J).

В другом предпочтительном объекте петля представляет собой -O-P(S)OH-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>6</sub>-P(S)OH-O-K-(O-P(S)OH-O)-, где K представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH-(L<sub>f</sub>-J).

В другом конкретном аспекте петля имеет формулу (I)



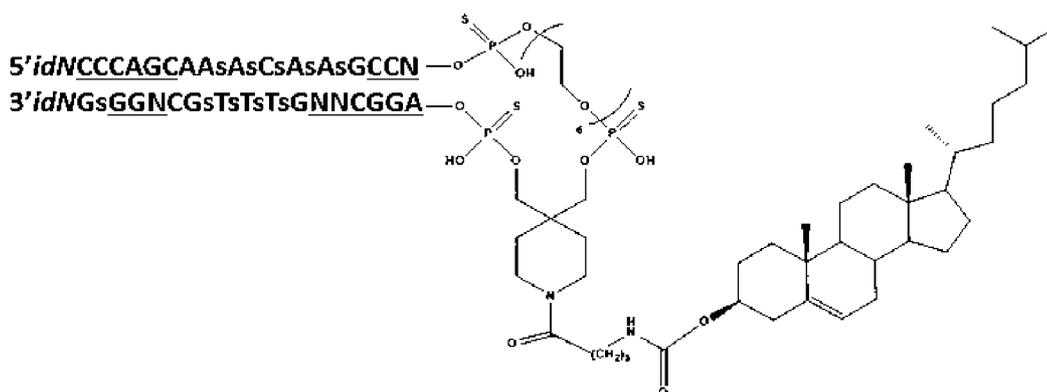
и K представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH(L<sub>f</sub>-J)-, f равно 1, и L-J представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O]<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-C(O)-J, где m равно 3; n равно 3; и p равно 0.

Необязательно, 2'-модифицированные нуклеотиды независимо выбираются из группы, состоящей из 2'-дезоксидезокси-2'-фтор, 2'-О-метила (2'-ОМе), 2'-О-метоксиэтила (2'-ОМОЕ), 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-ДМАЕ), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-ДМАР), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-ДМАЕОЕ),

модификации 2'-O-N-метилацетида (2'-O-NMA), 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотида (FANA) и 2'-мостиковых нуклеотидов (LNA).

В конкретном аспекте 2'-модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотид (FANA). В другом аспекте 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-O-метилнуклеотиды (2'-OMe).

В конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где межнуклеотидные связи «S» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям;

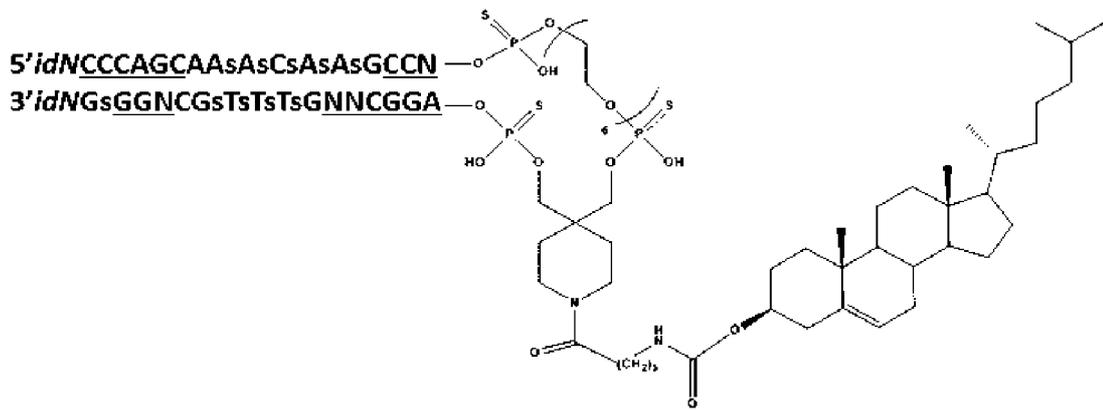
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-O-метилнуклеотиды (2'-OMe); и

где молекула имеет 1) по меньшей мере один N, который представляет собой U, и/или 2) по меньшей мере один присутствующий idN;

или их фармацевтически приемлемые соли.

Необязательно, когда присутствует idN, то он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин, idT

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

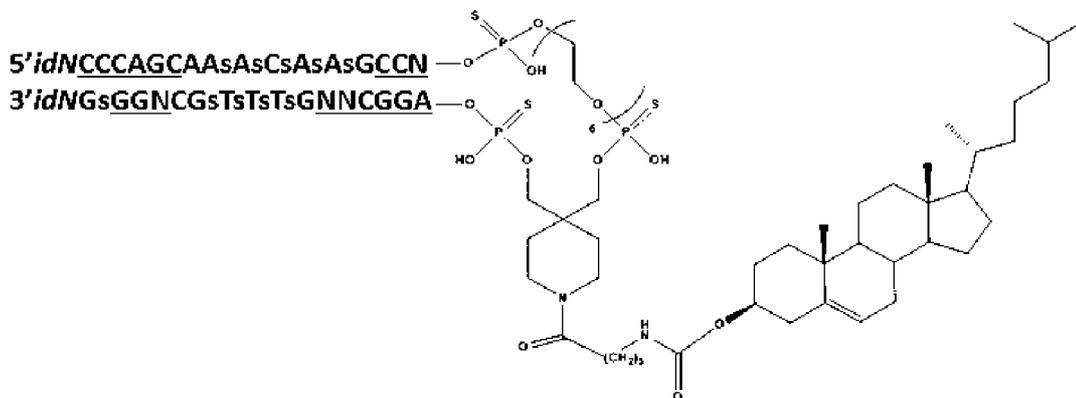
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид, предпочтительно инвертированный тимидин, idT,

где N представляет собой T,

где межнуклеотидные связи «S» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe), или их фармацевтически приемлемые соли.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

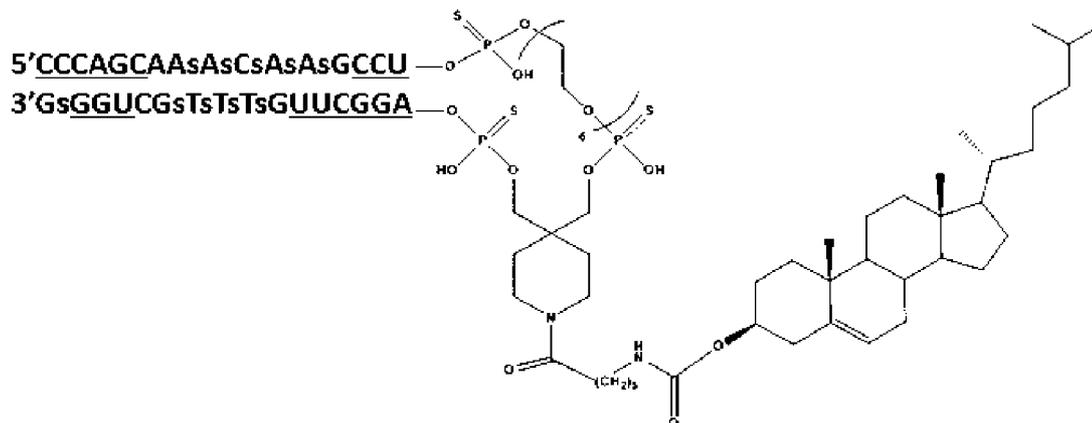
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин, idT,

где N представляет собой U,

где межнуклеотидные связи «S» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), или их фармацевтически приемлемые соли.

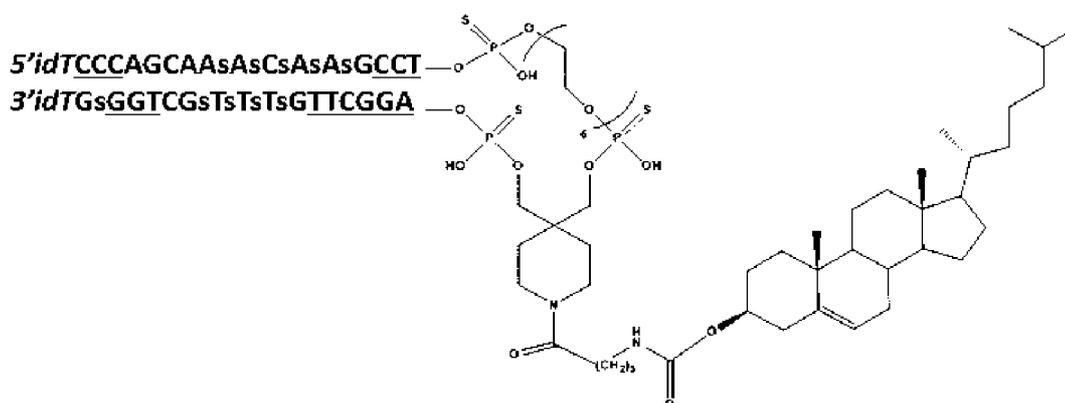
В одном аспекте, когда idN отсутствует, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), молекула представляет собой OX416:



SEQ ID NO: 7 и 8.

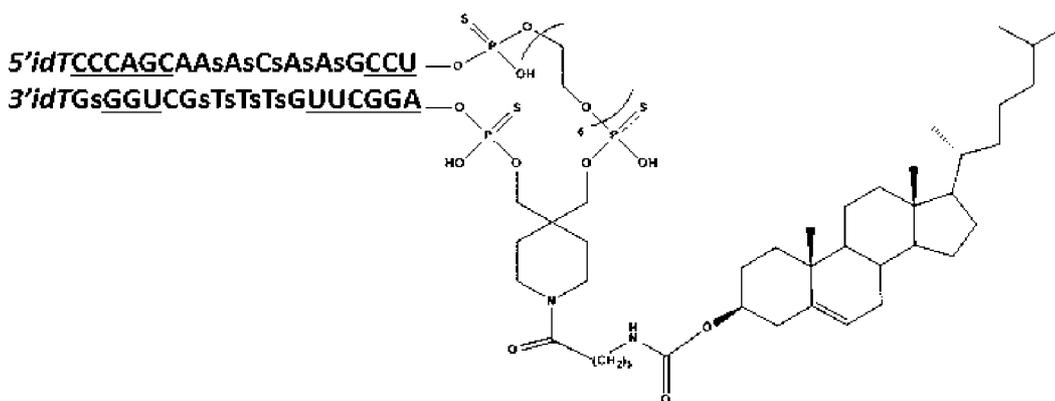
В другом аспекте присутствуют idN и:

- когда idN присутствует и представляет собой idT на 5'-конце и 3'-конце, N представляет собой T, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA), молекула представляет собой OX421:



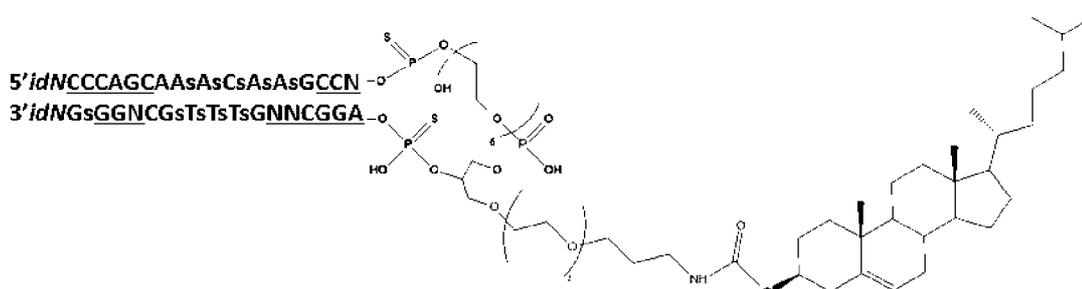
SEQ ID NO: 9 и 10.

- когда idN присутствует и представляет собой idT на 5'-конце и 3'-конце, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), молекула представляет собой OX422:



SEQ ID NO: 11 и 12

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

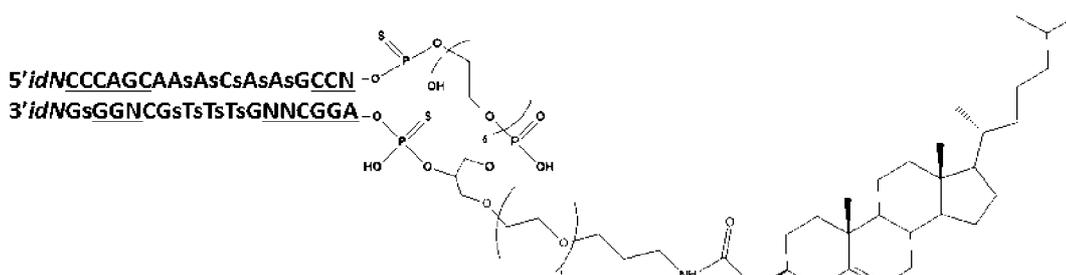
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин, idT,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe),

или их фармацевтически приемлемые соли.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

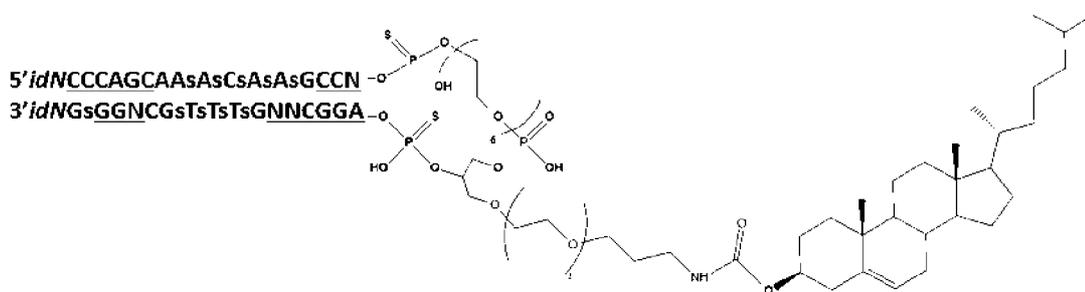
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где N представляет собой T,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe), или их фармацевтически приемлемые соли.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

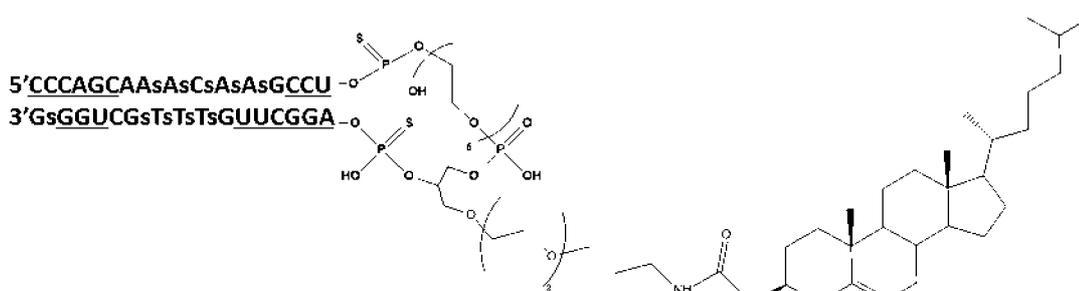
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где N представляет собой U,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

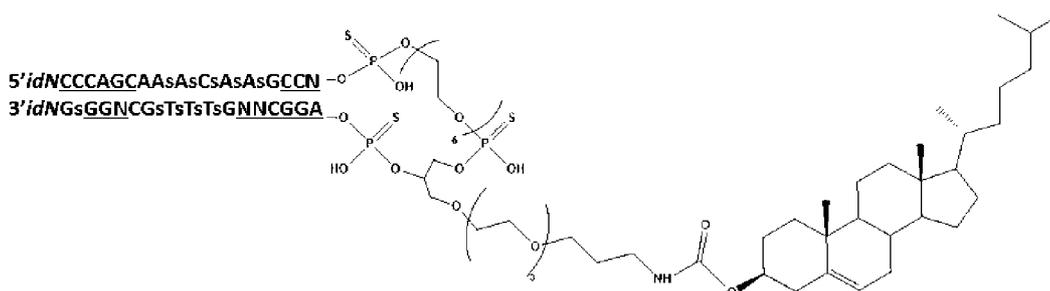
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe), или их фармацевтически приемлемые соли.

В предпочтительном аспекте, когда idN отсутствует, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe), молекула представляет собой OX423:



SEQ ID NO: 7 и 8.

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

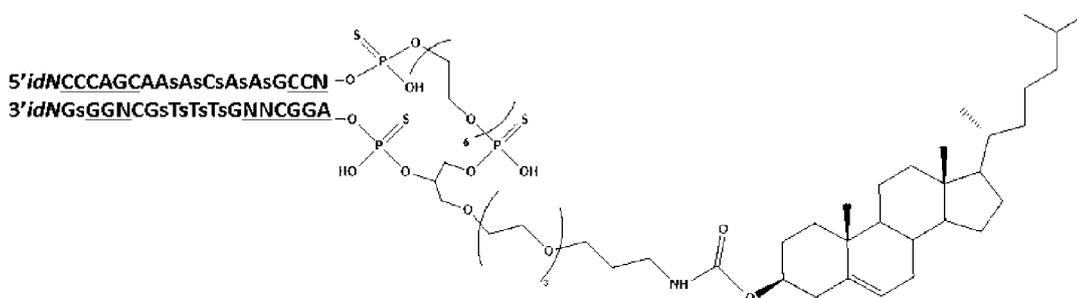
где в каждом случае N независимо представляет собой T или U

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), или их фармацевтически приемлемые соли.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

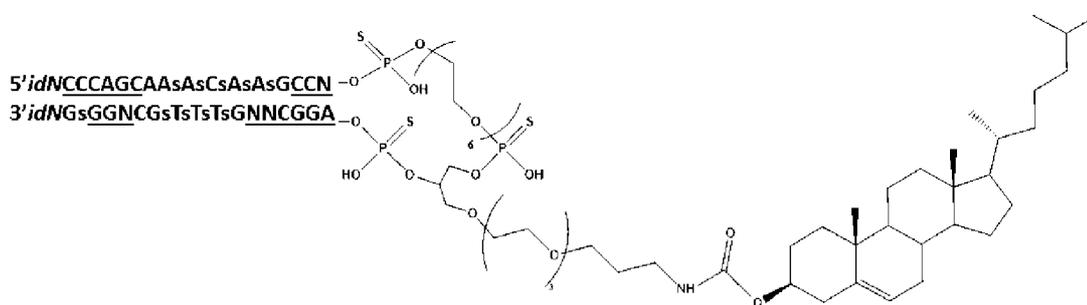
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где N представляет собой T,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), или их фармацевтически приемлемые соли.

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

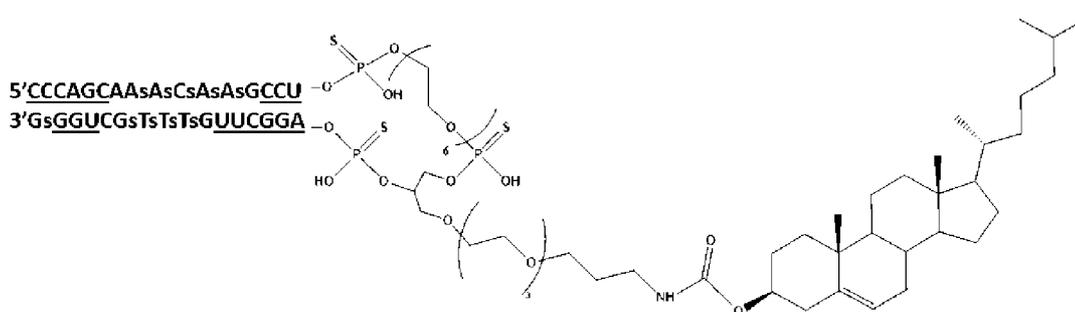
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, и когда idN присутствует, то предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где N представляет собой U,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

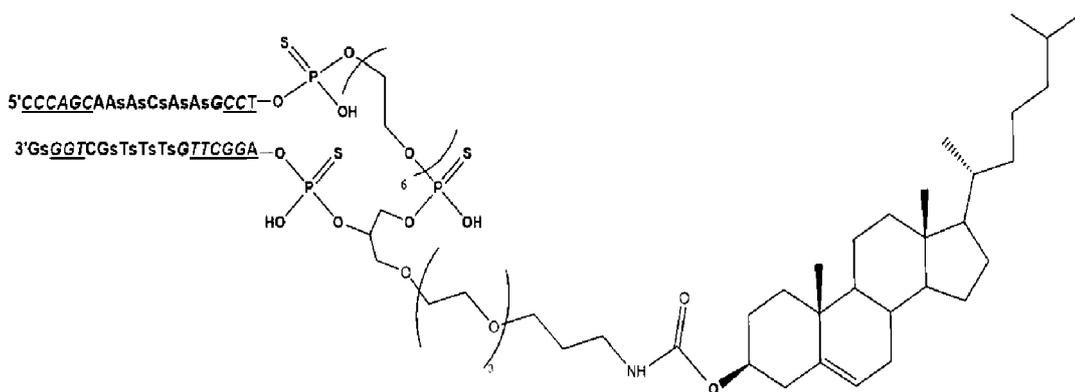
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), или их фармацевтически приемлемые соли.

В предпочтительном аспекте, когда idN отсутствует, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), молекула представляет собой OX424:



SEQ ID NO: 7 и 8.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой OX425:



SEQ ID NO: 19 и 20.

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротриоатным межнуклеотидным связям; и где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (FANA).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит или может быть объединена с дополнительным терапевтическим агентом, предпочтительно выбранным из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), противоопухолевой иммунотерапии на основе Т-клеток, такой как адоптивный перенос клеток (ACT), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или стандартный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент, или таргетный иммунотоксин. В конкретном аспекте дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), Ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317

(Beigene), BGB -108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

Настоящее изобретение также относится к конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты или фармацевтической композиции или ветеринарной композиции согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства, в частности для применения при лечении рака. Оно дополнительно относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение терапевтически эффективного количества конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты или фармацевтической композиции по настоящему изобретению неоднократно или постоянно. Необязательно, способ включает проведение повторных курсов лечения, предпочтительно, по меньшей мере, двух курсов введения, еще более предпочтительно, по меньшей мере, трех или четырех курсов введения.

Повторное или постоянное введение конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению не приводит к развитию устойчивости раковых клеток к терапии. Его можно использовать в комбинации с иммуномодулятором, таким как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), или в комбинации с противораковой иммунотерапией на основе Т-клеток, включая адаптивный перенос клеток (ACT), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки). В конкретном аспекте дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), Ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesarо), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB -108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics). Действительно, синергический эффект наблюдался, когда конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению комбинировали с ингибитором иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитором пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно с анти-PD-1 антителом.

Соответственно, конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция предназначена для применения при лечении рака в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, предпочтительно выбранным из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI),

противоопухолевой иммунотерапии на основе Т-клеток, такой как адоптивный перенос клеток (АСТ), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или стандартный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент, или таргетный иммунотоксин. В конкретном аспекте дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), Ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB -108 (Beigene), INC5HR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

В конкретном аспекте рак выбран из лейкоза, лимфомы, саркомы, меланомы и рака головы и шеи, почек, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, легких, пищевода, молочной железы, мочевого пузыря, головного мозга, ободочной и прямой кишки, печени, эндометрий и шейки матки. Необязательно, рак представляет собой опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации. Альтернативно, рак представляет собой опухоль, способную к гомологичной рекомбинации.

В конкретном аспекте настоящее изобретение также относится к возможной стратегии отбора или стратегии клинической стратификации для пациентов с опухолями, несущими дефицит синтеза НАД<sup>+</sup>. Эти пациенты могут лучше отвечать на медикаментозное лечение согласно настоящему изобретению, в частности, пациенты с опухолями, несущими дефекты обоих путей репарации ДНК (например, дефицит ERCC1 и ATM) или мутации IDH.

В конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция предназначены для применения для направленного воздействия на опухолевые клетки, несущие дефицит синтеза НАД<sup>+</sup>, при лечении рака. Более конкретно, опухолевые клетки дополнительно несут дефекты путей репарации ДНК, выбранные из дефицита ERCC1 или ATM или мутаций IDH.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. OX413-индуцированное взаимодействие с мишенью. Клетки обрабатывали OX413 (5 мкМ) или OX401 (5 мкМ) и активацию PARP оценивали путем измерения клеточного PARилирования. (A) Репрезентативные изображения PARилирования через 48

часов после обработки OX401 или OX413; (B) Количественное определение % положительных клеток с сигналом PARилирования (клетки PAR+).

Фиг. 2. OX413 проявляет высокую противоопухолевую цитотоксичность. Клетки MDA-MB-231 обрабатывали возрастающими дозами OX401 или OX413 и оценивали выживаемость клеток с использованием анализа ХТТ. Выживаемость клеток рассчитывали как отношение живых обработанных клеток к живым необработанным клеткам. IC<sub>50</sub> рассчитывали по кривым «доза-эффект» с использованием программного обеспечения GraphPadPrism.

Фиг. 3. OX413 индуцирует накопление цитоплазматической ДНК и запускает врожденный иммунный ответ. (A) Репрезентативные изображения PARилирования через 48 часов после обработки OX413 (200 нМ). (B, C) Уровни клеток с микроядрами (MN) (B) или фрагментами цитоплазматического хроматина (CCF) (C) анализировали методом иммунофлуоресценции через 48 часов после обработки OX413 (50 и 100 нМ). (D, F, G) Анализ проточной цитометрии биомаркеров (D) pSTING, (F) PD-L1 и (G) MIC-A. (E) Секретируемый CCL5 анализировали в клеточной надосадочной жидкости с помощью ELISA через 48 часов после обработки OX413 (200 нМ).

Фиг. 4. OX413 индуцирует активацию PARP и STING *in vivo*. Опухоли, полученные из ксенотрансплантатов клеток EMT6, обработанных OX413 (10 мг/кг) в течение 6, 24 или 72 часов, извлекали, диссоциировали и сортировали CD45<sup>+</sup> или Cd45<sup>-</sup> (в основном клетки EMT6) (A). На клетках EMT6 анализировали экспрессию (B) PARP, (D) PD-L1 и (C) CCL5 для каждого условия. (E) Процент инфильтрирующих опухоль лейкоцитов (TIL) (CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, DCs-клеток, NK-клеток) определяли с помощью анализа проточной цитометрии.

Фиг. 5. OX413 и OX416 индуцируют взаимодействие с мишенями PARP и активацию пути STING. Анализ проточной цитометрии PARилирования (A, D), STING (B, E) и pSTING (C, F) через 24 и 48 часов после обработки OX413 (500 нМ в EMT6 или 100 нМ в MDA-MB-231) или обработки OX416 (50 нМ). Обработка в клетках EMT6 (A, B, C) и клетках MDA-MB-231 (D, E, F).

Фиг. 6. Фармакокинетика OX413, OX421 и OX422. Средние концентрации OX413 (A), OX422 (B) и OX423 (C) с течением времени в крови мышей после внутрибрюшинного введения лекарственного средства (OX413, OX422 или OX423).

Фиг. 7. Противоопухолевая эффективность OX413 и OX416 на модели клеток молочной железы EMT-6 с высоким уровнем PARP. Обработка OX413 (20 мг/кг два раза в неделю) и OX416 (20 мг/кг два раза в неделю) ингибировала рост опухоли у мышей Balb/c, несущих опухолевые клетки молочной железы EMT-6 с высоким уровнем PARP.

Фиг. 8. ОХ425 улавливает и гиперактивирует PARP. (А) Взаимодействие ОХ425 с PARP1 оценивали с помощью рекомбинантных белков PARP1 (rPARP1) и анализа сдвига в геле. (В) Репрезентативные изображения PARилирования в клетках MDA-MB-231 и MDA-MB-436, не обработанных (контроль) или обработанных ОХ425 (от 100 до 500 нМ) в течение 24 часов. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) оценивали для оценки уровня PARилирования.

Фиг. 9. Эффективность ОХ425 специфична для опухолевых клеток. (А) Чувствительность к возрастающим дозам ОХ425 (до 2 мкМ) различных линий опухолевых клеток с различным статусом репарации гомологичной рекомбинации (HR) (дефицит HR, HRD или способные к HR, HRP) оценивали с помощью анализа ХТТ на 6-й день после обработки. IC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPadPrism. (В) Чувствительность РВМС к различным ингибиторам репарации ДНК оценивали путем подсчета клеток на 3-й день после обработки.

Фиг. 10. Эффективность ОХ425 в клеточных моделях HRD и HRP. (А) Чувствительность к ОХ425 клеток рака яичника UWB1.289 с мутацией BRCA1 (UWB1.289) по сравнению с их аналогами, дополненными BRCA1 (UWB1.289 BRCA1), оценивали с помощью анализа ХТТ через 6 дней после обработки. IC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPadPrism. (В) Раковые клеточные линии с различным мутационным статусом группировали на клетки с дефицитом гомологичной рекомбинации (HRD) или клетки, способные к ней (HRP) и сравнивали анализы этих двух групп относительно их чувствительности к ОХ425 или олапарибу, выполненные с использованием непарного t-критерия Стьюдента. ns, не значимо; \*, p<0,05.

Фиг. 11. Эффективность ОХ425 при опухолях, прогрессирующих на фоне обработки олапарибом. (А) изменения размера опухоли CDX MDA-MB-436 после непрерывной обработки олапарибом в дозе 100 мг/кг – 5 дней в неделю (зеленая кривая – среднее значение для 10 независимых мышей) или олапарибом + ОХ425 10 мг/кг 1 раз в неделю, вводили на 30-й день после начала приема олапариба (красная кривая - среднее значение для 10 независимых мышей). (В) % изменения размера опухоли на 74 день (конец обработки) по сравнению с днем 0 (начало обработки) у мышей (n=10). Опухоли, прогрессировавшие более чем на +20% по сравнению с днем 0, считаются прогрессирующими, от +20% до –30% считаются стабильными, от –30% до –99% – частичный ответ, а 100% – полный ответ, аналогично критериям RECIST. (С) % изменения массы тела по сравнению с днем 0. (D) Функциональность репарации гомологичной рекомбинацией в ксенотрансплантате, полученном из клеток MDA-MB-436, анализировали во время начала обработки олапарибом, а также при раннем и позднем

возникновении резистентности с использованием анализа окрашивания RAD51 IHC. HRD, дефицит гомологичной рекомбинации; HRP, способность к гомологичной рекомбинации.

Фиг. 12. OX425 индуцирует активацию пути STING и противоопухолевые иммунные реакции. Опухолевые клетки рака поджелудочной железы PAN02 обрабатывали OX425 и оценивали на предмет (A) активации PARP через 24 часа после обработки, (B) чувствительности на 6-й день после обработки, активации пути STING посредством (C) фосфорилирования STING, (D) высвобождения CCL5 и (E) Сверхэкспрессии PD-L1, через 48 часов после обработки. (F) Активацию PARP также оценивали в ксенотрансплантатах, полученных из PAN02, а также в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL, CD45+ клетках) и (H) эффекты задержки роста опухоли в опухолях, обработанных OX425 в дозе 25 мг/кг 2 раза в неделю в течение трех недель.

Фиг. 13. OX425 увеличивает иммунную инфильтрацию в микроокружении опухоли. Ксенотрансплантаты, полученные из клеток рака молочной железы EMT6, обрабатывали OX425 в дозе 25 или 100 мг/кг в день 0, 3 и 5, а опухоли собирали в день 6 для анализа микроокружения опухоли. % различных иммунных популяций (CD3, CD4, CD8, CD4+CD49b+) анализировали методом проточной цитометрии после диссоциации опухоли и сортировки CD45+ клеток. (A) % CD45+ и CD3+, нормализованные к общему количеству клеток, полученных после диссоциации опухоли. (B) Количественно определяли CD3+, CD4+ и CD8+% опухоль инфильтрирующих лимфоцитов (TIL). (C) Инфильтрация специфической Treg-подобной популяции (CD45+ CD4+ CD49b+) в опухоль (n=6).

Фиг. 14. OX425 индивидуально или в комбинации с блокадой PD-1 опосредует иммунотерапевтическую активность одного агента в моделях рака молочной железы HR+HER2, устойчивых к PD-1. Опухоли молочной железы, индуцируемые MPA/DMBA, обрабатывали OX425 в дозе 25 или 5 мг/кг два раза в неделю (2 раза в неделю) или один раз в неделю (1 раз в неделю), оценивали рост опухоли и выживаемость животных. Также проводили статистический анализ выживаемости животных. ns, не значимо.

Фиг. 15. OX425 проявляет более высокую противоопухолевую активность. Чувствительность к возрастающим дозам OX425 (до 2 мкМ) различных опухолевых клеточных линий с различным статусом репарации гомологичной рекомбинации (HR) (дефицит HR, HRD или опытный HR, HRP) оценивали с помощью анализа ХТТ на 6-й день после обработки. IC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPadPrism.

### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новым молекулам нуклеиновой кислоты, конъюгированным с молекулой, облегчающей эндоцитоз, таким как конъюгаты холестерин-нуклеиновая кислота, которые направленно воздействуют и специфически активируют PARP, вызывая глубокую отрицательную регуляцию клеточного НАД и, следовательно, конкретно предназначенные для лечения рака, в частности, раковых клеток, которые демонстрируют дефицит НАД, обусловленный дефицитом генов репарации ДНК (например, дефицитом ERCC1 и ATM) или мутациями IDH (изоцитратдегидрогеназы).

Настоящее изобретение относится к новым молекулам нуклеиновой кислоты, конъюгированным с молекулой, облегчающей эндоцитоз, таким как конъюгаты холестерин-нуклеиновая кислота, которые направленно воздействуют на механизмы DDR, а также являются агонистами STING, что позволяет комбинировать их с терапией, направленной на иммунные контрольные точки (immune checkpoint therapy, ICT), для оптимального лечения рака.

Предложены новые конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению:

1) Активация PARP без активации DNA-ПК конъюгированными молекулами нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению приводит к увеличению раковых клеток с микроядрами, фрагментами цитоплазматического хроматина (CCF) и цитотоксичности при индивидуальном применении по сравнению с молекулами Dbait.

2) Специфическое увеличение количества микроядер (MN) и фрагментов цитоплазматического хроматина (CCF) в раковых клетках приводит к раннему увеличению активации пути STING, о чем свидетельствует увеличение высвобождения воспалительных цитокинов (CCL5) и экспрессия лигандов PD-L1 и NKG2D (MIC-A) на раковых клетках. Эти эффекты специфичны для раковых клеток. Такая специфичность раковых клеток предотвращает общее и обширное воспаление с последующими возможными вредными побочными эффектами.

3) Активация пути STING посредством ингибирования пути репарации ДНК и образования как микроядер, так и CCF представляет собой очень привлекательный способ специфической активации пути STING в опухолевых клетках, в частности, путем активации врожденного иммунитета.

4) Конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению обеспечивают высокую противоопухолевую активность как в опухолях с дефицитом

гомологичной рекомбинации, так и в опухолях, способных к ней, в отличие от современных ингибиторов PARP.

5) Конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению оказывают множество иммуностимулирующих эффектов, что делает их интересной терапевтической стратегией в комбинации с иммунотерапией, особенно в «холодных» опухолях. Синергический эффект наблюдался при использовании конъюгированных молекул нуклеиновой кислоты в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек.

На основании этих наблюдений настоящее изобретение относится к:

- конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке;

- фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель, в частности, для применения при лечении рака;

- конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства, в частности, для применения при лечении рака;

- применению конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, описанной в настоящей заявке, для производства лекарственного средства, в частности, для применения при лечении рака;

- способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящей заявке;

- фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке, дополнительный терапевтический агент и фармацевтически приемлемый носитель, в частности, для применения при лечении рака;

- продукту или набору, содержащему (а) конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящей заявке, и необязательно б) дополнительный терапевтический агент в виде комбинированного состава для одновременного, раздельного или последовательного применения, в частности, при лечении рака;

- комбинированному составу, который содержит (а) молекулу нуклеиновой кислоты-спильки, раскрытую ниже, б) дополнительный терапевтический агент, как описано в настоящей заявке, для одновременного, раздельного или последовательного применения, в частности, при лечении рака;

- фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящей заявке, для применения при лечении рака в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом;

- применению фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящей заявке, для производства лекарственного средства для лечения рака в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом;

- способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества а) конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящей заявке, и б) эффективного количества дополнительного терапевтического агента;

- способу лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты, раскрытую в настоящей заявке, и эффективного количества дополнительного терапевтического агента;

- способу повышения эффективности лечения рака с помощью терапевтического противоопухолевого агента или повышения чувствительности опухоли к лечению терапевтическим противоопухолевым агентом у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящей заявке;

- способу лечения рака, включающему введение конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящей заявке, неоднократно или постоянно, посредством повторяющихся курсов лечения, предпочтительно, по меньшей мере, в течение двух курсов введения, еще более предпочтительно, по меньшей мере, трех или четырех курсов введения;

- способу лечения рака у пациентов с опухолевыми клетками, несущими дефицит синтеза НАД<sup>+</sup> и, необязательно, дефицит путей репарации ДНК, выбранный из дефицита ERCC1 или ATM или мутаций IDH.

#### Определения

Всякий раз, когда во всем описании «лечение рака» или тому подобное упоминается со ссылкой на фармацевтическую композицию, набор, продукт и комбинированный состав по изобретению, имеется в виду: а) способ лечения рака, причем указанный способ включает введение фармацевтической композиции, набора, продукта и комбинированного состава по изобретению пациенту, нуждающемуся в таком лечении; б) фармацевтическая композиция, набор, продукт и комбинированный состав по

изобретению для применения при лечении рака; с) применение фармацевтической композиции, набора, продукта и комбинированного состава по изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака; и/или d) фармацевтическая композиция, набор, продукт и комбинированный состав по изобретению для применения при лечении рака.

В контексте изобретения термин «лечение» означает лечебное, симптоматическое и профилактическое лечение. Фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные составы по изобретению можно применять у людей с существующим раком или опухолью, в том числе на ранних или поздних стадиях прогрессирования рака. Фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные составы по изобретению не обязательно излечат пациента, имеющего рак, но будут задерживать или замедлять прогрессирование или предотвращать дальнейшее прогрессирование заболевания, улучшая тем самым состояние пациентов. В частности, фармацевтические композиции, наборы, продукты и комбинированные составы по настоящему изобретению уменьшают развитие опухолей, уменьшают опухолевую нагрузку, вызывают регрессию опухоли у млекопитающего-хозяина и/или предотвращают появление метастазов и рецидив рака. При лечении рака фармацевтическую композицию, набор, продукт и комбинированный состав по настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве.

Термины «набор», «продукт» или «комбинированный состав», используемые в настоящем описании, определяют, в частности, «набор частей» в том смысле, что партнеры по комбинации (a) и (b), как определено выше, могут быть дозированы независимо или с использованием различных фиксированных комбинаций с разными количествами партнеров по комбинации (a) и (b), т.е. одновременно или в разные моменты времени. Компоненты набора из частей могут затем вводиться, например, одновременно или в хронологическом порядке, то есть в разные моменты времени и с равными или разными интервалами времени для любой части набора из частей. Соотношение общих количеств партнера по комбинации (a) к партнеру по комбинации (b), вводимых в комбинированном составе, можно варьировать. Партнеры по комбинации (a) и (b) можно вводить одним и тем же путем или разными путями.

Под «эффективным количеством» подразумевается количество фармацевтической композиции, набора, продукта и комбинированного состава по изобретению, которое предотвращает, устраняет или снижает вредное воздействие рака у млекопитающих, включая человека, индивидуально или в комбинации с другими активными ингредиентами фармацевтической композиции, набора, продукта или комбинированного

состава. Понятно, что вводимые дозы могут быть адаптированы специалистами в данной области соответственно пациенту, способу введения и т.д.

Термин «STING» относится к стимулятору рецептора генов интерферона (STimulator of INterferon Genes receptor), также известному как TMEM173, ERIS, MITA, MPYS, SAVI или NET23). В настоящей заявке термины «STING» и «рецептор STING» используются взаимозаменяемо и включают различные изоформы и варианты STING. Последовательности мРНК и белков изоформы 1 человеческого STING, самой длинной изоформы, имеют эталонную последовательность NCBI [NM\_198282.3] и [NP\_938023.1]. Последовательности мРНК и белка для изоформы 2 человеческого STING, более короткой изоформы, имеют эталонную последовательность NCBI [NM\_001301738.1] и [NP\_001288667.1].

Термин «активатор STING», используемый в настоящем описании, относится к молекуле, способной активировать путь STING. Активация пути STING может включать, например, стимуляцию воспалительных цитокинов, включая интерфероны, такие как интерфероны типа 1, включая IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , интерфероны типа 3, например, IFN- $\lambda$ , IP-10 (интерферон- $\gamma$ -индуцируемый белок, также известный как CXCL10), PD-L1, TNF, IL-6, CXCL9, CCL4, CXCL11, лиганд NKG2D (MICA/B), CCL5, CCL3 или CCL8. Активация пути STING может также включать стимуляцию фосфорилирования TANK-связывающей киназы (TBK) 1, активацию регуляторного фактора интерферона (IRF) (например, активацию IRF3), секрецию IP-10 или других воспалительных белков и цитокинов. Активацию пути STING можно определить, например, по способности соединения стимулировать активацию пути STING, что обнаруживается с помощью анализа стимуляции интерфероном, анализа репортерного гена (например, анализа hSTING wt или анализа THP1-Dual), анализа активации TBK1, анализа IP-10 или других анализов, известных специалистам в данной области. Активация пути STING также может определяться способностью соединения повышать уровень транскрипции генов, которые кодируют белки, активируемые STING или путем STING. Такую активацию можно обнаружить, например, с помощью анализа RNAseq.

Активацию пути STING можно определить с помощью одного или более «анализов STING», выбранных из: анализа стимуляции интерферона, анализа hSTING wt, анализа THP1-Dual, анализа TANK-связывающей киназы 1 (TBK1), анализа секреции интерферон- $\gamma$ -индуцируемого белка 10 (IP-10) или анализ PD-L1.

Более конкретно, молекула является активатором STING, если она способна стимулировать выработку одного или более STING-зависимых цитокинов в STING-экспрессирующей клетке по меньшей мере в 1,1 раза, в 1,2 раза, в 1,3 раза, в 1,4 раза, в 1,5

раза, в 1,6 раза, в 1,7 раза, в 1,8 раза, 1,9 раза, в 2 раза или больше, чем необработанная клетка, экспрессирующая STING. Предпочтительно STING-зависимый цитокин выбран из интерферона, интерферона 1 типа, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , интерферона 3 типа, IFN- $\lambda$ , CXCL10 (IP-10), PD-L1 TNF, IL-6, CXCL9, CCL4, CXCL11, лиганда NKG2D (MICA/B), CCL5, CCL3 или CCL8, более предпочтительно CCL5 или CXCL10.

Конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты

Дополнительное преимущество некоторых конъюгированных молекул нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению основано на том факте, что их можно синтезировать как одну молекулу только с использованием твердофазного синтеза олигонуклеотидов, что обеспечивает низкие затраты и большие масштабы производства.

Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержит фрагмент двухцепочечной нуклеиновой кислоты длиной от 16 до 17 пар оснований, при этом 5'-конец первой цепи и 3'-конец комплементарной цепи соединены вместе петлей, и необязательно содержит молекулу, облегчающую эндоцитоз, которая связана с петлей. Другой конец фрагмента двухцепочечной нуклеиновой кислоты свободен.

Конъюгированные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно определить по ряду характеристик, необходимых для их терапевтической активности, таких как их длина от 16 до 17 п.н., наличие по меньшей мере одного свободного конца и наличие двухцепочечной части, предпочтительно двухцепочечной части ДНК с наличием фосфоротиоатных межнуклеотидных связей и нуклеотидных модификаций, соответствующих положению 2' рибозы нуклеотидов. Конкретная комбинация фосфоротиоатных межнуклеотидных связей и 2'-модифицированных нуклеотидов неожиданно связана с улучшенной активностью и фармакокинетикой.

Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты способна активировать белок PARP-1. С другой стороны, конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты не активирует ДНК-РК.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтически приемлемой соли конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Молекулы нуклеиновых кислот

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержат двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты, причем 5'-конец первой цепи и 3'-конец комплементарной цепи соединены вместе петлей, длина конъюгированных молекул нуклеиновой кислоты имеет от 16 до 17 пар оснований (п.о.), что обеспечивает

соответствующее связывание и активацию белка PARP (PARP-1) и является недостаточным для обеспечения соответствующего связывания белкового комплекса Ku, содержащего белки Ku и ДНК-РКс. Под «п.о.» подразумевается, что молекулы содержат двухцепочечную часть указанной длины.

Конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты не гибридизуются в жестких условиях с геномной ДНК человека.

В одном аспекте тимидины могут быть заменены 2'-дезоксидефторарабинотимидином, гуанозины могут быть заменены 2'-дезоксидефторарабинотимидином; цитидины могут быть заменены 2'-дезоксидефторарабиноцитидином; или аденины могут быть заменены 2'-дезоксидефторарабиноаденином.

В другом воплощении уридин может быть заменен 2'-О-метилуридином (2'-ОМе-уридином), гуанозин может быть заменен 2'-О-метилгуанозином (2'-ОМе-гуанозином); цитидин может быть заменен 2'-О-метилцитидином (2'-ОМе-цитидином); аденин может быть заменен 2'-О-метиладенином (2'-ОМе-аденином); или тимидин может быть заменен 2'-О-метилтимидином (2'-ОМе-тимидином).

Когда идентифицируется взаимодействие между 2'-положением нуклеотида и PARP-1, нуклеотид остается без каких-либо модификаций в 2'-положении. Когда идентифицируется взаимодействие между соединением нуклеотидов и PARP-1, модификации нуклеотидов представляют собой 2'-модификации. Когда нуклеотиды не имеют какого-либо известного взаимодействия с PARP-1, межнуклеотидные связи этих нуклеотидов были химически модифицированы путем введения фосфоротиоатов («s»), чтобы защитить их от деградации. Поскольку молекулы двухцепочечной нуклеиновой кислоты имеют от 16 до 17 пар оснований, были выполнены симметричные химические модификации, а именно: имеется 6 2'-модифицированных нуклеотидов на 5'-конце каждой цепи и 3 2'-модифицированных нуклеотида на 3'-конце каждой цепи, и большинство нуклеотидов между этими участками 2'-модифицированных нуклеотидов имеют фосфоротиоатную связь.

Согласно одному воплощению конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты содержат модификацию, соответствующую положению 2' рибозы. Например, конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты могут содержать по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид, например, имеющий 2'-дезоксидефтор, 2'-О-метил (2'-ОМе), 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-ДМАЕ), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-ДМАР), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-ДМАЕОЕ) или 2'-О-N-метилацетиламино (2'-О-NМА)

модификацию или, например, 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотид (FANA). В другом воплощении конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты содержат модификацию в 2'-положении, соответствующую 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотидам (FANA), и 2'-О-метилу (2'-ОМе).

В конкретном аспекте конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты содержат 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA). В другом аспекте 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе).

Необязательно, молекулы двухцепочечной нуклеиновой кислоты могут иметь на своем 5'-свободном конце и/или 3'-свободном конце инвертированный нуклеотид (idN). Необязательно, молекулы двухцепочечной нуклеиновой кислоты могут иметь на своем 5'-свободном конце и 3'-свободном конце инвертированный нуклеотид (idN). Инвертированный нуклеотид (idN) может представлять собой инвертированный гуанидин, аденин, цитидин или тимидин. Предпочтительно инвертированный нуклеотид (idN) представляет собой инвертированный тимидин (idT). Более конкретно, инвертированный нуклеотид (idN) на свободном 5'-конце связан связью 5'-5', а инвертированный нуклеотид (idN) на свободном 3'-конце связан связью 3'-3'.

В конкретном аспекте фрагмент двухцепочечной нуклеиновой кислоты имеет следующую последовательность:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и,

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды.

Необязательно, все N представляют собой T. Необязательно, все N представляют собой U.

Необязательно, idN отсутствует. Необязательно, присутствует idN. Необязательно, idN присутствует на 5'-конце. Необязательно, idN присутствует на 3'-конце. Необязательно, idN присутствует на 5'-конце и на 3'-конце.

Необязательно, 2'-модифицированный нуклеотид независимо выбирают из группы, состоящей из 2'-дезоксидезокси-2'-фтора, 2'-О-метила (2'-ОМе), 2'-О-метоксиэтила (2'-ОМОЕ), 2'-

О-аминопропила (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-O-DMAE), 2'-О-диметиламинопропила (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-O-DMAEOE), модификации 2'-О-N-метилацетамидо (2'-O-NMA), 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотида (FANA) и 2'-мостиковых нуклеотидов, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотидов (FANA) и 2'-О-метила (2'-OMe).

В конкретном аспекте 2'-модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотид (FANA). FANA имеет структуру, подобную ДНК, что приводит к неизменному распознаванию конъюгированных молекул нуклеиновых кислот интересующими белками. FANA включает следующие пиримидиновые 2'-фторарабинонуклеозиды и пуриновые 2'-фторарабинонуклеозиды:

- 9-(2-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)аденин (2'-FANA-A);
- 9-(2-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)гуанин (2'-FANA-G);
- 1-(2-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)цитозин (2'-FANA-C);
- 1-(2-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)урацил (2'-FANA-U); и
- 1-(2-Дезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)тимидин (2'-FANA-T).

В другом аспекте 2'-модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-О-метилнуклеотид (2'-OMe). Более конкретно, уридин можно заменить 2'-О-метилуридином (2'-OMe-уридин), гуанозин можно заменить 2'-О-метилгуанозином (2'-OMe-гуанозин); цитидин можно заменить 2'-О-метилцитидином (2'-OMe-цитидин); аденин можно заменить 2'-О-метиладенином (2'-OMe-аденин); или тимидин можно заменить на 2'-О-метилтимидин (2'-OMe-тимидин).

#### Петли

Петля связана с 5'-концом первой цепи и 3'-концом комплементарной цепи двухцепочечного фрагмента и, необязательно, с молекулой, облегчающей эндоцитоз.

Петля предпочтительно содержит цепь из 10-100 атомов, предпочтительно из 15-25 атомов.

Молекулы, облегчающие эндоцитоз, конъюгированы с петлей, необязательно через линкер. Любой линкер, известный в данной области техники, может быть использован для ковалентного присоединения молекулы, облегчающей эндоцитоз, к петле. Например, в WO09/126933 представлен широкий обзор удобных линкеров на страницах 38-45. Линкер может представлять собой, помимо прочего, алифатическую цепь, полиэфир, полиамин, полиамид, пептид, углевод, липид, полиуглеводород или другие полимерные соединения (например, олигоэтиленгликоли, такие как те, что имеют от 2 до 10 этиленгликольных единиц, предпочтительно, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 этиленгликольных единиц, еще более предпочтительно, 6 этиленгликольных единиц), а также включая любые связи, которые



число, равное 0 или 1, и J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой H;

или



где b и c независимо представляют собой целое число от 0 до 4, а сумма b+c составляет от 3 до 7;

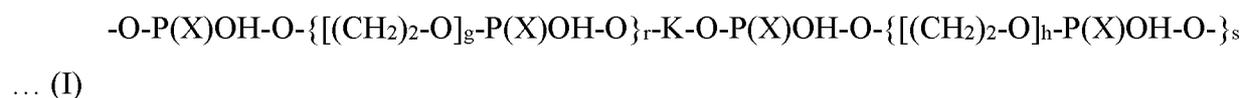
d и e независимо представляют собой целое число от 1 до 3, предпочтительно от 1 до 2;

где R представляет собой -L<sub>f</sub>-J,

где X представляет собой O или S в каждом случае -O-P(X)OH-O-, причем L представляет собой линкер, предпочтительно линейный алкилен и/или олигоэтиленгликоль, необязательно прерываемый одной или несколькими группами, выбранными из аминогруппы, амидной группы и оксогруппы, и f представляет собой целое число, равное 0 или 1, и J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой H.

Когда J представляет собой H, молекулу можно использовать в качестве синтона для получения молекулы, конъюгированной с молекулой, облегчающей эндоцитоз. Альтернативно, молекулу можно также использовать в качестве лекарственного средства без какой-либо конъюгации с молекулой, облегчающей эндоцитоз.

В первом аспекте петля имеет структуру согласно формуле (I):



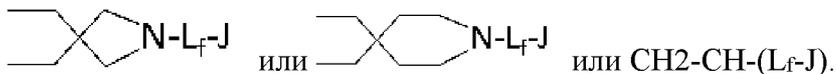
X представляет собой O или S. X может варьироваться между O и S при каждом появлении -O-P(X)OH-O- в формуле (I). Предпочтительно X представляет собой S.

Сумма g+h предпочтительно составляет от 5 до 7, особенно равна 6. Соответственно, если r равно 0, h может составлять от 5 до 7 (при этом s равно 1); если g равно 1, h может составлять от 4 до 6 (при этом r и s равны 1); если g равно 2, h может составлять от 3 до 5 (при этом r и s равны 1); если g равно 3, h может составлять от 2 до 4 (при этом r и s равны 1); если g равно 4, h может составлять от 1 до 3 (при этом r и s равны 1); если g равно 5, h может составлять от 1 до 2 (при этом r равно 1, а s равно 0 или 1); или если g равно 6 или 7, s равно 0 (где r равно 1).

Предпочтительно, i и j могут быть одним и тем же целым числом или могут быть разными. i и j могут быть выбраны из целых чисел 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 1, 2 или 3, еще более конкретно 1 или 2, особенно 1.

Предпочтительно, чтобы  $k$  и  $l$  были одним и тем же целым числом. В одном аспекте  $k$  и  $l$  представляют собой целое число, выбранное из 1, 2 или 3, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 2.

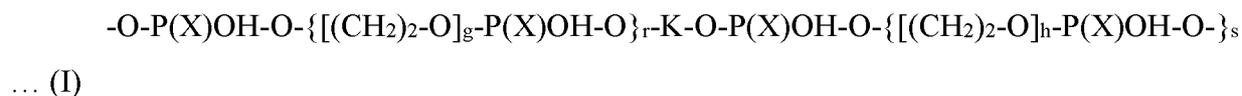
Соответственно,  $K$  может представлять собой



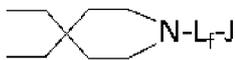
В предпочтительном аспекте  $K$  представляет собой



В одном конкретном аспекте петля имеет формулу (I)



где  $X$  равно  $S$ ,  $r$  равно 1,  $g$  равно 6,  $s$  равно 0, а  $K$  равно



В другом аспекте  $K$  может представлять собой  $\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{L}_f\text{-J})\text{-}$ .

В конкретном аспекте  $f$  равно 1, а  $L\text{-}J$  представляет собой  $\text{-C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-[C(O)]}_t\text{-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-[C(O)]}_v\text{-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-[C(O)-CH}_2\text{-O]}_t\text{-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-[C(O)]}_v\text{-J}$  или  $\text{-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 15;  $p$  представляет собой целое число от 0 до 4;  $t$  и  $v$  представляют собой целое число 0 или 1, причем хотя бы одно из  $t$  и  $v$  равно 1.

Более конкретно,  $f$  равно 1, и  $L\text{-}J$  выбран из группы, состоящей из  $\text{-C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-C(O)-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $\text{C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-C(O)-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{C(O)-(CH}_2)_m\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$  и  $\text{-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 10;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 15; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 3.

Необязательно,  $f$  равно 1, и  $L\text{-}J$  выбран из группы, состоящей из  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-CH}_2\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-CH}_2\text{-J}$ ,  $\text{C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-CH}_2\text{-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-CH}_2\text{-C(O)-J}$  и  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-CH}_2\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-J}$  или  $\text{-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{3-13}\text{-(CH}_2)_{3-5}\text{-NH-CH}_2\text{-C(O)-J}$ .

Например,  $f$  может быть равно 1, а  $L\text{-}J$  выбран из группы, состоящей из  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_3\text{-(CH}_2)_2\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_3\text{-(CH}_2)_3\text{-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_5\text{-CH}_2\text{-C(O)-J}$ ,  $\text{-C(O)-(CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_9\text{-}$

$\text{CH}_2\text{-C(O)-J}$ ,  $-\text{C(O)-}(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_{13}\text{-CH}_2\text{-C(O)-J}$ ,  $-\text{C(O)-}(\text{CH}_2)_5\text{-NH-C(O)-J}$  или  $-\text{CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_3\text{-(CH}_2)_3\text{-NH-CH}_2\text{-C(O)-J}$ .

В очень конкретном аспекте  $f$  равно 1, а  $L\text{-J}$  представляет собой  $-\text{C(O)-}(\text{CH}_2)_m\text{-NH-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ , где  $m$  представляет собой целое число из от 0 до 10, предпочтительно от 4 до 6, особенно 5;  $n$  представляет собой целое число от 0 до 6; и  $p$  представляет собой целое число от 0 до 2. В конкретном аспекте  $m$  равно 5, а  $n$  и  $p$  равны 0. В другом конкретном аспекте  $m$  равно 5,  $n$  равно 3 и  $p$  равно 2.

В другом конкретном аспекте петля имеет формулу (I)

В одном аспекте петля представляет собой  $-\text{O-P(S)OH-O-}\{[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_g\text{-P(O)OH-O}\}_r\text{-K-O-P(S)OH-O-}\{[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_h\text{-P(X)OH-O-}\}_s$ , где  $X$  представляет собой  $\text{O}$  или  $\text{S}$  в каждом случае  $-\text{O-P(X)OH-O-}$ , причем  $r$  равно 1,  $g$  равно 6,  $s$  равно 0, а  $K$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-CH-(L}_f\text{-J)}$ .

В предпочтительном объекте петля представляет собой  $-\text{O-P(S)OH-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_6\text{-P(O)OH-O-K-(O-P(S)OH-O)-}$ , где  $K$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-CH(L}_f\text{-J)-}$ . В другом предпочтительном объекте петля представляет собой  $-\text{O-P(S)OH-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_6\text{-P(S)OH-O-K-(O-P(S)OH-O)-}$ , где  $K$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-CH(L}_f\text{-J)-}$ . В конкретном аспекте  $f$  равно 1, а  $L\text{-J}$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_n\text{-(CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_p\text{-C(O)-J}$ , где  $m$  равно 3;  $n$  равно 3; и  $p$  равно 0.

В конкретном воплощении линкер между молекулой, облегчающей эндоцитоз, и петлей содержит  $J$ , представляющий собой  $\text{C(O)-NH-(CH}_2)_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n$  или  $\text{NH-C(O)-(CH}_2)_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_n$ , где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 10, причем предпочтительно  $n$  выбран из группы, состоящей из 3, 4, 5 и 6. В особо конкретном воплощении линкер представляет собой  $\text{CO-NH-(CH}_2)_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_4$  (карбоксамидотетраэтиленгликоль или также радикал  $13\text{-O-[1-пропил-3-N-карбамоилхолестерил]тетраэтиленгликоля}$ ).

В другом конкретном воплощении линкер между молекулой, облегчающей эндоцитоз, и молекулой петли представляет собой диалкилдисульфид {например,  $(\text{CH}_2)_p\text{-S-S-(CH}_2)_q$ , где  $p$  и  $q$  являются целыми числами от 1 до 10, предпочтительно от 3 до 8, например, 6}.

Во втором аспекте описания петля имеет структуру согласно формуле (II):



где  $X$  представляет собой  $\text{O}$  или  $\text{S}$ ;

$b$  и  $c$  независимо представляют собой целое число от 0 до 4, а сумма  $b+c$  составляет от 3 до 7;

d и e независимо представляют собой целое число от 1 до 3, предпочтительно от 1 до 2;

где R представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{1-5}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{L}_f-\text{J}$  или  $-(\text{CH}_2)_{1-5}-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{L}_f-\text{J}$ , и

где L представляет собой линкер, предпочтительно линейный алкилен или олигоэтиленгликоль, f представляет собой целое число, равное 0 или 1, и J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз.

Если b и/или c равны 2 или более, d и e могут быть разными в каждом случае  $[(\text{CH}_2)_d-\text{C}(\text{O})-\text{NH}]$  или  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_e$ .

В одном аспекте, когда d и e равны 2, сумма b+c составляет от 3 до 5, в частности, 4. Например, b может быть равно 0, а c равно от 3 до 5; b может быть равно 1, а c равно от 2 до 4; b может быть равно 2, а c равно от 1 до 3; или b может быть от 3 до 5, а c равно 0.

В одном аспекте, когда d и e равны 1, сумма b+c составляет от 4 до 7, в частности, 5 или 6. Например, b может быть равно 0, а c равно от 3 до 6; b может быть равно 1, а c равно от 2 до 5; b может быть равно 2, а c равно от 1 до 4; или b может быть от 3 до 6, а c равно 0.

В одном аспекте b, c, d и e выбраны таким образом, чтобы петля содержала цепь из 10-100 атомов, предпочтительно из 15-25 атомов.

В неисчерпывающем списке примеров петля может представлять собой одно из следующего:

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

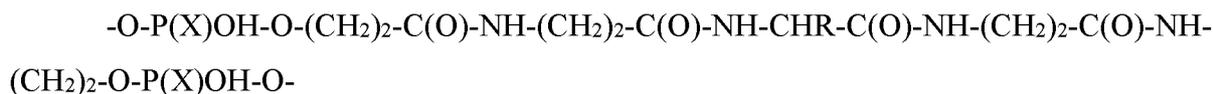
$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$ , или

$-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CHR}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{O}-\text{P}(\text{X})\text{OH}-\text{O}-$

В конкретном аспекте петля может представлять собой следующее:



где R представляет собой  $-L_f-J$ ; и

где L представляет собой линкер, предпочтительно линейный алкилен и/или олигоэтиленгликоль, необязательно прерванный одной или несколькими группами, выбранными из аминогруппы, амидной группы и оксогруппы, и f представляет собой целое число, равное 0 или 1.

Предпочтительно X представляет собой S.

L может представлять собой  $-(CH_2)_{1-5}-C(O)-J$ , предпочтительно  $-CH_2-C(O)-J$  или  $-(CH_2)_2-C(O)-J$ .

Альтернативно, L-J может представлять собой  $-(CH_2)_4-NH-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-C(O)-J$ , где n представляет собой целое число от 0 до 6; и p представляет собой целое число от 0 до 2. В конкретном аспекте n равно 3, а p равно 2.

Молекулы, облегчающие эндоцитоз

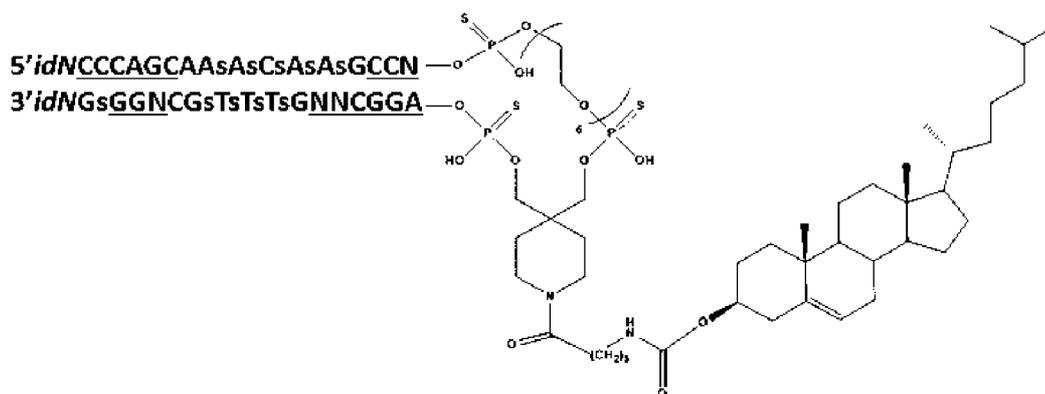
Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению необязательно конъюгированы с молекулой, облегчающей эндоцитоз, обозначенной как J в приведенных выше формулах. Следовательно, в первом аспекте J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз. В альтернативном аспекте J представляет собой водород.

Молекулы, облегчающие эндоцитоз, могут представлять собой липофильные молекулы, такие как холестерин, одно- или двухцепочечные жирные кислоты, или лиганды, которые нацелены на клеточные рецепторы, обеспечивающие рецептор-опосредованный эндоцитоз, такие 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 находиться в группе  $C_4-C_{28}$ , предпочтительно в группе  $C_{14}-C_{22}$ , еще более предпочтительно в группе  $C_{18}$ , например, олеиновая кислота или стеариновая кислота. Конкретно, жирные кислоты могут быть октадециловыми или диолеоиловыми. Жирные кислоты могут находиться в форме двойной цепи, связанной с подходящим линкером, таким как глицерин, фосфатидилхолин или этаноламин и т.п., или соединенными вместе линкерами, используемыми для присоединения к конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты. Подразумевается, что используемый в настоящем описании термин «фолат» относится к фолату и к производным фолата, включая производные птероевой кислоты и аналоги. Аналоги и производные фолиевой кислоты, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, помимо прочего,

антифолаты, дигидрофолаты, тетрагидрофолаты, фолиновую кислоту, птерополиглютаминовую кислоту, 1-деаза-, 3-деаза-, 5-деаза-, 8-деаза-, 10-деаза-, 1,5-деаза-, 5,10-дидеаза-, 8,10-дидеаза- и 5,8-дидеаза-фолаты, антифолаты и производные птероевой кислоты. Дополнительные фолатные аналоги описаны в US2004/242582.

Соответственно, молекула, облегчающая эндоцитоз, может быть выбрана из группы, состоящей из одноцепочечных или двухцепочечных жирных кислот, фолатов и холестерина. Более предпочтительно, молекула, облегчающая эндоцитоз, выбрана из группы, состоящей из диолеоила, октадецила, фолиевой кислоты и холестерина. В наиболее предпочтительном воплощении молекулой, облегчающей эндоцитоз, является холестерин.

Соответственно, в одном предпочтительном воплощении конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты имеет следующую формулу:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N представляет собой T или U,

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

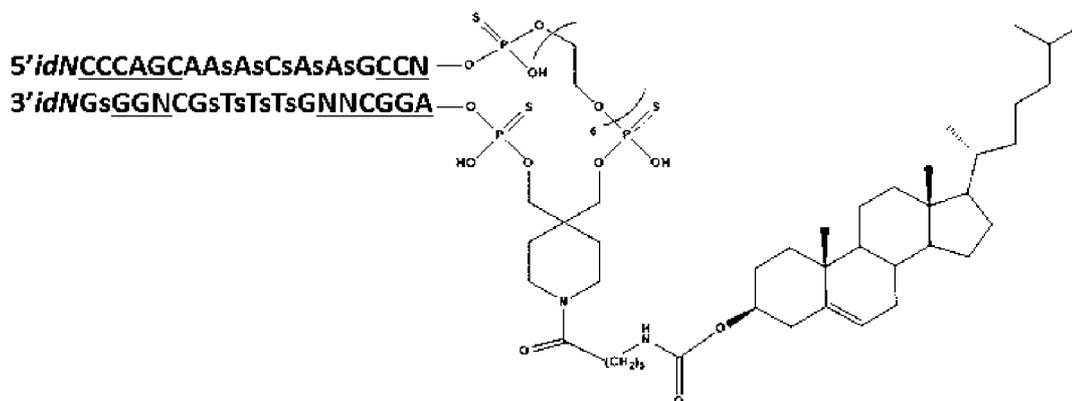
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды,

или их фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительно, чтобы молекула имела 1) по меньшей мере один N, который представляет собой U, и/или 2) по меньшей мере один присутствующий idN. Альтернативно, молекула не является OX413.

В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

где *id*N представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где N представляет собой T,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

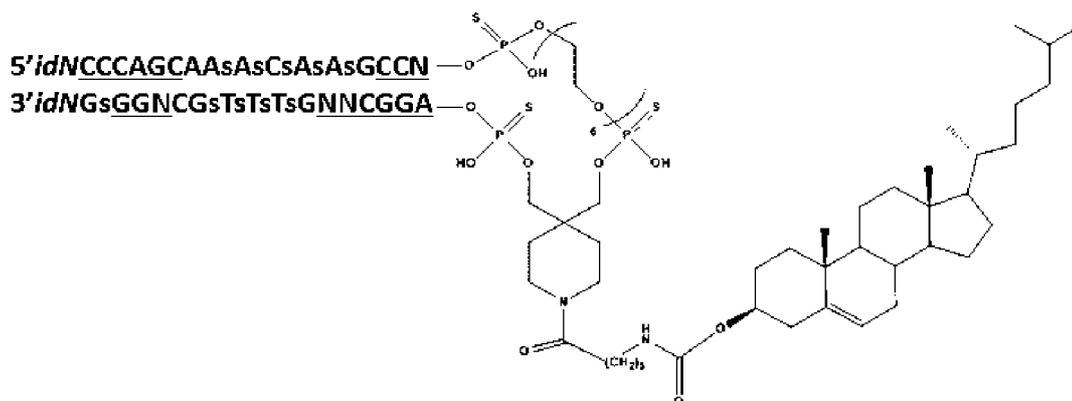
где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe),

или их фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительно, в молекуле присутствует *id*N. Альтернативно, молекула не является OX413.

В конкретном аспекте, когда присутствует *id*N, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин *id*T.

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

где *id*N представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где N представляет собой U,

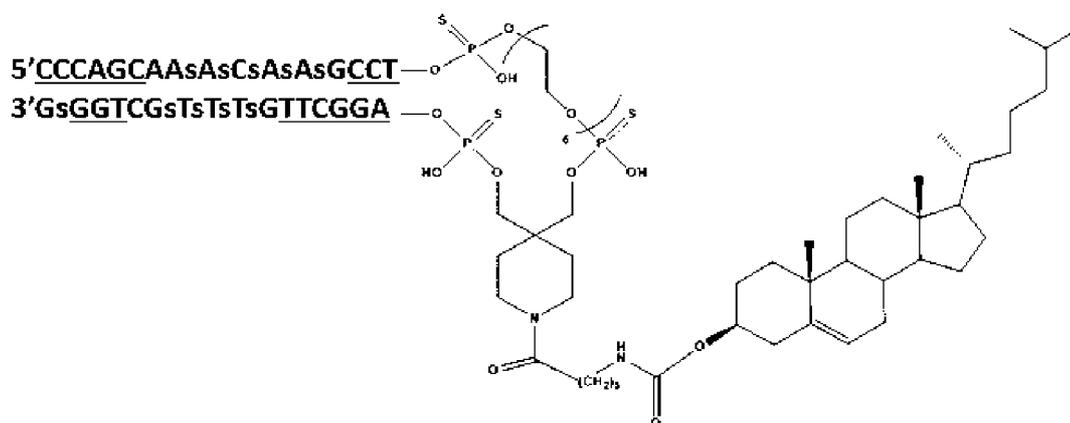
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

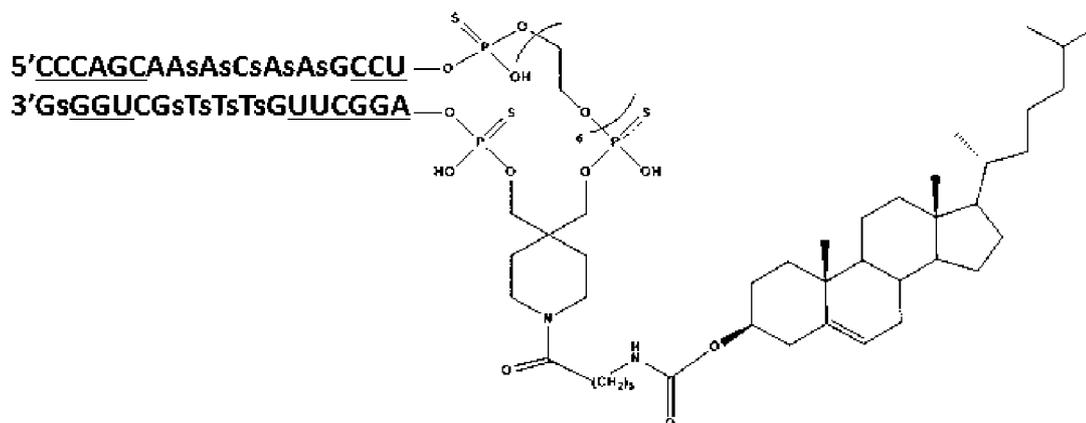
В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

Когда idN отсутствует, N представляет собой T, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA), молекула представляет собой OX413:



SEQ ID No 13 и 14

В одном аспекте, когда idN отсутствует, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), молекула представляет собой OX416:

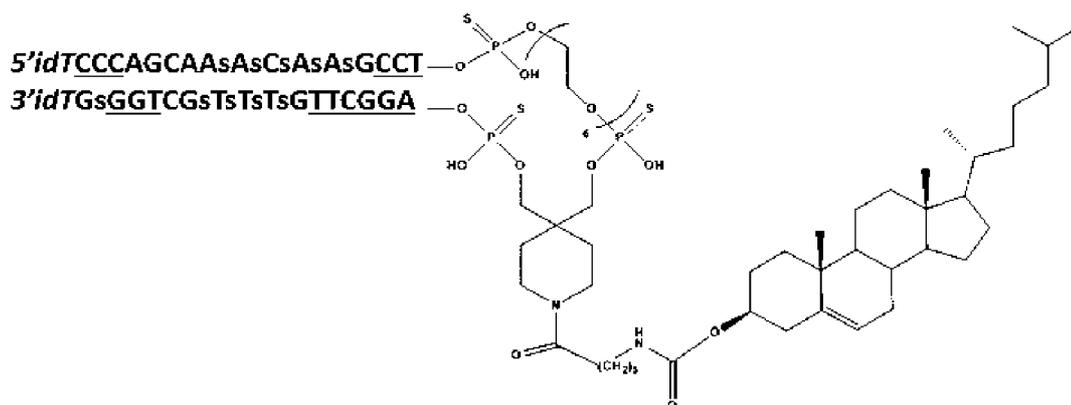


SEQ ID NO: 7 и 8.

В другом аспекте idN присутствуют и

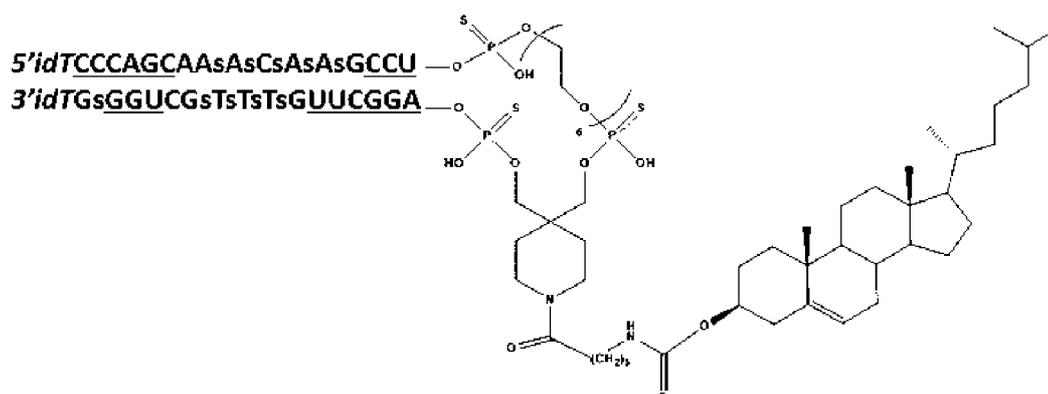
- когда idN представляет собой idT и присутствует на 5'-конце и на 3'-конце, N представляет собой T, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют

собой 2'-дезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA), молекула представляет собой OX421:



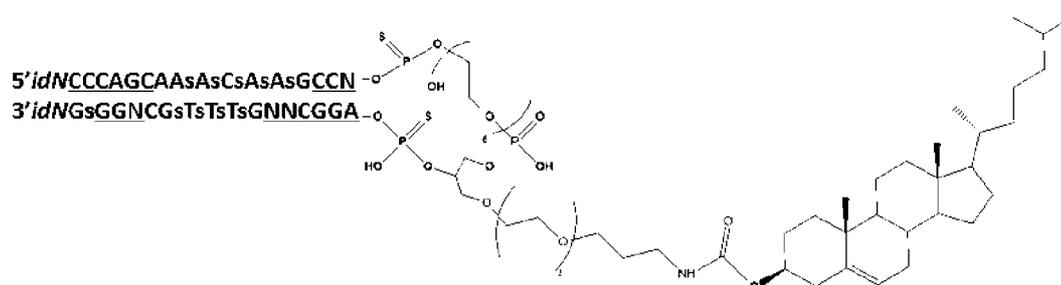
SEQ ID NO: 9 и 10.

- когда idN представляет собой idT и присутствует на 5'-конце и на 3'-конце, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), молекула представляет собой OX422:



SEQ ID NO: 11 и 12

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N представляет собой T или U,

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

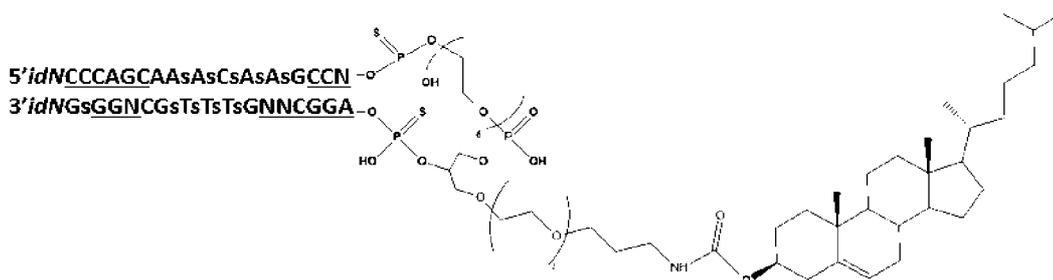
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где N представляет собой T,

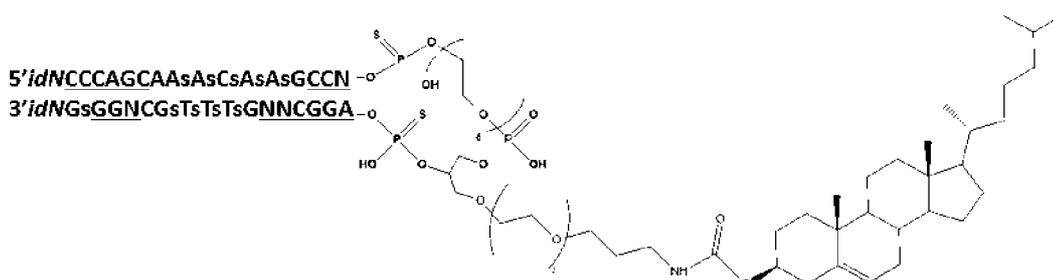
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где N представляет собой U,

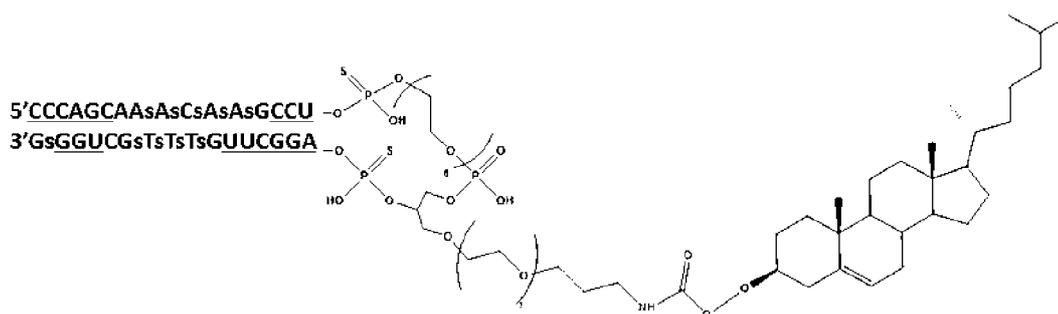
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

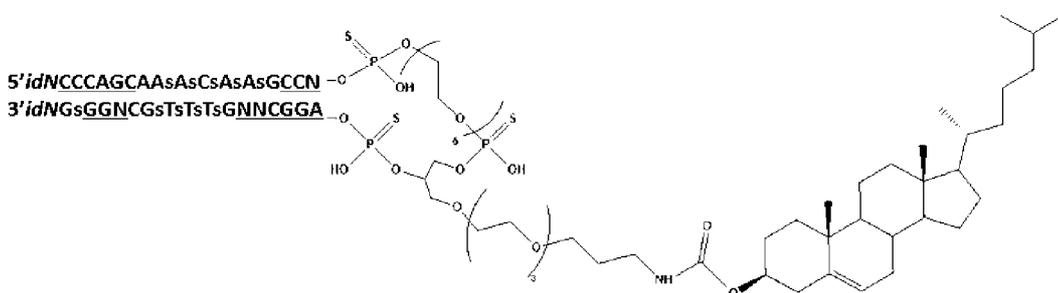
В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В предпочтительном аспекте idN отсутствуют, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), а молекула представляет собой OX423:



SEQ ID NO: 7 и 8.

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует на 5'-конце и/или на 3'-конце,

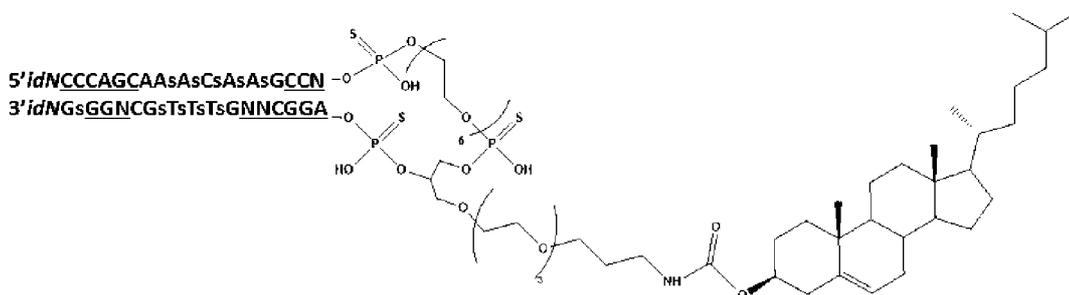
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 3 и 4

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует на 5'-конце и/или на 3'-конце,

где N представляет собой T,

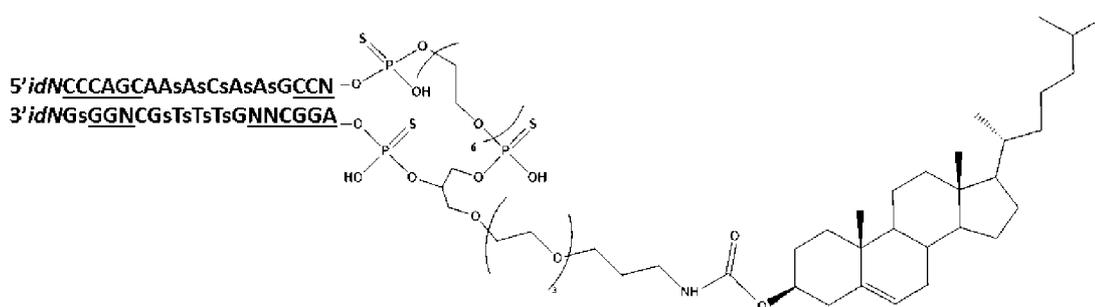
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В другом конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 5 и 6.

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует на 5'-конце и/или на 3'-конце

где N представляет собой U,

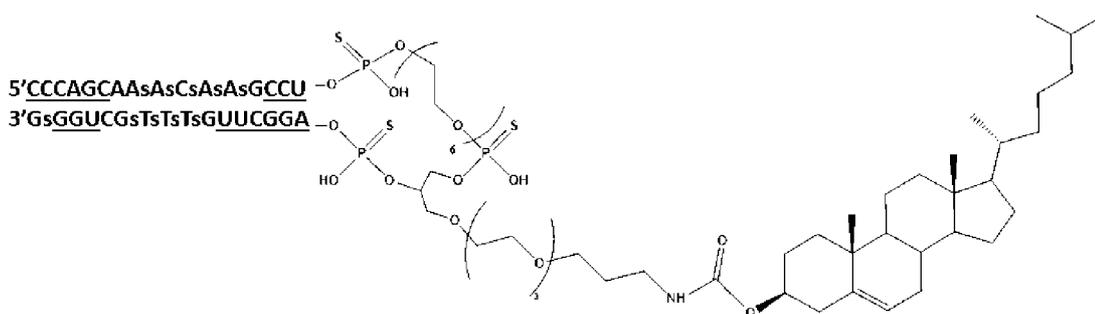
где межнуклеотидные связи «S» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe),

или их фармацевтически приемлемые соли.

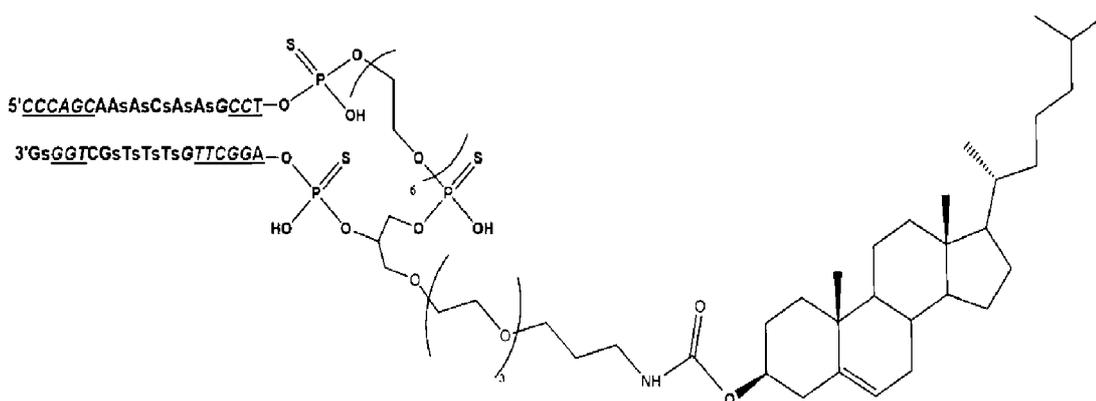
В конкретном аспекте, когда присутствует idN, он предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT.

В предпочтительном аспекте idN отсутствует, N представляет собой U, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe), а молекула представляет собой OX424:



SEQ ID NO: 7 и 8.

В особенно конкретном аспекте конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой OX425:



SEQ ID NO: 19 и 20.

где межнуклеотидные связи «S» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (FANA).

Альтернативно, молекулой, облегчающей эндоцитоз, также может представлять собой токоферол, сахар, такой как галактоза и манноза, и их олигосахарид, пептид, такой как RGD и бомбесин, и белки, такие как интегрин.

Терапевтическое использование молекул нуклеиновой кислоты

Конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению способны активировать PARP. Они приводят к увеличению количества микроядер и цитотоксичности в раковых клетках. Они проявляют специфичность по отношению к опухолевым клеткам, что может предотвратить или ограничить побочные эффекты. Кроме того, специфическое увеличение количества микроядер в раковых клетках приводит к ранней активации пути STING.

Соответственно, конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно использовать в качестве лекарственного средства, особенно для лечения рака.

Таким образом, настоящее изобретение относится к конъюгированной молекуле нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства. Оно также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, особенно для применения для лечения рака. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции или ветеринарной композиции согласно настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, рассматриваемые в настоящей заявке, могут включать фармацевтически приемлемый носитель дополнительно к активному ингредиенту(ам). Подразумевается, что термин «фармацевтически приемлемый носитель» охватывает любой носитель (например, подложку, вещество, растворитель, и т.д.), который не препятствует эффективности биологической активности активных ингредиентов и который не токсичен по отношению к хозяину, которому вводится. Например, для парентерального введения активные соединения могут быть включены в состав в виде стандартной лекарственной формы для инъекций в носителях, таких как солевой раствор, раствор декстрозы, сывороточный альбумин и раствор Рингера.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде растворов в фармацевтически совместимых растворителях или в виде эмульсий, суспензий или дисперсий в подходящих фармацевтических растворителях или носителе, или в виде пилюль, таблеток или капсул, которые содержат твердые носители известным в данной области способом. Составы по настоящему изобретению, подходящий для перорального введения, может быть представлен в форме дискретных единиц в виде капсул, саше, таблеток или пастилок, каждая из которых содержит определенное количество активного ингредиента; в форме порошка или гранул; в форме раствора или суспензии в водном жидком растворе или в безводном жидком растворе; или в форме эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле. Составы, подходящие для парентерального введения, обычно включают стерильный водный или неводный препарат активного ингредиента, который предпочтительно является изотоническим по отношению к крови реципиента. Каждый такой состав также может содержать другие фармацевтически совместимые и нетоксичные вспомогательные агенты, такие как, например, стабилизаторы, антиоксиданты, связующие агенты, красители, эмульгаторы, или ароматизаторы. Составы по настоящему изобретению включают активный ингредиент совместно и фармацевтически совместимым носителем, а также необязательно другие терапевтические ингредиенты. Носитель должен быть «совместимым» в смысле того, что он совместим с другими ингредиентами составов и не должен быть вредным по отношению к реципиенту. Фармацевтические композиции предпочтительно применяются с помощью инъекции или внутривенной инфузии подходящих стерильных растворов или в виде пероральной дозировки с помощью желудочно-кишечного тракта. Методы безопасного и эффективного введения большинства из этих химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области. Кроме того, введение описано в стандартной научной литературе.

Фармацевтические композиции и продукты, наборы или комбинированные составы, описанные в изобретении, можно использовать для лечения рака у субъекта.

Термин «рак» и «злокачественный» относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают, помимо прочего, солидные опухоли и гематологические раки, включая карциному, лимфому, бластому (включая медуллобластому и ретинобластому), саркому (включая липосаркому и синовиально-клеточную саркому), нейроэндокринные опухоли (включая карциноидные опухоли, гастриному и рак островковых клеток), мезотелиому, шванному (включая акустическую неврому), менингиому, аденокарциному, меланому, а также лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак (например, эпителиально-плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого на запущенной стадии (ES-SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, нейробластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, гепатому, рак эндометрия, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, почечно-клеточный рак (RCC), рак печени, анальную карциному, карциному полового члена, рак яичка, рак пищевода, опухоли желчевыводящих путей, а также рак головы и шеи. Дополнительные связанные с раком показания раскрыты в настоящем описании.

В конкретном аспекте рак представляет собой опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации. Альтернативно, рак представляет собой опухоль, способную к гомологичной рекомбинации.

В конкретном воплощении термин «рак» относится к опухолевым клеткам, несущим истощение НАД<sup>+</sup>, например, выбранное из дефицита ERCC1 или ATM, или к опухолевым клеткам, несущим мутации IDH.

В особо конкретном воплощении возможна клиническая стратификация или отбор лучших респондеров для пациентов с опухолями, демонстрирующими дефицит синтеза НАД<sup>+</sup>, в частности для пациентов с опухолями, несущими истощение НАД<sup>+</sup>.

Определение оптимальной дозировки обычно включает баланс между уровнем терапевтической пользы и любым риском или вредными побочными эффектами лечения по настоящему изобретению. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, помимо прочего, активность конъюгированной молекулы

нуклеиновой кислоты, путь введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие лекарства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации, а также возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни пациента. Количество конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты и способ введения в конечном итоге будут определяться по усмотрению врача, хотя обычно дозировка будет обеспечивать достижение местных концентраций в месте действия, обеспечивающих желаемый эффект.

Путь введения конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты, как описано в настоящей заявке, может быть пероральным, парентеральным, внутривенным, внутриопухолевым, подкожным, внутричерепным, внутриартериальным, местным, ректальным, чрескожным, внутрикожным, назальным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутрикостным и т.п. В предпочтительном воплощении конъюгированные молекулы нуклеиновой кислоты следует вводить или инъектировать вблизи опухолевого участка(ов), подлежащего лечению.

Например, эффективное количество молекул конъюгированной нуклеиновой кислоты составляет от 0,01 до 1000 мг, предпочтительно, например, от 0,1 до 100 мг. Конечно, дозировка и режим могут быть адаптированы специалистом в данной области с учетом схемы химиотерапии и/или лучевой терапии.

Конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом. Дополнительный терапевтический агент может представлять собой, например, иммуномодулирующее средство, такое как ингибитор иммунных контрольных точек, иммунотерапию злокачественного новообразования на основе Т-клеток, включая адоптивный перенос клеток (АСТ), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), стандартный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент или таргетный иммунотоксин.

Комбинации с иммуномодуляторами/ингибиторами иммунных контрольных точек (ICI)

Авторы продемонстрировали высокий противоопухолевый терапевтический потенциал комбинации конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты с иммуномодулятором, таким как ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, о чем свидетельствует активация пути STING и увеличение экспрессии PD-L1. Таким образом, изобретение обеспечивает комбинированную терапию, при которой конъюгированную молекулу нуклеиновой

кислоты по изобретению вводят пациентам до, одновременно или после иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI).

Соответственно, настоящее изобретение касается фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и иммуномодулятор, более конкретно, для применения при лечении рака. Настоящее изобретение также относится к продукту, содержащему конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и иммуномодулятор в виде комбинированного состава для одновременного, отдельного или последовательного применения, более конкретно для применения при лечении рака. В предпочтительном воплощении иммуномодулятор представляет собой ингибитор пути PD-1/PD-L1.

Изобретение также относится к способу лечения рака путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в комбинации с одним или более иммуномодуляторами (например, одним или более из активатора костимулирующей молекулы или ингибитора молекулы иммунной контрольной точки). В предпочтительном воплощении иммуномодулятор представляет собой ингибитор пути PD-1/PD-L1.

Активатор костимулирующей молекулы:

В некоторых воплощениях иммуномодулятор представляет собой активатор костимулирующей молекулы. В одном воплощении агонист костимулирующей молекулы выбран из агониста (например, агонистического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или растворимого гибрида) OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 или лиганда CD83.

Ингибитор молекулы иммунной контрольной точки:

В некоторых воплощениях иммуномодулятор представляет собой ингибитор молекулы иммунной контрольной точки. В одном воплощении иммуномодулятор представляет собой ингибитор PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, NKG2D, NKG2L, KIR, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и/или TGFRбета. В одном воплощении ингибитор молекулы иммунной контрольной точки ингибирует PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, TIGIT или CTLA-4 или любую их комбинацию. Термин «ингибирование» или «ингибитор» включает снижение определенного параметра, например активности данной молекулы, например, ингибитора иммунной контрольной точки. Например, в этот термин включено ингибирование активности, например, активности PD-1 или PD-L1, по меньшей мере, на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или более. Таким образом, ингибирование не обязательно должно быть 100%.

Ингибирование ингибирующей молекулы может осуществляться на уровне ДНК, РНК или белка. В некоторых воплощениях ингибирующую нуклеиновую кислоту (например, дцРНК, миРНК или кшРНК) можно использовать для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы. В других воплощениях ингибитор ингибирующего сигнала представляет собой полипептид, например, растворимый лиганд (например, PD-1 Ig или CTLA-4 Ig) или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с ингибирующей молекулой; например, антитело или его фрагмент (также называемый в настоящей заявке «молекулой антитела»), которое связывается с PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, NKG2D, NKG2L, KIR VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и/или TGFR бета или их комбинацию.

В одном воплощении молекула антитела представляет собой цельное антитело или его фрагмент (например, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других воплощениях молекула антитела имеет константную область тяжелой цепи (Fc), выбранную, например, из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE; в частности, выбранных, например, из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, из константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4 (например, человеческих IgG1 или IgG4). В одном воплощении осуществления константная область тяжелой цепи представляет собой IgG1 человека или IgG4 человека. В одном воплощении константная область изменена, например, мутирована, чтобы модифицировать свойства молекулы антитела (например, увеличить или уменьшить одно или более из связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, количества остатков цистеина, функции эффекторной клетки, или дополняющей функции). В некоторых воплощениях молекула антитела находится в форме молекулы биспецифического или полиспецифического антитела.

#### Ингибиторы PD-1

В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором PD-1. В некоторых воплощениях ингибитор PD-1 выбран из PDR001 (Novartis), ниволумаба (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаба (Merck & Co), пидилизумаба (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042. (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

#### Примерные ингибиторы PD-1

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4). Альтернативные названия ниволумаба включают MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, BMS-936558 или OPDIVO®. Ниволумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие человеческие моноклональные антитела, специфически связывающиеся с PD1, описаны в патенте США № 8008449 и публикации PCT № WO 2006/121168, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В других воплощениях анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (торговое название KEYTRUDA, ранее Ламбролизумаб, также известный как Merck 3745, МК-3475 или SCH-900475) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD1. Пембролизумаб описан, например, у Hamid, O. et al. (2013) *New England Journal of Medicine* 369 (2): 134-44, PCT публикации No. WO 2009/114335 и патенте США № 8354509, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В некоторых воплощениях анти-PD-1 антитело представляет собой пидилизумаб. Пидилизумаб (CT-011; CureTech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 k, которое связывается с PD1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 раскрыты в публикации PCT № WO 2009/101611, которая включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

Другие антитела против PD1 раскрыты в патенте США № 8609089, публикации США № 2010028330 и/или публикации США № 20120114649, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме. Другие антитела против PD1 включают AMP514 (Amplimmune).

В одном воплощении молекулой антитела против PD-1 представляет собой MEDI0680 (Medimmune), также известная как AMP-514. MEDI0680 и другие антитела против PD-1 раскрыты в патентах США 9205148 и WO 2012/145493, которые полностью включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой REGN2810 (Regeneron), также известную как Цемиплимаб.

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой PF-06801591 (Pfizer).

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой BGB-A317 (Beigene), также известный как BGB-108 или Тислелизумаб.

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой INC5HR1210 (Incyte), также известный как INC5HR01210 или SHR-1210 или Камрелизумаб.

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой TSR-042 (Tesaro), также известный как ANB011 или Достарлимаб.

В одном воплощении молекула антитела против PD-1 представляет собой IB1308 (Innovent и Eli Lilly), также известный как синтилимаб.

В одном воплощении осуществления молекула гуманизированного моноклонального антитела IgG4 против PD-1 представляет собой JS 001, также известный как Торипалимаб.

В одном воплощении молекулой антитела против PD-1 представляет собой JTX-4014 (Jounce Therapeutics).

В одном воплощении молекула моноклонального антитела против PD-1 представляет собой PDR001 (Novartis), также известный как Спартализумаб.

В одном воплощении осуществления молекула моноклонального антитела гуманизированного IgG4 против PD-1 MGA012 (Incyte and MacroGenics), также известный как INCMGA00012 или Ретифанлимаб.

Другие известные антитела против PD-1 включают антитела, описанные, например, в WO 2015/1 12800, WO 2016/092419, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2014/194302, WO 2014/209804, WO 2015/2001. 19, US 8735553, US 7488802, US 8927697, US 8993731 и US 9102727, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении анти-PD-1 антитело представляет собой антитело, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из антител против PD-1, описанных в настоящей заявке.

В одном воплощении ингибитор PD-1 представляет собой пептид, который ингибирует сигнальный путь PD-1, например, как описано в патенте США 8907053, который включен в настоящее описание ссылкой в полном объеме. В некоторых воплощениях ингибитор PD-1 представляет собой иммуноадгезин ((например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, Fc-участком последовательности иммуноглобулина)). В некоторых воплощениях ингибитор PD-1 представляет собой AMP-224 (B7-DCIg (Amplimmune), например, описанный в WO 2010/027827 и WO 2011/066342, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В очень конкретном воплощении конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из OX416, OX421, OX422, OX423, OX424 и OX425, более предпочтительно OX425, а дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

#### Ингибиторы PD-L1

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором PD-L1. В некоторых воплощениях ингибитор PD-L1 выбран из FAZ053 (Novartis), атезолизумаба (Genentech/Roche), авелумаба (Merck Serono и Pfizer), дурвалумаба (MedImmune/AstraZeneca) или BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb).

#### Примерные ингибиторы PD-1

В одном воплощении ингибитор PD-L1 представляет собой молекулу антитела против PD-L1. В одном воплощении молекулой антитела против PD-L1 является авелумаб (Merck Serono и Pfizer), также известный как MSB0010718C. Авелумаб и другие антитела против PD-L1 раскрыты в WO 2013/079174, которая включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула антитела против PD-L1 представляет собой дурвалумаб (MedImmune/AstraZeneca), также известный как MEDI4736. Дурвалумаб и другие антитела против PD-L1 раскрыты в патенте США 8779108, который включен в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула антитела против PD-L1 представляет собой BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), также известный как MDX-1105 или 12A4. BMS-936559 и другие антитела против PD-L1 раскрыты в патенте США 7943743 и WO 2015/081158, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

Другие известные антитела против PD-L1 включают антитела, описанные, например, в WO 2015/181342, WO 2014/100079, WO 2016/000619, WO 2014/022758, WO 2014/055897, WO 2015/061668, WO 2013/079174, WO 2012/145493, WO 2015/112805, WO

2015/109124, WO 2015/195163, US 8168179, US 8552154, US 8460927 и US 9175082, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении антитело против PD-L1 представляет собой антитело, которое конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и одно из антител против PD-L1, описанных в настоящей заявке.

Ингибиторы CTLA-4 (белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами)

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CTLA-4. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором CTLA-4. В некоторых воплощениях ингибитор CTLA-4 представляет собой ипилимумаб.

#### Примерные ингибиторы CTLA-4

В одном воплощении ингибитор CTLA-4 представляет собой молекулу антитела против CTLA-4. В одном воплощении молекулой антитела против CTLA-4 является ипилимумаб (Bristol-Myers Squibb), также известный как MDX-010.

#### Ингибиторы LAG-3

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор LAG-3. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором LAG-3. В некоторых воплощениях ингибитор LAG-3 выбран из LAG525 (Novartis), BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), TSR-033 (Tesaro), MK-4280 (Merck), REGN3767 (Regeneron), BI-754111 (Boehringer Ingelheim), SYM-022 (Symphogen), FS118 (F-star) или MGD013 (MacroGenics).

#### Примерные ингибиторы LAG-3

В одном воплощении ингибитор LAG-3 представляет собой молекулу анти-LAG-3 антитела. В одном воплощении ингибитором LAG-3 является BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), также известный как BMS986016 или Релатлимаб. BMS-986016 и другие анти-LAG-3 антитела раскрыты в WO 2015/116539 и US 9505839, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой TSR-033 (Tesaro).

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой IMP731 или GSK2831781 (GSK и Prima BioMed). IMP731 и другие анти-LAG-3 антитела раскрыты

в WO 2008/132601 и US 9,244,059, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой LAG525 (Novartis), также известный как Иерамилимаб.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой МК-4280 (Merck), также известный как Мавезелимаб.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой REGN3767 (Regeneron), также известный как Фианлимаб.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой BI-754111 (Boehringer Ingelheim), также известный как Миптеналимаб.

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой SYM-022 (Symphogen).

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой FS118 (F-star).

В одном воплощении молекула анти-LAG-3 антитела представляет собой MGD013 (MacroGenics), также известный как Теботелимаб.

Другие известные анти-LAG-3 антитела включают антитела, описанные, например, в WO 2008/132601, WO 2010/019570, WO 2014/140180, WO 2015/116539, WO 2015/200119, WO 2016/028672, US 9244059, США. 9 505 839, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

#### Ингибиторы TIM-3

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор TIM-3. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором TIM-3. В некоторых воплощениях ингибитор TIM-3 представляет собой MGB453 (Novartis), TSR-022 (Tesarо), BMS-986258 (Bristol-Myers Squibb), SHR-1702, RO7121661 (La Roche), MBG453 (Novartis), Sym023 (Symphogen), INCAGN2390 (Agenus) или LY3321367 (Eli Lilly).

#### Примерные ингибиторы TIM-3

В одном воплощении молекулой анти-TIM-3 антитела является TSR-022 (AnaptysBio/Tesarо).

В одном воплощении анти-TIM-3 антитело представляет собой APE5137 или APE5121. APE5137, APE512 и другие анти-TIM-3 антитела раскрыты в WO 2016/161270, которая включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой BMS-986258 (Bristol-Myers Squibb), также известный как ONO 7807.

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой SHR-1702.

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой RO7121661 (La Roche).

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой MBG453 (Novartis), также известный как Сабатолимаб.

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой Sym023 (Symphogen).

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой INCAGN2390 (Agenus).

В одном воплощении молекула анти-TIM-3 антитела представляет собой LY3321367 (Eli Lilly).

Другие известные анти-TIM-3 антитела включают антитела, описанные, например, в WO 2016/111947, WO 2016/071448, WO 2016/144803, US 8552156, US 8841418 и US 9163087, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

#### Ингибиторы NKG2D

В некоторых воплощениях ингибитор пути NKG2D/NKG2DL представляет собой ингибитор NKG2D. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором NKG2D. В некоторых воплощениях ингибитор NKG2D представляет собой молекулу анти-NKG2D антитела, такую как анти-NKG2D антитело NNC0142-0002 (также известное как NN 8555, IPH2301 или JNJ-4500).

#### Примерные ингибиторы NKG2D

В одном воплощении молекула анти-NKG2D антитела представляет собой NNC0142-0002 (Novo Nordisk), как описано в WO 2009/077483 и US 7879985, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В другом варианте осуществления молекула анти-NKG2D антитела представляет собой JNJ-64304500 (Janssen), как описано в WO 2018/035330, которая включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В некоторых воплощениях анти-NKG2D антитела представляют собой человеческие моноклональные антитела 16F16, 16F31, MS и 21F2, полученные, выделенные и охарактеризованные структурно и функционально, как описано в патенте США 7879985. Другие известные анти-NKG2D антитела включают антитела, описанные,

например, в WO 2009/077483, WO 2010/017103, WO 2017/081190, WO 2018/035330 и WO 2018/148447, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

В некоторых других воплощениях ингибитор NKG2D представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или NKG2D-связывающую часть NKG2DL, объединенную с константной областью (например, Fc-областью последовательности иммуноглобулина, как описано в WO 2010/080124, WO 2017/083545 и WO 2017/083612, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.).

#### Ингибиторы NKG2DL

В некоторых воплощениях ингибитор пути NKG2D/NKG2DL представляет собой ингибитор NKG2DL, такой как MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 или представитель семейства RAET1. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором NKG2DL. В некоторых воплощениях ингибитор NKG2DL представляет собой молекулу анти-NKG2DL антитела, такую как антитело против MICA/B.

#### Примерные ингибиторы MICA/MICB

В одном воплощении молекула анти-MICA/B антитела представляет собой IPH4301 (Innate Pharma), как описано в WO 2017/157895, которая включена в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

Другие известные анти-MICA/B антитела включают антитела, описанные, например, в WO 2014/140904 и WO 2018/073648, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

#### Ингибиторы KIR

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор KIR. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором KIR. В некоторых воплощениях ингибитор KIR представляет собой Лирилумаб (ранее также называемый BMS-986015 или IPH2102).

#### Типичные ингибиторы KIR

В одном воплощении молекулой анти-KIR антитела является лирилумаб (Innate Pharma/AstraZeneca), как описано в WO 2008/084106 и WO 2014/055648, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные известные анти-KIR антитела включают антитела, описанные, например, в WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO

2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2010/065939, О 2012 г. /071411 и WO/2012/160448, которые включены в настоящее описание ссылкой в полном объеме.

#### Ингибиторы TIGIT

В некоторых воплощениях ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых воплощениях конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором TIGIT. В некоторых воплощениях ингибитор TIGIT представляет собой МК-7684, этигилимаб, тираголумаб или BMS-986207.

#### Примерные ингибиторы TIGIT

В одном воплощении ингибитор TIGIT представляет собой молекулу анти-TIGIT антитела. В одном воплощении молекула анти-TIGIT антитела выбрана из МК-7684 (Merck Sharp & Dohme), Этигилимаба (OncoMed Pharmaceuticals, Mereo BioPharma), Тираголумаба (Genentech, Roche) или BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb).

В одном воплощении молекула анти-TIGIT антитела представляет собой МК-7684 (Merck Sharp & Dohme), также известно как Вибостолимаб.

В одном воплощении молекула анти-TIGIT антитела представляет собой Этигилимаб (OncoMed Pharmaceuticals, Mereo BioPharma).

В одном воплощении молекула анти-TIGIT антитела представляет собой Тираголумаб (Genentech, Roche), также известно как RO7092284.

В одном воплощении молекула анти-TIGIT антитела представляет собой BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb).

Комбинации с традиционными химиотерапевтическими, радиотерапевтическими и антиангиогенными средствами

Настоящее изобретение также относится к комбинированной терапии, в которой конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению используют одновременно, до или после хирургического вмешательства или лучевой терапии; или вводят пациентам вместе, до или после применения обычного химиотерапевтического, радиотерапевтического или антиангиогенного агента или таргетного иммунотоксина.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в комбинации со стандартным химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или антиангиогенным агентом или таргетным иммунотоксином. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и стандартный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент или таргетный

иммунотоксин, более конкретно, для применения при лечении рака. Изобретение также относится к продукту, содержащему конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению и обычный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент или таргетный иммунотоксин в виде комбинированного состава для одновременного, раздельного или последовательного применения, более конкретно, для применения при лечении рака.

Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения будут раскрыты в следующем разделе, относящемся к экспериментальным исследованиям, который следует рассматривать как иллюстративный, а не ограничивающий объем настоящей заявки. В настоящем описании цитируется ряд источников; каждый из этих цитируемых источников включен в данную заявку ссылкой.

### Примеры

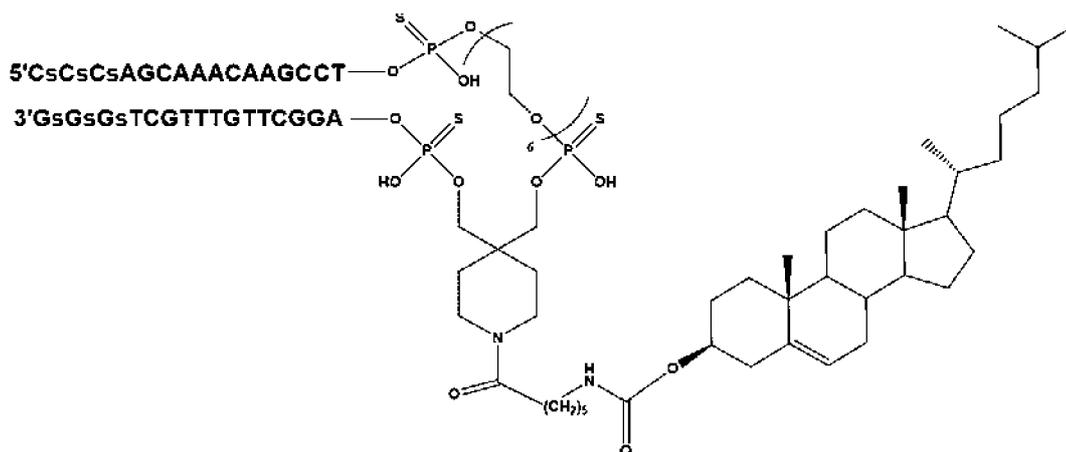
#### Пример 1. Синтез молекул нуклеиновых кислот

#### Материалы и методы

#### OX401

В некоторых примерах OX401 используется в качестве контрольной молекулы. OX401 представляет собой синтетическую холестерин-конъюгатную двойную спираль ДНК из 16 пар оснований с модифицированным фосфодиэфирным остовом, более конкретно, с 3 фосфоротиоатными связями на каждой цепи.

Синтез OX401 был основан на стандартном твердофазном синтезе ДНК с использованием химии твердых фосфорамидитов (dA(Bz); dC(Bz); dG(Ibu); dT (-)), фосфорамидитов HEG и Chol6.



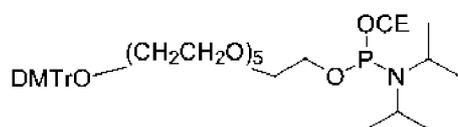
SEQ ID NO: 15 и 16

Стадии детритилирования проводили с помощью 3% DCA в толуоле, окисления проводили с помощью 50 mM йода в смеси пиридин/вода 9/1 и сульфуризацию проводили с помощью 50 mM DDTT в смеси пиридин/ACN 1/1. Кэпирование осуществляли с

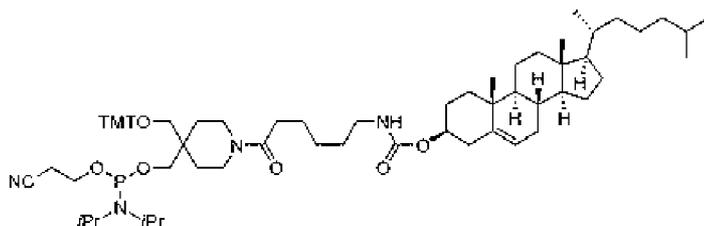
помощью 20% NMI в ACN вместе с 20% Ac2O в 2,6-лутидин/ACN (40/60). Расщепление и снятие защиты проводили соответственно с использованием 20% диэтиламина в ACN для удаления цианоэтильных защитных групп на фосфатах/тиофосфатах в течение 25 минут и концентрированного водного раствора аммиака в течение 18 часов при 45°C.

Неочищенный раствор загружали в препаративную колонку AEX-HPLC (гель TSK SuperQ 5PW20). Затем осуществляли очистку, элюируя градиентом соли бромид натрия при pH 12, содержащего 20% ацетонитрила по объему. После объединения фракций проводили обессоливание с помощью TFF на регенерированной целлюлозе.

Чистота OX401: 91,8% по AEX-HPLC; Молекулярная масса по ESI-MS: 11046,5 Да. HEG-фосфорамидит (гексаэтиленгликольфосфорамидит) (№ CLP-9765, ChemGenes Corp)



Фосфорамидит Chol6 (№ 51230, AM Chemicals)



Chol4 фосфорамидит (3-O-(N-холестерил)-3-аминопропил)триэтиленгликоль-глицерил)

OX413, OX416, OX421, OX422, OX423 и OX424

Синтез OX413, OX416, OX421, OX422, OX423 и OX424 от Axolabs (Германия) был основан на стандартном твердофазном синтезе ДНК с использованием фосфорамидитной химии, HEG и фосфорамидитов Chol6 или Chol4 с последующими стадиями детритилирования, сульфуризации, кэпирования и очистки.

Чистота OX413: 93,8% по данным AEX-HPLC; Молекулярная масса по ESI-MS: 11434,9 Да.

Чистота OX416: 85,3% по данным AEX-HPLC; Молекулярная масса по ESI-MS: 11596,0 Да.

Чистота OX421: 85,1% по данным AEX-HPLC; Молекулярная масса по ESI-MS: 12042,6 Да.

Чистота OX422: 95,1% по данным AEX-HPLC; Молекулярная масса по ESI-MS: 12203,4 Да.

Чистота OX423: 94,5% по данным АЕХ-НРLС; Молекулярная масса по ESI-MS: 11601,9 Да.

#### OX425

Синтез OX425 был осуществлен компанией Axolabs (Германия) с использованием традиционных подходов синтеза олигонуклеотидов. Производство олигонуклеотидов состоит из 5 стадий: твердофазный синтез, расщепление и снятие защиты, массовая очистка и имитационное объединение, ультрафильтрация и диафильтрация, а также лиофилизация. Твердофазный синтез осуществляли методом химического синтеза на твердой подложке путем итеративных циклов добавления нуклеотидов от 3'-конца к 5'-концу до тех пор, пока не будет получен олигонуклеотид соответствующей длины и последовательности. Синтез каждой цепи этого двухцепочечного олигонуклеотида включает четыре стадии: детритилирование, связывание, окисление и кэпирование (за исключением последнего основания). Затем олигонуклеотид отщепляют от твердой подложки в виде смолы, и удаляют защитные группы из гетероциклических оснований и фосфодиэфирной основной цепи. Основную часть олигонуклеотида очищают, а нужные фракции объединяют для дальнейшей очистки. На стадии ультрафильтрации и диафильтрации олигонуклеотидный продукт в растворе дополнительно очищают для удаления солей. На стадии лиофилизации раствор сначала фильтруют через PES-мембрану, чтобы обеспечить стерильность лекарственного вещества, затем воду удаляют с помощью циклов лиофилизации. Конечный олигонуклеотидный продукт получают в виде порошка от белого до бледно-желтого цвета.

Чистота OX425: 85% по IP-RP-LC-UV; Молекулярная масса по ESI-MS: 11458,2 Да.

#### Пример 2. OX413 активирует PARP

##### Материалы и методы

##### Клеточная культура

В качестве клеточной модели использовали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 от ATCC. Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика в среде Лейбовица L15 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 0% CO<sub>2</sub>.

Количественная оценка PARилирования с помощью иммунофлуоресцентного анализа

Клетки высевали в камеры LabTek (Fischer Scientific) в концентрации  $2 \times 10^4$  клеток и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали 5 мкМ OX401 или OX413. Через шесть часов, двадцать четыре часа и сорок восемь часов после

обработки клетки фиксировали в течение 20 минут в 4% параформальдегиде/PBS 1х, пермеабелизовали в 0,5% Triton X-100 в течение 10 минут, блокировали 10% FBS в течение 15 минут и инкубировали с первичным антителом (пан-связывающий реагент, против АДФ-рибозы, 1/300, Millipore) в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторичные козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa-488 (Molecular Probes), использовали в разведении 1/200 в течение 45 минут при комнатной температуре, а ДНК окрашивали 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Частоту встречаемости положительных клеток (показывающих полимеры поли-АДФ-рибозы, PARилирование) оценивали как количество положительных клеток по отношению к общему количеству клеток. Для каждого образца анализировали по меньшей мере 100 клеток.

### Результаты

Авторы проанализировали активацию поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) в клетках MDA-MB-231 после связывания OX413 или олигонуклеотидного фрагмента OX401, который имитирует двухцепочечный разрыв. Клетки MDA-MB-231, обработанные OX401, показали накопление полимера поли(АДФ-рибозы) (PAR) (PARилирование, результат активации PARP), начиная с 24 часов после обработки, при этом примерно 10% PARилированных клеток через 24 часа и 20% через 48 часов после обработки (фиг. 1А, В). Клетки, обработанные OX413, показали более высокую активацию PARP по сравнению с клетками, обработанными OX401, особенно через 48 часов после обработки, при этом более 40% PARилированных клеток (фиг. 1А, В). Таким образом, авторы наблюдали более высокое взаимодействие с мишенью OX413 в клетках MDA-MB-231, что подтверждается ложной передачей сигналов о повреждении ДНК (PARилирование), по сравнению с OX401.

Пример 3. OX413 проявляет высокую противоопухолевую активность

### Материалы и методы

#### Клеточная культура

В качестве клеточной модели использовали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 от ATCC. Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика в среде Лейбовица L15 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 0% CO<sub>2</sub>.

#### Обработка лекарственным средством и измерение клеточной выживаемости

MDA-MB-231 (5.103 клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали 24 часа при +37°C перед добавлением возрастающих концентраций лекарственного средства в течение 7 дней. После воздействия лекарственного средства выживаемость клеток измеряли с помощью анализа ХТТ (Sigma Aldrich). Вкратце, раствор

ХТТ добавляли непосредственно в каждую лунку, содержащую культуру клеток, и клетки инкубировали в течение 5 часов при 37°C перед считыванием оптической плотности при 490 нм и 690 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов (BMG Fluostar, Galaxy). Выживаемость клеток рассчитывали как соотношение живых обработанных клеток к живым ложнообработанным клеткам. IC<sub>50</sub> (которая представляет собой дозу, при которой 50% клеток являются жизнеспособными) рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04) путем построения графика процентной жизнеспособности в зависимости от Log концентрации лекарственного средства на каждой клеточной линии.

#### Результаты

Чтобы оценить противоопухолевую эффективность ОХ413, опухолевые клетки MDA-MB-231 обрабатывали ОХ413 (черный) или ОХ401 (темно-серый) в течение 1 недели для оценки IC<sub>50</sub> (средняя ингибирующая концентрация), а выживаемость измеряли через 7 дней после обработки с использованием анализа ХТТ (фиг. 2). Интересно, что ОХ413 проявлял более высокую противоопухолевую активность по сравнению с ОХ401, при этом значения IC<sub>50</sub> в 30 раз ниже, чем у ОХ401 (фиг. 2).

Пример 4. ОХ413 индуцирует накопление цитоплазматической ДНК и запускает врожденный иммунный ответ

#### Материалы и методы

##### Клеточная культура

В качестве клеточной модели использовали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 от ATCC. Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика в среде Лейбовица L15 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 0% CO<sub>2</sub>.

Количественная оценка PARилирования с помощью иммунофлуоресцентного анализа

Клетки высевали в камеры LabTek (Fischer Scientific) в концентрации  $2 \times 10^4$  клеток и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали ОХ413 (200 нМ). Через сорок восемь часов после обработки клетки фиксировали в течение 20 минут в 4% параформальдегиде/PBS 1x, пермеабелизовали в 0,5% Triton X-100 в течение 10 минут, блокировали 10% FBS в течение 15 минут и инкубировали с первичным антителом (пан-связывающий реагент против АДФ-рибозы, 1/300, Millipore) в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторичные козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa-488 (Molecular Probes), использовали в разведении 1/200 в

течение 45 минут при комнатной температуре, а ДНК окрашивали 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI).

Обнаружение микроядер (MN) и фрагментов цитоплазматического хроматина (CCF)

Клетки MDA-MB-231 высевали на покровные стекла (Menzel, Брауншвейг, Германия) в количестве  $5 \times 10^4$  клеток в 6-луночные планшеты с соответствующей плотностью, а затем обрабатывали в течение 48 часов с OX413 или без него (50 нМ или 100 нМ). После обработки клетки фиксировали 4% параформальдегидом/PBS 1X в течение 20 минут, пермеабелизовали в 0,5% Triton X-100 в течение 10 минут и блокировали 15 минут 10% FBS. Затем клетки промывали PBS, окрашивали красителем picogreen (Invitrogen, для обнаружения CCF) и/или DAPI (для анализа MN) в течение 5 минут. Процент MN оценивали как количество клеток, представляющих структуру MN, среди общего числа клеток. Для каждого условия было проанализировано около 150 клеток.

Анализ проточной цитометрией

Клетки MDA-MB-231 высевали в колбу T25 в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл, а затем обрабатывали в течение 48 часов с OX413 или без него при 200 нМ. Для внутриклеточного окрашивания (анализ pSTING) клетки промывали, затем фиксировали в PBS/70% этаноле в течение по меньшей мере 1 часа при 4°C. Затем клетки промывали, пермеабелизовали PBS/0,2% раствором TritonX-100 при комнатной температуре в течение 10 минут и насыщали PBS/2% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем клетки промывали PBS и инкубировали в течение 1 часа с конъюгированным с Alexa488 антителом против pSTING (cell signaling, Нидерланды, 1/200) перед анализом проточной цитометрии (Guava EasyCyte 12H, Luminex, Германия). Для окрашивания рецепторов клеточной поверхности клетки собирали и промывали непосредственно после окончания обработки, а затем инкубировали в течение 1 часа при 4°C с антителом против MIC-A, связанным с Alexa-488 (R&D System, 1/200), и APE-связанным антителом против PD-L1 (Abcam, 1/200). Окрашенные клетки затем промывали PBS и измеряли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра Guava EasyCyte 12H (Luminex, Германия). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Калифорния).

ELISA для обнаружения CCL5

Опухолевые клетки MDA-MB-231 обрабатывали OX413 или без него (500 нМ) в течение 24 и 48 часов с Т-лимфоцитами или без них. Затем собирали надосадочные

жидкости клеточных культур и центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут для удаления клеточного дебриса. Стрипованные 96-луночные планшеты, входящие в набор (Human SimpleStep CCL5 ELISA Kit – Abcam – ab174446), поставлялись готовыми к использованию. По 50 мкл каждой надосадочной жидкости добавляли в каждую лунку в двух повторах с 50 мкл коктейля антител, а затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин, после чего промывали 1X промывочным буфером РТ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 минут в темноте на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин. Затем в каждую лунку на шейкере для планшетов добавляли по 100 мкл стоп-раствора на 1 минуту и полученные люминесцентные сигналы измеряли на микропланшетном ридере (Enspire™ Perkin-Elmer).

### Результаты

Чтобы подтвердить эффективность оптимизированной молекулы ОХ413, авторы проверили, не влияют ли химические модификации на ее способность фиксировать белок PARP1. Гиперактивацию белков PARP в обработанных ОХ413 клетках MDA-MB-231 оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа PARилирования (фиг. 3А). Клетки, обработанные ОХ413, были положительными по «ложной» передаче сигналов ядерного PARилирования, что подтверждает взаимодействие с мишенью (фиг. 3А).

Чтобы проверить, обусловлена ли такая более высокая противоопухолевая эффективность более сильным воздействием на клеточный стресс и репарацию ДНК, авторы изучали путем иммуноокрашивания количество цитоплазматической нерепарированной ДНК, индуцированной обработкой ОХ413 (в дозах 50 и 100 нМ), путем количественного определения микроядер (MN) и фрагментов цитоплазматического хроматина (CCF). ОХ413 индуцировал значительное увеличение количества клеток с MN (фиг. 3В) и CCF (фиг. 3С). Чтобы проверить, может ли ОХ413-индуцированное накопление цитоплазматической ДНК активировать путь STING, авторы проанализировали с помощью проточной цитометрии фосфорилированную и активированную форму STING (pSTING). ОХ413 индуцировал активацию STING через 48 часов после обработки (средняя флуоресценция 57,4 по сравнению с 35 в необработанных клетках) (фиг. 3D). Чтобы подтвердить активацию пути STING, авторы также проанализировали секрецию хемокина CCL5 в супернатанте клеток, обработанных ОХ413. ОХ413 индуцировал увеличение секреции CCL5 48 после обработки (фиг. 3Е). Среди последствий активации пути STING в опухолевых клетках — активация PD-L1 (лиганда запрограммированной клеточной смерти 1), вероятно, реакция защиты от

иммунной системы. Авторы проанализировали уровень связанного с клеточной поверхностью PD-L1 в клетках, обработанных OX413. OX413 индуцировал двукратное увеличение мембраносвязанного PD-L1 по сравнению с необработанными клетками (фиг. 3F). В некоторых сообщениях также показано, что активация опухолевого STING может увеличивать количество лигандов NK-клеток в опухолевых клетках, таких как лиганды NKG2D (M1C-A, M1C-B, ULBP1/6). Таким образом, анализировали экспрессию M1C-A на поверхности клеток, обработанных OX413. Интересно, что клетки, обработанные OX413, показали более чем двукратное увеличение экспрессии M1C-A на клеточной поверхности (фиг. 3G).

Эти результаты подтвердили, что оптимизация структуры OX401 за счет повышения ее стабильности позволила увеличить количество молекул, достигающих мишени, и, следовательно, повысить противоопухолевую эффективность и противоопухолевый иммунный ответ.

Пример 5. OX413 индуцирует *in vivo* внутриопухолевую активацию путей PARP и STING, что приводит к повышению уровня инфильтрирующих опухоль лейкоцитов

Материалы и методы

ELISA для обнаружения CCL5

Для количественной оценки уровня CCL в микроокружении опухоли (TME) надосадочные жидкости после диссоциации опухоли собирали и центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут для удаления клеточного дебриса. Стрипованные 96-луночные планшеты, входящие в набор (Human SimpleStep CCL5 ELISA Kit – Abcam – ab174446), поставляются готовыми к использованию. По 50 мкл каждой надосадочной жидкости добавляли в каждую лунку в двух экземплярах с 50 мкл коктейля антител, а затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин, после чего промывали 1X промывочным буфером РТ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 минут в темноте на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин. Затем в каждую лунку на шейкере для планшетов добавляли по 100 мкл стоп-раствора на 1 минуту и полученные люминесцентные сигналы измеряли на микропланшетном ридере (Enspire™ Perkin-Almer).

Эксперименты *in vivo*, гидролиз опухолей, сортировка клеток и проточная цитометрия

Ксенотрансплантаты из клеток EMT6 (CDX), получали путем инъекции  $4 \cdot 10^5$  клеток в правый бок 6-8-недельной взрослой самки Balb/c (Janvier). Животных содержали по меньшей мере за 1 неделю до приживления опухоли в контролируемых условиях света

и темноты (12 часов/12 часов), относительной влажности (55%) и температуры (21°C). Рост опухоли оценивали три раза в неделю с использованием штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Местный комитет по этике экспериментов на животных одобрил все эксперименты.

Мышей случайным образом распределяли по группам, когда объем приживленных опухолей достигал от 150 до 300 мм<sup>3</sup>. OX413 (10 мг/кг) вводили внутривентрально. Мышей умерщвляли в указанные сроки (6, 24 или 72 часа после обработки), а CDX EMT6 экстрагировали, мелко измельчали и смешивали с октодиссоциатором GentleMACS (MilteNY Biotec) с использованием набора для диссоциации опухолей мышей (MilteNY Biotec, 130-096-730) согласно инструкции производителя. Диссоциированные опухолевые клетки промывали средой DMEM и лизировали эритроциты раствором для лизиса эритроцитов (MilteNY Biotec, 130-094-183). Затем обогащали лейкоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), с помощью микрогранул CD45 (MilteNY Biotec, 130-110-618) и сепаратора MultiMACS Cell24 Separator plus (MilteNY Biotec).

Клетки CD45+ ресуспендировали в буфере FACS (PBS, содержащий 2% BSA и 2 mM EDTA) и окрашивали панелью антител (анти-CD45-VioBlue, CD3-FITC, CD8a-PE-Vio770, CD4-APC-Vio770, CD49b-PE, CD335-APC, CD11c-PerCP-Vio700) или соответствующими изотипами в течение 30 минут при 4°C. Клетки CD45-, содержащие по существу опухолевые клетки EMT6, окрашивали антителом против PD-L1-PE (30 минут, 4°C), а затем фиксировали и пермеабелизовали с использованием набора буферов для окрашивания FoxP3/фактора транскрипции (ThermoFisher, 00-5523-00) в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали 30 минут при 4°C с антителом против поли(ADP)-рибозы (клон 10H; MERCK, MABC547). Затем клетки промывали, ресуспендировали в PBS и анализировали с использованием проточного цитометра Guava EasyCyte 12HT (Luminex). Компенсацию выполняли вручную с использованием контролей одного цвета и изотипа. Определение порога сигнала устанавливали с использованием всех окрашенных, неокрашенных и контролей изотипа. Анализ осуществляли на программном обеспечении FlowJo.

### Результаты

Авторы оценили эффективность OX413 в ксенотрансплантатах, полученных из модели сингенной опухоли молочной железы EMT6. Ксенотрансплантаты, полученные из клеток EMT6, обрабатывали носителем или OX413 (200 мкг), а опухоли собирали через 6, 24 или 72 часа после обработки (фиг. 4A). Чтобы подтвердить поглощение OX413 опухолями и взаимодействие с мишенью, авторы проанализировали в клетках EMT6, отобранных из диссоциированных опухолей, активацию PARP и уровни PD-L1 на

поверхности клеток. Обработка OX413 вызывала значительную активацию PARP, начиная с 6 часов после обработки, что указывает на поглощение опухолью и взаимодействие с мишенью (фиг. 4B). Это OX413-индуцированное PARилирование возвращается к базальному уровню через 72 часа после обработки, что указывает на то, что повторение обработки два раза в неделю необходимо для поддержания высокого целевого взаимодействия (фиг. 4B). Чтобы проверить, связано ли это PARилирование с активацией пути STING, как наблюдалось в экспериментах *in vitro*, авторы количественно оценили высвобождение опухолевого CCL5 в микроокружении опухоли (TME). Интересно, что TME-CCL5 увеличивался аналогично PARилированию, с пиком через 24 часа после обработки и снижением через 72 часа (фиг. 4C). Уровень PD-L1 на поверхности опухолевых клеток также увеличился после обработки, что подтверждает предыдущие результаты авторов изобретения *in vitro* и связь между отменой активности PARP и увеличением PD-L1, что может способствовать иммуносупрессии (фиг. 4D).

Затем авторы решили определить влияние OX413 на иммунное микроокружение. Проточно-цитометрический анализ лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL; клетки CD45+), показал, что OX413 значительно увеличивает общее количество TIL уже через 3 дня после обработки, что измерено с помощью окрашивания CD45 (фиг. 4E). Пропорции Т-клеток (CD3+) среди клеток CD45+ значительно увеличивались в ответ на обработку OX413 (фиг. 4E). OX413 не только усиливал инфильтрацию опухоли Т-клетками (CD45+, CD3+), но и клетки-натуральные киллеры (NK) (общее количество инфильтрирующих NK-клеток: CD3-, CD49b+; активированные инфильтрирующие NK-клетки: CD3-, CD49b+, CD335+ - фиг. 4E), что указывает на активацию как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Более того, TME заселялся в дендритных клетках (DC) после обработки OX413 (CD45+, CD11c+).

В совокупности эти результаты демонстрируют эффективную активацию путей PARP и STING, индуцированную OX413, в опухолях, что увеличивает рекрутирование врожденных и адаптивных иммунных клеток и усиливает продуктивный противоопухолевый иммунный ответ.

Пример 6. OX413 и OX416 запускают активацию PARP и вызывают врожденный иммунный ответ

Материалы и методы

Клеточная культура

В качестве клеточных моделей использовали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы человека MDA-MB-231 и клеточную линию рака молочной железы мыши EMT6 (от ATCC). Клетки MDA-MB-231 выращивали согласно

инструкциям поставщика в среде Лейбовица L15 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 0% CO<sub>2</sub>. Клетки EMT6 выращивали в среде RPMI с добавлением 10% FBS и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Трансфекцию OX416 в клетки проводили с помощью реагента JetPRIME (JetP) (Polyplus). Вкратце, комплексы OX416/JetP готовили экстенпорально путем инкубации при комнатной температуре 50 нМ OX416 (разведенного в 200 мкл буфера jetPRIME) с 2 мкл трансфецирующего реагента jetPRIME. Затем комплексы добавляли к клеткам, посеянным в 2 мл полной среды (в лунку 6-луночного планшета).

Количественная оценка активации путей PARилирования и STING с помощью проточной цитометрии

Клетки MDA-MB-231 или EMT6 высевали во флакон T25 в концентрации 2E5 клеток/мл, а затем обрабатывали в течение 24 и 48 часов OX416/JetP (50 нМ) или OX413 (100 нМ и 500 нМ, соответственно) или не обрабатывали (NT). После обработки клетки собирали и промывали, фиксировали в PBS/70% этаноле в течение по меньшей мере 1 часа при 4°C, а затем промывали и пермеабелизовали PBS/0,2% раствором TritonX-100 при комнатной температуре в течение 10 минут, насыщали раствором PBS/2%/бычий сывороточный альбумин (BSA) при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем клетки промывали PBS и инкубировали в течение 1 часа с антителом против pSTING, конъюгированным с Alexa488 (передача сигналов клеток, Нидерланды, 1/200) и антителом против PAR, конъюгированным с Alexa647 (Merck Millipore, 1/200), перед анализом проточной цитометрии. (MACSQuant10, Милтеньи, Германия). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Калифорния).

### Результаты

Авторы сначала проанализировали активацию поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) с помощью OX413 и OX416 в клетках MDA-MB-231 и EMT6. Этот фермент активируется после связывания олигонуклеотидного фрагмента OX416 или OX413, что имитирует двухцепочечный разрыв.

Данные представлены как среднее кратное изменение дифференциальной флуоресценции между условиями с обработкой (OX413 или OX416) и условиями без обработки (NT). Опухолевые клетки, обработанные OX413, демонстрировали накопление полимера поли(АДФ-рибозы) (PAR) (PARилирование, результат активации PARP), начиная с 24 часов после обработки, достигая плато через 48 часов после обработки в клетках EMT6, но очень кратковременное в MDA-MB- 231 клетка (фиг. 5A, D). В клетках, обработанных OX416, наблюдалась активация PARP через 24 часа после обработки и

значительное снижение через 48 часов после обработки, вероятно, из-за значительной гибели клеток, вызванной лекарственным средством, в этот момент времени (фиг. 5A, D). Эти результаты подтверждают эффективность оптимизированной молекулы OX416 и то, что химические модификации не повлияли на ее способность связывать белки PARP-1.

Как захват PARP, так и гиперактивация приводят к высокому накоплению цитоплазматической нерепарированной ДНК, которая может активировать путь STING. Чтобы проверить, вызывают ли молекулы OX413 и OX416 активацию пути STING, авторы проанализировали с помощью проточной цитометрии общее количество белка STING (фиг. 5B, E) и фосфорилированной и активированной формы STING, pSTING (фиг. 5C, F). В обеих клеточных линиях OX413 и OX416 индуцировали активацию пути STING, начиная через 24 часа после обработки.

#### Пример 7. Фармацевтические свойства / ФК

##### Материалы и методы

Самки мышей BAL/C были приобретены у Janvier-labs. По одному миллиграмму OX413, OX416, OX421, OX422 и OX423 вводили мышам внутривенно (в/в) и кровь собирали в разное время: 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа и 24 часа. Забор крови осуществляли пункцией нижнечелюстной вены в течение первых пяти временных точек и внутрисердечной терминальной пункцией под глубокой газовой анестезией в течение 24 часов. Кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом (K2-EDTA) и центрифугировали при 1200 g в течение 15 минут при +4°C для выделения плазмы. Образцы плазмы хранили в пропиленовых пробирках при температуре 80°C.

Раствор протеиназы K (solK) готовили путем разведения 5 мкл протеиназы K sol > 20 мг/мл, 20 мкл буфера (400 мкл CaCl<sub>2</sub> 0,5 M, 100 мкл HEPES 1M, 500 мкл воды) и 75 мкл воды MilliQ. Фиксированный объем образцов (около 10 мкл) разводили таким же объемом раствора протеиназы K (solK) и нагревали при 55°C в течение 1 часа перед прямым вводом в жидкостную хроматографию высокого давления, оснащенную колонкой Waters VEN C18. Градиент осуществляли путем увеличения процентного содержания ацетонитрила по сравнению с фазой триэтиламин (ТЭА)/гексафторизопропанол (ГФИП) с течением времени.

##### Результаты

Инъекция OX413, OX422 или OX423 в дозе 1 мг в/в путем мышам приводит к высокой максимальной концентрации (C<sub>max</sub>) соединений в плазме (фиг. 6). Значения C<sub>max</sub> OX422 и OX423 (соответственно, 196 мкг/мл и 154,7 мкг/мл, фиг. 6B, C), измеренные методом ВЭЖХ, были выше значения C<sub>max</sub> OX413 (69,26 мкг/мл) через 2 часа (фиг. 6A).

Измеренная площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства от времени (AUC) в плазме была значительно выше при введении OX422 или OX423 (соответственно, 1480 мкг·ч/мл и 1700 мкг·ч/мл) по сравнению с OX413 (179 мкг·ч/мл).

Значения  $C_{max}$  и AUC после в/б введения OX413, OX422 и OX423 показаны в таблице 1 ниже:

	Время для $C_{max}$ (ч)	$C_{max}$ (мкг/мл)	AUC (мкг·ч/мл)
OX413	2	69,26	179
OX422	2	196,0	1480
OX423	2	154,7	1700

Соединения, имеющие модификации 2'OMe, обладают улучшенными фармацевтическими свойствами по сравнению с соединениями, имеющими модификации FANA.

#### Пример 8. Кинетика ассоциации/диссоциации и сила взаимодействия (KD)

##### Материалы и методы

Взаимодействие OX413 и OX416 с белком поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 человека (PARP-1) (115 кДа) охарактеризовали методом SPR с использованием прибора Biacore T100 от GE Healthcare Life Sciences и с использованием человеческого His-меченного белка PARP-1, приобретенного у Thermofisher. Для оценки взаимодействий PARP1/шпилька, PARP1-His захватывали анти-His-антителами, иммобилизованными на поверхности карбоксиметилированного чипа.

##### Результаты

Кинетика ассоциации ( $k_{on}$ ) и диссоциации ( $k_{off}$ ), а также сила взаимодействия (KD) OX413 и OX416 представлены в таблице 2 ниже:

	$K_D$ (нМ)	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )
OX413	$45 \pm 11$	$3,7 \cdot 10^4 \pm 5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$
	$85 \pm 7$	$4,7 \cdot 10^3 \pm 2 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^{-4} \pm 1 \cdot 10^{-5}$
OX416	$2,4 \pm 0,2$	$1,6 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-4}$

OX416 лучше взаимодействует с белком PARP-1 по сравнению с OX413.

#### Пример 9. OX413 и OX416 проявляют высокую противоопухолевую активность

##### Материалы и методы

##### Клеточная культура

Клеточная линия карциномы молочной железы мыши EMT-6 была приобретена в Американской коллекции типовых культур, США. Опухолевые клетки EMT-6 подвергали *in vitro* воздействию олапариба для получения опухолевой клеточной линии, сверхэкспрессирующей PARP, что приводило к получению клеточной линии EMT-6 с высоким содержанием PARP (EMT-6<sup>PARP high</sup>). Клетки культивировали в среде Waymouth,

содержащей 2 mM L-глутамин с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пени-стрептомицина (Gibco) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Иммунокомпетентные мыши Balb/c, несущие опухолевые клетки молочной железы EMT-6<sup>PARP<sup>high</sup></sup>, обработка лекарственным средством и измерение роста опухоли

Самки мышей Balb/c (Balb/cByJ) в возрасте 6-8 недель были получены от компании Janvier (Сен-Бертевен, Франция). Клетки EMT-6<sup>PARP<sup>high</sup></sup> ( $5 \times 10^5$  клеток/мышь в 200 мкл среды Уэймута) имплантировали подкожно в бок мышам. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 25-40 мм<sup>3</sup>, животных случайным образом распределяли по группам по 7 мышей и проводили обработку, описанную в таблице 3 ниже:

Группа	Обработка	Путь	Доза	График
I	Необработанные	-	-	-
II	OX416	Внутрибрюшинный	20 мг/кг	Дважды в неделю
III	OX413	Внутрибрюшинный	20 мг/кг	Дважды в неделю
IV	OX421	Внутрибрюшинный	20 мг/кг	Дважды в неделю

#### Результаты

Соединения OX413 (сплошные линии, серые кружки) и OX416 (пунктирные линии, серые кружки) вызывали заметное ингибирование роста опухоли по сравнению с группой, не получавшей обработки (NT, черные квадраты), через девятнадцать дней после обработки OX413 или OX416 (фиг. 7).

#### Пример 10. OX425 улавливает и гиперактивирует PARP

##### Материалы и методы

##### Клеточная культура

В качестве клеточных моделей использовали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-436 от ATCC. Клетки выращивали в соответствии с инструкциями поставщика в среде Лейбовица L15 (Gibco, Кат.# 11570396), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, Biowest; Кат.#: S1810-100) и 1% пенициллином/стрептомицином (Gibco; Кат.#: 15140-122) и поддерживали во влажной атмосфере при температуре 37°C и 0% CO<sub>2</sub>. Кроме того, в среду Лейбовица L15 добавляли 10 мкг/мл инсулина (Sigma, кат.# I9278), 16 мкг/мл глутатиона (Sigma, кат.# Y0000517) для клеточной линии MDA-MB-436.

##### Электрофоретический анализ изменения подвижности (EMSA)

Чтобы подтвердить взаимодействие между OX425 и его мишенью поли-(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1), использовали способ EMSA. Для этой цели 1 пмоль OX425 (Axolabs; партия #K1K2) элюировали в 10 mM буфере EDTA с использованием или с добавлением рекомбинантного белка PARP1 (Active Motif, кат. # 81037). Два разных соотношения: 1:1 и 1:5 (лекарственное средство:рекомбинантный белок) тестировали и инкубировали в течение 30 минут при 37°C с использованием THERMO MIXER C

(Eppendorf) в конечном объеме 40 мкл. По истечении времени инкубации непосредственно в пробирки добавляли 1X краситель для загрузки ДНК в гель (ThermoFisher, кат.#R0631). 15 мкл образцов помещали в 20% полиакриламидный гель Novex™ TBE (ThermoFisher, кат.#EC63155BOX). Электрофорез проводили с использованием 1X буфера TBE (ThermoFisher, кат.#15581044) в течение 80 минут при 180 В. В качестве лидера использовали оранжевый лидер ДНК длиной 5 пар оснований (ThermoFisher, кат.#SM1303). По окончании миграции гели промывали дистиллированной водой и окрашивали в течение 20 мин красителем SyberGold (1/10000 в дистиллированной воде). Гели анализировали с помощью УФ-трансиллюминатора (PERKIN ELMER, ENSPIRE ALPHA 2390).

Количественная оценка PARилирования с помощью иммунофлуоресцентного анализа

Клетки высевали в камеры LabTek (Fischer Scientific) в концентрации  $2 \times 10^4$  клеток и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали 1, 2,5 и 5 мкМ OX425 (Axiolabs; партия # K1K2). Через двадцать четыре часа после обработки клетки фиксировали в течение 20 минут в 4% параформальдегиде/PBS 1x, пермеабелизовали в 0,5% Triton X-100 в течение 10 минут, блокировали 10% FBS (Sigma, кат.# F0685) в течение 15 минут и инкубировали с первичным антителом (пан-связывающий реагент против АДФ-рибозы, 1/300, Millipore, кат.# MABE1016) в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторичные козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa-488 (Molecular Probes, кат.# 10453272), использовали в разведении 1/200 в течение 45 минут при комнатной температуре, а ДНК окрашивали 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Life Technologies; Кат.#: 62248). Частоту встречаемости положительных клеток (показывающих полимеры поли-АДФ-рибозы, PARилирование) оценивали как количество положительных клеток по отношению к общему количеству клеток. Для каждого образца анализировали по меньшей мере 100 клеток.

### Результаты

Эффект ловушки OX425 был продемонстрирован путем анализа взаимодействия поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) с OX425 с использованием анализа сдвига в геле и изучения статуса активации PARP в клетках, обработанных OX425. Как показано на фиг. 8А, OX425 взаимодействует с PARP1 дозозависимым образом и приводит к гиперактивации в клеточных линиях рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-436, что оценивается с помощью иммунофлуоресценции для обнаружения накопления полимера поли(АДФ-рибозы) (PAR) (PARилирование, результат активации PARP). В

клетках, обработанных ОХ425, наблюдалось значительное увеличение количества полимеров PAR и активации PARP, начиная с 24 часов после обработки (фиг. 8B).

Пример 11. ОХ425 демонстрирует мощную противоопухолевую активность на нескольких моделях опухолевых клеток

Материалы и методы

Клеточная культура

В качестве клеточных моделей использовали клеточные линии рака предстательной железы 22Rv1 и PC-3, клеточная линия рака яичника OVCAR3, клеточные линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-436 от ATCC и BC227 (подарок от Института Кюри). Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика. BC227 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла DMEM (Gibco; кат.#: 31966-021) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Gibco; кат.#: 10270-106), 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco; кат.#: 15140-122) и инсулина 10 мкг/мл (Sigma, кат.# I9278).

Обработка лекарственным средством и измерение клеточной выживаемости

MDA-MB-231 и MDA-MB-436 ( $2 \cdot 10^3$  клеток/лунку), 22Rv1 ( $1 \cdot 10^3$  клеток/лунку), PC-3, OVCAR3 и BC227 ( $5 \cdot 10^2$  клеток/лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 часов при  $37^\circ\text{C}$  до добавления возрастающих концентраций лекарственного средства в течение 6 дней. После воздействия лекарственного средства выживаемость клеток измеряли с использованием анализа ХТТ (Thermo, кат.#: X12223). Вкратце, раствор ХТТ добавляли непосредственно в каждую лунку, содержащую культуру клеток, и клетки инкубировали в течение 4 часов при  $37^\circ\text{C}$  перед считыванием оптической плотности при 485 нм с помощью микропланшетного ридера (VICTOR Nivo Plate Reader, Perkinelmer). Выживаемость клеток рассчитывали как соотношение живых обработанных клеток к живым ложнообработанным клеткам.  $IC_{50}$  (которая представляет собой дозу, при которой 50% клеток являются жизнеспособными) рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04) путем построения графика процентной жизнеспособности в зависимости от Log концентрации лекарственного средства на каждой клеточной линии.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) и тест на цитотоксичность

Выделение PBMC из цельной крови (здорового донора, предоставленного учреждением Blood French (EFS)) осуществляли путем прямой иммуномагнитной негативной селекции с помощью EasySep Magnet (StemCell, кат.# 19654 и кат.# 18103) в соответствии с протоколом производителя. Свежие выделенные PBMC активировали и

культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней с использованием коктейля активаторов Т-клеток, дополненного ИЛ-2, в соответствии с рекомендациями производителя (StemCell, кат.# 10981, # 10970 и # 78036.2).

Для теста на цитотоксичность 2,5x10<sup>5</sup> полностью активированных клеток РВМС обрабатывали ОХ425 и другими ингибиторами (Олапариб (Clinisciences, кат.#: A10111-10), Талазопариб (Sigma, кат.#: P57204), Адасертиб (Selleckhem, кат.#: МК -1775) и Цераласертиб (Selleckhem, кат.#: AZD6738)) в течение 3 дней. Жизнеспособность и пролиферацию клеток оценивали путем подсчета с помощью красителя акридиновый оранжевый/йодид пропидия (Logos Biosystems, кат.# F23011).

### Результаты

Влияние обработки ОХ425 на жизнеспособность опухолевых клеток анализировали при концентрациях, при которых ОХ425 проявляет агонистический эффект-ловушку на PARP (захват и гиперактивация). Различные типы опухолевых клеток (молочной железы, яичников, предстательной железы) обрабатывали ОХ425 в течение 6 дней и выживаемость измеряли с помощью анализа жизнеспособности ХТТ. ОХ425 индуцировал высокую противоопухолевую активность, причем большинство IC<sub>50</sub> находились в диапазоне от 10 до 300 нМ (фиг. 9А). Интересно, что эта активность была специфичной для опухолевых клеток, поскольку в здоровых клетках крови не наблюдалось существенного влияния на жизнеспособность клеток по сравнению с другими ингибиторами реакции на повреждение ДНК (ингибиторы WEE1, ATR или PARP), которые показали значительную токсичность по отношению к здоровым клеткам (фиг. 9В).

Пример 12. ОХ425 демонстрирует мощную противоопухолевую активность в клетках с дефицитом гомологичной рекомбинации и клетках, способных к гомологичной рекомбинации.

### Материалы и методы

#### Клеточная культура

В качестве клеточных моделей использовали клеточные линии рака предстательной железы 22Rv1 и PC-3, клеточные линии колоректального рака HT29 и HCT116, клеточные линии рака яичника UWB1.289, UWB1.289 BRCA1, A2780 и OVCAR3, клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231, MDA-MB-436 BT-549, HCC38, HCC1143, клеточную линию рака легкого A549 от ATCC и BC227 (подарок от Института Кюри). Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика. BC227 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла DMEM (Gibco; кат.#: 31966-021) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS; Gibco; кат.#: 10270-106), 1%

пенициллина/стрептомицина (Gibco; кат.#: 15140-122) и инсулина 10 мкг/мл (Sigma, кат.# I9278).

Обработка лекарственным средством и измерение клеточной выживаемости

Опухолевые клеточные линии MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT549, HCC38 и HCC1143 ( $2 \times 10^3$  клеток/на лунку), 22Rv1, UWB1.289 и UWB1.289 BRCA1 ( $1 \times 10^3$  клеток/на лунку), PC-3, OVCAR3, HT29, HCT116, A2780 и BC227 ( $5 \times 10^2$  клеток/на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 часов при 37°C перед добавлением возрастающих концентраций лекарственного средства в течение 6 дней. После воздействия лекарственного средства выживаемость клеток измеряли с использованием анализа ХТТ (Thermo, кат.#: X12223). Вкратце, раствор ХТТ добавляли непосредственно в каждую лунку, содержащую культуру клеток, и клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C перед считыванием оптической плотности при 485 нм с помощью микропланшетного ридера (VICTOR Nivo Plate Reader, Perkinelmer). Выживаемость клеток рассчитывали как соотношение живых обработанных клеток к живым ложнообработанным клеткам. IC<sub>50</sub> (которая представляет собой дозу, при которой 50% клеток являются жизнеспособными) рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04) путем построения графика процентной жизнеспособности в зависимости от Log концентрации лекарственного средства на каждой клеточной линии.

#### Результаты

Ингибиторы PARP продемонстрировали значительные преимущества у больных раком с недостаточной репарацией гомологичной рекомбинации (HRD; например, вызванной мутациями BRCA). Однако они не проявляют эффективности при опухолях с активной репарацией или со способностью к репарации (HRP). Поскольку OX425 нацелен на PARP, авторы хотели проверить, проявляет ли он более высокую активность в опухолевых клетках HRD по сравнению с клетками HRP. UWB1.289 (клеточная линия рака яичников, несущая мутацию BRCA1 - HRD) и ее аналог дикого типа, дополненный BRCA1 (UWB1.289 BRCA1 - HRP), обрабатывали олапарибом или OX425 в течение 6 дней, а жизнеспособность клеток оценивали с помощью анализа ХТТ. Как и ожидалось, олапариб продемонстрировал более высокий эффект в отношении выживаемости клеток HRD по сравнению с клетками HRP. Однако OX245 продемонстрировал сходные эффекты в отношении жизнеспособности клеток независимо от статуса репарации гомологичной рекомбинации (фиг. 10A). Было обнаружено, что это справедливо для различных клеточных линий, представляющих различные гистологии опухолей, т.е. по сравнению с олапарибом, который показал значительно более высокую эффективность в клетках HRD,

не наблюдалось существенной разницы в чувствительности к OX425 между опухолевыми клеточными линиями HRD и HRP (фиг. 10B).

Пример 13. OX425 задерживает появление приобретенной устойчивости к олапарибу в ортотопических опухолях рака молочной железы

Материалы и методы

Модель животного

Всех животных разводили и содержали в специальных свободных от патогенов условиях в соответствии с рекомендациями. Это исследование было проведено с соблюдением всех соответствующих этических норм для испытаний и исследований на животных и получило этическое одобрение Комитета по этике. Животным давали воду без ограничения и кормили обычным кормом. Эксперименты проводили на голых мышах NMRI (модель иммунодефицита, поставщик JANVIER Labs). Однопометных животных из разных клеток случайным образом распределяли по экспериментальным группам и либо содержались вместе, либо систематически подвергались воздействию подстилки других групп, чтобы обеспечить равное воздействие общей микробиоты.

Клетки MDA-MB436 трижды негативного рака молочной железы (TNBC) ( $2 \times 10^6$ ) суспендировали в смеси среды Лейбовица L15 (Gibco, кат.#: 11570396) и BD Matrigel Matrix (BD Biosciences; кат.#: 356234) в соотношении 1:1 и вводили подкожно голым мышам NMRI. Олапариб (Clinisciences, кат.#: A10111-10) в дозе 100 мг/кг при пероральном введении или OX425 (10 мг/кг/IP, (Axolabs; партия № K1K2)) один раз в неделю. Животных взвешивали каждый день во время обработки и каждые два дня последующего наблюдения. Эффективность обработки оценивали по влиянию исследуемого вещества на объем опухоли. Диаметр опухолей будут измерять два раза в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли штангенциркулем, а объем опухоли оценивали по формуле: Объем\_опухоли = (длина × ширина<sup>2</sup>)/2. В конце эксперимента мышей подвергли эвтаназии; опухоли замораживали для последующего анализа.

Результаты

Авторы исследовали, может ли OX425 вызвать реверсию резистентности к олапарибу *in vivo* на модели MDA-MB-436, которая имеет мутацию BRCA1 (HRD) и изначально очень чувствительна к олапарибу. Это исследование состояло из четырех групп; контрольная группа, группа монотерапии OX425, группа монотерапии олапарибом и четвертая группа, в которой OX425 был добавлен к обработке олапарибом через 30 дней монотерапии олапарибом, когда появились признаки резистентности (фиг. 11A). Интересно, что приобретенная устойчивость к олапарибу возникла через 30–60 дней после начала обработки, как и в моделях *in vitro* (данные не показаны). Фактически, CDX MDA-

МВ-436 изначально были высокочувствительны к олапарибу, а затем претерпели быстрый рост, способствуя агрессивной резистентности к монотерапии олапарибом в 90% опухолей. В предыдущем эксперименте авторы показали, что эта приобретенная резистентность обусловлена повторной активацией пути репарации HR в этой модели, вызывая переключение с HRD-олапариб-чувствительного статуса к HRP-олапариб-резистентному статусу (фиг. 11D). Введение ОХ425 значительно устраняло переключение статуса репарации гомологичной рекомбинации опухоли и устойчивость к олапарибу (фиг. 11В). Более того, во время обработки не наблюдалось явной токсичности или потери массы тела (фиг. 11С).

Пример 14. ОХ425 индуцирует накопление цитоплазматической ДНК и запускает врожденный иммунный ответ

Материалы и методы

Клеточная культура

Клетки Pan02 аденокарциномы поджелудочной железы мышей (ODS, лот#: 8876) хранили в RPMI 1640 (Gibco, кат.#: 11530586) с добавлением 10% FBS (FBS, Biowest; кат.#: S1810-100). Культуры клеток поддерживали во влажном инкубаторе при температуре 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

Количественная оценка PARилирования с помощью иммунофлуоресцентного анализа

Клетки высевали в камеры LabTek (Fischer Scientific) в концентрации  $1 \times 10^2$  клеток и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали 1 или 2 мкМ ОХ425 (Axolabs; партия # K1K2). Через двадцать четыре часа после обработки клетки фиксировали в течение 20 минут в 4% параформальдегиде/PBS 1x, пермеабелизовали в 0,5% Triton X-100 в течение 10 минут, блокировали 10% FBS (Sigma, кат.# F0685) в течение 15 минут и инкубировали с первичным антителом (пан-связывающий реагент против АДФ-рибозы, 1/300, Millipore, кат.# MABE1016) в течение 1 часа при комнатной температуре. Вторичные козы антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa-488 (Molecular Probes, кат.# 10453272), использовали в разведении 1/200 в течение 45 минут при комнатной температуре, а ДНК окрашивали 6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI, Life Technologies; Кат.#: 62248). Частоту встречаемости положительных клеток (показывающих полимеры поли-АДФ-рибозы, PARилирование) оценивали как количество положительных клеток по отношению к общему количеству клеток. Для каждого образца анализировали по меньшей мере 100 клеток.

Обработка лекарственным средством и измерение клеточной выживаемости

Pan02 ( $1 \times 10^2$  клеток/на лунку) высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали 24 часа при  $37^\circ\text{C}$  перед добавлением возрастающих концентраций лекарственного средства в течение 6 дней. После воздействия лекарственного средства выживаемость клеток измеряли с использованием анализа ХТТ (Thermo, кат.#: X12223). Вкратце, раствор ХТТ добавляли непосредственно в каждую лунку, содержащую культуру клеток, и клетки инкубировали в течение 4 часов при  $37^\circ\text{C}$  перед считыванием оптической плотности при 485 нм с помощью микропланшетного ридера (VICTOR Nivo Plate Reader, Perkinelmer). Выживаемость клеток рассчитывали как соотношение живых обработанных клеток к живым ложнообработанным клеткам.  $\text{IC}_{50}$  (которая представляет собой дозу, при которой 50% клеток являются жизнеспособными) рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04) путем построения графика процентной жизнеспособности в зависимости от Log концентрации лекарственного средства на каждой клеточной линии.

#### Анализ проточной цитометрии

Клетки Pan02 высевали в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/мл и затем обрабатывали в течение 24 часов или 48 часов с OX425 или без него при 100 или 200 нМ (Axolabs; партия # K1K2). Все окрашивания и инкубации проводили при  $4^\circ\text{C}$  в темноте. Для внеклеточного (PD-L1) клетки сначала обрабатывали трипсином, промывали и окрашивали на жизнеспособность с использованием VB-Viability (MilteNY Biotec, 130-130-420) в течение 15 минут в PBS. После отмывки клетки окрашивали в течение 30 мин PD-D1\_PE (Abcam, 1/800) в течение 30 мин в свежем 0,5% буфере PBS/BSA. Затем клетки фиксировали и пермеабелизовали с использованием набора буферов для окрашивания транскрипционных факторов (MilteNY Biotec, 130-122-981) в течение 1 часа 30 минут. Перед внутриклеточным окрашиванием клетки насыщали красящим буфером в течение 15 мин. Клетки окрашивали STING (Cell Signaling, 13647S, 1/200) или пан-антителом, связывающим АДФ-рибозу (Merck, MABE1016, 1/500) в течение 1 часа в 0,5% буфере PBS/BSA. После промывания использовали вторичное окрашивание антителами AlexaFluor647 (Abcam, ab150083, 1/2000) с использованием того же буфера в течение 30 мин. Наконец, окрашенные клетки затем промывали, интенсивность флуоресценции измеряли с помощью MACSQUANT8 (MilteNY Biotec) и анализировали данные с использованием программного обеспечения Flowlogic.

#### ИФА для обнаружения CCL5

Клетки Pan02 обрабатывали OX425 в концентрации 1 или 2 мкМ (Axolabs; партия # K1K2) в течение 48 часов с Т-лимфоцитами или без них. Затем собирали надосадочные жидкости клеточных культур и центрифугировали при 1500 g в течение 10 минут для

удаления клеточного дебриса. Стрипованные 96-луночные планшеты, входящие в набор (Human SimpleStep CCL5 ELISA Kit – Abcam – ab174446), поставляются готовыми к использованию. По 50 мкл каждой надосадочной жидкости добавляли в каждую лунку в двух экземплярах с 50 мкл коктейля антител, а затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин, после чего промывали 1X промывочным буфером РТ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 минут в темноте на шейкере для планшетов, установленном на 400 об/мин. Затем в каждую лунку на шейкере для планшетов добавляли по 100 мкл стоп-раствора на 1 минуту и полученные люминесцентные сигналы измеряли на микропланшетном ридере (Enspire™ Perkin-Elmer).

#### Модель животного

Всех животных разводили и содержали в специальных свободных от патогенов условиях в соответствии с рекомендациями. Это исследование было проведено с соблюдением всех соответствующих этических норм для испытаний и исследований на животных и получило этическое одобрение Комитета по этике. Животным давали воду без ограничения и кормили обычным кормом. Эксперименты проводили на голых мышах. Однопометных животных из разных клеток случайным образом распределяли по экспериментальным группам и либо содержали вместе, либо систематически подвергали воздействию подстилки других групп, чтобы обеспечить равное воздействие общей микробиоты.

Клетки Pan02 ( $2 \times 10^6$ ) суспендировали в PBS (100 мкл) и вводили подкожно в правый бок мышей C57BL/6. OX425 (25 мг/кг/в.б.) вводили два раза в неделю. Животных взвешивали каждый день во время обработки и каждые два дня последующего наблюдения. Эффективность обработки оценивали по влиянию исследуемого вещества на объем опухоли. Диаметр опухолей будут измерять два раза в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли штангенциркулем, а объем опухоли оценивали по формуле: Объем\_опухоли = (длина  $\times$  ширина<sup>2</sup>)/2. В конце эксперимента мышей подвергли эвтаназии; опухоли замораживали для последующего анализа.

#### Диссоциация опухоли и анализ проточной цитометрии

Ксенотрансплантированные опухоли Pan02 собирали на 6-й день после обработки, затем опухоли мелко измельчали и смешивали с октодиссоциатором GentleMACS (MilteNY Biotec) с использованием набора для диссоциации опухолей мыши (MilteNY Biotec, 130-096-730) в соответствии с инструкциями производителя. Диссоциированные опухолевые клетки промывали средой DMEM, а эритроциты лизировали раствором для

лизиса эритроцитов (MilteNY Biotec, 130-094-183). Затем лейкоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), обогащали с использованием микрогранул CD45 (MilteNY Biotec, 130-110-618) и сепаратора MultiMACS Cell24 Separator plus (MilteNY Biotec). Клетки подсчитывали на каждой стадии, чтобы определить процент живых клеток CD45+ в опухоли.

Клетки CD45-, содержащие по существу опухолевые клетки Pan02, окрашивали красителем на жизнеспособность (Viability-VB, MilteNY, 130-130-420, 1/100), в течение 15 минут, а затем фиксировали и пермеабелизовали (MilteNY Biotec, 130-122-981), насыщали и инкубировали в течение 1 часа при 4°C с пан-связывающим реагентом против АДФ-рибозы (Merck, MABE1016, 1/500) в 0,5% буфере для окрашивания PBS/BSA. Затем клетки промывали, ресуспендировали в рабочем буфере MACS и анализировали с использованием MACSQUANT8 (MilteNY Biotec), а данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowlogic.

### Результаты

Гиперактивацию белков PARP в клетках, обработанных OX425, оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа PARилирования (фиг. 12A). Клетки, обработанные OX425, были положительными по «ложной» передаче сигналов ядерного PARилирования, что подтверждало взаимодействие с мишенью с увеличением от 2 до 6 раз по сравнению с необработанными клетками при дозах 100 нМ и 200 нМ (фиг. 12A). Чтобы оценить влияние OX425 на жизнеспособность клеток, клетки рака поджелудочной железы PAN02 обрабатывали возрастающими дозами OX425 в течение 6 дней и определяли IC<sub>50</sub>. Авторы обнаружили, что при обработке OX425 гиперактивация PARP коррелирует со снижением жизнеспособности клеток с IC<sub>50</sub> приблизительно 150 нМ – фиг. 12B. Чтобы проверить, вызвано ли это воздействием на клеточный стресс и репарацию ДНК, вызывающим накопление нерепарированной ДНК в цитоплазме, авторы изучили активацию пути STING, отслеживая фосфорилированную и активированную форму STING (pSTING) с помощью проточной цитометрии. OX425 индуцировал активацию Sting через 48 часов после обработки (фиг. 12C). Чтобы подтвердить активацию пути STING, авторы также проанализировали секрецию хемокина CCL5 в надосадочной жидкости клеток, обработанных OX425. OX425 индуцировал увеличение секреции CCL5 через 48 часов после обработки дозозависимым образом (увеличение в 3,5 раза при 200 нМ по сравнению с необработанными клетками (фиг. 12D)). Среди последствий активации пути Sting в опухолевых клетках положительная ирегуляция PD-L1 (лиганда программируемой клеточной смерти 1), вероятно, петля обратной связи, индуцированная в опухолевых клетках для защиты от иммунной системы. Авторы проанализировали

уровень клеточной поверхности, ассоциированный с PD-L1, в клетках, обработанных OX425. OX425 индуцировал 5-6-кратное увеличение мембраносвязанного PD-L1 по сравнению с контролем (фиг. 12E).

Чтобы подтвердить эти результаты *in vivo*, ксенотрансплантаты, полученные из клеток PAN02, обрабатывали OX425 в дозе 25 мг/кг и анализировали взаимодействие с мишенями, а также инфильтрирующие опухоль лейкоциты (TIL - в результате активации пути STING) через 48 часов после последнего введения методом проточной цитометрии. Опухоли, обработанные OX425, демонстрировали тенденцию к активации PARP (фиг. 12F). Однако наблюдалось значительное увеличение инфильтрации CD45+ TIL (фиг. 12G), что подтверждает индуцированные OX425 иммунные эффекты, которые, как известно, опосредуют противоопухолевое действие. В соответствии с этими наблюдениями, монотерапия OX425 была связана со значительной задержкой роста опухоли в этой модели ксенотрансплантата (фиг. 12H). В совокупности эти результаты демонстрируют, что OX425 индуцирует врожденный иммунный ответ и активацию пути Sting посредством накопления фрагментов цитоплазматической ДНК и секреции цитокинов.

Пример 15. OX425 увеличивает инфильтрацию иммунных клеток в микроокружении опухоли

Материалы и методы

Модель животного

Всех животных разводили и содержали в специальных свободных от патогенов условиях в соответствии с рекомендациями. Это исследование было проведено с соблюдением всех соответствующих этических норм для испытаний и исследований на животных и получило этическое одобрение Комитета по этике. Животным давали воду без ограничения и кормили обычным кормом. Эксперименты проводили на мышах BALB/c. Однопометных животных из разных клеток случайным образом распределяли по экспериментальным группам и либо содержались вместе, либо систематически подвергали воздействию подстилки других групп, чтобы обеспечить равное воздействие общей микробиоты.

Клетки EMT6 ( $0,5 \times 10^6$ ) суспендировали в смеси среды Waymouth MB 752/1 (Sigma, кат.#: W1625) с 2 mM L-глутамин и BD Matrigel Matrix (BD Biosciences; кат.#: 356234) в соотношении 1:1 и вводили мышам BALB/c (ортопическая модель). OX425 (25 мг/кг или 100 мг/кг/в.б., (Axolabs; партия # K1K2)) вводили три раза в течение 6 дней. Животных взвешивали каждый день во время обработки и каждые два дня последующего наблюдения. Эффективность обработки оценивали по влиянию исследуемого вещества на

объем опухоли. Диаметр опухолей будут измерять два раза в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли штангенциркулем, а объем опухоли оценивали по формуле: Объем\_опухоли = (длина × ширина<sup>2</sup>)/2. В конце эксперимента мышей подвергли эвтаназии; опухоли замораживали для последующего анализа.

Диссоциация опухоли и анализ проточной цитометрии.

Опухоли ЕМТ6 собирали через 24 часа после последней обработки, затем опухоли мелко измельчали и смешивали с октодиссоциатором GentleMACS (MilteNY Biotec) с использованием набора для диссоциации опухолей мышей (MilteNY Biotec, 130-096-730) в соответствии с инструкциями производителя. Диссоциированные опухолевые клетки промывали средой DMEM, а эритроциты лизировали раствором для лизиса эритроцитов (MilteNY Biotec, 130-094-183). Затем лейкоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), обогащали с использованием микрогранул CD45 (MilteNY Biotec, 130-110-618) и сепаратора MultiMACS Cell24 Separator plus (MilteNY Biotec). Клетки подсчитывали на каждой стадии, чтобы определить % TIL.

Клетки CD45<sup>+</sup> ресуспендировали в PBS и окрашивали панелью антител (краситель Viobility, CD3-APC, CD8a-PE-Vio770, CD4-APC-Vio770 и CD49b-VioBright515, MilteNY Biotec) или соответствующими изотипами в течение 30 минут при 4°C в PBS/BSA 0,5%. Компенсации проводили с использованием моноокрашивания и изотипов. Затем клетки промывали, ресуспендировали в рабочем буфере MACS и анализировали с использованием MACSQUANT8 (MilteNY Biotec), данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowlogic, наконец, статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04).

Результаты

Для дальнейшего изучения иммуноопосредованных эффектов ОХ425 авторы оценили эффективность ОХ425 в ксенотрансплантатах сингенной опухоли молочной железы ЕМТ6. Ксенотрансплантаты, полученные из клеток ЕМТ6, обрабатывали носителем или ОХ425 в различных дозах (25 и 100 мг/кг - три введения в день 0, 3 и 5), а опухолевую ткань собирали на 6 день после последней обработки. Чтобы подтвердить влияние ОХ425 на противоопухолевый иммунный ответ, они проанализировали иммунные компоненты микроокружения опухоли. Проточно-цитометрический анализ лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL; клетки CD45<sup>+</sup>), показал, что ОХ425 значительно повышал общее количество TIL уже через 6 дней после начала обработки, что измеряли с помощью окрашивания CD45 (фиг. 13А). Пропорции Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) среди клеток CD45<sup>+</sup> значительно увеличивались в ответ на обработку ОХ425 (фиг. 13В). ОХ425 не только индуцировал увеличение инфильтрации опухоли Т-клетками, но также

вызывал уменьшение количества Т-регуляторных клеток (CD3-, CD4+, CD49b+) (фиг. 13С). Все эти эффекты наблюдались даже при низкой дозе 25 мг/кг.

В совокупности эти результаты демонстрируют эффективную активацию путей PAMP и STING, индуцированную OX425, в опухолях, что увеличивает рекрутирование врожденных и адаптивных иммунных клеток и усиливает продуктивный противоопухолевый иммунный ответ.

Пример 16. Иммунотерапевтическая активность OX425 против резистентного к PD-1 рака молочной железы HR+HER2

Материалы и методы

Животная модель

Мыши

Использовали мышей C57BL/6 в возрасте 6-15 недель. Мышей содержали в стандартных условиях содержания без специфических патогенов (SPF) ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажность  $50 \pm 5\%$ , 12-12-часовые циклы света/темноты, еда и вода без ограничения), если не указано иное в плане исследования. Эксперименты на животных проводились в соответствии с рекомендациями Федерации Европейской ассоциации лабораторных животных (FELASA), Директивой ЕС 63/2010 (протокол 2012\_034A) и были одобрены институциональными этическими комитетами для экспериментов на животных в Gustave Roussy (№. 2016031417225217), Centre de Recherche des Cordeliers (№. 2016041518388910) и в Медицинском колледже Вейла Корнелла (№. 2017-0007 и 2018-0002). WT C57BL/6 были получены от Taconic Farms. Во всех экспериментах мышей регулярно контролировали на предмет роста опухоли и подвергали эвтаназии, когда поверхность опухоли достигала  $200\text{-}250\text{ мм}^2$  (этическая конечная точка) или при наличии явных признаков дистресса (например, сгорбленности, анорексии, изъязвления опухоли).

Онкогенез

Гранулы MPA с медленным высвобождением (90 дней) по 50 мг (#NP-161, Innovative Research of America) имплантировали подкожно хирургическим путем 6–9-недельным самкам мышей (день 0). Мышам вводили 200 мкл раствора 7,12-диметилбенз[а]антрацена (DMBA; #D3254, от Millipore Sigma) в кукурузном масле (#C8267, Millipore Sigma) перорально один раз в неделю через зонд в недели 1, 2, 3, 5, 6 и 7 после имплантации гранулы MPA.

Обработка

OX425 (0,1 мг или 0,5 мг – что эквивалентно 5 или 25 мг/кг/в.б.) вводили один раз (1 раз) или два раза (2 раза) в неделю. Животных взвешивали каждый день во время обработки и каждые два дня последующего наблюдения. Эффективность обработки

оценивали по влиянию исследуемого вещества на объем опухоли. Диаметр опухолей будут измерять два раза в неделю. Длину и ширину опухоли измеряли штангенциркулем, а объем опухоли оценивали по формуле: Объем\_опухоли = (длина × ширина<sup>2</sup>)/2. В конце эксперимента мышей подвергли эвтаназии; опухоли замораживали для последующего анализа.

### Результаты

Рак молочной железы с рецептором гормона (HR)<sup>+</sup> — это холодная опухоль, которая плохо реагирует на блокаторы иммунных контрольных точек, нацеленные на PD-1, что требует разработки терапевтических стратегий, которые воспаляют микроокружение опухоли HR<sup>+</sup> для восстановления чувствительности к PD-1. Была разработана уникальная эндогенная мышьячная модель, которая воспроизводит ключевые иммунобиологические особенности рака молочной железы человека HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup>, на основе подкожного введения гранул медроксипрогестерона ацетата (МРА) с медленным высвобождением в комбинации с 7,12-диметилбенз[а]антраценом (DMBA) через зонд, чтобы исследовать терапевтическую эффективность OX425, вводимого внутривнутрибрюшинно один или два раза в неделю в дозе 5 или 25 мг/кг, необязательно в комбинации с ингибитором PD-1 мыши (вводимого внутривнутрибрюшинно в 2 дозах по 200 мкг/мышь с интервалом в 3 дня друг относительно друга). Рост опухоли, оценки шкалы RECIST, адаптированные к мышам, выживаемость без прогрессирования, общая выживаемость и другие клинически значимые параметры контролировались до этической конечной точки.

Как показано на фиг. 14 и в следующей таблице, OX425 при самой высокой схеме дозирования (25 мг/кг два раза в неделю) был связан с потерей веса у обработанных мышей (независимо от блокады PD-1) и преждевременной смертностью у 10% мышей, вызывая снижение дозы до 5 мг/кг два раза в неделю. При всех других схемах введения OX425 хорошо переносился, эффективно контролировал рост опухоли и увеличивал общую выживаемость у мышей с карциномами, вызванными МРА/DMBA (которые по своей природе устойчивы к PD-1, подобно HR<sup>+</sup> раку молочной железы у женщин). Блокирование PD-1 увеличивало терапевтическую активность OX425 при введении два раза в неделю в дозе 5 мг/кг, поскольку оно ингибировало развитие вторичных опухолей. В совокупности эти результаты показали, что OX425 в дозах <25 мг/кг два раза в неделю хорошо переносится мышами и опосредует иммунотерапевтическую активность одного агента на моделях PD-1-резистентного рака молочной железы HR<sup>+</sup>HER2<sup>-</sup> с потенциалом синергизма с PD-1.

Обработка	Медианное выживание (дни)	Vs контроля
контроль	10,5	
aPD-1	17	Ns: 0,1280

OX-425 100 мкг 2x/w + aPD-1	36	<0,0001
OX-425 500 мкг 1x/w + aPD-1	44	<0,0001
OX-425 100 мкг 2x/w	20	<0,0001
OX-425 500 мкг 1x/w	35	0,0033
OX-425 100 мкг 1x/w	38	<0,0001
OX-425 100 мкг 1x/w+ aPD-1	40,5	<0,0001

Пример 17. OX425 демонстрирует более высокую противоопухолевую эффективность по сравнению с OX401.

#### Материалы и методы

##### Клеточная культура

В качестве клеточных моделей использовали клеточные линии рака молочной железы MDA-MB-231, BT549 и HCC38 от ATCC. Клетки выращивали согласно инструкциям поставщика в полной среде с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и поддерживали во влажной атмосфере при 37°C и 0% CO<sub>2</sub>.

##### Обработка лекарственным средством и измерение клеточной выживаемости

Клетки высевали в 96-луночные планшеты ( $2 \cdot 10^3$  клеток/лунку) и инкубировали 24 часа при 37°C перед добавлением возрастающих концентраций лекарственного средства в течение 6 дней. После воздействия лекарственного средства выживаемость клеток измеряли с использованием анализа ХТТ (Thermo, кат.#: X12223). Вкратце, раствор ХТТ добавляли непосредственно в каждую лунку, содержащую культуру клеток, и клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C перед считыванием оптической плотности при 485 нм с помощью микропланшетного ридера (VICTOR Nivo Plate Reader, Perkinelmer). Выживаемость клеток рассчитывали как соотношение живых обработанных клеток к живым ложнообработанным клеткам. IC<sub>50</sub> (которая представляет собой дозу, при которой 50% клеток являются жизнеспособными) рассчитывали с помощью модели нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.04) путем построения графика процентной жизнеспособности в зависимости от Log концентрации лекарственного средства на каждой клеточной линии.

##### Результаты

Для оценки противоопухолевой эффективности OX425, клетки рака молочной железы MDA-MB-231, BT549 и HCC38 обрабатывали увеличивающимися дозами OX425 или OX401 в течение 6 дней для оценки IC<sub>50</sub> (средней ингибирующей концентрации). Интересно, что OX425 показал IC<sub>50</sub> значительно ниже, чем OX401 (фиг. 15).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или ее фармацевтически приемлемые соли, причем молекула содержит двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты из 16 или 17 пар оснований, 5'-конец первой цепи и 3'-конец комплементарной цепи, соединенные вместе петлей;

причем двухцепочечный фрагмент нуклеиновой кислоты имеет следующую последовательность



SEQ ID NO: 1 и 2

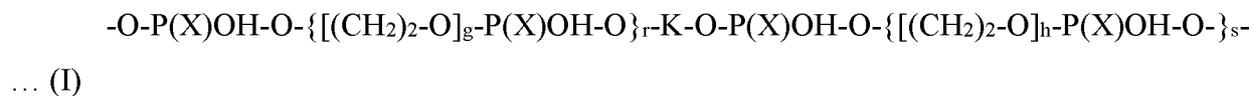
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям,

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды,

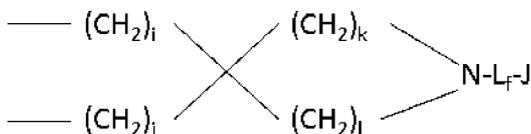
петля представляет собой



где r и s независимо представляют собой целое число 0 или 1; g и h независимо представляют собой целое число от 1 до 7, а сумма g+h составляет от 4 до 7;

X представляет собой O или S в каждом случае -O-P(X)OH-O-;

где K представляет собой



или -CH<sub>2</sub>-CH(L<sub>f</sub>-J)-

где i, j, k и l независимо представляют собой целое число от 0 до 6, предпочтительно от 1 до 3, L представляет собой линкер, f представляет собой целое число, равное 0 или 1, и J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой H;

или



где b и c независимо представляют собой целое число от 0 до 4, а сумма b+c составляет от 3 до 7;

d и e независимо представляют собой целое число от 1 до 3, предпочтительно от 1 до 2; и

где R представляет собой  $-L_f-J$ ,

X представляет собой O или S в каждом случае  $-O-P(X)OH-O-$ , L представляет собой линкер, и f представляет собой целое число, равное 0 или 1, и J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, или представляет собой H; и

где молекула содержит 1) по меньшей мере один N, который представляет собой U, и/или 2) по меньшей мере один присутствующий idN, и/или 3) петля представляет собой

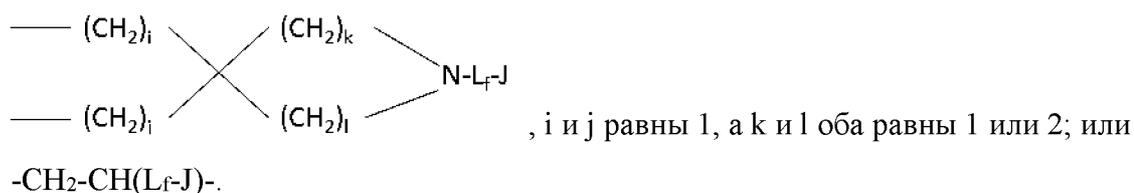
$-O-P(X)OH-O-\{[(CH_2)_2-O]_g-P(X)OH-O\}_r-K-O-P(X)OH-O-\{[(CH_2)_2-O]_h-P(X)OH-O\}_s-$   
(I), и K представляет собой  $-CH_2-CH(L_f-J)-$ .

2. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что J представляет собой молекулу, облегчающую эндоцитоз, и молекула, способствующая эндоцитозу, выбрана из группы, состоящей из холестерина, одно- или двухцепочечных жирных кислот, лиганда, который нацелен на клеточный рецептор, давая возможность рецептор-опосредованному эндоцитозу, или трансферрина, предпочтительно холестерина.

3. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-2, отличающаяся тем, что петля представляет собой

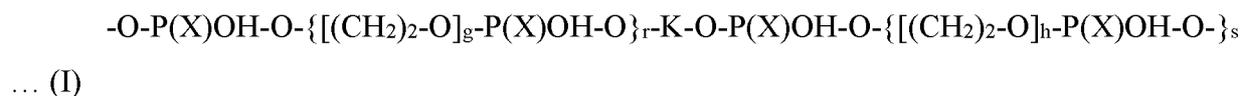
$-O-P(X)OH-O-\{[(CH_2)_2-O]_g-P(X)OH-O\}_r-K-O-P(X)OH-O-\{[(CH_2)_2-O]_h-P(X)OH-O\}_s-$   
(I) и r равно 1, s равно 0 и g представляет собой целое число от 5 до 7, предпочтительно 6.

4. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что K представляет собой



5. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что f равно 1, и L-J выбран из группы, состоящей из  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-C(O)-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-C(O)-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-C(O)-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_m-NH-C(O)-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_p-C(O)-J$  и или  $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_n-(CH_2)_m-NH-(CH_2)_p-C(O)-J$ , где m представляет собой целое число от 0 до 10, предпочтительно целое число от 4 до 6, более предпочтительно 5; n представляет собой целое число от 0 до 15; и p представляет собой целое число от 0 до 3.

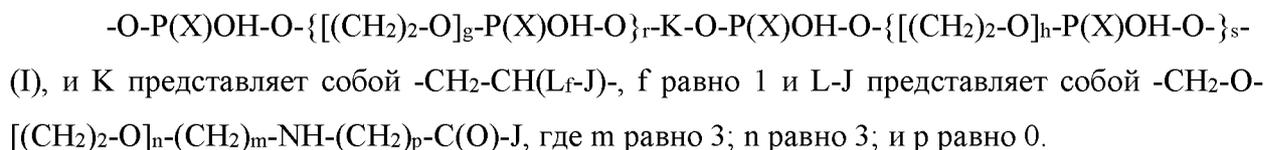
6. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что петля имеет формулу (I)



где X представляет собой S в каждом случае  $-O-P(X)OH-O-$ , r равно 1, g равно 6, s равно 0, i и j равно 1, а k и l равно 2,

где f равно 1, и L-J представляет собой  $C(O)-(CH_2)_5-NH-[(CH_2)_2-O]_3-(CH_2)_2-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-C(O)-[(CH_2)_2-O]_3-(CH_2)_3-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-C(O)-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_5-CH_2-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-C(O)-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_9-CH_2-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-C(O)-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_{13}-CH_2-C(O)-J$ ,  $-C(O)-(CH_2)_5-NH-C(O)-J$  или  $-CH_2-O-[(CH_2)_2-O]_6-(CH_2)_3-NH-CH_2-C(O)-J$ .

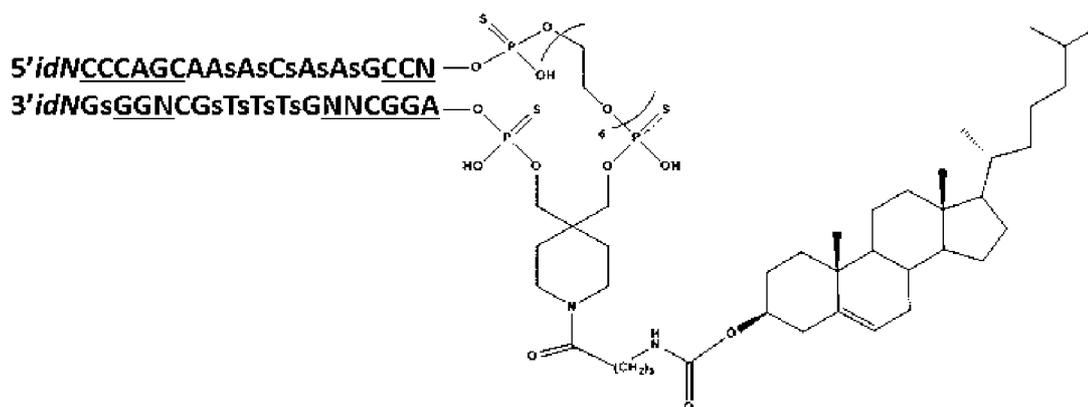
7. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, отличающаяся тем, что петля представляет собой



8. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что 2'-модифицированные нуклеотиды независимо выбраны из группы, состоящей из 2'-дезоксидезокси-2'-фтора, 2'-О-метила (2'-ОМе), 2'-О-метоксиэтила (2'-ОМОЕ), 2'-О-аминопропила (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтила (2'-О-ДМАЕ), 2'-О-диметиламинопропила (2'-О-ДМАР), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтила (2'-О-ДМАЕОЕ), модификации 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NМА), 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотида (FANA) и 2'-мостиковых нуклеотидов.

9. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 8, отличающаяся тем, что 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (FANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе).

10. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6 и 8-9, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует;

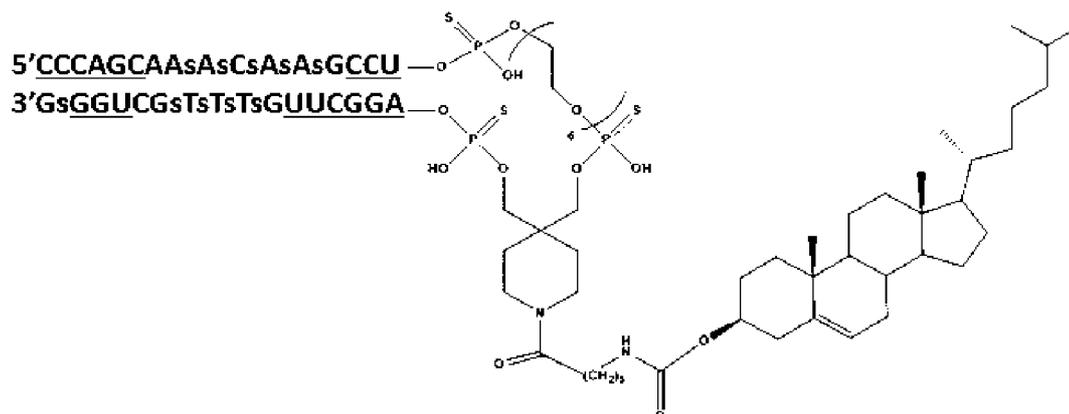
где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфотиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксидеозиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe),

где молекула имеет 1) по меньшей мере один N, который представляет собой U, и/или 2) по меньшей мере один присутствующий idN;

или их фармацевтически приемлемые соли.

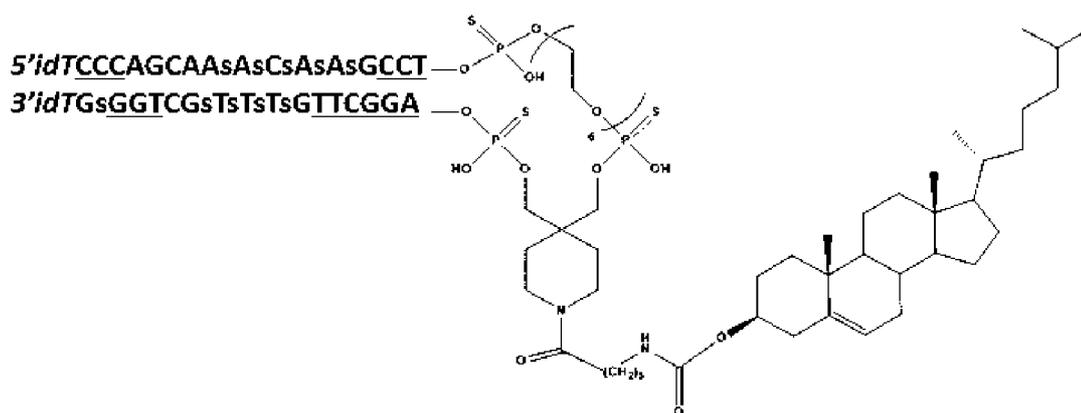
11. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 10, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 17 и 18

где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидеозиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-OMe);

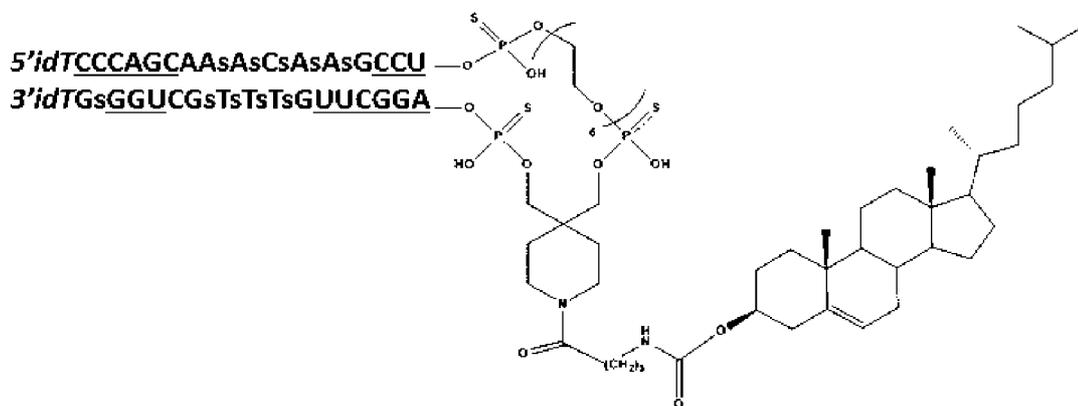
или



SEQ ID NO: 9 и 10

где idT присутствует на 5'-конце и на 3'-конце, а подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидеокси-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) и;

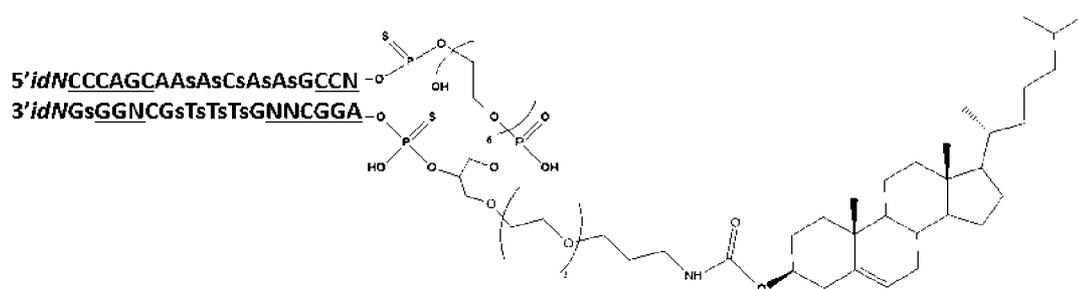
или



SEQ ID NO: 11 и 12

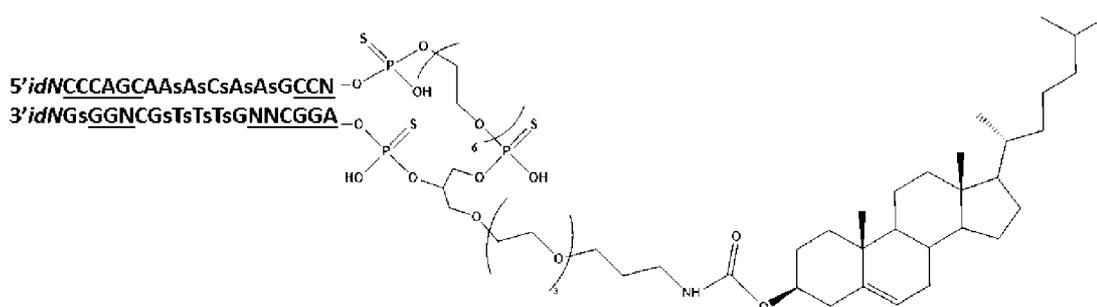
где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе), а idT присутствует на 5'-конце и на 3'-конце.

12. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5 и 7-9, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 1 и 2

или



SEQ ID NO: 1 и 2

где в каждом случае N независимо представляет собой T или U;

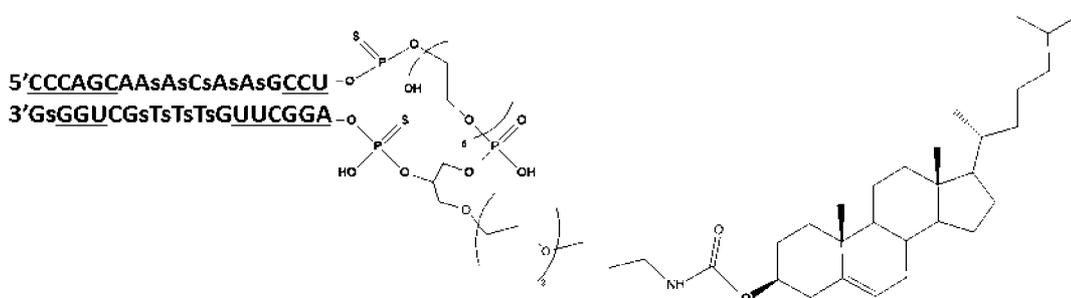
где idN представляет собой инвертированный нуклеотид и присутствует или отсутствует, когда idN присутствует, idN предпочтительно представляет собой инвертированный тимидин idT,

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и

где подчеркнутые нуклеотиды представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-дезоксид-2'-фторарабинонуклеотиды (F-ANA) или 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе),

или их фармацевтически приемлемые соли.

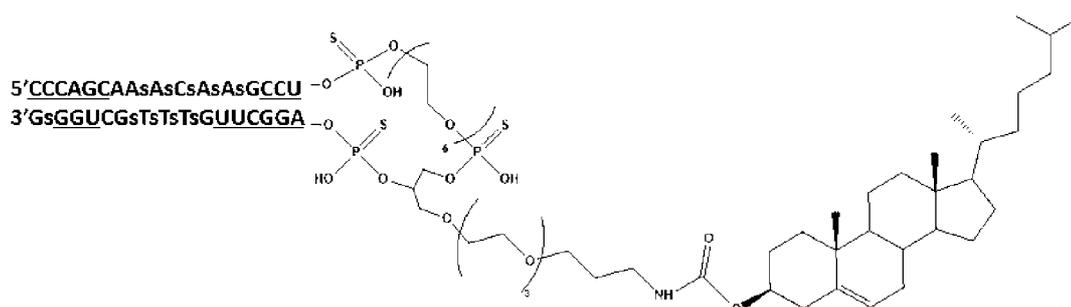
13. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по п. 12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 7 и 8

где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе);

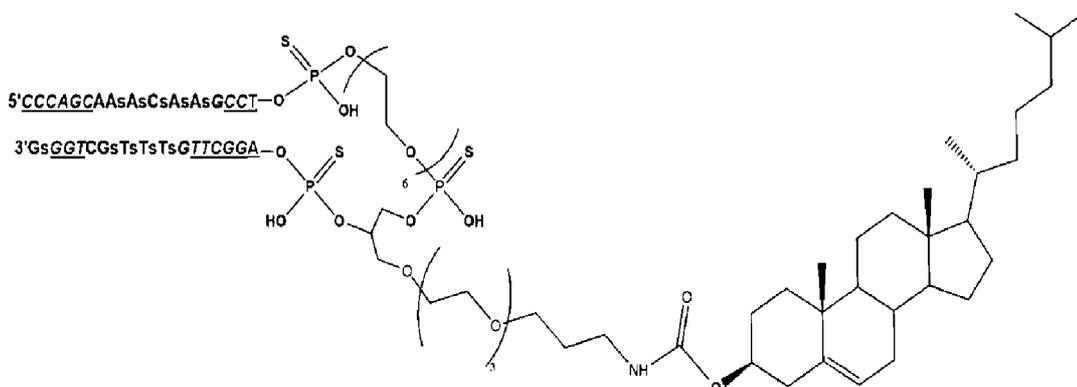
или



SEQ ID NO: 7 и 8

где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метилнуклеотиды (2'-ОМе).

14. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-5, 7-9 и 12, отличающаяся тем, что молекула нуклеиновой кислоты представляет собой:



SEQ ID NO: 19 и 20

где межнуклеотидные связи «s» относятся к фосфоротиоатным межнуклеотидным связям; и где подчеркнутые 2'-модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-дезоксидезокси-2'-фторарабинонуклеотиды (FANA).

15. Фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция, содержащая конъюгированную молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 и необязательно дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент, предпочтительно выбранный из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), противораковую иммунотерапию на основе Т-клеток, такую как адоптивный перенос клеток (АСТ), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или традиционный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент или таргетный иммунотоксин.

16. Фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция по п. 15, дополнительно содержащая ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesar), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

17. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 или фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция по любому из пп. 15-16 для применения в качестве лекарственного средства.

18. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 или фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция по любому из пп. 15-16 для применения при раке.

19. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция для применения по п. 18, отличающаяся тем, что рак выбран из лейкоза, лимфомы, саркомы, меланомы и рака головы и шеи, почек, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, легких, пищевода, молочной железы, мочевого пузыря, головного мозга, ободочной и прямой кишки, печени, эндометрия и шейки матки.

20. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты для применения по любому из пп. 17-19 в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, предпочтительно выбранным из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), противораковой иммунотерапии на основе Т-клеток, такой как адаптивный перенос клеток (ACT), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или стандартный химиотерапевтический, радиотерапевтический или антиангиогенный агент, или таргетный иммунотоксин.

21. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты для применения по п. 20, отличающаяся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesarо), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

22. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция для применения по любому из пп. 18-21, отличающаяся тем, что рак представляет собой опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации.

23. Конъюгированная молекула нуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция или ветеринарная композиция для применения по любому из пп. 18-21,

отличающаяся тем, что рак представляет собой опухоль, способную к гомологичной рекомбинации.

24. Способ лечения зрака у субъекта, включающий введение эффективного количества конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 или фармацевтической композиции или ветеринарной композиции по любому из пп. 15-16.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что рак выбрано из лейкоза, лимфомы, саркомы, меланомы и рака головы и шеи, почек, яичников, поджелудочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, легких, пищевода, молочной железы, мочевого пузыря, головного мозга, ободочной и прямой кишки, печени, эндометрия и шейки матки.

26. Способ по п. 24 или 25, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение эффективного количества дополнительного терапевтического агента, предпочтительно выбранного из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), противораковой иммунотерапии на основе Т-клеток, такой как адоптивный перенос клеток (ACT), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или стандартного химиотерапевтического, радиотерапевтического или антиангиогенного агента, или таргетного иммунотоксина.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesar), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

28- Способ по любому из пп. 24-27, отличающийся тем, что рак представляет собой опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации.

29- Способ по любому из пп. 24-27, отличающийся тем, что рак представляет собой опухоль, способную к гомологичной рекомбинации.

30. Применение конъюгированной молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14 или фармацевтической композиции или ветеринарной композиции по любому из пп. 15-16 для производства лекарственного средства для лечения рака.

31. Применение по п. 30, отличающийся тем, что зрак выбран из лейкоза, лимфомы, саркомы, меланомы и рака головы и шеи, почек, яичников, поджелудочной

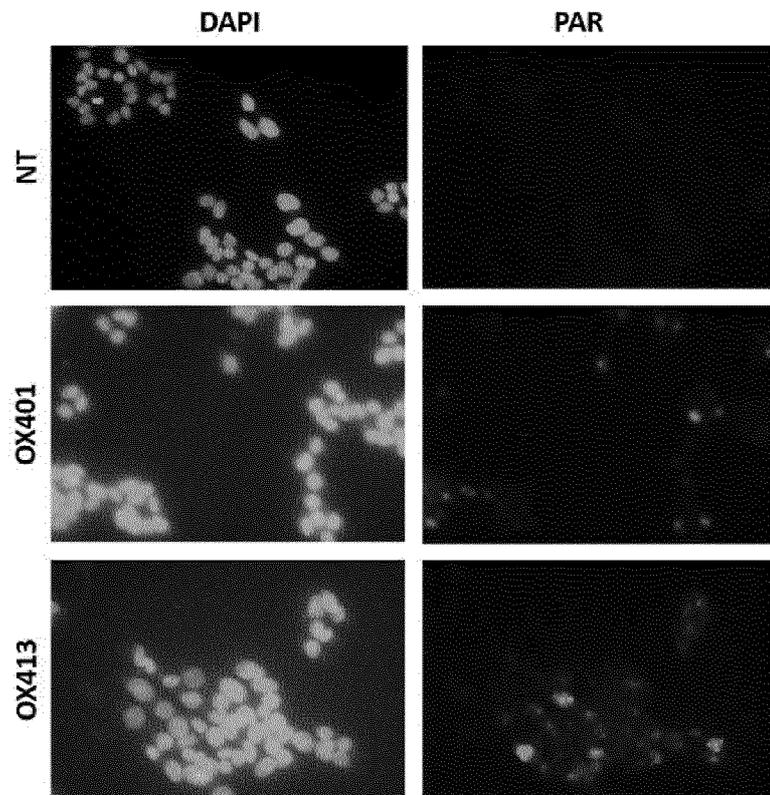
железы, предстательной железы, щитовидной железы, легких, пищевода, молочной железы, мочевого пузыря, головного мозга, ободочной и прямой кишки, печени, эндометрия и шейки матки.

32. Применение по любому из пп. 30-31 для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, предпочтительно выбранным из иммуномодулятора, такого как ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), противораковой иммунотерапии на основе Т-клеток, такой как адоптивный клеточный перенос (АСТ), генетически модифицированные Т-клетки или сконструированные Т-клетки, такие как клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетки), или стандартного химиотерапевтического, радиотерапевтического или антиангиогенного агента, или таргетного иммунотоксина.

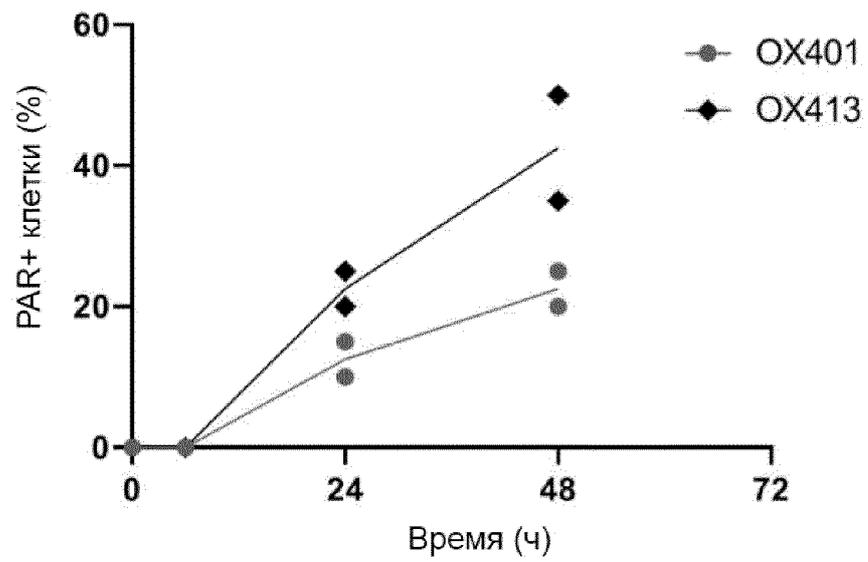
33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки (ICI), предпочтительно ингибитор пути PD-1/PD-L1, более предпочтительно анти-PD-1 антитело, такое как PDR001 (Novartis), ниволумаб (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (Merck & Co), пидилизумаб (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesaro), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte), AMP-224 (Amplimmune), IBI308 (Innovent и Eli Lilly), JS001, JTX-4014 (Jounce Therapeutics), PDR001 (Novartis) или MGA012 (Incyte и MacroGenics).

34. Применение по любому из пп. 30-33, отличающееся тем, что рак представляет собой опухоль с дефицитом гомологичной рекомбинации.

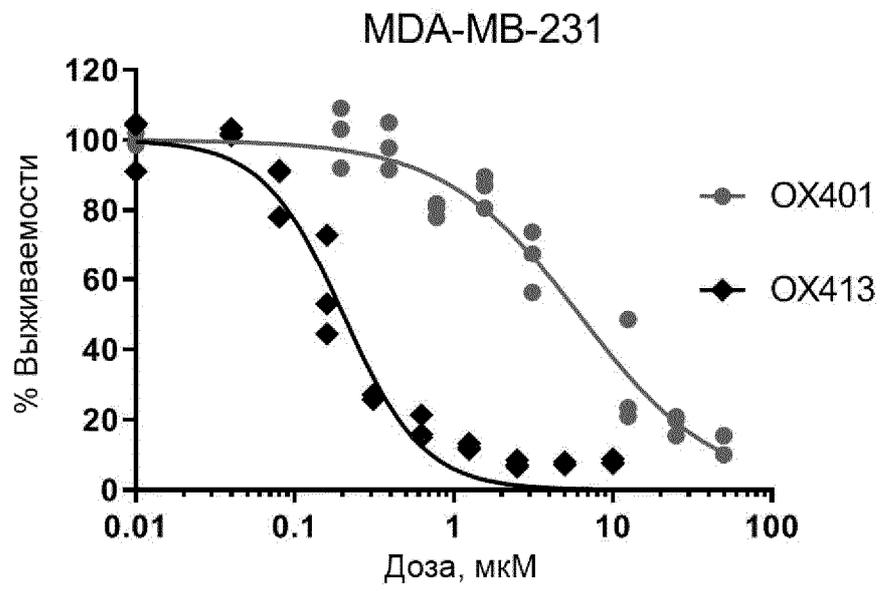
35. Применение по любому из пп. 30-33, отличающееся тем, что рак представляет собой опухоль, способную к гомологичной рекомбинации.



Фиг. 1А

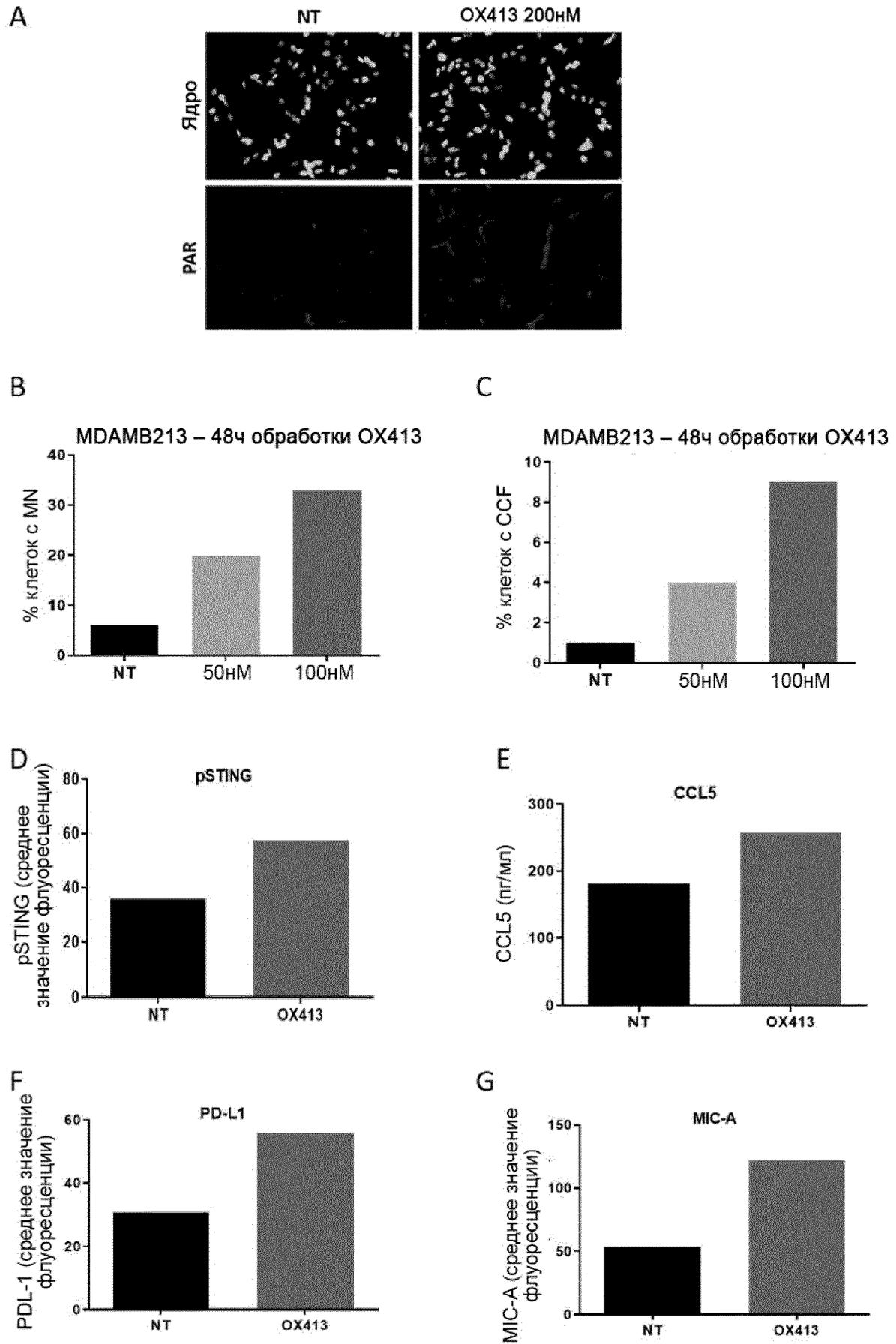


Фиг. 1В

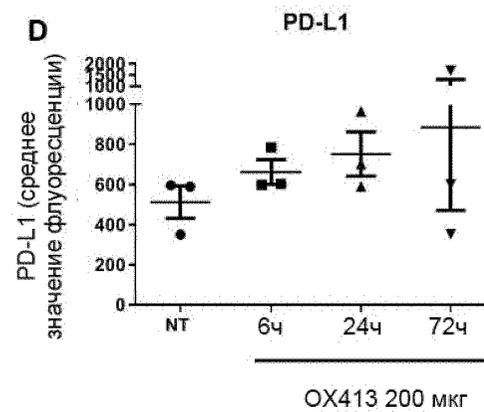
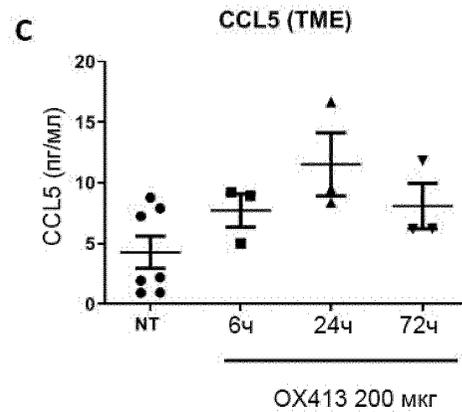
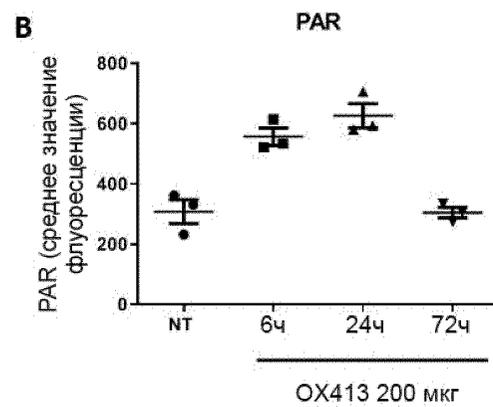
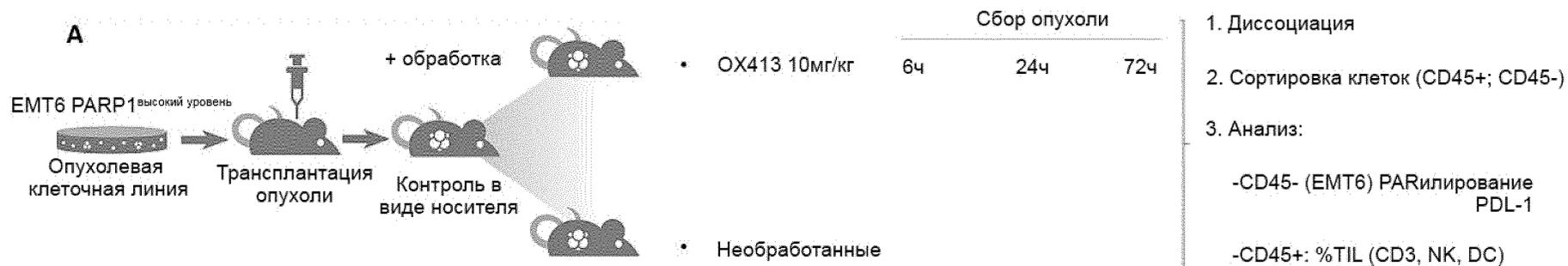


	OX401	OX413
IC50	6.140	0.2019

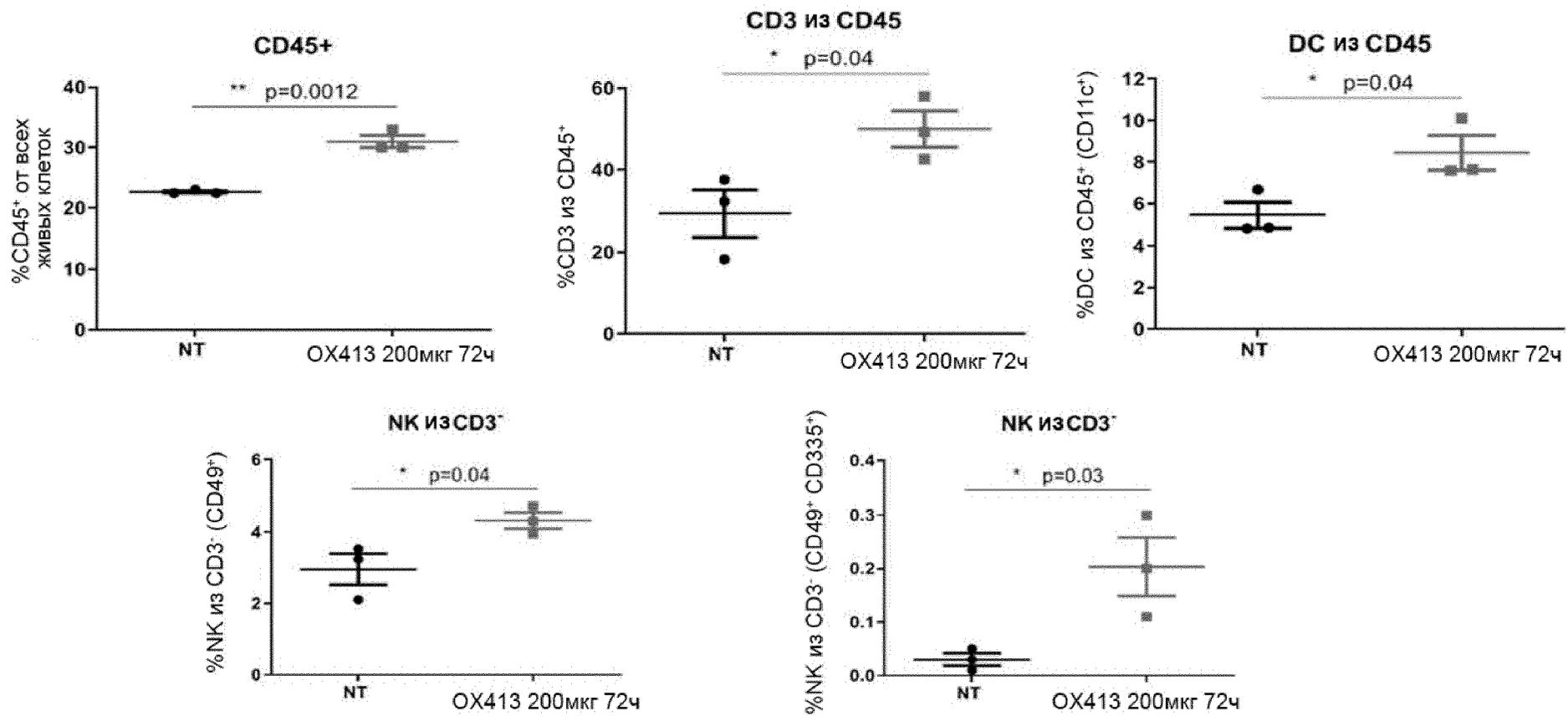
Фиг. 2

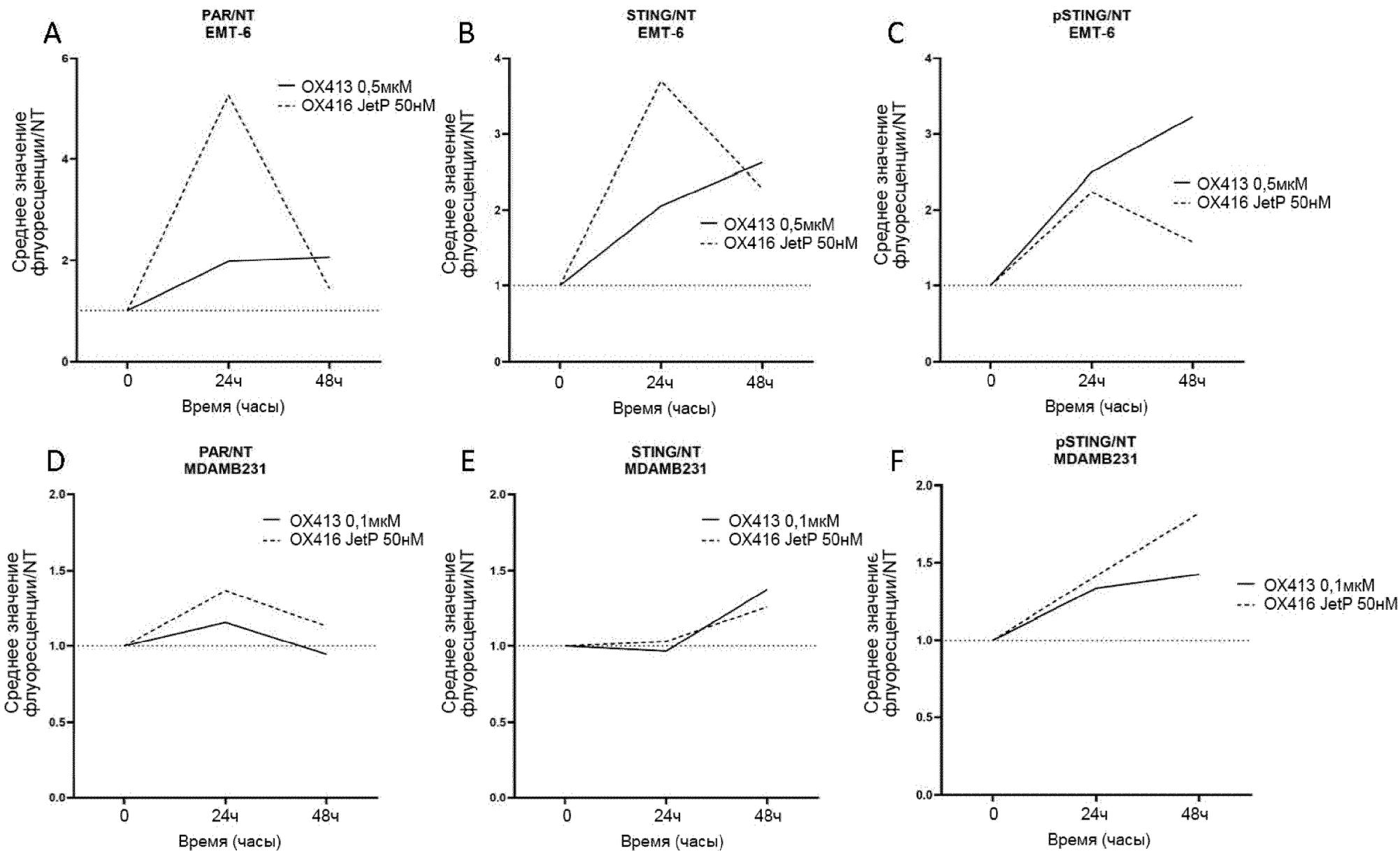


ФИГ. 3

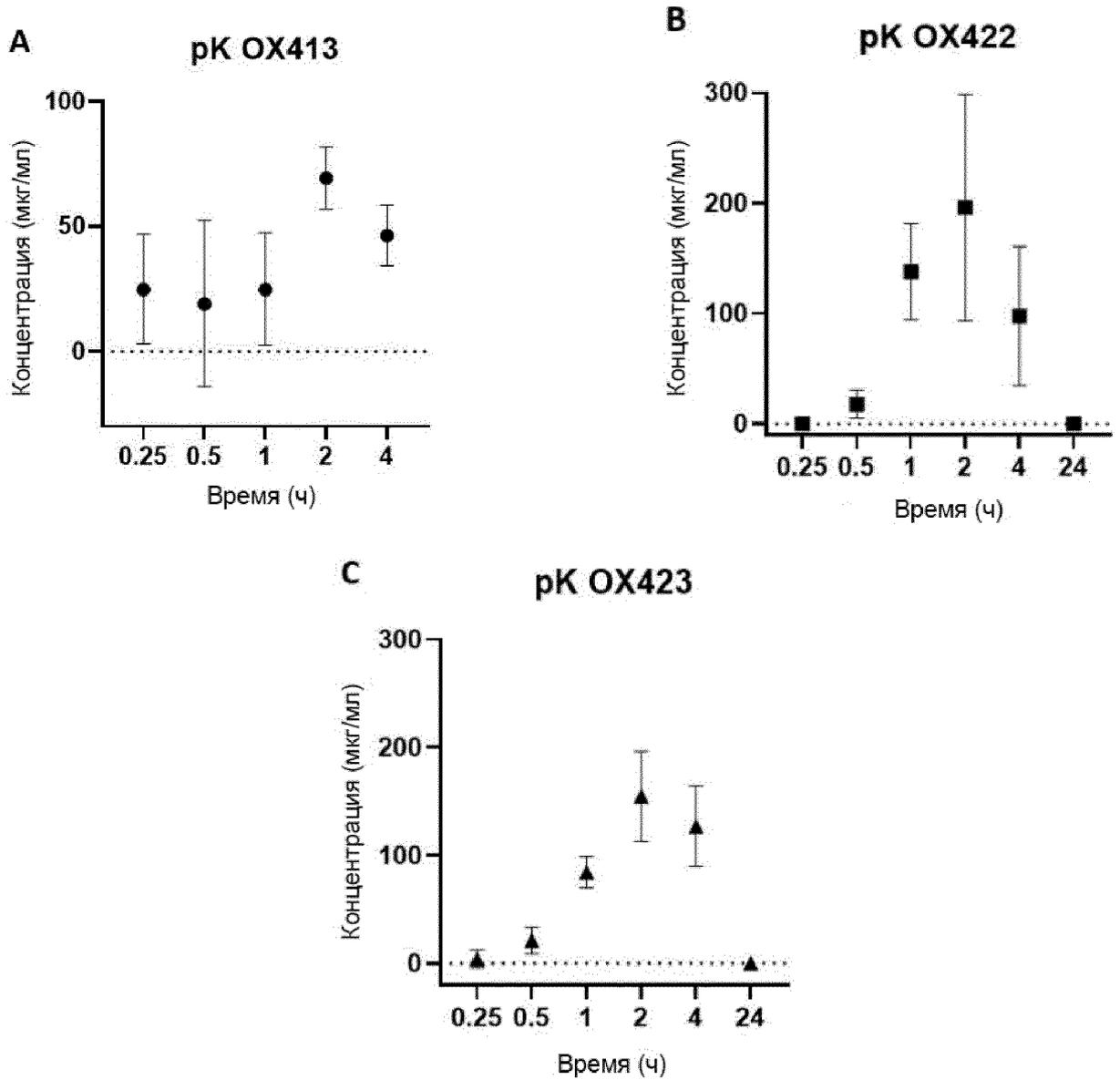


Фиг. 4

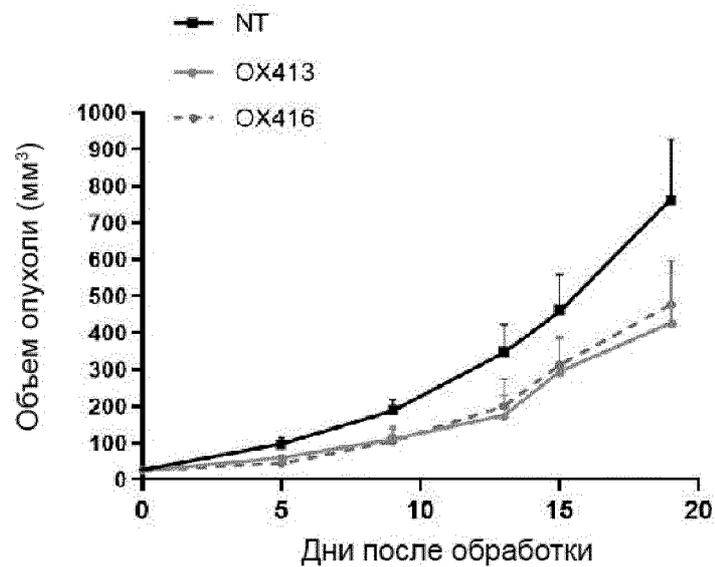
**E****Фиг. 4** (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



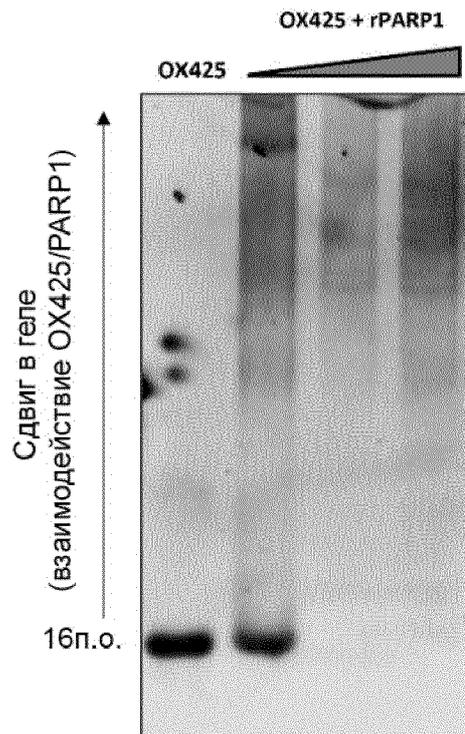
Фиг. 5



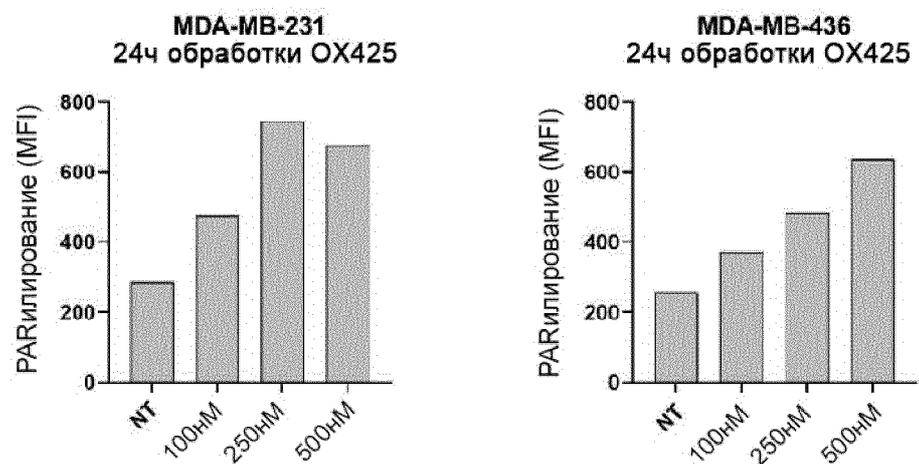
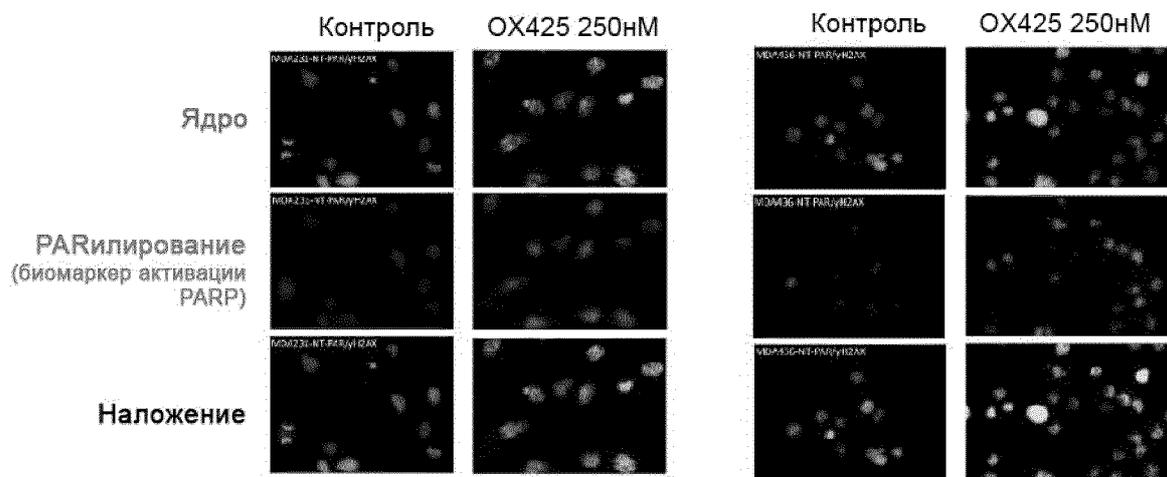
Фиг. 6



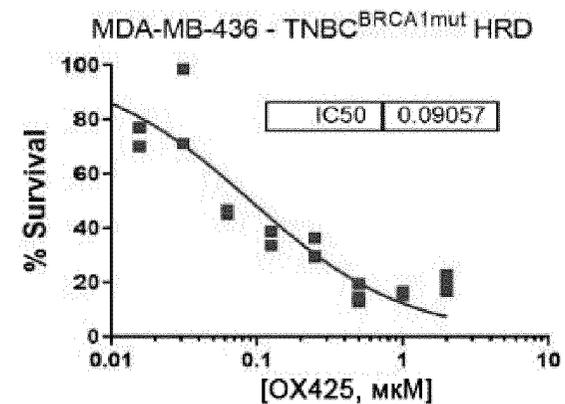
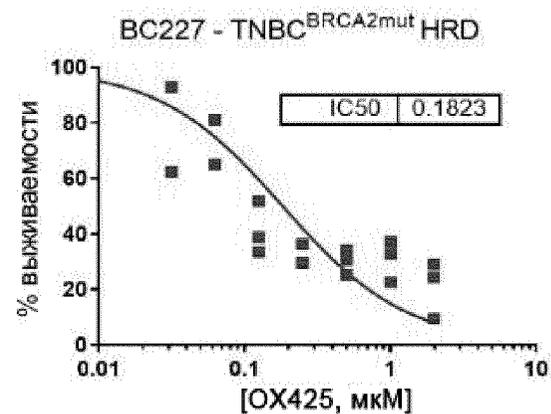
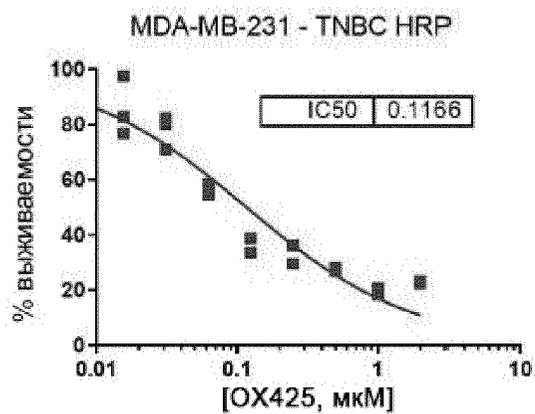
Фиг. 7



Фиг. 8А

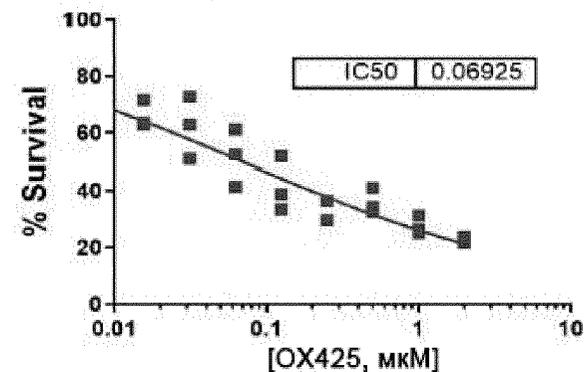
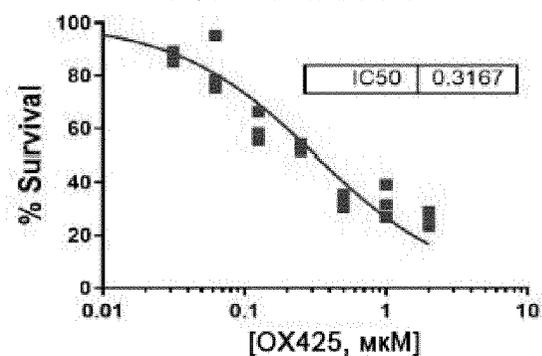
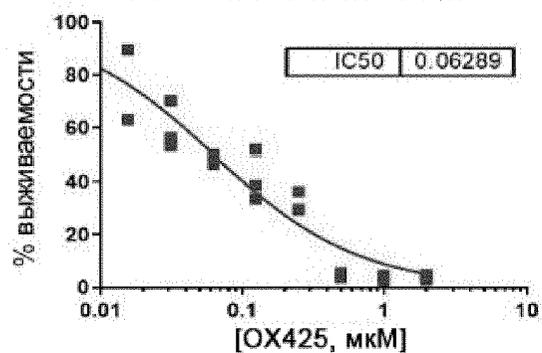


Фиг. 8В

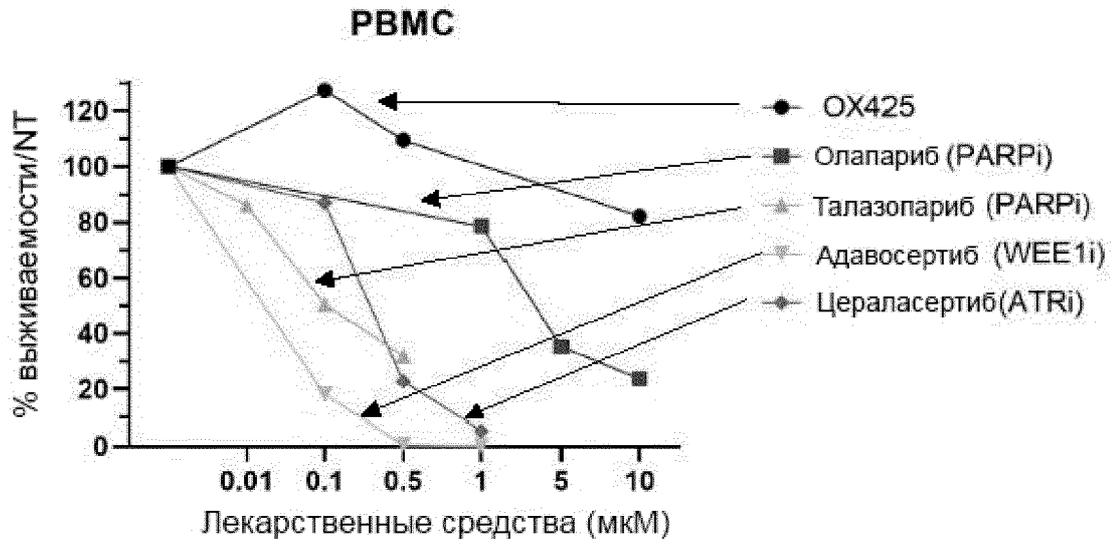


22RV1 предстательная железа BRCA2mut PC-3 – рак предстательной железы

OVCAR-3 рак яичников HRD

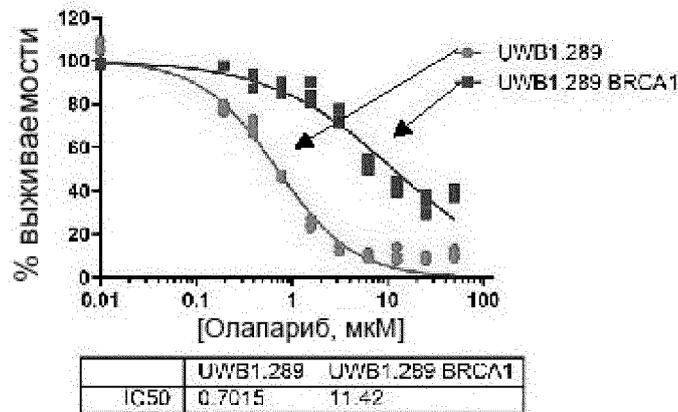


Фиг. 9А

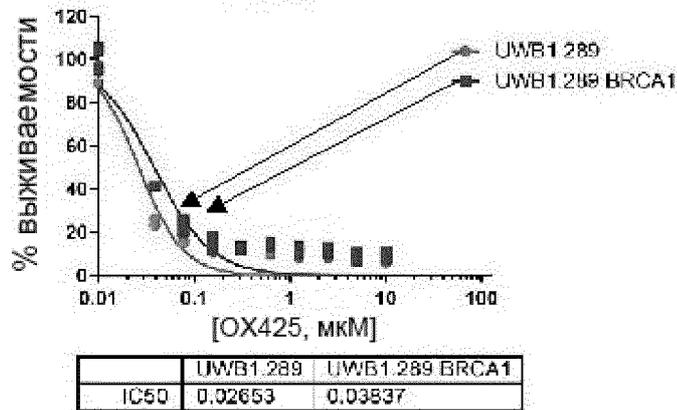


Фиг. 9В

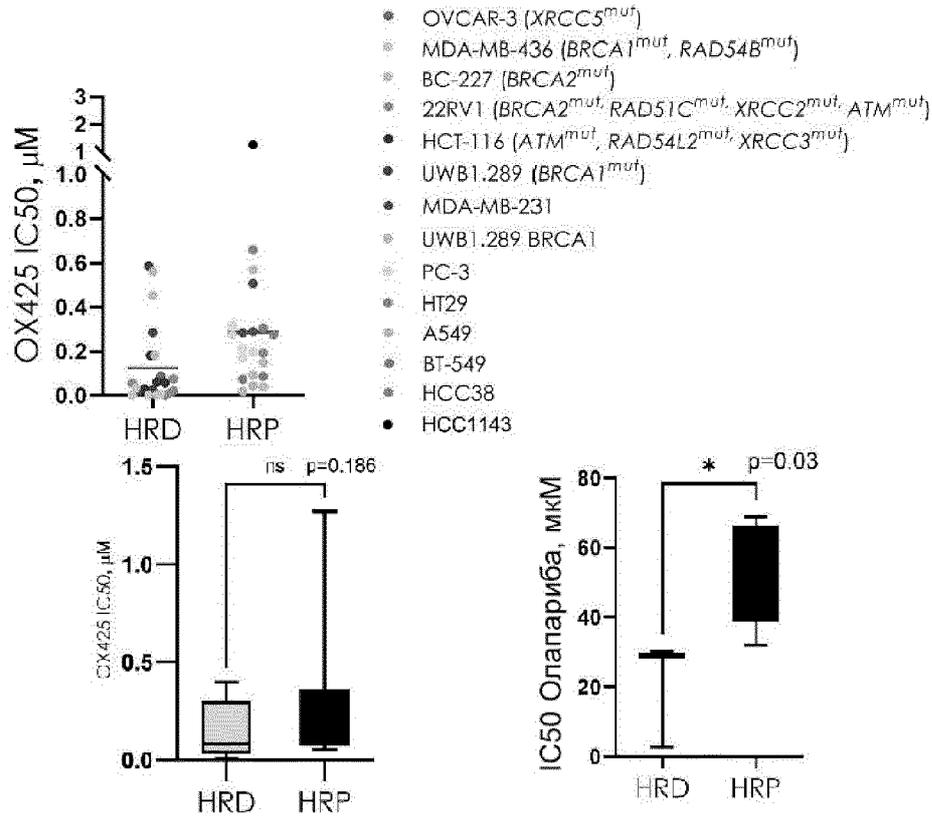
**Олапариб**



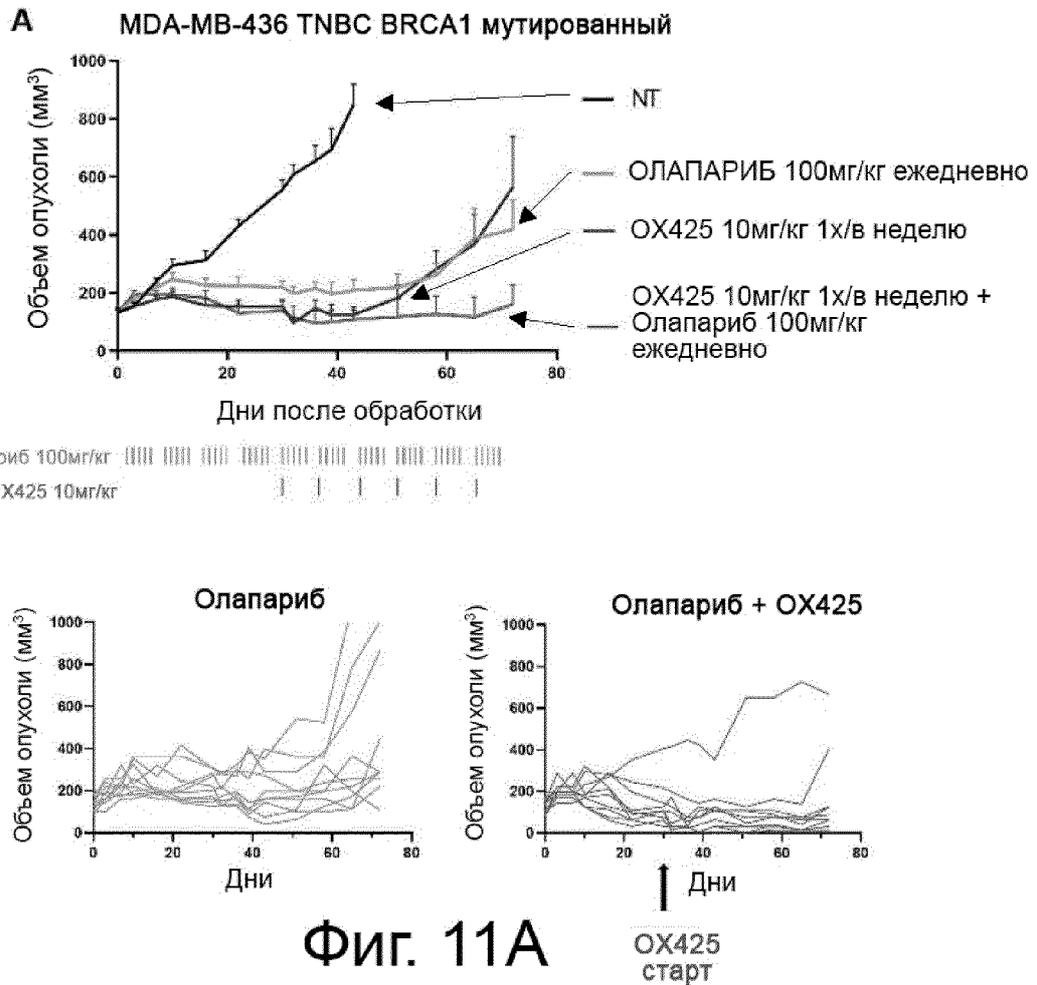
**OX425**



Фиг. 10А

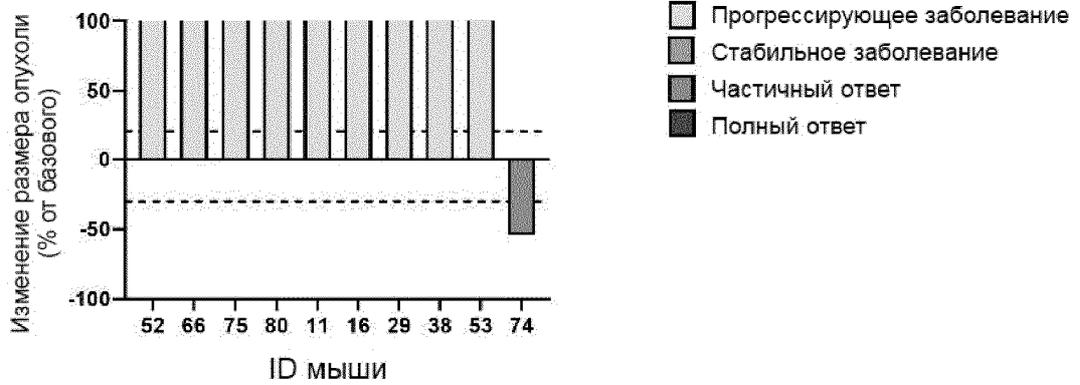


Фиг. 10В

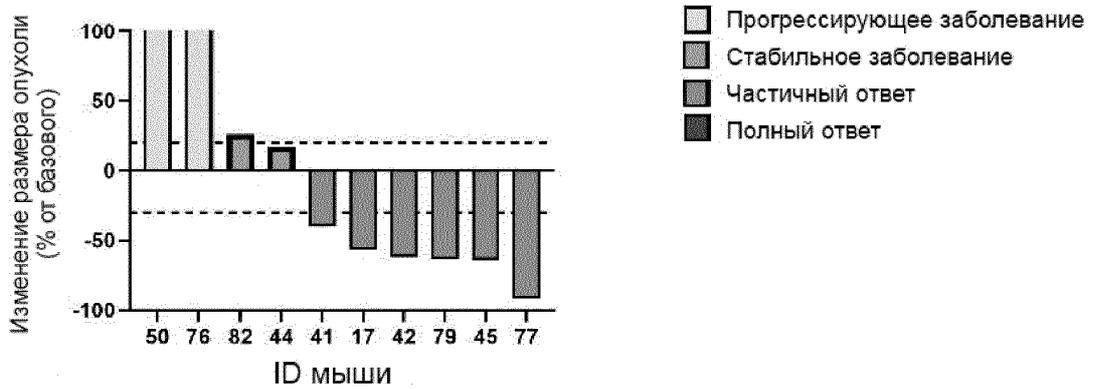


Фиг. 11А

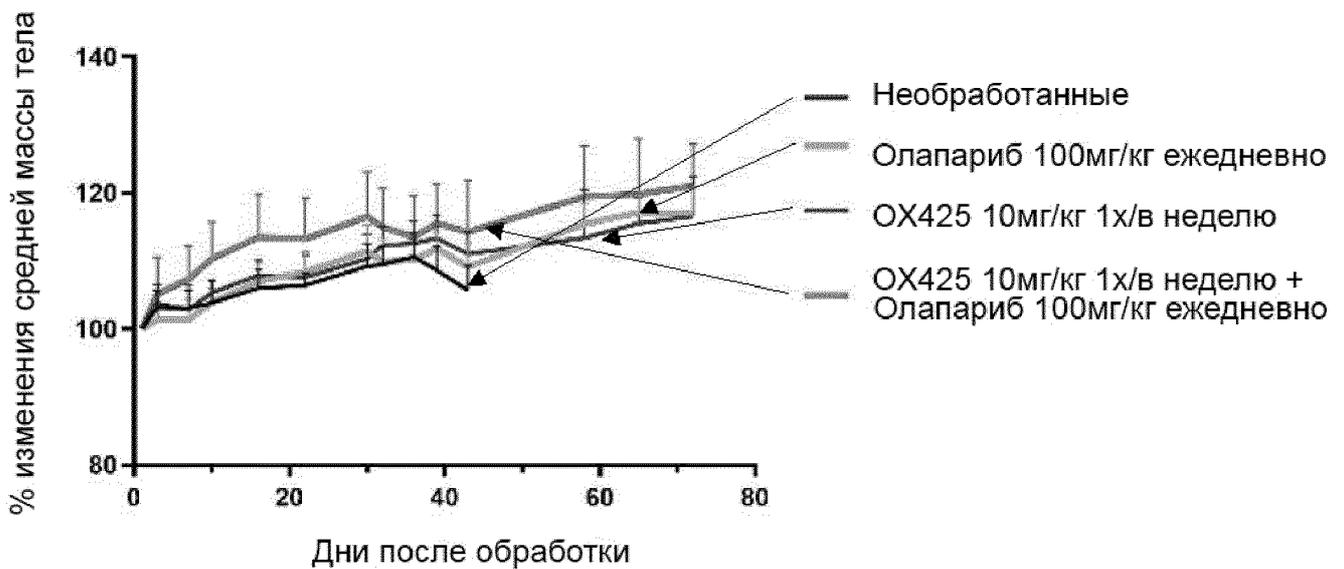
Олапариб



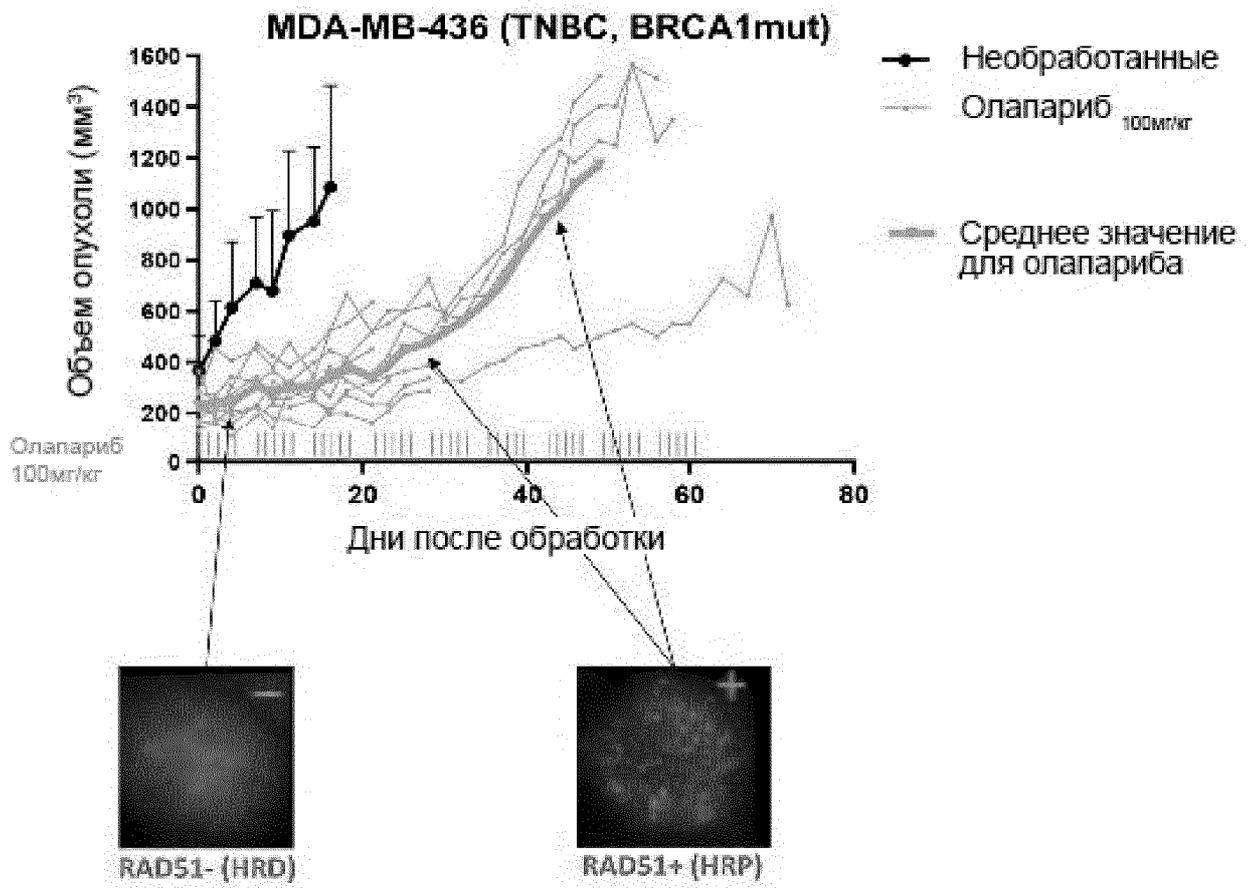
Олапариб + ОХ425



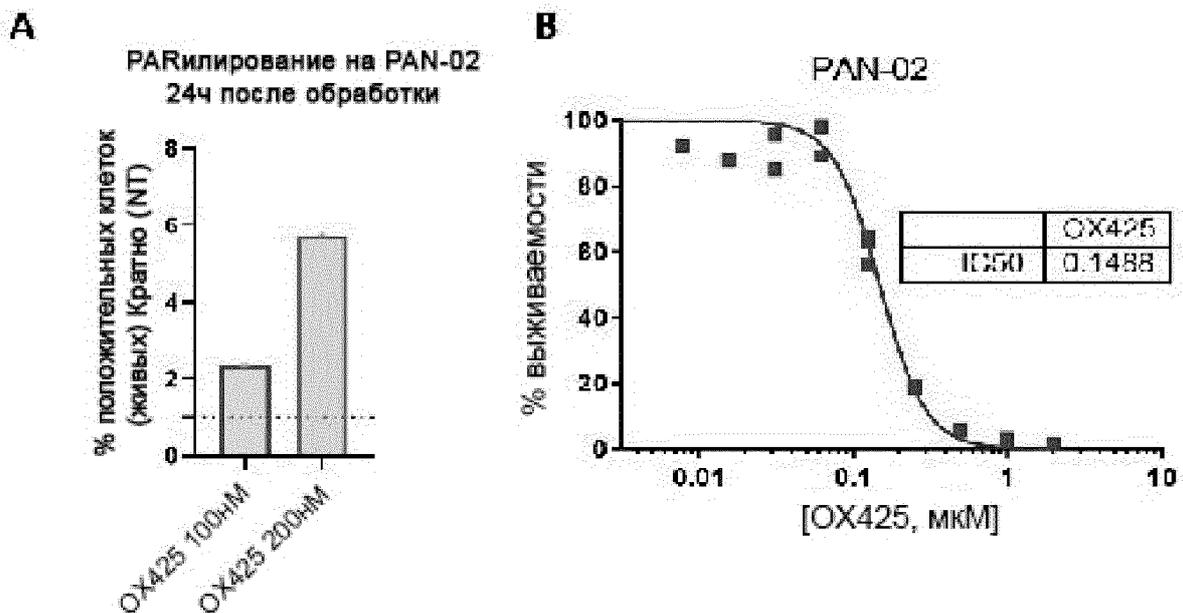
Фиг. 11В



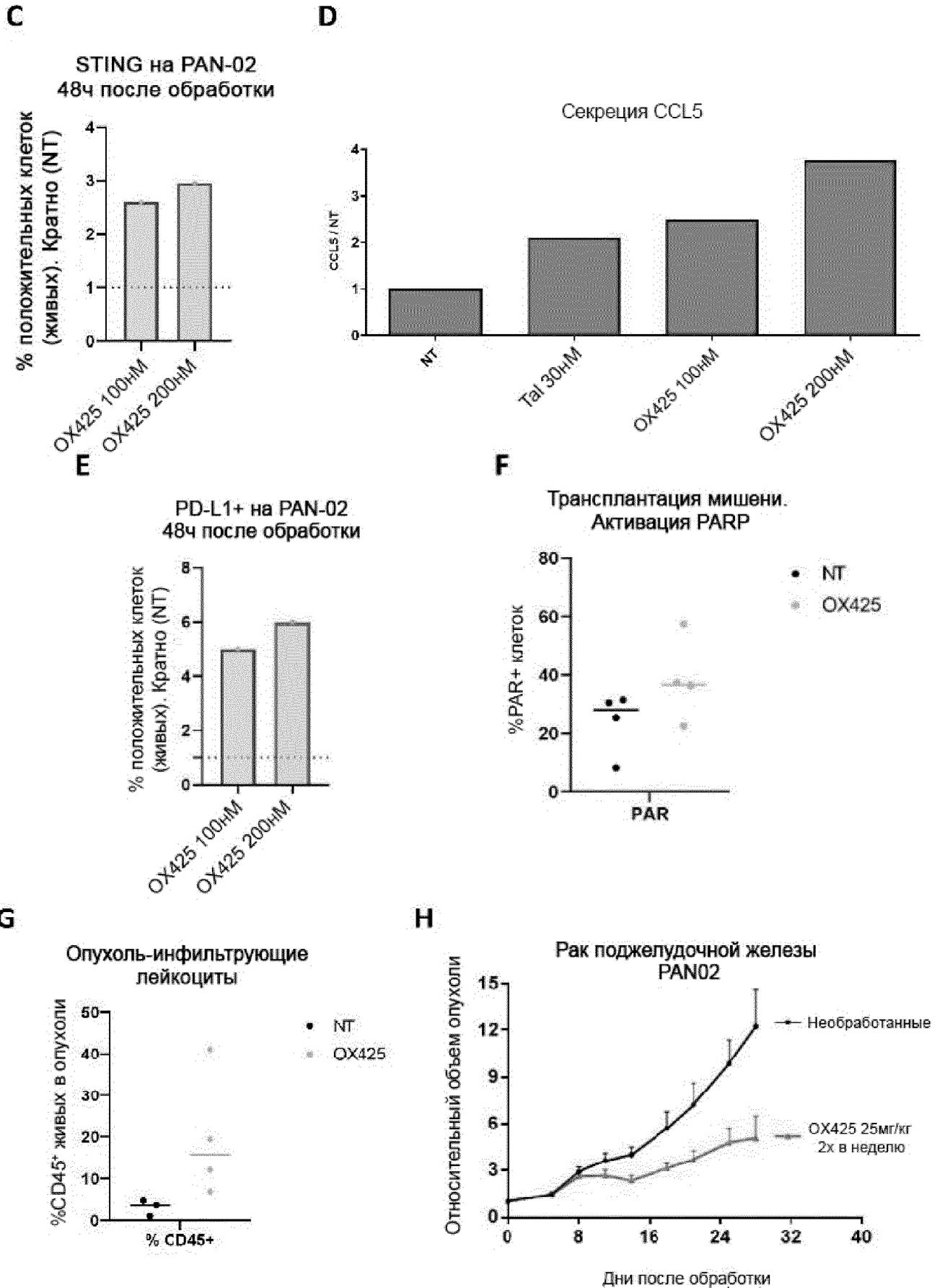
Фиг. 11С



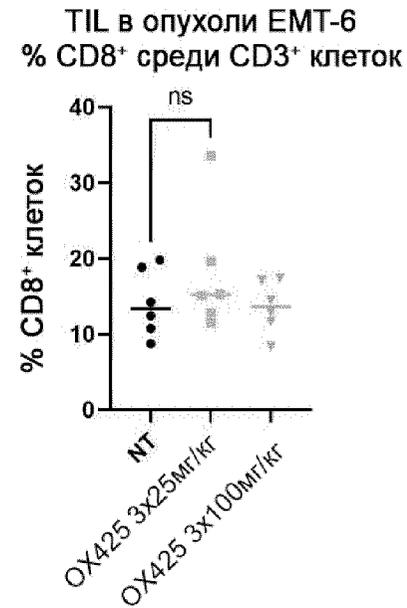
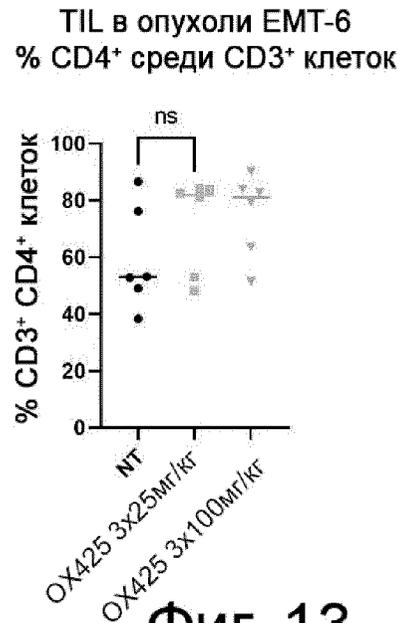
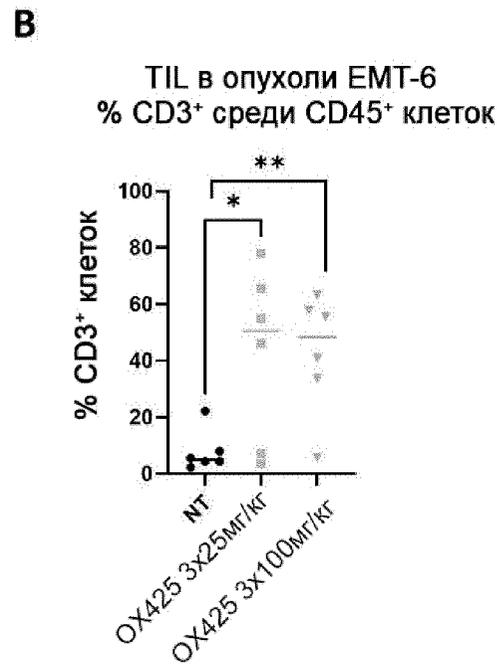
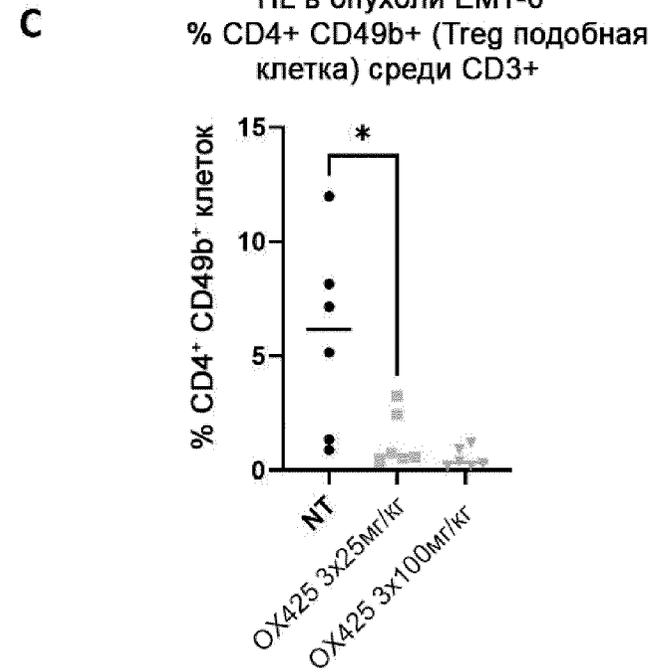
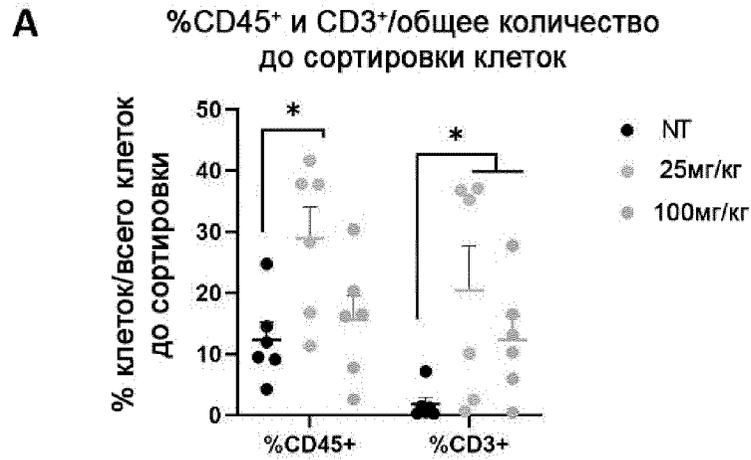
Фиг. 11D



Фиг. 12

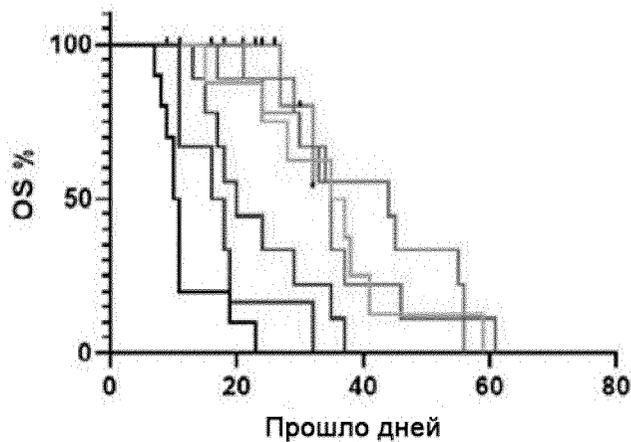
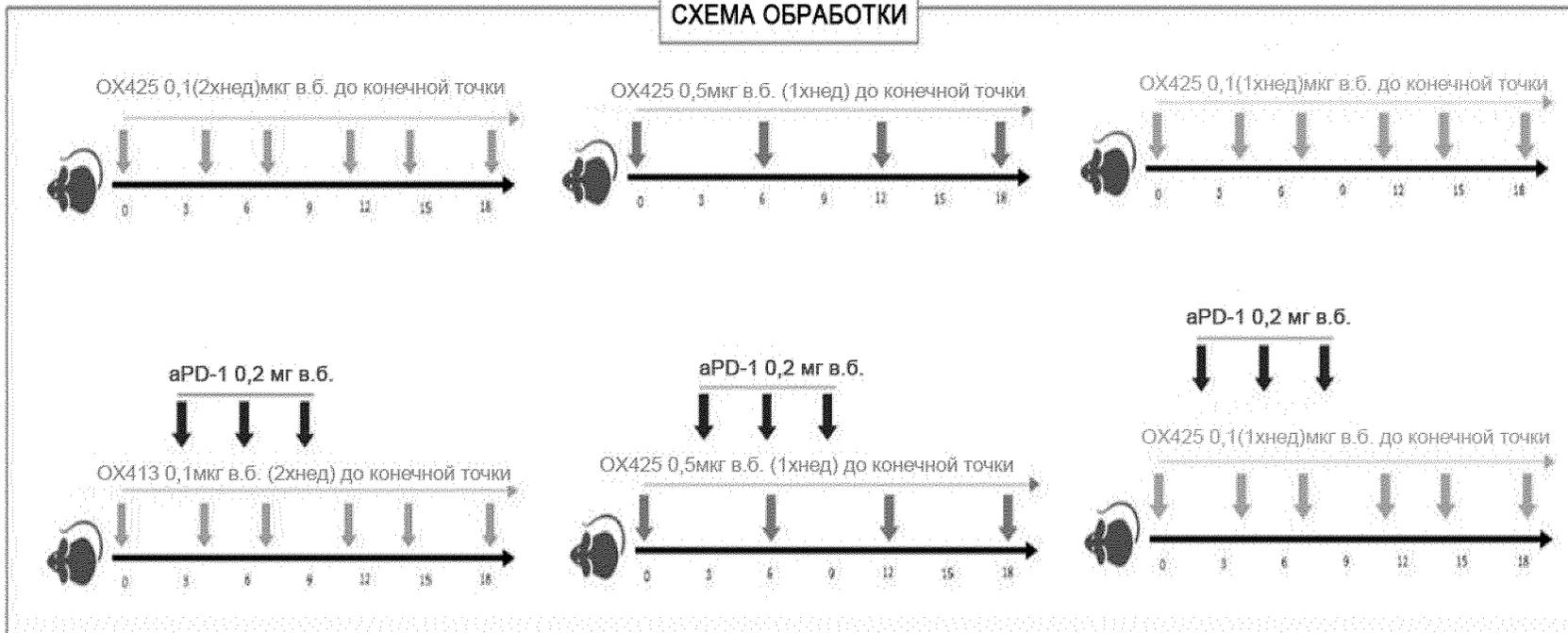


Фиг. 12 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



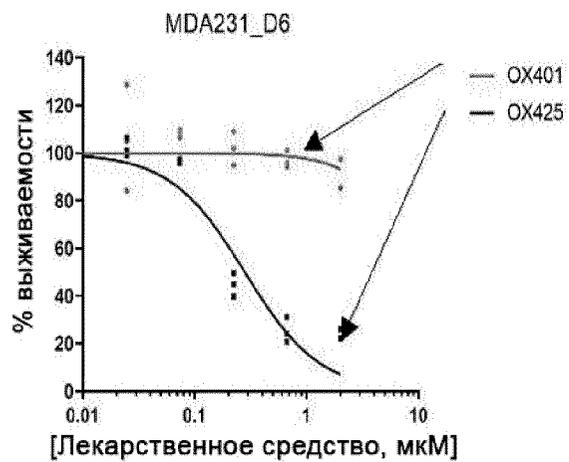
Фиг. 13

**СХЕМА ОБРАБОТКИ**

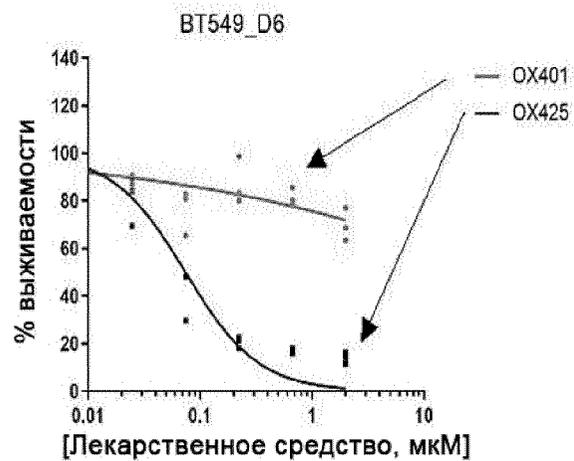


- + Контроль n=10
- + aPD-1 (n=6)
- + OX-425 100 мкг 2X/w + aPD-1 (n=8)
- + OX-425 500 мкг 1X/w + aPD-1 (n=9)
- + OX-425 100 мкг 2X/w (n=9)
- + OX-425 500 мкг 1X/w (n=9)
- + OX-425 100 мкг 1X/w (n=10)
- + OX-425 100 мкг 1X/w + aPD-1 (n=10)

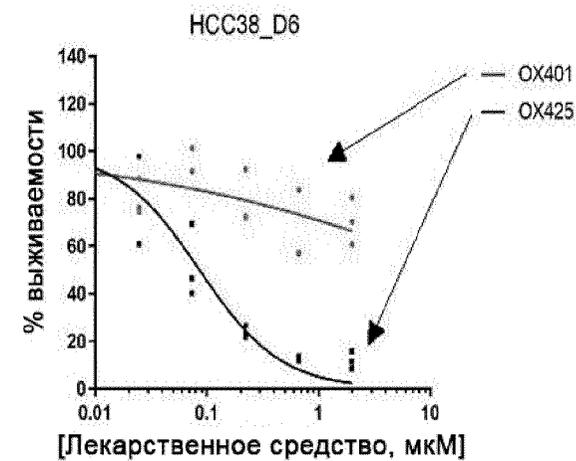
**Фиг. 14**



	OX401	OX425
IC50	10.30	0.2809



	OX401	OX425
IC50	58.12	0.07401



	OX401	OX425
IC50	19.06	0.08607

Фиг. 15