

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047415**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.18

(21) Номер заявки
202091566

(22) Дата подачи заявки
2018.12.26

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/28 (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(54) СОДЕРЖАЩАЯ НУКЛЕИНОВУЮ КИСЛОТУ ЛИПИДНАЯ НАНОЧАСТИЦА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 2017-252616

(32) 2017.12.27

(33) JP

(43) 2020.09.18

(86) PCT/JP2018/047872

(87) WO 2019/131770 2019.07.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
Кувае Синобу, Мацумото Сатору (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) SMITH, Tyrel T. et al.: "In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers", NATURE NANOTECHNOLOGY, August 2017, vol. 12, pp. 813-820, abstract, fig. 1, 2b
de WITTE, Moniek A. et al.: "Requirements for Effective Anti tumor Responses of TCR Transduced T Cells", The Journal of Immunology, 2008, vol. 181, pp. 5128-5136, abstract
JP-A-2017500869
WO-A1-2016021683
JP-A-2016525146
JP-A-2015509505
WANG, Hui et al.: "Construction and Primary Study on the Anti-Tumor Effect of TCR BV12-3 Recombinant Vector", Progress in Modern Biomedicine, 2014, vol. 14, no. 2, pp. 206-208, 213, abstract, page 206, right column, bottom paragraph
JP-A-2013510096

(57) Изобретение относится к липидной наночастице, содержащей следующие элементы (a)-(c): (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) или экзогенный Т-клеточный рецептор (TCR); (b) катионный липид и (c) некаатионный липид. Настоящее изобретение также относится к иммуноциту, экспрессирующему CAR или экзогенный TCR, полученному путем введения липидной наночастицы в Т-клетки in vivo или ex vivo, и к терапевтическому подходу in vivo или ex vivo с использованием иммуноцитов при таком заболевании, как рак и тому подобное.

B1

047415

047415 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к липидным наночастицам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор или Т-клеточный рецептор, к способу экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора в представляющем интерес иммуноците с использованием липидных наночастиц, к их фармацевтическому применению и тому подобному.

Уровень техники изобретения

Научные исследования в области противораковой иммунотерапии с использованием CAR-T-клеток или TCR-T-клеток, вводимых с геном химерного антигенного рецептора (CAR) или Т-клеточного рецептора (TCR), полученного из раковых антиген-специфичных киллерных Т-клеток, быстро продвигаются. Современная CAR-T-клеточная терапия, такая как Kymriah (торговое наименование) и Yescarta (торговое наименование), которые были одобрены в США, обычно включает в себя получение CAR-T-клеток путем трансфекции Т-клеток, собранных у пациентов генами CAR ex vivo с использованием вирусных векторов, таких как лентивирусный вектор, и введение этих CAR-T-клеток пациентам. Однако этот способ имеет недостаток, заключающийся в том, что стоимость производства становится высокой из-за стоимости культивирования клеток и получения вирусных векторов. Если избирательное введение CAR или экзогенного TCR в иммунциты, такие как Т-клетки, возможно in vivo, то получение ex vivo не требуется, и может быть создана CAR- или TCR-иммуноклеточная терапия с низкой себестоимостью получения. Кроме того, если CAR или экзогенный TCR можно избирательно вводить в иммунциты, такие как Т-клетки, ex vivo без использования вирусных векторов, требующих больших финансовых затрат, затраты на тестирование остатков вируса и т.д. будут исключены, и может быть создана CAR- или TCR-иммуноклеточная терапия с низкой себестоимостью получения.

Сообщалось об ex vivo или in vivo трансфекции CAR в Т-клетки с использованием наночастиц, содержащих агрегаты кодирующей CAR плазмидной ДНК и катионного полимера, которые покрыты некаатионным полимером, конъюгированным с фрагментами анти-CD3 антитела (патентный документ 1, непатентный документ 1) или наноноситель, содержащий мезопористый диоксид кремния, инкапсулирующий кодирующую CAR ДНК в порах и покрытый липидом, поверхность которого модифицирована анти-CD3 антителом (патентный документ 2).

Помимо этого сообщалось о способах доставки миРНК в клетку-мишень путем инкапсулирования целевой миРНК в "липидные наночастицы (ЛНЧ)", которые не имеют внутренней структуры пор и состоят из катионного липида, некаатионного вспомогательного липида и лиганд для доставки в клетку-мишень. Например, сообщалось о трансфекции миРНК ex vivo или in vivo для CD45 в Т-клетки с использованием фрагмента анти-CD4 антитела в качестве целевого лиганда (патентный документ 3, непатентный документ 2).

Однако до настоящего времени нет сообщений о том, что нуклеиновая кислота (например, мРНК, ДНК), кодирующая CAR или экзогенный TCR, избирательно вводится в иммунциты, такие как Т-клетки, с использованием ЛНЧ.

Список документов

Патентные документы:

Патентный документ 1: Заявка на патент США 2017/0296676

Патентный документ 2: Заявка на патент США 2016/0145348

Патентный документ 3: Международная патентная заявка WO 2016/189532

Непатентные документы:

Непатентный документ 1: Nature Nanotechnology 12, 813-820 (2017)

Непатентный документ 2: ACS Nano, 2015, 9 (7), 6706-6716

Сущность изобретения

Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является создание новой технологии трансфекции, при помощи которой можно эффективно вводить CAR или экзогенный TCR избирательно в иммунциты, такие как Т-клетки, in vivo или ex vivo, тем самым обеспечивая CAR- или TCR-иммуноклеточную терапию с низкой себестоимостью получения. Другой целью настоящего изобретения является создание более безопасной CAR- или TCR-иммуноклеточной терапии, которая не имеет проблем с антигенностью вирусных белков.

Решение проблемы

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования в попытке достичь вышеупомянутых целей и преуспели в эффективном введении нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или экзогенный TCR, избирательно в иммунциты, такие как Т-клетки, in vivo и ex vivo с использованием ЛНЧ, что привело к созданию настоящего изобретения.

Соответственно, настоящее изобретение относится к следующему.

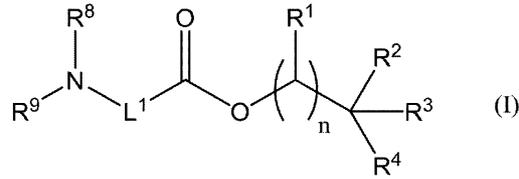
1. Липидная наночастица, содержащая следующие элементы (a)-(c):

(a) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор;

(b) катионный липид и

(с) некатионный липид.

2. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанный катионный липид представляет собой соединение, представленное структурной формулой (I)



где

L^1 представляет собой C_{1-22} алкиленовую группу, C_{2-22} алкениленовую группу или C_{3-22} алкадиениленовую группу,

n представляет собой целое число 0 или 1,

R^1 представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(3) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(4) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

R^2 представляет собой $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^5$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^5$ или $-\text{R}^5$,

R^3 представляет собой $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^6$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^6$ или $-\text{R}^6$,

R^4 представляет собой атом водорода, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^7$, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}^7$ или $-\text{R}^7$,

R^5 , R^6 и R^7 каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(2) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(3) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

R^8 и R^9 , каждый независимо представляет собой C_{1-6} алкильную группу, или его соль.

3. Липидная наночастица по п.1 или 2, где вышеуказанная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК или ДНК.

4. Липидная наночастица по любому из пп.1-3, где вышеуказанный некатионный липид представляет собой фосфолипид, холестерин и/или ПЭГ липид.

5. Липидная наночастица по любому из пп.1-4, где вышеуказанная липидная наночастица имеет лиганд, который может быть нацелен на Т-клетки на поверхности.

6. Липидная наночастица по п.5, где вышеуказанный лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из анти-CD3 антитела, анти-CD4 антитела, анти-CD8 антитела и анти-CD28 антитела.

7. Липидная наночастица по п.5, где вышеуказанный лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела и/или анти-CD28 антитела.

8. Липидная наночастица по п.5, где вышеуказанный лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела.

9. Лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу по любому из пп.1-8.

10. Лекарственное средство по п.9, где лекарственное средство представляет собой профилактический или терапевтический лекарственный препарат против рака.

11. Лекарственное средство по п.9, где лекарственное средство вводит химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор в иммуноцит *in vivo* для индукции его экспрессии.

12. Лекарственное средство по п.9, где лекарственное средство вводит химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор в Т-клетки *in vivo* для индукции его экспрессии.

13. Способ экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора путем введения рецептора в иммуноцит млекопитающего *in vivo*, включающий в себя введение млекопитающему липидной наночастицы по любому из пп.1-8.

14. Способ экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора путем введения рецептора в Т-клетку млекопитающего *in vivo*, включающий в себя введение млекопитающему липидной наночастицы по любому из пп.1-8.

15. Способ предотвращения или лечения рака у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему липидной наночастицы по любому из пп.1-8.

16. Липидная наночастица по любому из пп.1-8 для применения в профилактике или лечении рака.

17. Применение липидной наночастицы по любому из пп.1-8 при производстве агента для профи-

лактики или лечения рака.

18. Композиция для индукции экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора, содержащая липидную наночастицу по любому из пп.1-8.

19. Иммуноцит *ex vivo*, который экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получен путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

20. Т-клетка *ex vivo*, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получена путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

21. Лекарственное средство, содержащее иммуноцит *ex vivo*, который экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор, и который получают путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

22. Лекарственное средство, содержащее Т-клетку *ex vivo*, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и которую получают путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

23. Лекарственное средство по п.21 или 22, где лекарственное средство представляет собой профилактический или терапевтический препарат против рака.

24. Лекарственное средство по п.21 или 22, где лекарственное средство представляет собой лекарственное средство для индукции апоптоза.

25. Способ экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора путем введения рецептора в иммуноцит *ex vivo*, включающий в себя добавление липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

26. Способ экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора в Т-клетке *ex vivo*, включающий в себя добавление липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

27. Способ предотвращения или лечения рака у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему иммуноцита *ex vivo*, который экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и который получают путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

28. Способ предотвращения или лечения рака у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему Т-клетки *ex vivo*, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и которую получают путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

29. Иммуноцит *ex vivo* для применения в профилактике или лечении рака, где иммуноцит *ex vivo* экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получен путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

30. Т-клетка *ex vivo* для применения в профилактике или лечении рака, где Т-клетка *ex vivo* экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получена путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

31. Применение иммуноцита *ex vivo* в производстве агента для профилактики или лечения рака, где иммуноцит *ex vivo* экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получен путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

32. Применение Т-клетки *ex vivo* в производстве агента для профилактики или лечения рака, где Т-клетка *ex vivo* экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор и получена путем добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

33. Способ получения лекарственного средства, содержащего иммуноцит *ex vivo*, который экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор, включающий в себя этап добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей иммуноцит *ex vivo*.

34. Способ получения лекарственного средства, содержащего Т-клетку *ex vivo*, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор, включающий в себя этап добавления липидной наночастицы по любому из пп.1-8 к культуре, содержащей Т-клетку *ex vivo*.

Полезный эффект изобретения

В соответствии с настоящим изобретением CAR или экзогенный TCR могут быть эффективно избирательно введены в иммуноциты, такие как Т-клетки, не только *ex vivo*, но и *in vivo*, и может быть обеспечена CAR- или TCR-иммуноклеточная терапия с низкой себестоимостью получения. Кроме того, поскольку не используется вирусный вектор, то можно избежать проблем с антигенностью вирусных белков.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты анализа методом проточной цитометрии экспрессии CD19 CAR в культивируемых первичных Т-клетках человека, трансфицированных hCD3/hCD28- соединение 12-

pcDNA3.1-hCD19CAR.

На фиг. 2 показаны результаты анализа методом проточной цитометрии экспрессии CD19 CAR в культивируемых первичных Т-клетках человека, трансфицированных hCD3/hCD28-соединение 21-pcDNA3.1-hCD19CAR и hCD3/hCD28-соединение 35-pcDNA3.1-hCD19CAR.

На фиг. 3 показан уровень цитотоксичности Nalm-6 и Daudi при добавлении к культивируемым первичным Т-клеткам человека, трансфицированным CD19 CAR.

Подробное описание изобретения

1. Липидная наночастица (ЛНЧ) настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к липидным наночастицам, содержащим следующие элементы (a)-(c):

(a) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) или экзогенный Т-клеточный рецептор (TCR);

(b) катионный липид и

(c) некатионный липид (далее именуемым также "липидная наночастица настоящего изобретения", "ЛНЧ настоящего изобретения").

В настоящем описании термин "липидная наночастица (ЛНЧ)" относится к частицам со средним диаметром менее 1 мкм, не имеющим мелкой пористой структуры (например, мезопористого материала) в молекулярной сборке, состоящей из вышеупомянутых элементов (b) и (c).

Составляющие элементы (a)-(c) липидной наночастицы настоящего изобретения поясняются ниже.

(a) Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR) или экзогенный Т-клеточный рецептор (TCR)

(a-1) Нуклеиновая кислота, кодирующая CAR

CAR представляет собой искусственно сконструированный гибридный белок, содержащий антигенсвязывающий домен (например, scFv) антитела, связанного с доменом трансдукции сигнала Т-клеток. CAR характеризуется способностью использовать антигенсвязывающее свойство моноклонального антитела для перенаправления специфичности и чувствительности Т-клеток к выбранной мишени без ограничения со стороны МНС. Не ограниченное МНС распознавание антигена придает CAR-экспрессирующим Т-клеткам способность распознавать антигены независимо от процессинга антигена, тем самым обходя основной механизм, при помощи которого опухоли избегают иммунного ответа. Кроме того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуется с эндогенными α -цепью и β -цепью TCR.

CAR, используемый в липидных наночастицах настоящего изобретения включает в себя антигенсвязывающий домен, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной трансдукции сигнала в Т-клетке антитела, которое может специфично распознавать поверхностные антигены (например, пептид ракового антигена, поверхностный рецептор, демонстрирующий повышенную экспрессию в раковых клетках и т.д.), которые должны распознавать целевые иммунциты (например, Т-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и т.д.).

Примеры поверхностных антигенов, специфично распознаваемых антигенсвязывающими доменами, включают в себя без ограничений поверхностные рецепторы, демонстрирующие повышенную экспрессию при различных видах рака (например, при остром лимфоцитарном раке, альвеолярной рабдомиосаркоме, раке мочевого пузыря, раке кости, раке головного мозга (например, медуллобластоме), раке молочной железы, ануса, анального канала или аноректальном раке, раке глаза, раке межпеченочного желчного протока, раке сустава, раке шейки матки, желчного пузыря или плевры, раке носа, полости носа или среднего уха, раке ротовой полости, раке вульвы, хроническом миелогенном раке, раке толстой кишки, раке пищевода, раке шейки матки, фибросаркомы, раке желудочно-кишечного тракта, раке головы и шеи (например, плоскоклеточном раке головы и шеи), гипофарингиальном раке, раке почки, раке гортани, лейкозе (например, остром лимфобластном лейкозе, остром лимфоцитарном лейкозе, хроническом лимфоцитарном лейкозе, остром миелоидном лейкозе), опухоли жидких тканей, раке печени, раке легкого (например, немелкоклеточном раке легкого), лимфоме (например, лимфоме Ходжкина, неходжкинской лимфоме, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме, фолликулярной лимфоме), злокачественной мезотелиоме, мастоцитоме, меланоме, множественной миеломе, раке носоглотки, раке яичников, раке поджелудочной железы; раке брюшины, сальника и брыжейки; фарингеальном раке, раке предстательной железы, раке прямой кишки, раке почки, раке кожи, раке тонкой кишки, раке мягких тканей, солидной опухоли, раке желудка, раке яичка, раке щитовидной железы, раке мочеочника и тому подобном, например, CD19, рецептор EGF, BCMA, CD30, Her2, ROR1, MUC16, CD20, мезотелин, В-клеточной мутантный антиген (BCMA), CD123, CD3, простат-специфический мембранный антиген (PSMA), CD33, MUC-1, CD138, CD22, GD2, PD-L1, CEA, хондроитинсульфат протеогликан-4, α -цепь рецептора IL-13, легкая цепь к IgG и пептиды ракового антигена (например, пептиды, полученные из WT1, GPC3, MART-1, gp100, NY-ESO-1, MAGE-A4 и т.д.).

Антигенсвязывающий домен, используемый в настоящем изобретении, специально не ограничивается при условии, что он представляет собой фрагмент антитела, который может специфично распозна-

вать антиген-мишень. Учитывая легкость получения CAR, желательным является одноцепочечное антитело (scFv), в котором переменная область легкой цепи и переменная область тяжелой цепи связаны через линкерный пептид. Конфигурация переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи в одноцепочечном антителе специально не ограничивается, при условии, что они могут образовывать функциональный антигенсвязывающий домен. Как правило, они могут быть сконструированы в следующем порядке: переменная область легкой цепи, линкерный пептид и переменная область тяжелой цепи со стороны N-конца. В качестве линкерного пептида может быть использован известный линкерный пептид, обычно применяемый для получения одноцепочечных антител. Например, ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, может быть получена путем клонирования гена легкой цепи и гена тяжелой цепи соответственно из антителопродуцирующих клеток и проведения ПЦР с использованием их в качестве матриц или тому подобного или путем их химического синтеза на основе информации о последовательности существующих антител. ДНК, кодирующая одноцепочечное антитело, может быть получена путем лигирования каждого полученного фрагмента ДНК с ДНК, кодирующей линкерный пептид, подходящим для этого способом. N-концевая часть антигенсвязывающего домена предпочтительно дополнительно содержит ридерную последовательность для презентирования CAR на поверхности иммуноцита.

В качестве внеклеточного шарнирного домена и трансмембранного домена могут быть использованы подходящие домены, полученные из молекулы T-клеточной поверхности, обычно используемые в соответствующей области техники. Например, они включают в себя без ограничений домены, полученные из CD8 α и CD28.

Примеры домена внутриклеточной трансдукции сигнала включают в себя без ограничений те домены, которые имеют цепь CD3 ζ , и те домены, которые дополнительно имеют костимулирующий мотив, такой как CD28, CD134, CD137, Lck, DAP10, ICOS, 4-1BB и тому подобное между трансмембранным доменом и цепью CD3 ζ и те домены, которые имеют два или более костимулирующих мотива. Любые домены, обычно используемые в соответствующей области техники, могут использоваться в комбинации.

Информация о последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, хорошо известна в соответствующей области техники. На основе такой информации специалисты в данной области техники могут легко получить фрагменты ДНК, кодирующие каждый из этих доменов, из T-клеток.

ДНК, кодирующая CAR, может быть получена путем связывания фрагментов ДНК, соответственно кодирующих полученный таким образом антигенсвязывающий домен, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной трансдукции сигнала, общепринятым способом.

Полученная ДНК, кодирующая CAR, может быть встроена в экспрессионный вектор, предпочтительно в плазмидный вектор, содержащий функциональный в T-клетках промотор, в том виде как есть, или после добавления подходящего линкера и/или сигнала ядерной транслокации и тому подобного. Примеры функционального в T-клетках промотора включают в себя без ограничений конститутивный промотор SR α в клетках млекопитающих, промотор SV40, промотор LTR, промотор CMV (цитомегаловируса), промотор RSV (вируса саркомы Рауса), MoMuLV (вируса мышинного лейкоза Молони) промотор LTR, промотор HSV-TK (тимидинкиназы простого вируса герпеса) и тому подобное. Кроме того, генные промоторы, такие как CD3, CD4 и CD8, которые специфично экспрессируются в T-клетках, также могут быть использованы.

РНК, кодирующая CAR, предпочтительно мРНК, может быть получена путем транскрипции в мРНК в системе транскрипции *in vitro*, известной в данной области техники, с использованием в качестве матрицы экспрессионного вектора, содержащего ДНК, кодирующую вышеупомянутый CAR.

(a-2) Нуклеиновая кислота, кодирующая экзогенный TCR

В настоящем описании термин "T-клеточный рецептор (TCR)" означает рецептор, который состоит из димеров цепи TCR (α -цепь, β -цепь) и распознает антиген или HLA-антиген (тип антигена лейкоцитов человека) (MHC; главный комплекс гистосовместимости) и передает стимулирующий сигнал к T-клеткам. Каждая цепь TCR состоит из переменной области и константной области, а переменная область содержит три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2, CDR3). TCR, используемый в настоящем изобретении, включает в себя не только те рецепторы, в которых α - и β -цепи TCR составляют гетеродимер, но также и те рецепторы, в которых они составляют гомодимер. Кроме того, TCR включает в себя те рецепторы, у которых удалена часть или все константные области, те рецепторы, которые имеют рекомбинантную аминокислотную последовательность, и те рецепторы, которые имеют растворимый TCR, и тому подобное.

Термин "экзогенный TCR" означает экзогенный для T-клетки, которая является клеткой-мишенью липидной наночастицы настоящего изобретения. Аминокислотная последовательность экзогенного TCR может быть такой же или отличаться от последовательности эндогенного TCR, экспрессируемого T-клеткой, которая является клеткой-мишенью липидной наночастицы настоящего изобретения.

Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, используемая в липидной наночастице настоящего изо-

бретения, представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую α -цепь и β -цепь TCR, которые могут специфично распознавать поверхностные антигены (например, пептид ракового антигена и т.д.), которые должны распознаваться целевой Т-клеткой.

Нуклеиновую кислоту можно получить способом, известным в данной области техники. Когда аминокислотная последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты желаемого TCR известна, ДНК, кодирующая полноразмерный или часть TCR настоящего изобретения, может быть сконструирована на основе этой последовательности, например, путем химического синтеза цепи ДНК или цепи РНК, или соединения синтезированной, частично перекрывающейся короткой цепи олиго-ДНК методом ПЦР или методом сборки Гибсона.

Например, когда последовательность желаемого TCR неизвестна, представляющая интерес Т-клетка выделяется из популяции клеток, содержащих Т-клетку, экспрессирующую представляющий интерес TCR, и нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, может быть получена из этой Т-клетки. В частности, популяцию клеток (например, МКПК), содержащую Т-клетки, получают из организма (например, человека), популяцию клеток культивируют в присутствии эпитопов антигенов клеточной поверхности, распознаваемых целевым TCR при стимуляции клеточной популяции, и Т-клетка, которая специфично распознает клетку, экспрессирующую антиген клеточной поверхности, может быть выбрана из популяции клеток известным способом и с использованием, в качестве показателей, специфичности для клеток, экспрессирующих антиген клеточной поверхности и антигены клеточной поверхности, такие как CD8 и CD4. Специфичность к клеткам, экспрессирующим антиген клеточной поверхности Т-клеток, можно измерить, например, с помощью анализа на декстромер, анализа ELISPOT, цитотоксического анализа или тому подобного. Вышеупомянутую популяцию клеток, содержащую Т-клетки, предпочтительно получают, например, из организма, имеющего большое количество клеток, экспрессирующих антиген клеточной поверхности, распознаваемый представляющий интерес TCR (например, от пациента с таким заболеванием, как рак, или содержащая Т-клетки популяция приводится в контакт с эпитопом антигена или дендритными клетками, активированными эпитопом).

Нуклеиновую кислоту настоящего изобретения можно получить путем экстракции ДНК из вышеупомянутой изолированной Т-клетки обычным способом, амплификации и клонирования гена TCR на основе последовательности нуклеиновой кислоты константной области TCR с использованием ДНК в качестве матрицы. Ее также можно получить путем выделения РНК из клетки и синтеза кДНК обычным способом и выполнения 5'-RACE ПЦР (быстрой амплификации концов кДНК) с кДНК в качестве матриц с использованием антисмысловых праймеров, комплементарных нуклеиновым кислотам, соответственно кодирующих константные области α -цепи и β -цепи TCR. 5'-RACE ПЦР может быть выполнена известным способом и может быть выполнена, например, с использованием коммерчески доступного набора реагентов, такого как набор реагентов для синтеза кДНК SMART PCR (производства Clontech). ДНК, кодирующая α -цепь и β -цепь полученного TCR, может быть встроена в соответствующий экспрессионный вектор таким же образом, как ДНК, кодирующая вышеупомянутый CAR. ДНК, кодирующая α -цепь, и ДНК, кодирующая β -цепь, могут быть встроены в один и тот же вектор или разные векторы. При вставке в один и тот же вектор экспрессионный вектор может экспрессировать обе цепи полицистронным или моноцистронным способом. В первом случае между последовательностями ДНК, кодирующими обе цепи, встраивается промежуточная последовательность, которая обеспечивает полицистронную экспрессию, такая как IRES или FMV 2A.

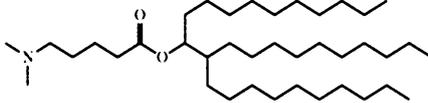
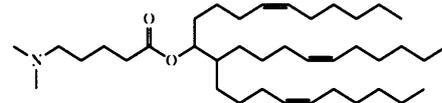
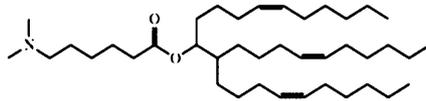
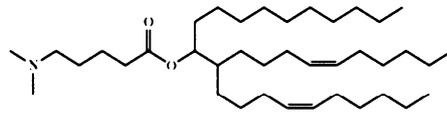
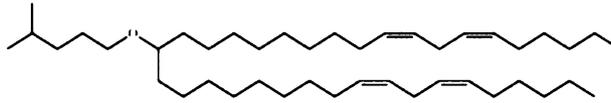
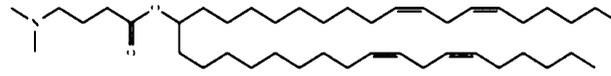
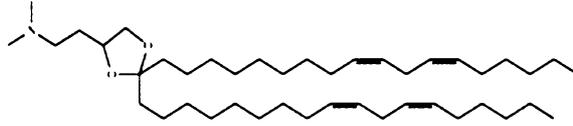
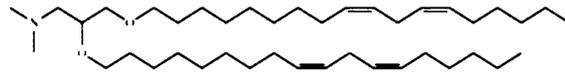
Кроме того, РНК, кодирующая каждую цепь TCR, предпочтительно мРНК, может быть получена таким же образом, как вышеупомянутая РНК, кодирующая CAR, например, с использованием в качестве матрицы экспрессионного вектора.

(b) Катионный липид

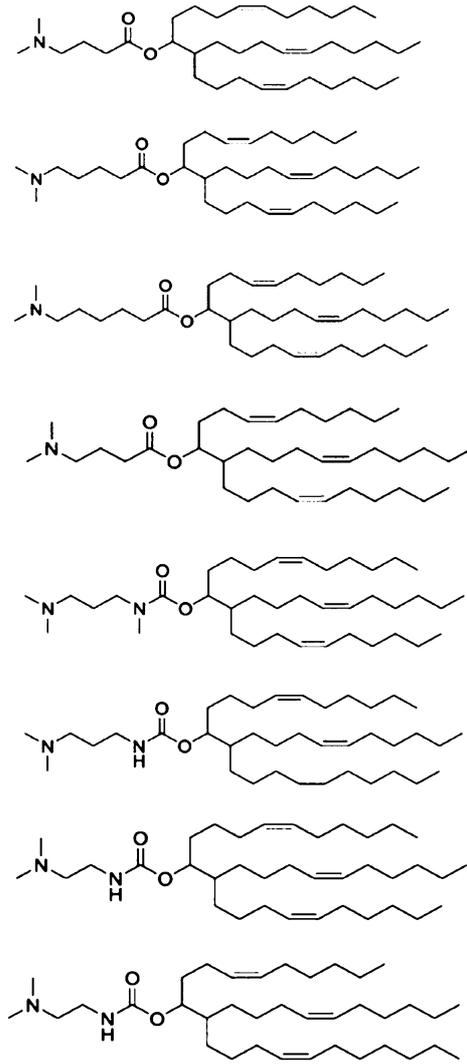
В настоящем описании термин "катионный липид" означает липид, который имеет суммарный положительный заряд при выбранном значении pH, таком как физиологическое значение pH. Катионные липиды, используемые в липидной наночастице настоящего изобретения, специально не ограничиваются. Например, катионные липиды и подобные им описаны в Международных патентных заявках WO 2015/011633, WO 2016/021683, WO 2011/153493, WO 2013/126803, WO 2010/054401, WO 2010/042877, WO 2016/104580, WO 2015/005253, WO 2014/007398, WO 2017/117528, WO 2017/075531, WO 2017/00414, WO 2015/199952, Заявке на патент США US 2015/0239834 и тому подобных документах.

Предпочтительные катионные липиды представлены следующими структурными формулами и описаны в Международной патентной заявке WO 2015/011633.

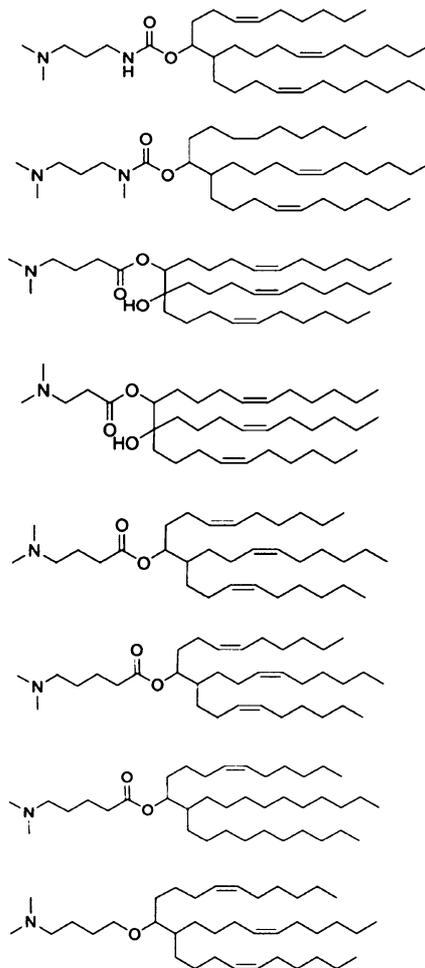
047415

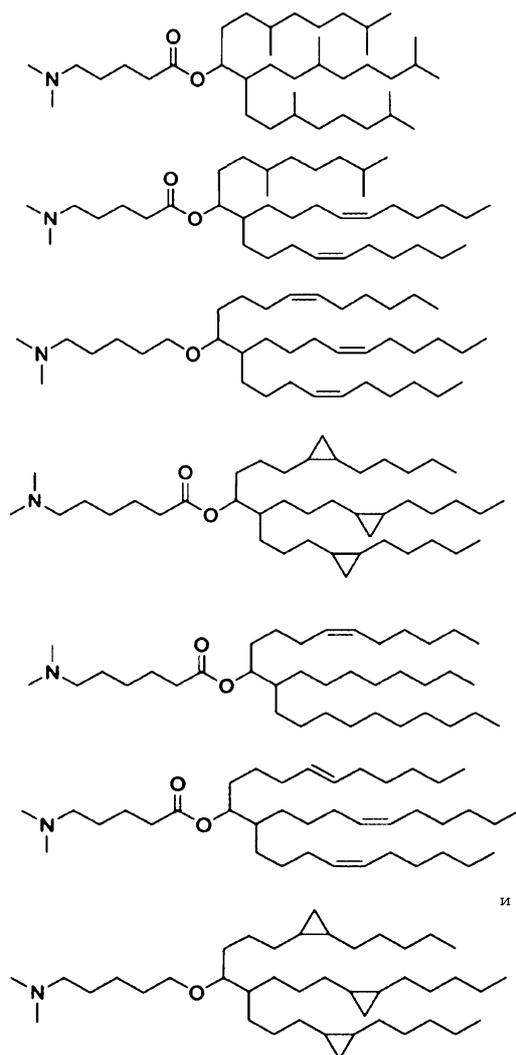


047415



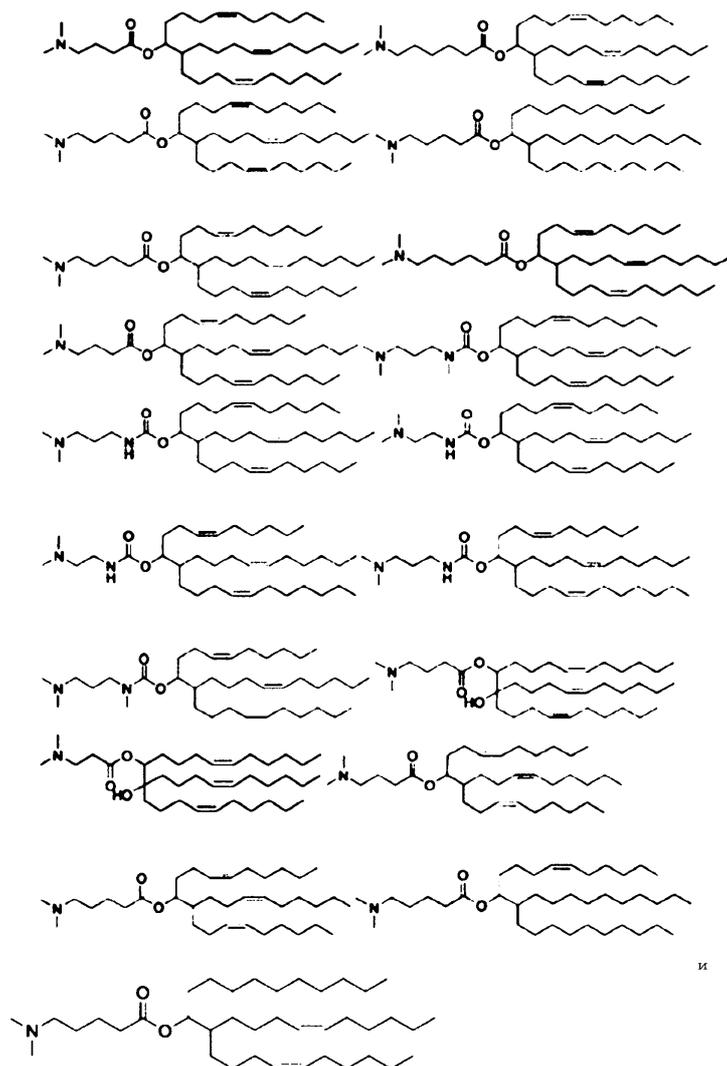
047415





и их соли.

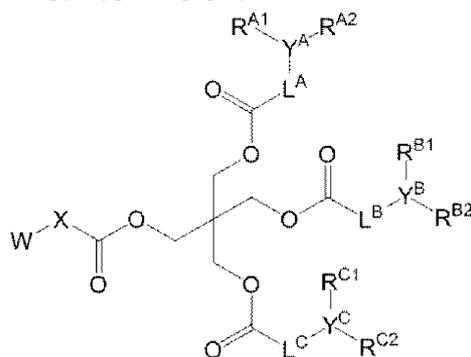
Среди вышеупомянутых катионных липидов катионные липиды, представленные следующими структурными формулами, являются более предпочтительными.



и их соли.

Предпочтительный катионный липид представлен следующей структурной формулой и описан в Международной патентной заявке WO 2016/021683.

Соединение, представленное структурной формулой



где

W представляет собой формулу $-NR^1R^2$ или формулой $-N^+R^3R^4R^5(Z^-)$,

R^1 и R^2 каждый независимо представляет собой C_{1-4} алкильную группу или атом водорода,

R^3 , R^4 и R^5 каждый независимо представляет собой C_{1-4} алкильную группу,

Z^- представляет собой анион,

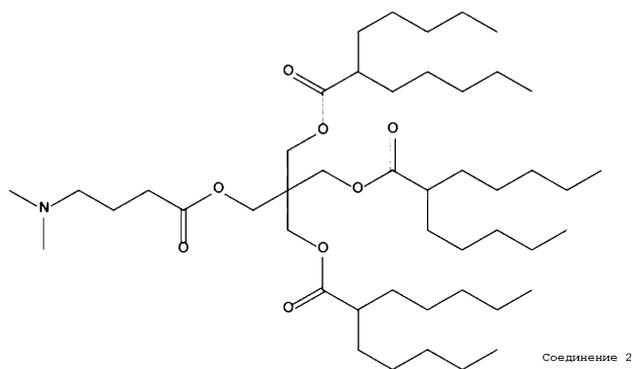
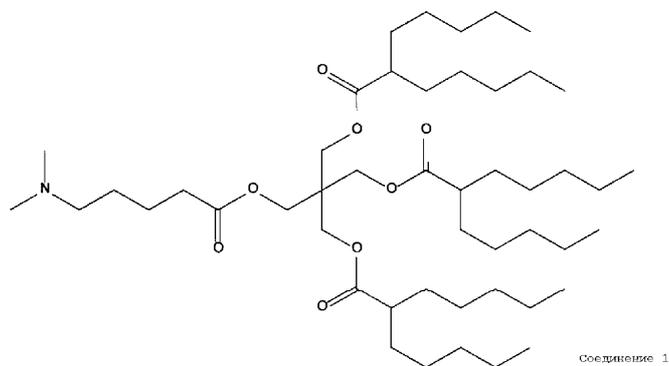
X представляет собой необязательно замещенную C_{1-6} алкиленовую группу,

Y^A , Y^B и Y^C каждый независимо представляет собой необязательно замещенную метиновую группу,

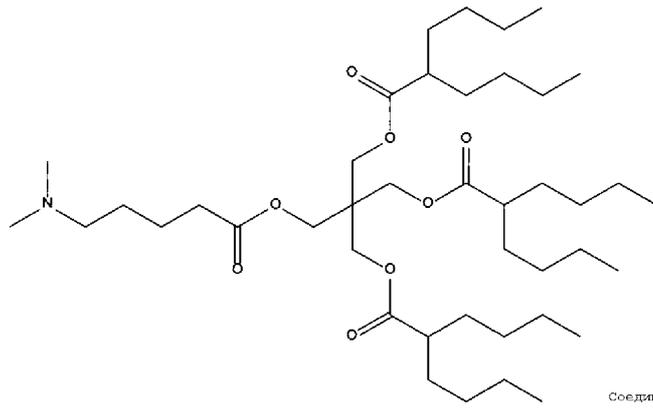
L^A , L^B и L^C каждый независимо представляет собой необязательно замещенную метиленовую группу или связь, и

R^{A1} , R^{A2} , R^{B1} , R^{B2} , R^{C1} и R^{C2} каждый независимо представляет собой необязательно замещенную C_{4-10} алкильную группу, или его соль.

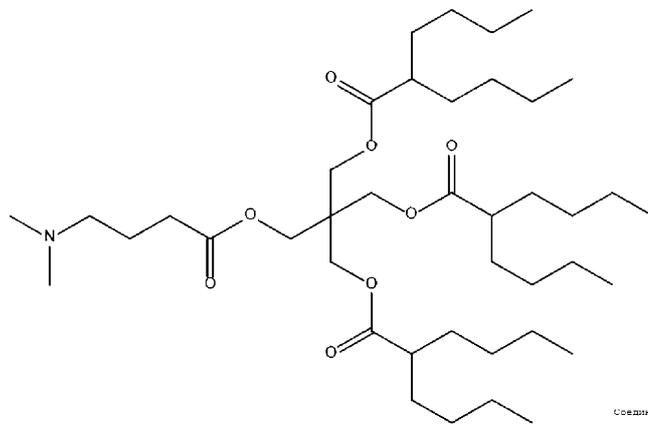
Более предпочтительно катионные липиды, представленные следующими структурными формулами, могут быть упомянуты.



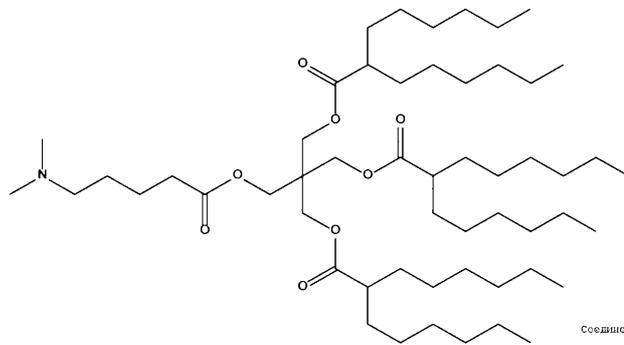
047415



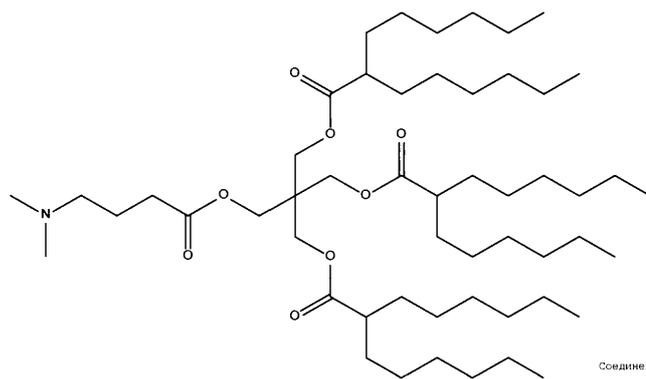
Соединение 3



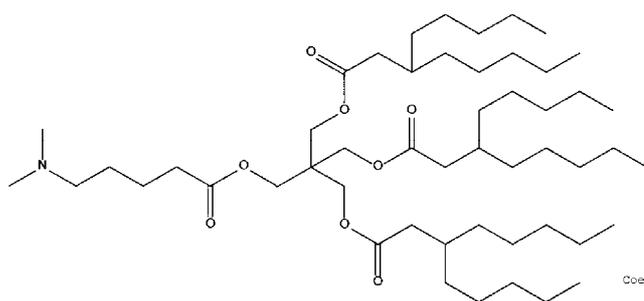
Соединение 4



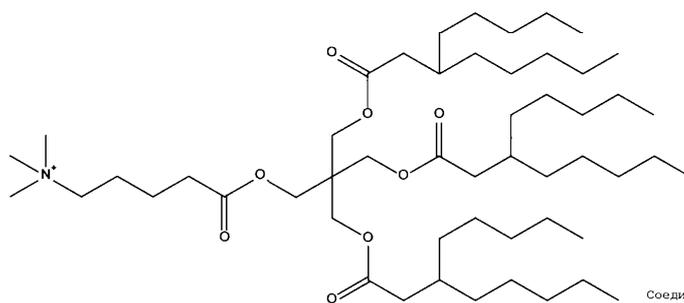
Соединение 5



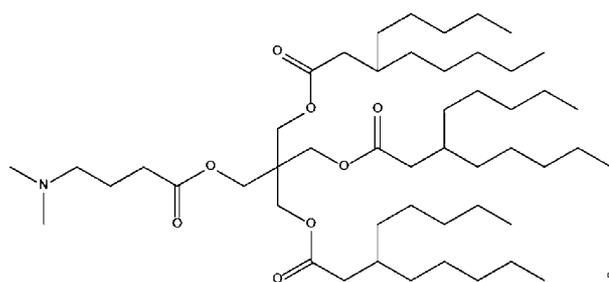
Соединение 6



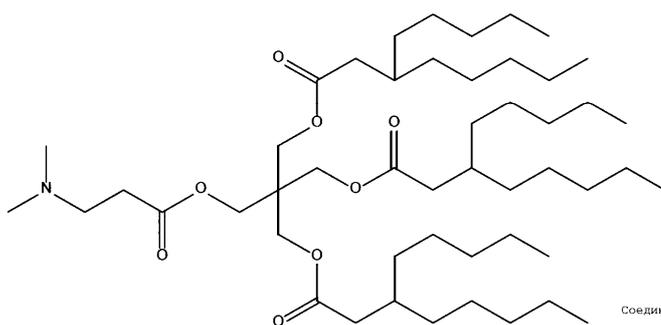
Соединение 7



Соединение 8



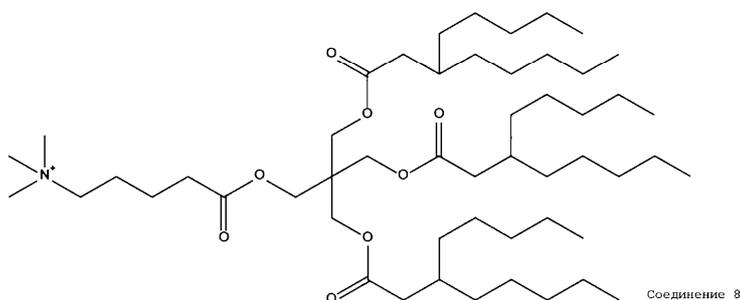
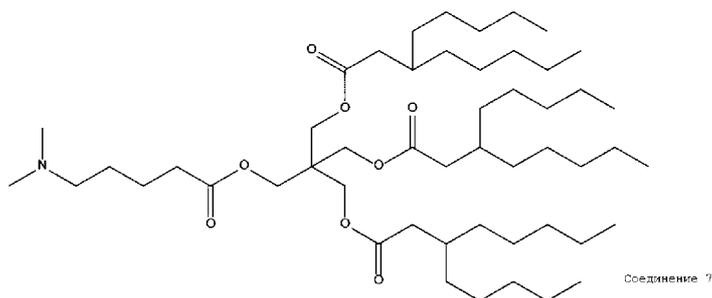
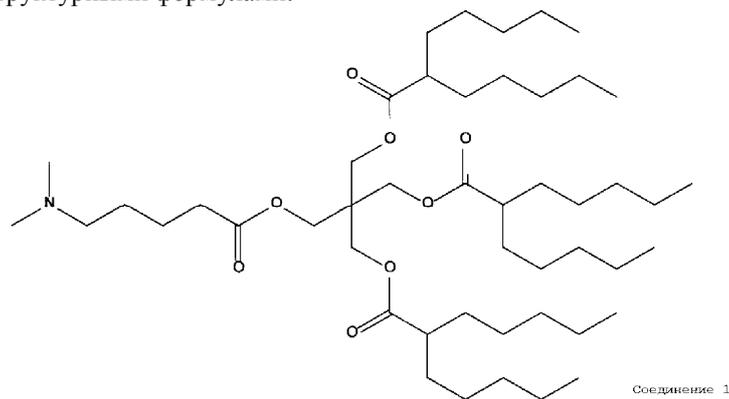
Соединение 9 и



Соединение 10

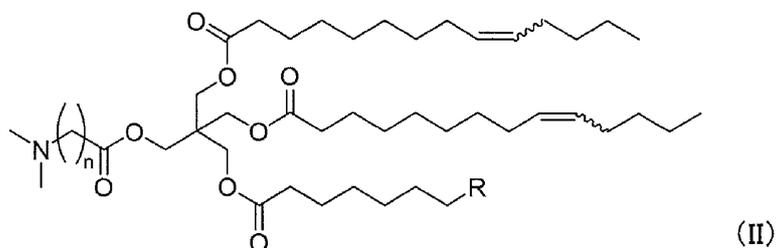
и их соли.

Среди вышеупомянутых катионных липидов более предпочтительные катионные липиды представлены следующими структурными формулами:



и их соли.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения может быть упомянут катионный липид, представленный следующей формулой (II) (далее именуемый также "Соединение (II)"). Соединение, представленное



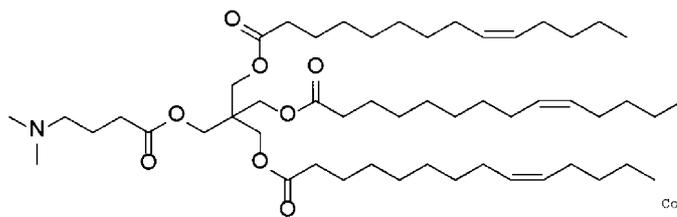
где

n представляет собой целое число от 2 до 5,

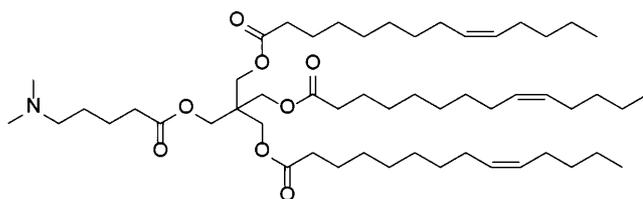
R представляет собой линейную C_{1-5} алкильную группу, линейную C_{7-11} алкенильную группу или линейную C_{11} алкадиенильную группу и волнистые линии каждая независимо показывает связь цис-типа или транс-типа, или его соль.

Более предпочтительно катионные липиды, представленные следующими структурными формулами, могут быть упомянуты.

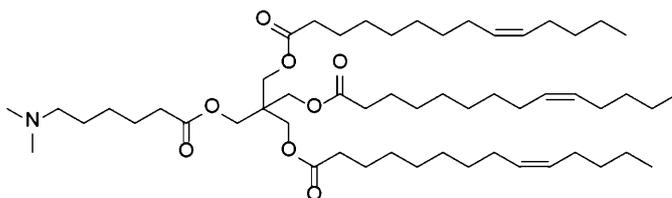
047415



Соединение 11

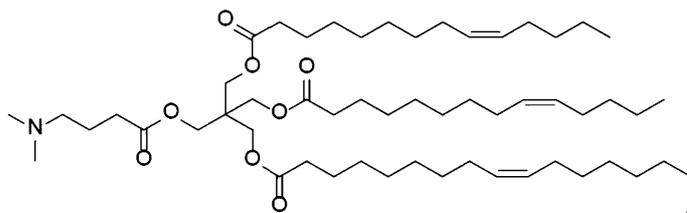


Соединение 12

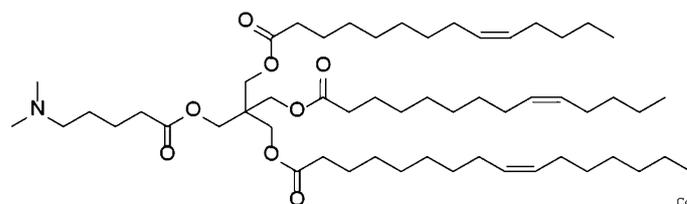


Соединение 13

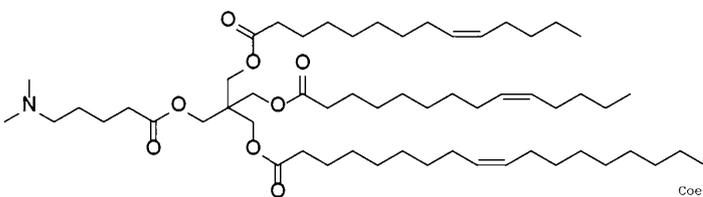
047415



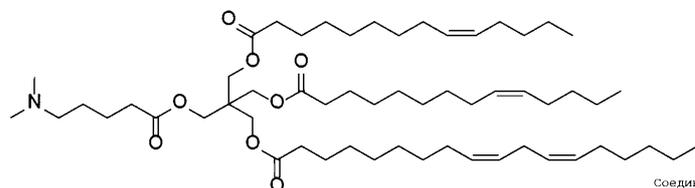
Соединение 14



Соединение 15

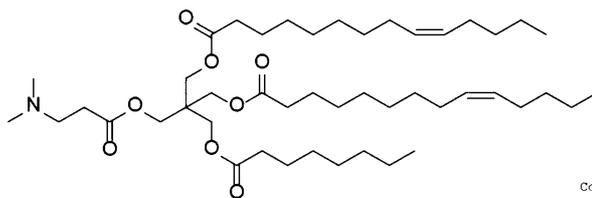


Соединение 16

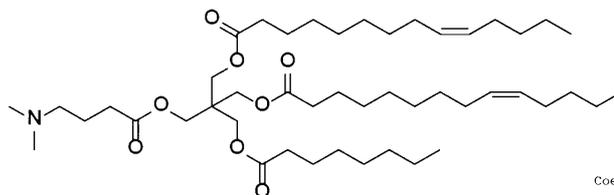


Соединение 17

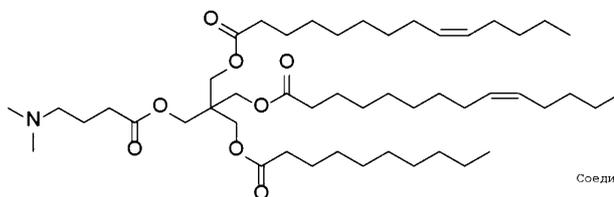
047415



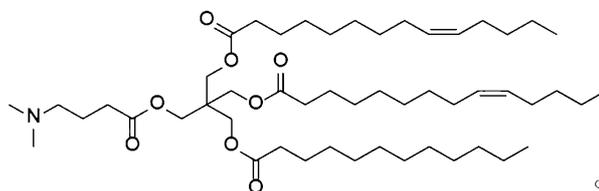
Соединение 18



Соединение 19



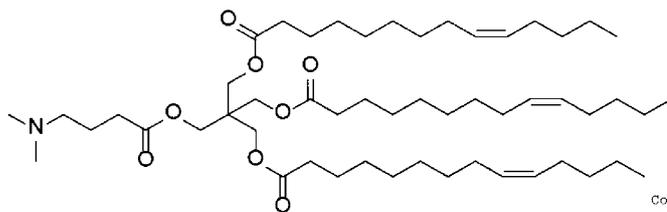
Соединение 20 и



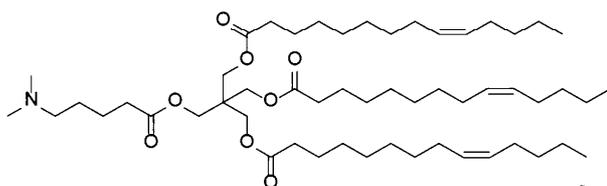
Соединение 21

и их соли.

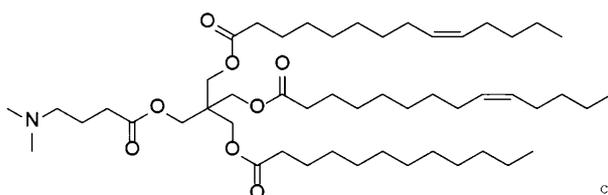
Среди вышеупомянутых катионных липидов более предпочтительные катионные липиды представлены следующими структурными формулами:



Соединение 11



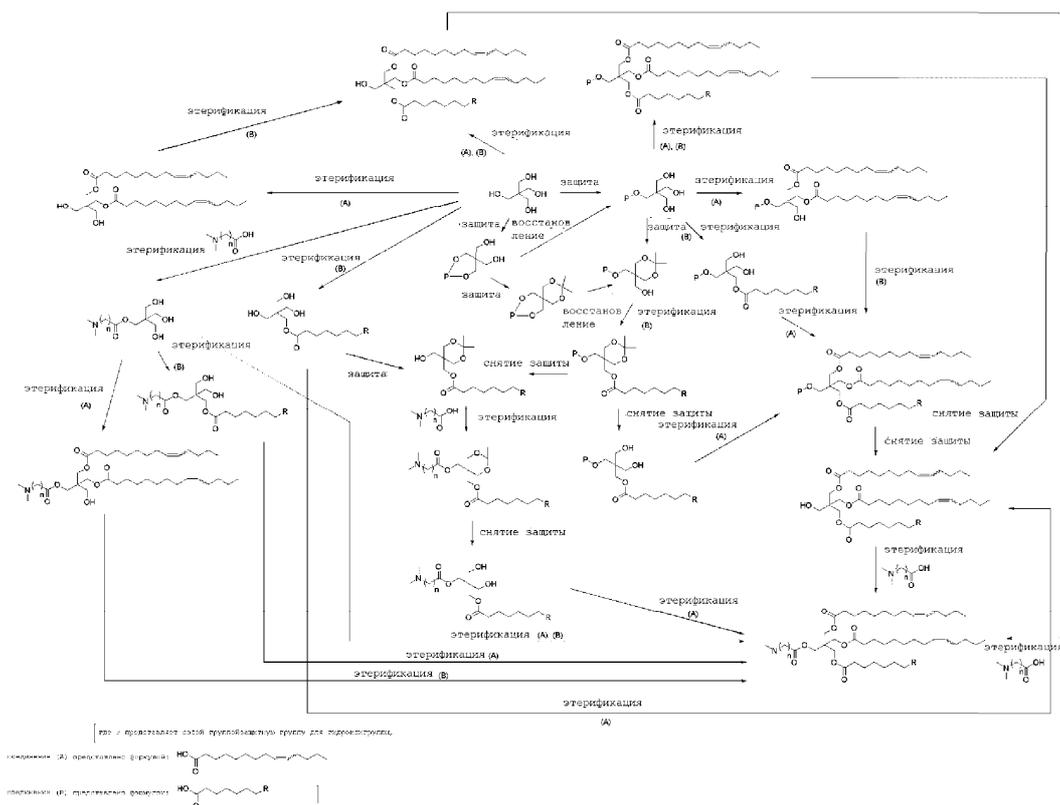
Соединение 12 и



Соединение 21

и их соли.

Соединение (II) можно получить, например, следующим способом получения. Среди соединений (II) как соединение, в котором обе волнистые линии представляют собой связи цис-типа, так и соединения, в котором одна или обе волнистые линии представляют собой связи транс-типа, могут быть получены способом получения, аналогичным показанному ниже. В частности, соединение (II) с желаемой структурой может быть синтезировано с использованием соответствующих исходных материалов в соответствии со структурой желаемого соединения (II) в процессе этерификации. Соль соединения (II) может быть получена путем соответствующего смешивания с неорганическим основанием, органическим основанием, органической кислотой, основной или кислой аминокислотой.



И исходный материал или реагент, используемый на каждом этапе в вышеупомянутом способе получения, и полученное соединение, могут образовывать соль.

Когда соединение, полученное на каждом этапе, является свободным соединением, это соединение может быть превращено в нужную соль способом, известным в данной области техники. Напротив, когда соединение, полученное на каждом этапе, представляет собой соль, эта соль может быть преобразована в свободную форму или нужную соль другого типа способом, известным в данной области техники.

Соединение, полученное на каждом этапе, можно использовать в следующей реакции непосредственно в форме его реакционного раствора или после получения в виде неочищенного продукта. Альтернативно, соединение, полученное на каждом этапе, может быть выделено и/или очищено из реакционной смеси методом разделения, таким как концентрирование, кристаллизация, перекристаллизация, дистилляция, экстракция растворителем, фракционирование или хроматография в соответствии с обычным способом.

Если исходный материал или соединение реагента для каждого этапа является коммерчески доступным, то этот коммерчески доступный продукт может быть использован непосредственно.

В реакции каждого этапа время реакции может различаться в зависимости от реагента или используемого растворителя и обычно составляет от 1 мин до 48 ч, предпочтительно от 10 мин до 8 ч, если не указано иное.

В реакции каждого этапа температура реакции может отличаться в зависимости от реагента или используемого растворителя и обычно составляет от -78 до 300°C , предпочтительно от -78 до 150°C , если не указано иное.

В реакции каждого этапа давление может различаться в зависимости от реагента или используемого растворителя и обычно составляет от 0,1 до 2 мПа, предпочтительно от 0,1 до 0,3 мПа, если не указано иное.

В реакции каждого этапа, например, может быть использовано устройство для микроволнового синтеза, такое как Biotage Initiator. Температура реакции может отличаться в зависимости от используемого реагента или растворителя и обычно составляет от комнатной температуры до 300°C , предпочтительно от комнатной температуры до 250°C , более предпочтительно от 50 до 250°C , если не указано иное. Время реакции может различаться в зависимости от используемого реагента или растворителя и обычно составляет от 1 мин до 48 ч, предпочтительно от 1 мин до 8 ч, если не указано иное.

В реакции каждого этапа реагент используют в количестве от 0,5 до 20 экв., предпочтительно от 0,8 до 5 экв. по отношению к субстрату, если не указано иное. В случае использования реагента в качестве катализатора реагент используют в количестве от 0,001 до 1 экв., предпочтительно от 0,01 до 0,2 экв. по отношению к субстрату. Когда реагент также служит реакционным растворителем, реагент используют в количестве растворителя.

На каждом этапе реакции реакцию проводят без растворителя или путем растворения или суспен-

дирования в подходящем растворителе, если не указано иное. Конкретные примеры растворителя включают в себя следующие вещества.

спирты: метанол, этанол, изопропанол, изобутанол, трет-бутиловый спирт, 2-метоксиэтанол и тому подобное;

простые эфиры: диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, дифениловый эфир, тетрагидрофуран, 1,2-диметоксиэтан и тому подобное;

ароматические углеводороды: хлорбензол, толуол, ксилол и тому подобное;

насыщенные углеводороды: циклогексан, гексан, гептан и тому подобное;

амиды: N,N-диметилформаид, N-метилпирролидон и тому подобное;

галогенированные углеводороды: дихлорметан, четыреххлористый углерод и тому подобное;

нитрилы: ацетонитрил и тому подобное;

сульфоксид: диметилсульфоксид и тому подобное;

ароматические органические основания: пиридин и тому подобное;

ангидриды кислот: уксусный ангидрид и тому подобное;

органические кислоты: муравьиная кислота, уксусная кислота, трифторуксусная кислота и тому подобное;

неорганические кислоты: соляная кислота, серная кислота и тому подобное;

сложные эфиры: этилацетат, изопропилацетатный эфир и тому подобное;

кетоны: ацетон, метилэтилкетон и тому подобное;

вода.

Два или более из этих растворителей можно использовать в виде смеси в соответствующем соотношении.

На каждом этапе реакции с использованием оснований примерами оснований, которые могут быть использованы, являются перечисленные ниже.

неорганические основания: гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид магния и тому подобное;

основные соли: карбонат натрия, карбонат кальция, гидрокарбонат натрия и тому подобное;

органические основания: триэтиламин, диэтиламин, пиридин, 4-диметиламинопиридин, N,N-диметиланилин, 1,4-диазабицикло [2.2.2]октан, 1,8-диазабицикло[5.4.0]-7-ундецен, имидазол, пиперидин и тому подобное;

алкоксиды металлов: этоксид натрия, трет-бутоксид калия, трет-бутоксид натрия и тому подобное;

гидриды щелочных металлов: гидрид натрия и тому подобное;

амиды металлов: амид натрия, диизопропиламид лития, гексаметилдисилазид лития и тому подобное;

органические соли лития: н-бутиллитий, втор-бутиллитий и тому подобное.

На каждом этапе реакции, использующем кислоту или кислотный катализатор, используют следующие кислоты или кислотные катализаторы.

неорганические кислоты: соляная кислота, серная кислота, азотная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота и тому подобное;

органические кислоты: уксусная кислота, трифторуксусная кислота, лимонная кислота, п-толуолсульфоновая кислота, 10-камфорсульфоновая кислота и тому подобное;

Кислота Льюиса: комплекс диэтилового эфира трифторида бора, йодид цинка, безводный хлорид алюминия, безводный хлорид цинка, безводный хлорид железа и тому подобное.

Если не указано иное, каждый этап реакции можно проводить в соответствии со стандартным способом, известным в данной области, таким как описанные в Jikken Kagaku Koza (Encyclopedia of Experimental Chemistry на английском языке), 5th Ed., Vol. 13-19 (под редакцией Химического общества Японии); Shin Jikken Kagaku Koza (New Encyclopedia of Experimental Chemistry на английском языке), Vol. 14-15 (под редакцией Химического общества Японии); тонкая органическая химия, 2-е изд. переработанное (L. F. Fieser, Th. Eicher, Nankodo); именные реакции органической химии; механизм и сущность реакции, переработанное (Hideo Togo, Kodansha); общий органический синтез Vol. I-VII (John Wiley & Sons, Inc.); современный органический синтез в лаборатории: сборник стандартных экспериментальных процедур (Jie Jack Li, Oxford University Press); комплексная гетероциклическая химия III, Vol. 1-14 (Elsevier Japan KK); стратегическое применение именных реакций в органическом синтезе (перевод: Kiyoshi Tomioka, Kagaku-Dojin Publishing); комплексные органические преобразования (VCH Publishers, Inc.), 1989; и т.д.

На каждом этапе реакцию защиты или снятия защиты функциональной группы можно проводить в соответствии со способом, известным в данной области техники, например способом, описанным в "Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Ed." (Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts), Wiley-Interscience, 2007; "Protecting Groups, 3rd Ed." (P.J. Kocienski) Thieme, 2004) и т.п.

Примеры защитной группы для гидроксигруппы или фенольной гидроксигруппы в спиртах или тому подобном включают в себя: защитные группы эфирного типа, такие как метоксиметилловый эфир, бензилловый эфир, п-метоксибензилловый эфир, трет-бутилдиметилсилиловый эфир, трет-бутилдифенилсилиловый эфир и тетрагидропираниловый эфир; защитные группы типа сложного эфира

карбоновой кислоты, такие как сложный эфир уксусной кислоты; защитные группы типа сложного эфира сульфоновой кислоты, такие как сложный эфир метансульфоновой кислоты; и защитные группы типа эфира угольной кислоты, такие как трет-бутилкарбонат.

Примеры защитной группы для карбонильной группы в альдегидах включают в себя защитные группы ацетального типа, такие как диметилацеталь; и циклические защитные группы ацетального типа, такие как циклический 1,3-диоксан.

Примеры защитной группы для карбонильной группы в кетонах включают в себя защитные группы кетального типа, такие как диметилкеталь; защитные группы циклического кетального типа, такие как циклический 1,3-диоксан; защитные группы оксимного типа, такие как О-метилоксим; и защитные группы гидразонового типа, такие как N,N-диметилгидразон.

Примеры защитной группы для карбоксильной группы включают в себя защитные группы сложноэфирного типа, такие как сложный метиловый эфир; и защитные группы амидного типа, такие как N,N-диметиламид.

Примеры защитной группы для тиола включают в себя защитные группы эфирного типа, такие как бензилтиоэфир; и защитные группы сложноэфирного типа, такие как сложный эфир тиоуксусной кислоты, тиокарбонат и тиокарбамат.

Примеры защитной группы для аминогруппы или ароматического гетероцикла, такого как имидазол, пиррол или индол, включают в себя: защитные группы карбаматного типа, такие как бензилкарбамат; защитные группы амидного типа, такие как ацетамид; защитные группы типа алкиламина, такие как N-трифенилметиламин; и защитные группы сульфонамидного типа, такие как метансульфонамид.

Защитные группы могут быть удалены с помощью способа, известного в данной области техники, например, с использованием кислоты, основания, ультрафиолетового света, гидразина, фенилгидразина, N-метилдитиокарбамата натрия, тетрабутиламмонийфторида, ацетата палладия или триалкилсилилгалогенида (например, триметилсилилйодида или триметилсилилбромид), или способом восстановления.

На каждом этапе с использованием реакции восстановления примеры восстанавливающих агентов, которые могут быть использованы, включают в себя: гидриды металлов, такие как литийалюминийгидрид, триацетоксиборгидрид натрия, цианоборогидрид натрия, диизобутилалюминийгидрид (DIBAL-H), борогидрид натрия и триацетоксиборгидрид тетраметиламмония; бораны, такие как боран-тетрагидрофурановый комплекс; никель Ренея; кобальт Ренея; водород и муравьиную кислоту. Например, никель Ренея или кобальт Ренея можно использовать в присутствии водорода или муравьиной кислоты. В случае восстановления углерод-углеродной двойной связи или тройной связи может быть использован способ с использованием катализатора, такого как палладий на углеводе или катализатор Линдлара.

На каждом этапе с использованием реакции окисления примеры окислителей, которые можно использовать, включают в себя: перкислоты, такие как м-хлорпербензойная кислота (м-ХПБК), пероксид водорода и трет-бутилгидропероксид; перхлораты, такие как перхлорат тетрабутиламмония; хлораты, такие как хлорат натрия; хлориты, такие как хлорит натрия; периодаты, такие как периодат натрия; реагенты с содержанием высоковалентного йода, такие как йодозилбензол; марганцевые реагенты, такие как диоксид марганца и перманганат калия; свинцовые реагенты, такие как тетраацетат свинца; реагенты хрома, такие как хлорхромат пиридиния (PCC), дихромат пиридиния (PDC) и реагент Джонса; галогеновые соединения, такие как N-бромсукцинимид (NBS); кислород; озон; комплекс триоксида серы с пиридином; тетроксид осмия; диоксид селена; и 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон (DDQ).

На каждом этапе с использованием реакции радикальной циклизации примеры инициаторов радикальной полимеризации, которые могут быть использованы, включают в себя: азосоединения, такие как азобисизобутиронитрил (AIBN); водорастворимые инициаторы радикальной полимеризации, такие как 4-4'-азобис-4-цианопентановая кислота (ACPA); триэтилборон в присутствии воздуха или кислорода; и бензоилпероксид. Примеры используемых инициаторов радикальной полимеризации включают в себя трибутилстаннан, тристриметилсилилсилан, 1,1,2,2-тетрафенилдисилан, дифенилсилан и иодид самария.

На каждом этапе с использованием реакции Виттига примеры реагентов Виттига, которые могут быть использованы, включают в себя алкилиденфосфораны. Алкилиденфосфораны могут быть получены способом, известным в данной области техники, например, реакцией между солью фосфония и сильным основанием.

На каждом этапе с использованием реакции Хорнера-Эммонса примеры реагентов, которые могут быть использованы, включают в себя сложные эфиры фосфоноуксусной кислоты, такие как метилдиметилфосфоноацетат и этилдиэтилфосфоноацетат, и основания, такие как гидриды щелочных металлов и органические соли лития.

На каждом этапе с использованием реакции Фриделя-Крафтса примеры реагентов, которые можно использовать, включают в себя кислоту Льюиса и хлорангидрид или алкилирующий агент (например, алкилгалогениды, спирты и олефины). Альтернативно, вместо кислоты Льюиса можно использовать органическую или неорганическую кислоту, а вместо хлорангидрида кислоты можно использовать ангидриды кислот, такие как уксусный ангидрид.

На каждом этапе с использованием реакции ароматического нуклеофильного замещения в качестве

реагентов можно использовать нуклеофил (например, амин или имидазол) и основание (например, основную соль или органическое основание).

На каждом этапе с использованием реакции нуклеофильного присоединения с использованием карбаниона, реакции нуклеофильного 1,4-присоединения (реакции присоединения Михаэля) с использованием карбаниона или реакции нуклеофильного замещения с использованием карбаниона, примеры оснований, которые можно использовать для получения карбаниона, включают в себя литийорганические реагенты, алкоксиды металлов, неорганические основания и органические основания.

На каждом этапе с использованием реакции Гриньяра примеры реагентов Гриньяра, которые могут быть использованы, включают в себя галогениды арилмагния, такие как бромид фенилмагния, и галогениды алкилмагния, такие как бромистый метилмагний, изопропилмагнийбромид. Реагент Гриньяра может быть получен способом, известным в данной области техники, например, реакцией между алкилгалогенидом или арилгалогенидом и металлическим магнием в эфире или тетрагидрофуране в качестве растворителя.

На каждом этапе с использованием реакции конденсации Кневенагеля активное метиленовое соединение, фланкированное двумя электронно-притягивающими группами (например, малоновой кислотой, диэтилмалонатом или малононитрилом), и основание (например, органические основания, алкоксиды металлов или неорганические основания) могут быть использованы в качестве реагентов.

На каждом этапе с использованием реакции Вильсмейера-Хаака в качестве реагентов можно использовать фосфорилхлорид и производное амида (например, N,N-диметилформамид).

На каждом этапе с использованием реакции азидирования спиртов, алкилгалогенидов или сложных эфиров сульфоновой кислоты примеры азидирующих агентов, которые могут быть использованы, включают в себя дифенилфосфорилазид (DPPA), триметилсилилазид и азид натрия. В случае азидирования, например, спиртов, может применяться способ с использованием дифенилфосфорилазида и 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундец-7-ена (DBU), способ с использованием триметилсилилазида и кислоты Льюиса или тому подобное.

На каждом этапе с использованием реакции восстановительного аминирования примеры восстановителей, которые могут быть использованы, включают в себя триацетоксиборгидрид натрия, цианоборгидрид натрия, водород и муравьиную кислоту. Когда субстрат представляет собой соединение амина, примеры карбонильных соединений, которые могут быть использованы, включают в себя п-формальдегид, а также альдегиды, такие как ацетальдегид, и кетоны, такие как циклогексанон. Когда субстрат представляет собой карбонильное соединение, примеры аминов, которые можно использовать, включают первичные амины, такие как аммиак и метиламин, и вторичные амины, такие как диметиламин.

На каждом этапе с использованием реакции Мицунобу в качестве реагентов можно использовать сложные эфиры азodicарбоновой кислоты (например, диэтилазodicарбоксилат (DEAD) и диизопропилазodicарбоксилат (DIAD)) и трифенилфосфин.

На каждом этапе с использованием реакции этерификации, амидирования или введения мочевины примеры реагентов, которые можно использовать, включают в себя ацилгалогениды, такие как хлорангидриды или бромиды кислот, и активированные карбоновые кислоты, такие как ангидриды кислот, активные сложные эфиры или сложные эфиры сульфатов. Примеры активирующих агентов для карбоновых кислот включают в себя: карбодиимидные конденсирующие агенты, такие как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (WSCD); триазиновые конденсирующие агенты, такие как 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина хлорид-н-гидрат (DMT-MM); конденсирующие агенты на основе сложных эфиров угольной кислоты, такие как 1,1-карбонилдимидазол (CDI); дифенилфосфорилазид (DPPA); соль бензотриазол-1-илокси-трисдиметиламинофосфония (реагент BOP); Йодид 2-хлор-1-метилпиридиния (реагент Мукайяма); тионилхлорид; низший алкилгалогенформиат, такой как этилхлорформиат; O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат (HATU); серная кислота; и их комбинации. В случае использования карбодиимидного конденсирующего агента может быть полезным добавление в реакцию такой добавки, как 1-гидроксибензотриазол (HOBT), N-гидроксисукцинимид (HOSu) или диметиламинопиридин (DMAP).

На каждом этапе с использованием реакции синтеза примеры металлических катализаторов, которые могут использоваться, включают в себя соединения палладия, такие как ацетат палладия (II), тетраakis(трифенилфосфин)палладий (0), дихлорбис(трифенилфосфин)палладий (II), дихлорбис(триэтилфосфин)палладий (II), трис(добензилиденацетон)дипалладий (0), 1,1'-бис(дифенилфосфино) ферроцен палладий (II), хлорид и ацетат палладия (II); соединения никеля, такие как тетраakis(трифенилфосфин)никель (0); родиевые соединения, такие как трис(трифенилфосфин)родий (III) хлорид; соединения кобальта; соединения меди, такие как оксид меди и йодид меди (I); и соединения платины. Добавление основания к реакции также может быть полезным. Примеры таких оснований включают в себя неорганические основания и основные соли.

На каждом этапе с использованием реакции тиокарбонилирования в качестве тиокарбонилирующего агента обычно используют дифосфор пентасульфид. Реагент, имеющий 1,3,2,4-дитиадифосфетан-2,4-дисульфидную структуру, такой как 2,4-бис(4-метоксифенил-1,3,2,4-дитиадифосфетан-2,4-дисульфид

(регент Лавессона) может быть использован вместо дифосфорного пентасульфида.

На каждом этапе с использованием реакции Воля-Циглера примеры галогенирующих агентов, которые могут быть использованы, включают в себя N-йодсукцинимид, N-бромсукцинимид (NBS), N-хлорсукцинимид (NCS), бром и сульфурилхлорид. Реакция может быть ускорена путем дополнительного добавления инициатора радикальной полимеризации, такого как тепло, свет, бензоилпероксид или азобисизобутиронитрил.

На каждом этапе с использованием реакции галогенирования гидроксигруппы примеры галогенирующих агентов, которые можно использовать, включают в себя галогенводородную кислоту или галогенангидрид неорганической кислоты; примеры включают в себя соляную кислоту, тионилхлорид и оксихлорид фосфора для хлорирования и 48% бромистоводородную кислоту для бромирования. Кроме того, также может быть использован способ получения алкилгалогенида из спирта под действием трифенилфосфина и четыреххлористого углерода или четырехбромистого углерода и т.д. Альтернативно, также может быть использован способ синтеза алкилгалогенида посредством двухстадийной реакции, включающей превращение спирта в сложный эфир сульфоновой кислоты и последующую реакцию с бромидом лития, хлоридом лития или йодидом натрия.

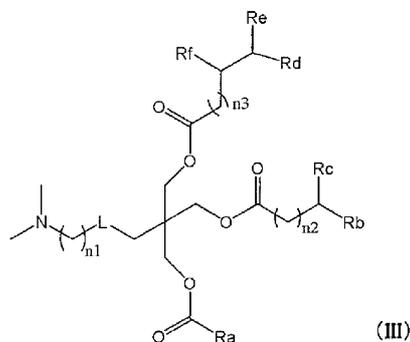
На каждом этапе с использованием реакции Арбузова примеры реагентов, которые можно использовать, включают в себя алкилгалогениды, такие как бромэтилацетат, и фосфиты, такие как триэтилфосфит и три(изопропил)фосфит.

На каждом этапе с использованием реакции этерификации сульфонами примеры используемого сульфонилирующего агента включают в себя метансульфонилхлорид, п-толуолсульфонилхлорид, метансульфоновый ангидрид и п-толуолсульфоновый ангидрид и трифторметансульфоновый ангидрид.

На каждом этапе с использованием реакции гидролиза в качестве реагента может быть использована кислота или основание. В случае проведения реакции кислотного гидролиза трет-бутилового эфира, реагенты, такие как муравьиная кислота, триэтилсилан или тому подобное, могут быть добавлены для восстановительного улавливания побочного продукта катиона трет-бутила.

На каждом этапе с использованием реакции дегидратации примеры дегидратирующих агентов, которые можно использовать, включают в себя серную кислоту, пентаоксид дифосфора, оксихлорид фосфора, N,N'-дициклогексилкарбодимид, оксид алюминия и полифосфорную кислоту.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения можно упомянуть катионный липид, представленный следующей структурной формулой (III) (далее также называемый "Соединение (III)"). Соединение, представленное

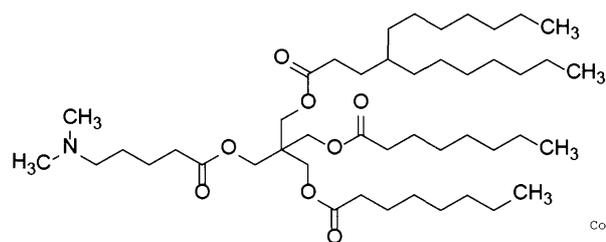


где

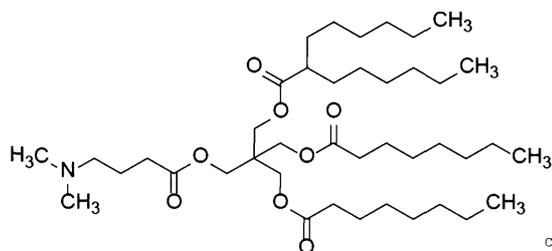
n_1 представляет собой целое число от 2 до 6, n_2 представляет собой целое число от 0 до 2, n_3 представляет собой целое число от 0 до 2, L представляет собой $-C(O)O-$ или $-NH(C(O)O)-$,

R_a представляет собой линейную C_{5-13} алкильную группу, линейную C_{13-17} алкенильную группу или линейную C_{17} алкадиенильную группу, R_b представляет собой линейную C_{2-9} алкильную группу, R_c представляет собой атом водорода или линейную C_{2-9} алкильную группу, R_d представляет собой атом водорода или линейную C_{2-9} алкильную группу, R_e представляет собой линейную C_{2-9} алкильную группу и R_f представляет собой линейную C_{2-9} алкильную группу или его соль. Более предпочтительно можно упомянуть следующую структурную формулу, представленную катионным липидом.

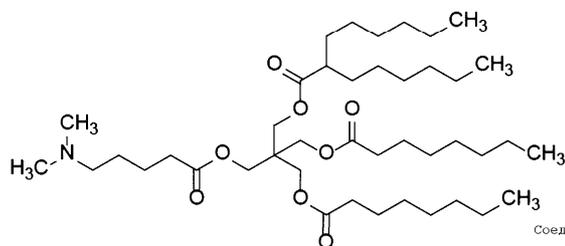
047415



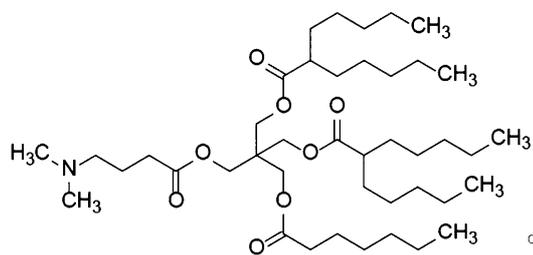
Соединение 22



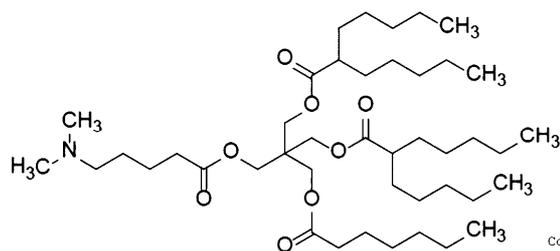
Соединение 23



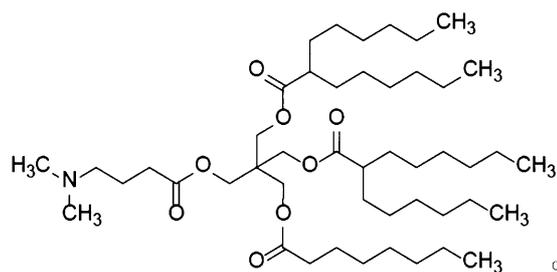
Соединение 24



Соединение 25

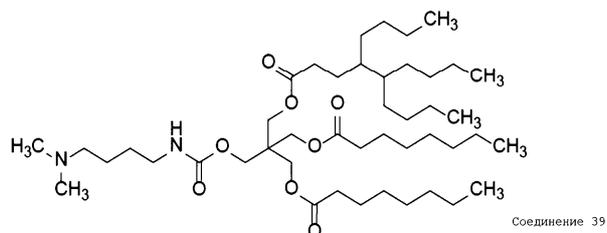
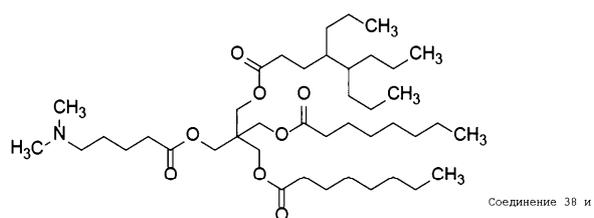
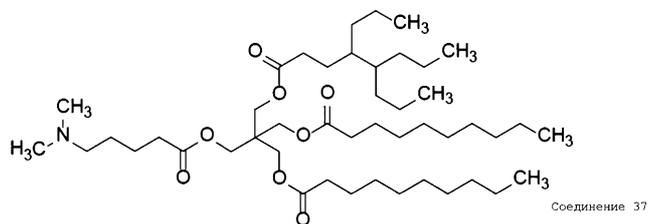
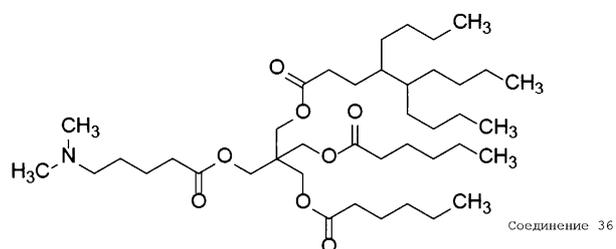
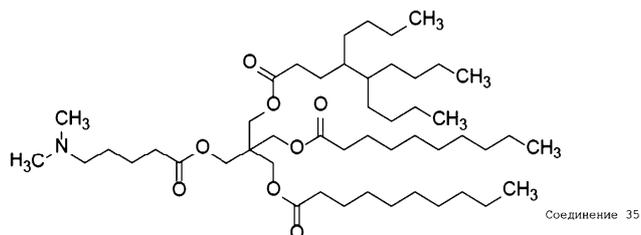
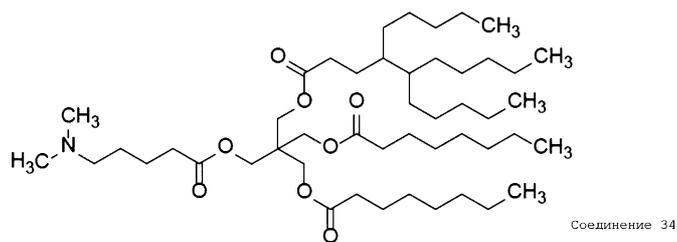


Соединение 26



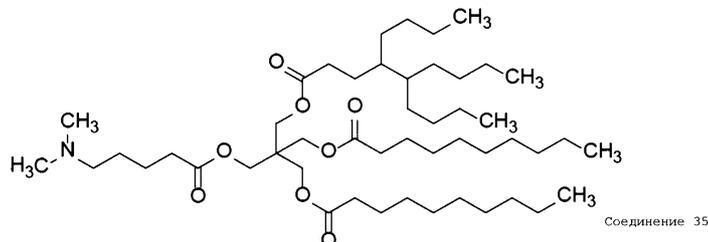
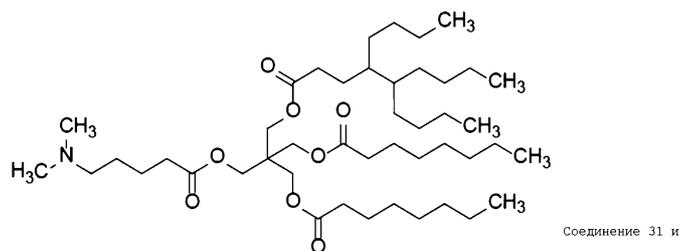
Соединение 27

047415



и их соли.

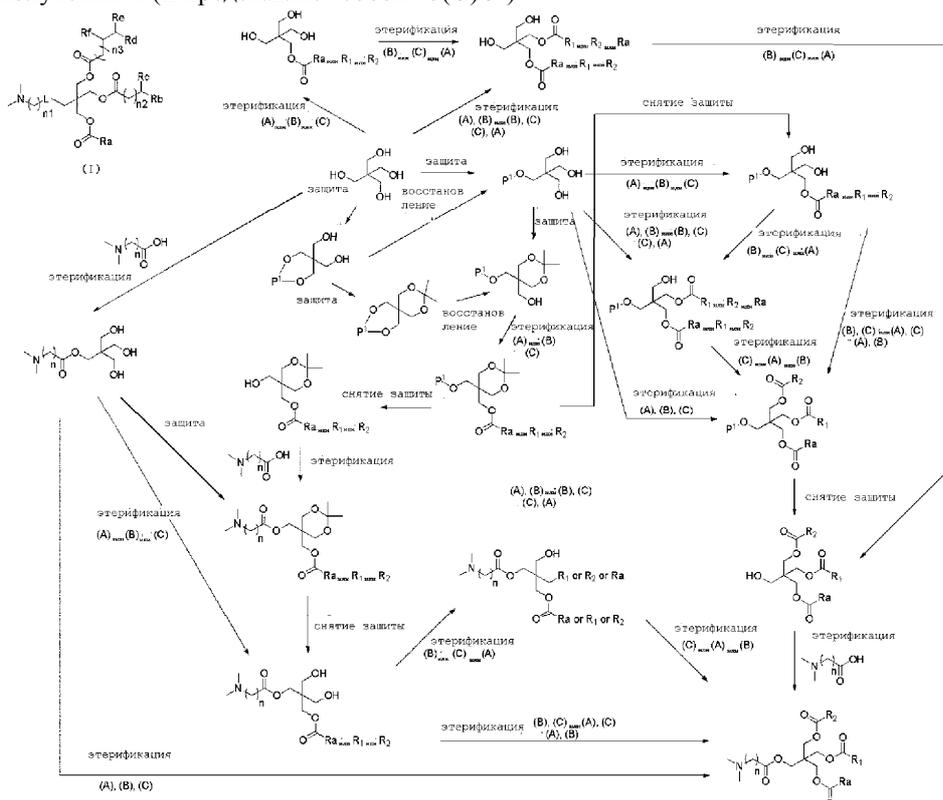
Среди вышеупомянутых катионных липидов более предпочтительным является катионный липид, представленный следующей структурной формулой:

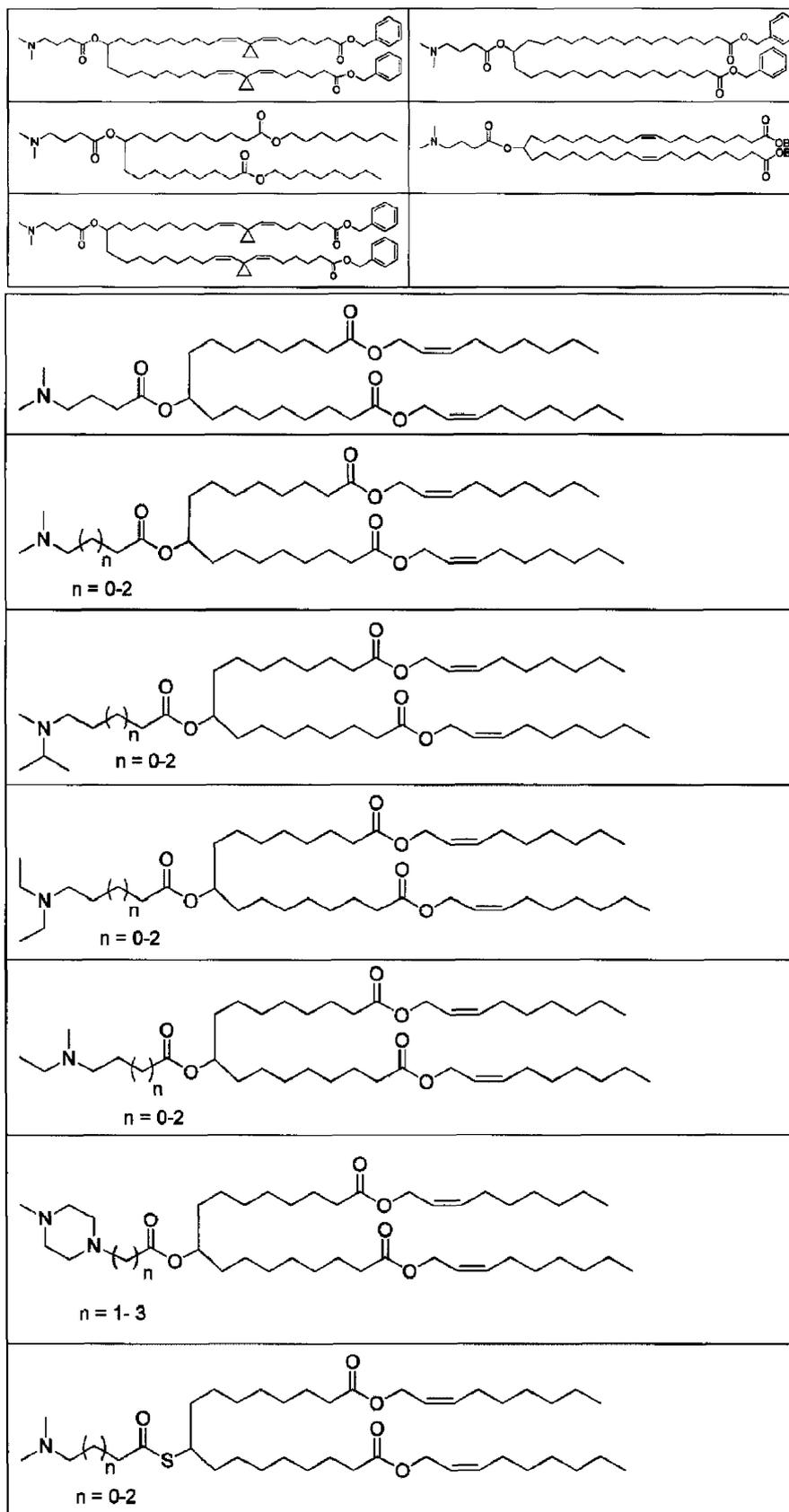


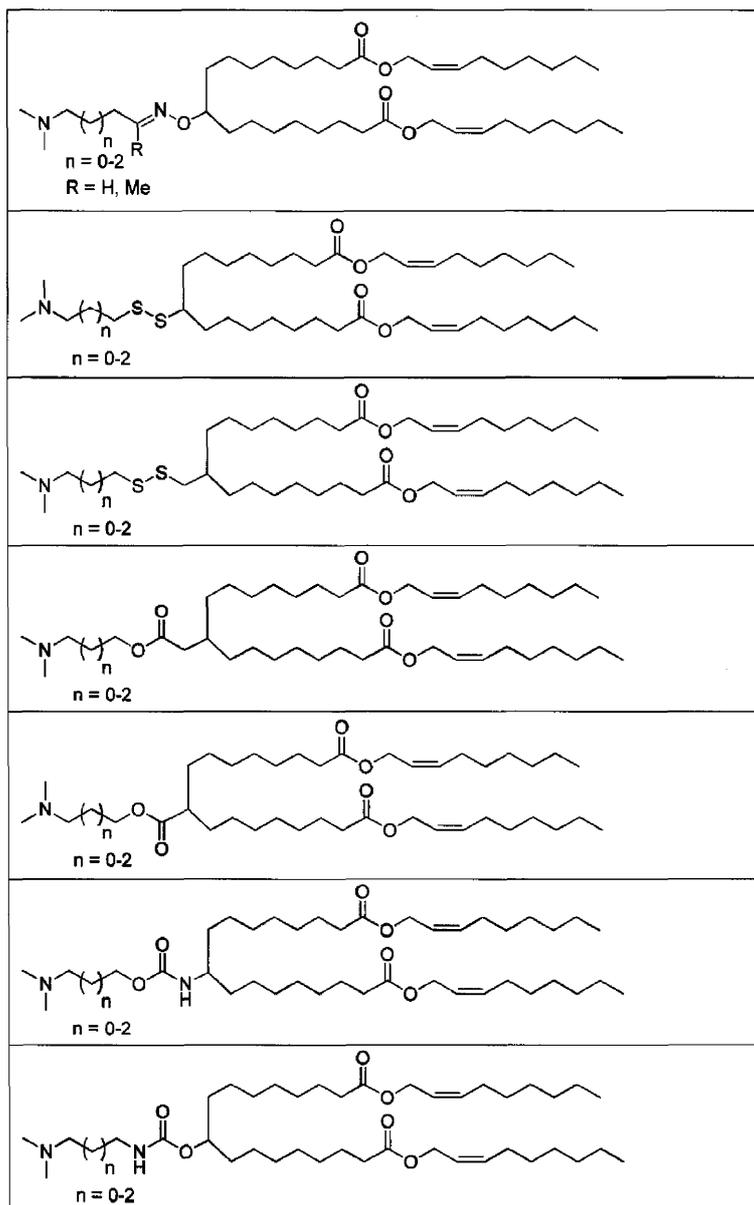
и их соли.

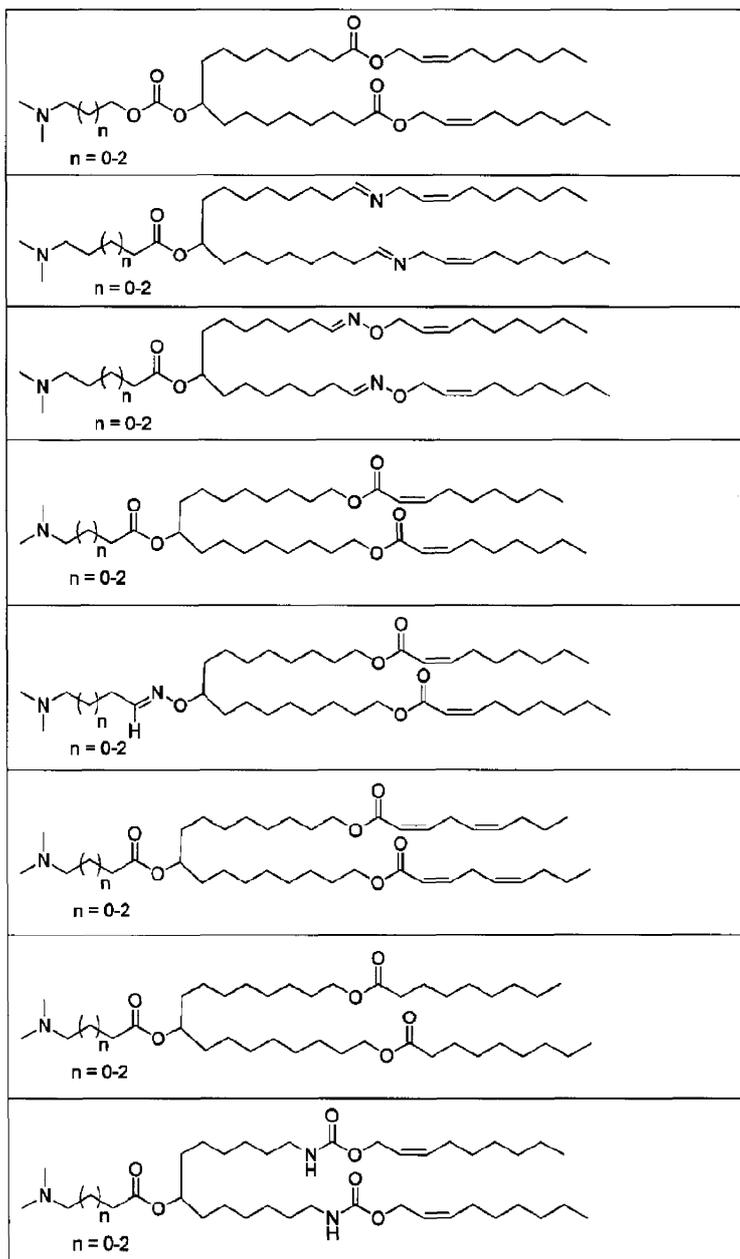
Соединение (III) может быть произведено, например, следующими способами получения. В частности, соединение (I) с желаемой структурой может быть синтезировано с использованием соответствующих исходных материалов в соответствии со структурой желаемого соединения (III) в процессе этерификации. Соль соединения (III) может быть получена путем соответствующего смешивания с неорганическим основанием, органическим основанием, органической кислотой, основной или кислой аминокислотой.

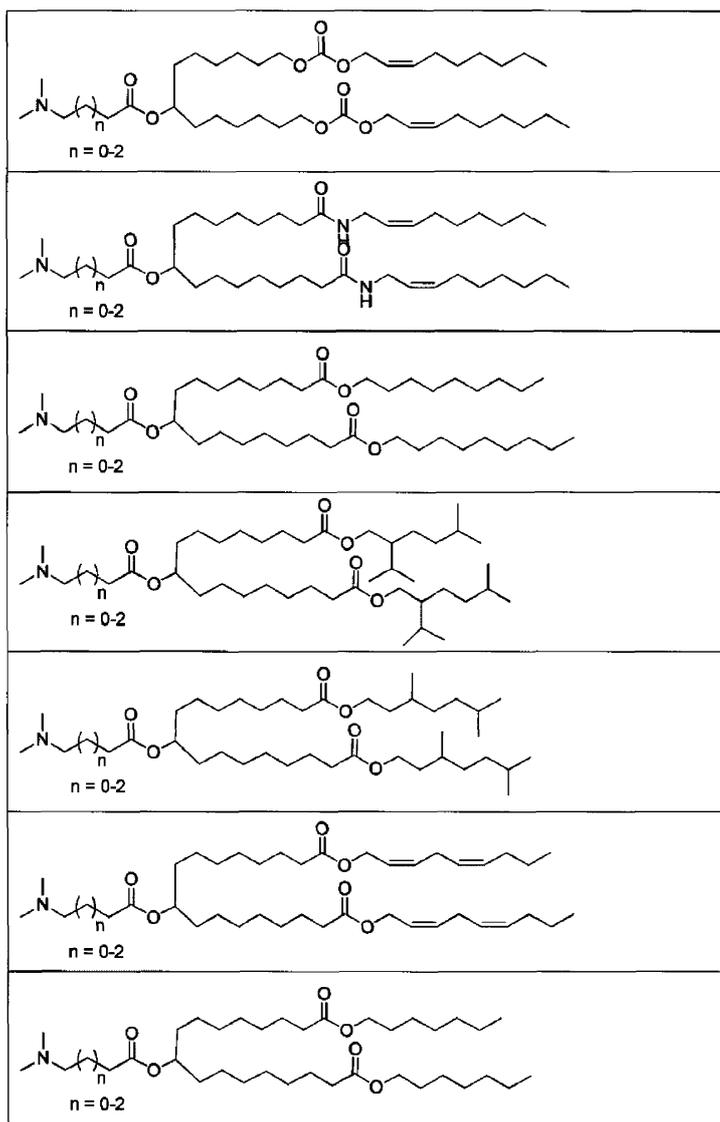
Способ получения А (L представляет собой -C(O)O-)

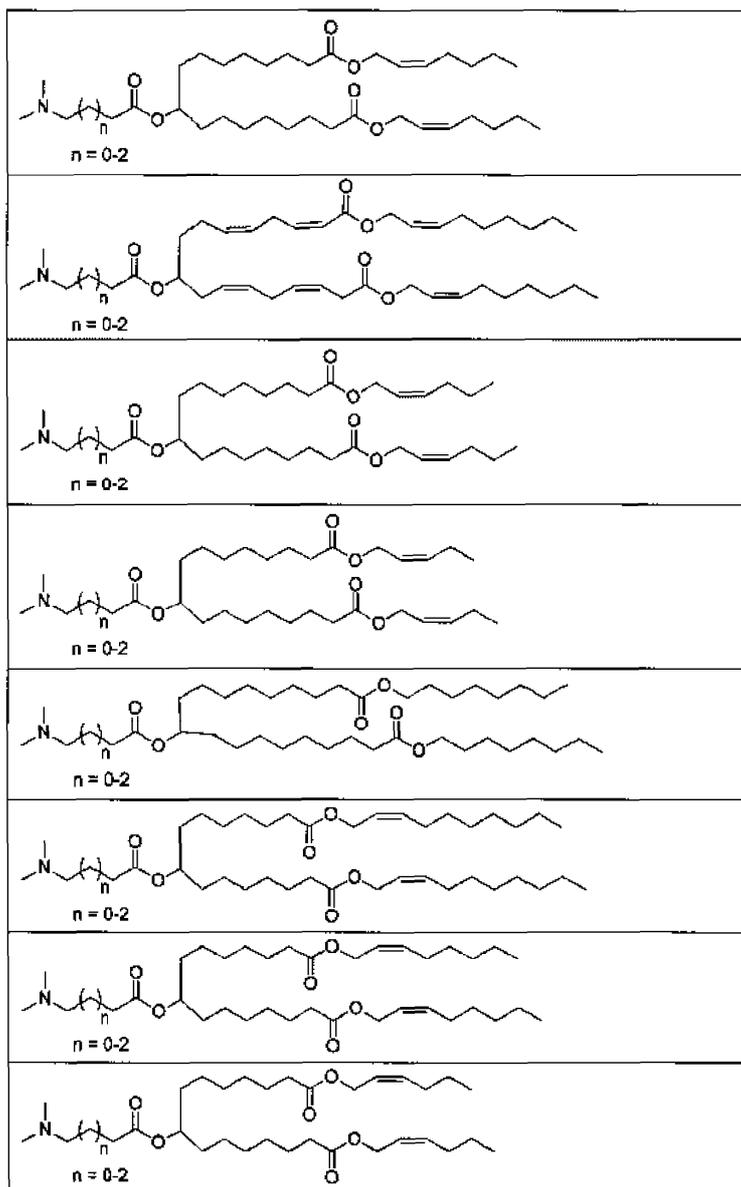


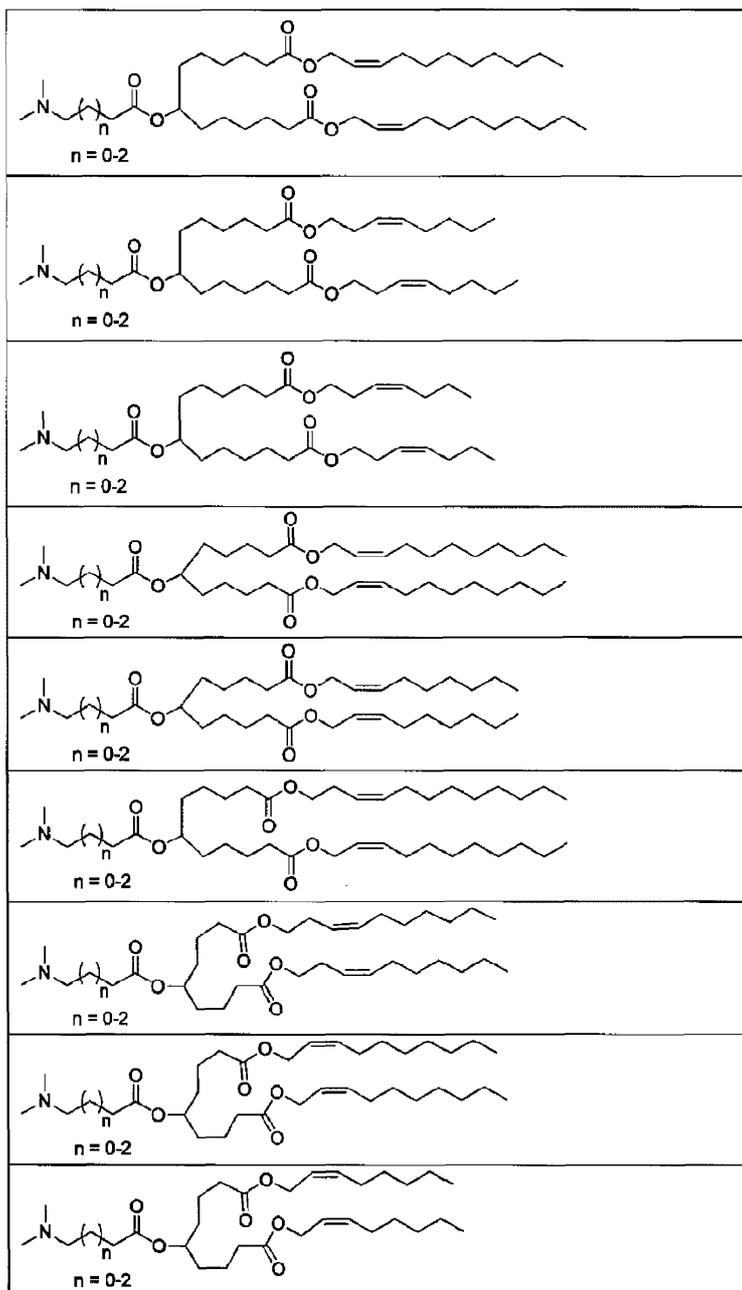


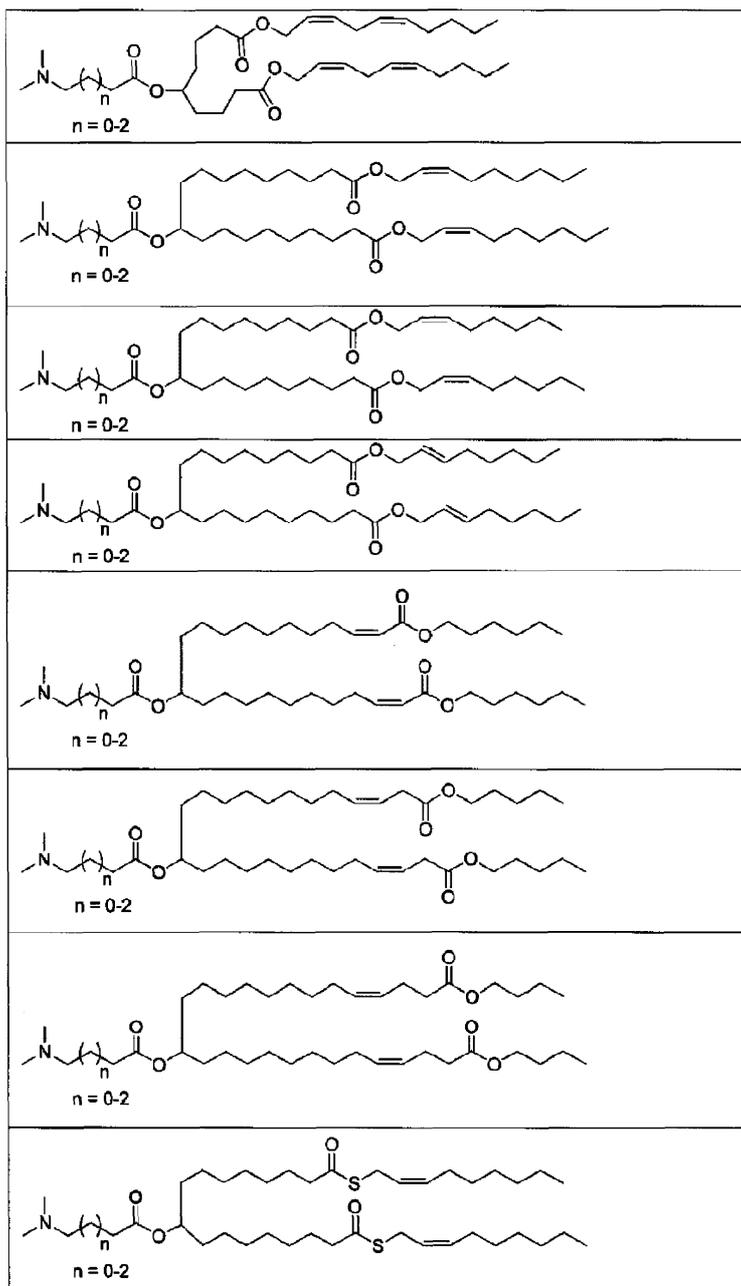


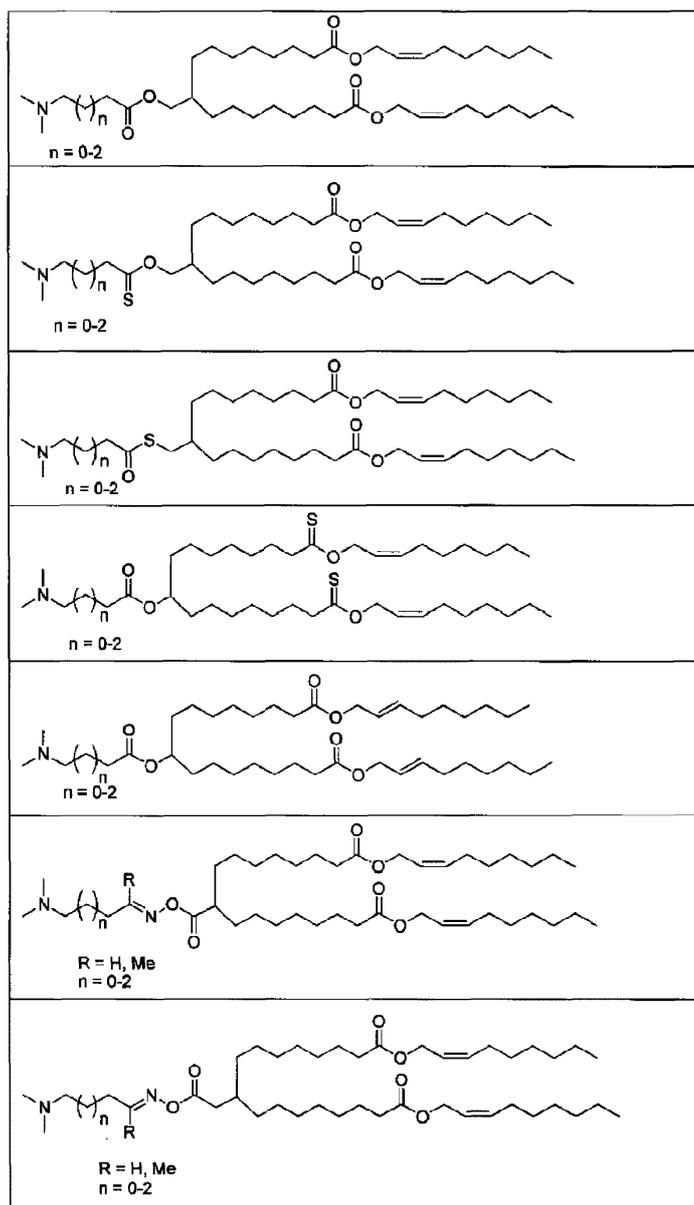


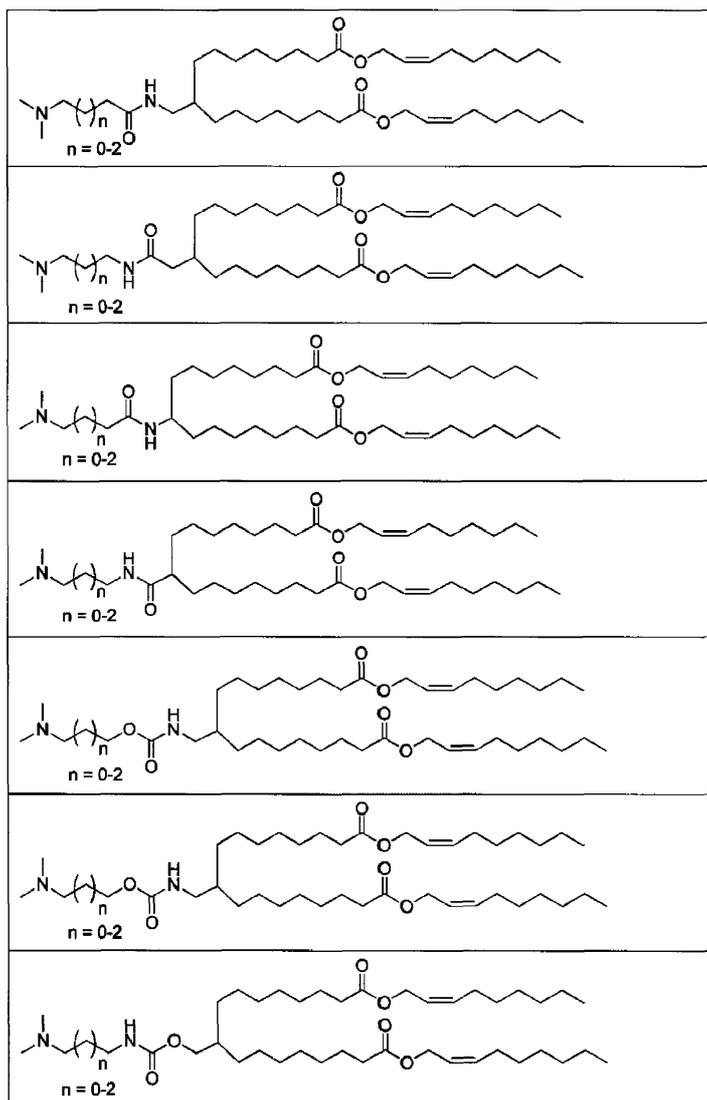


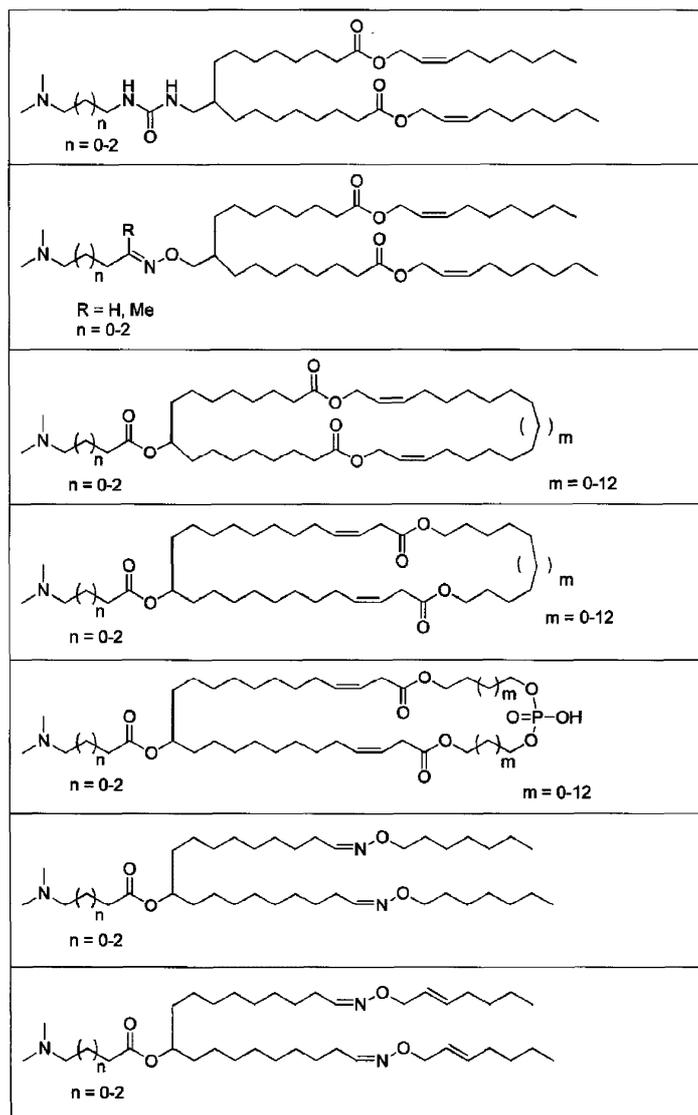


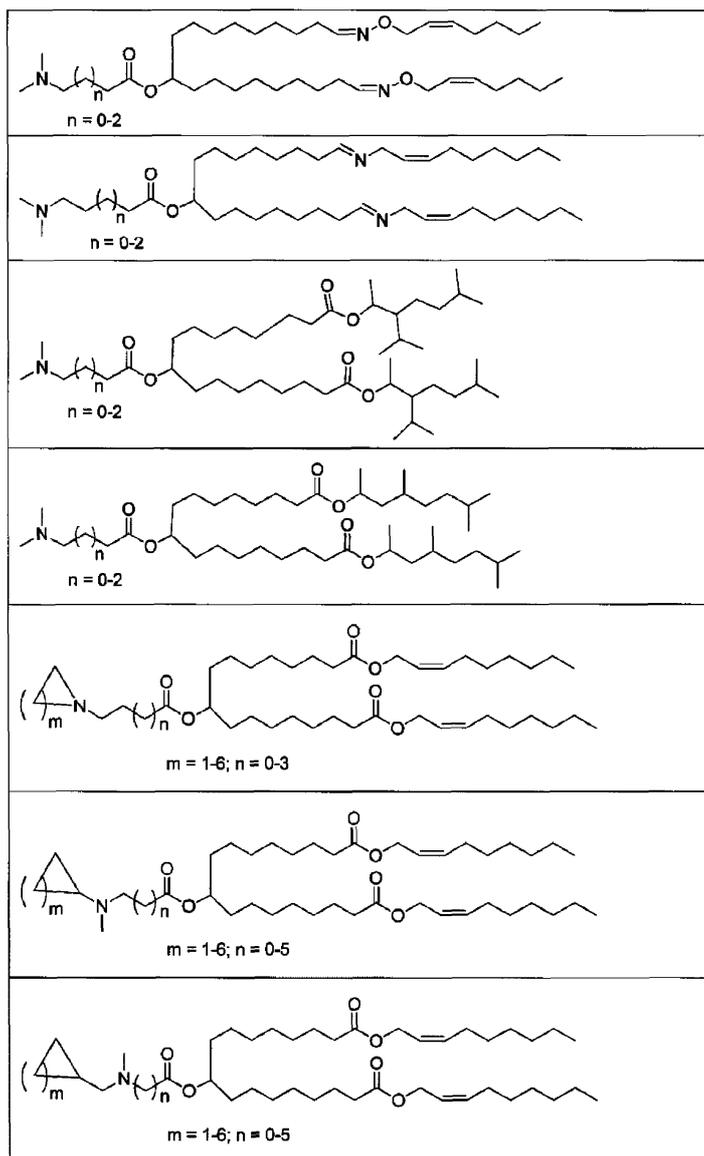


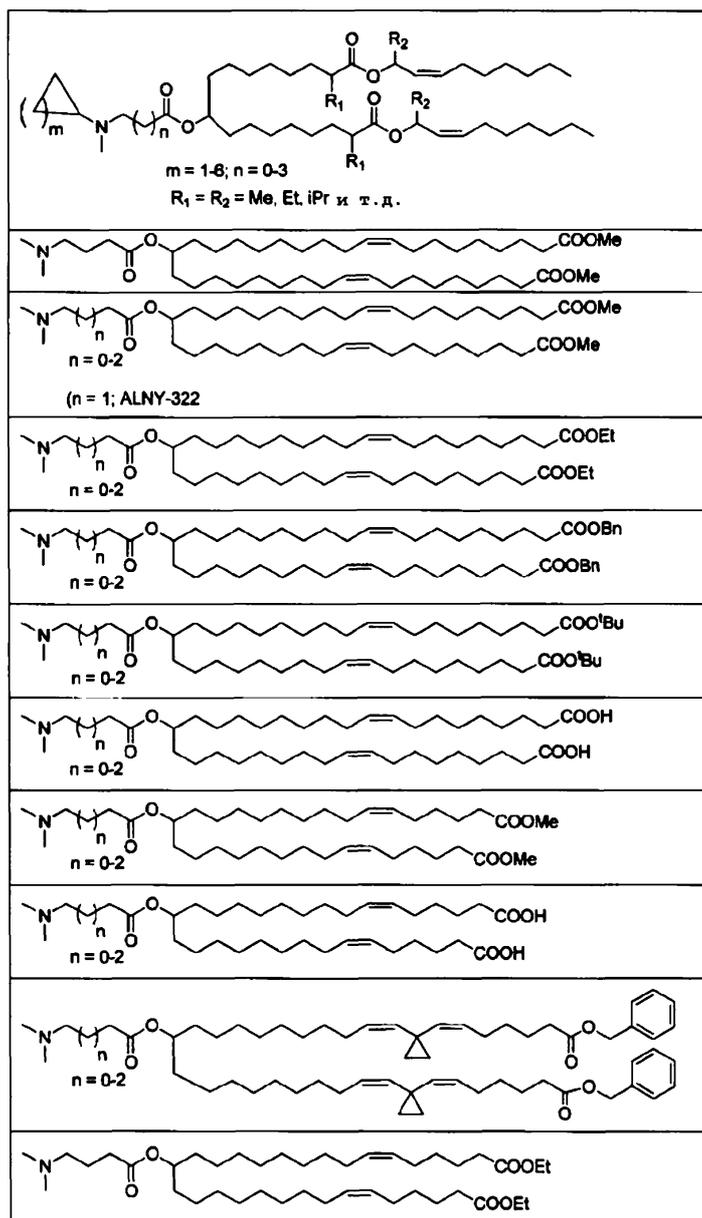


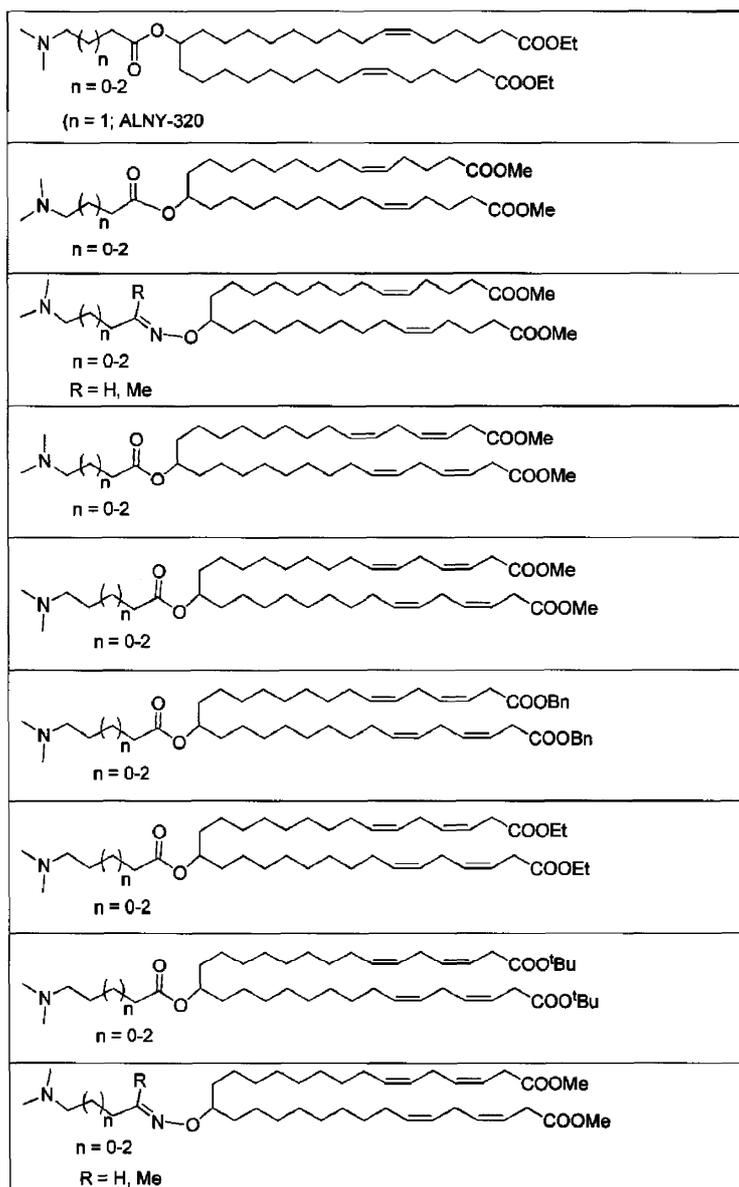


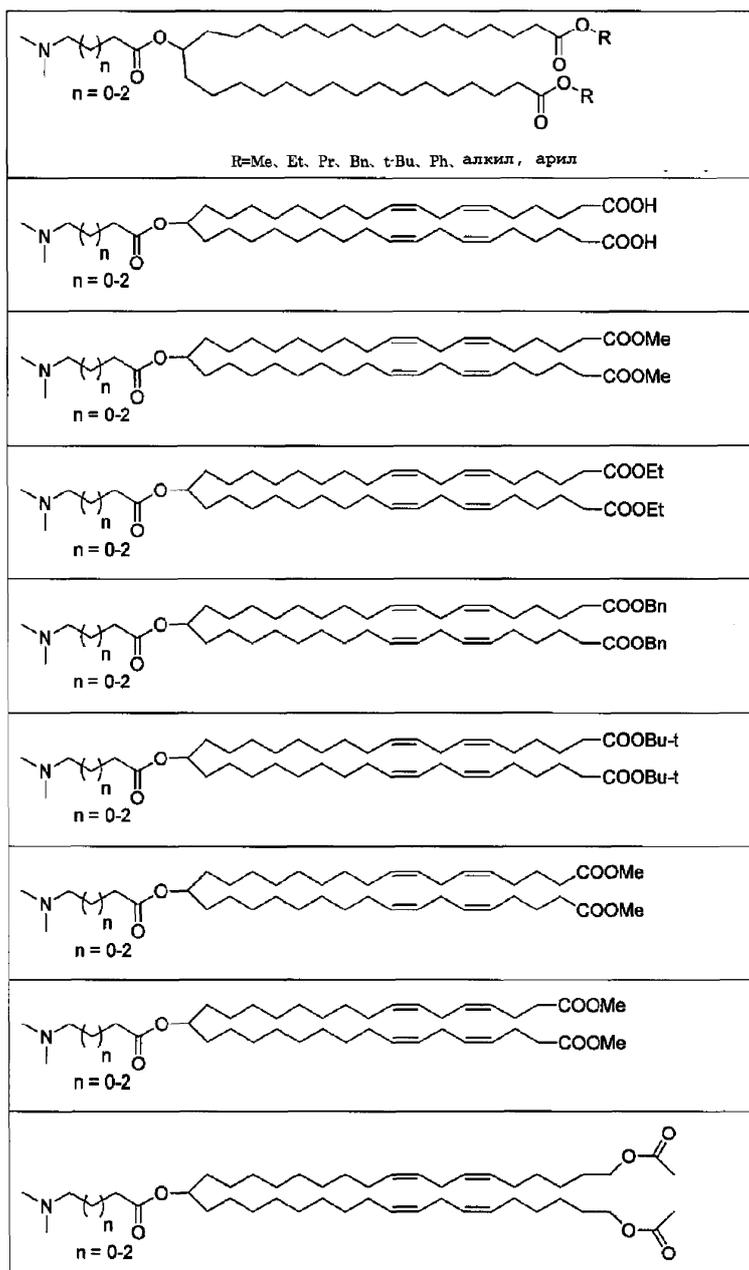


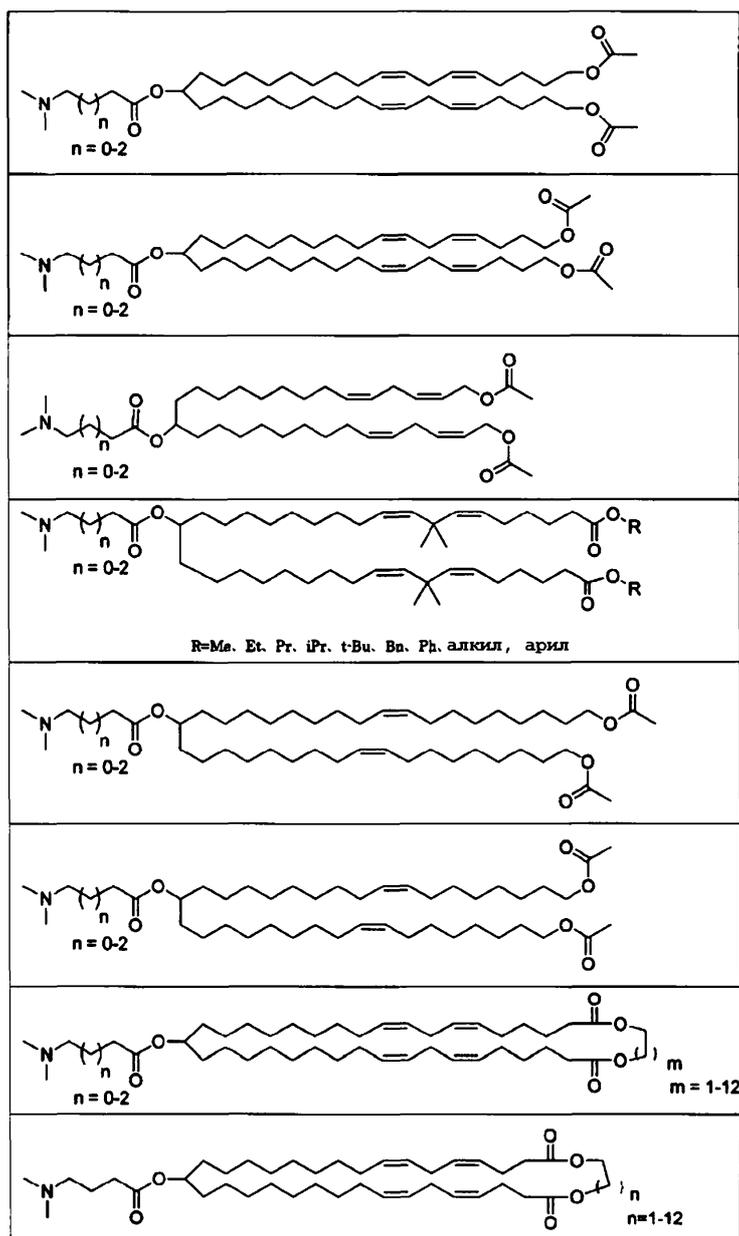


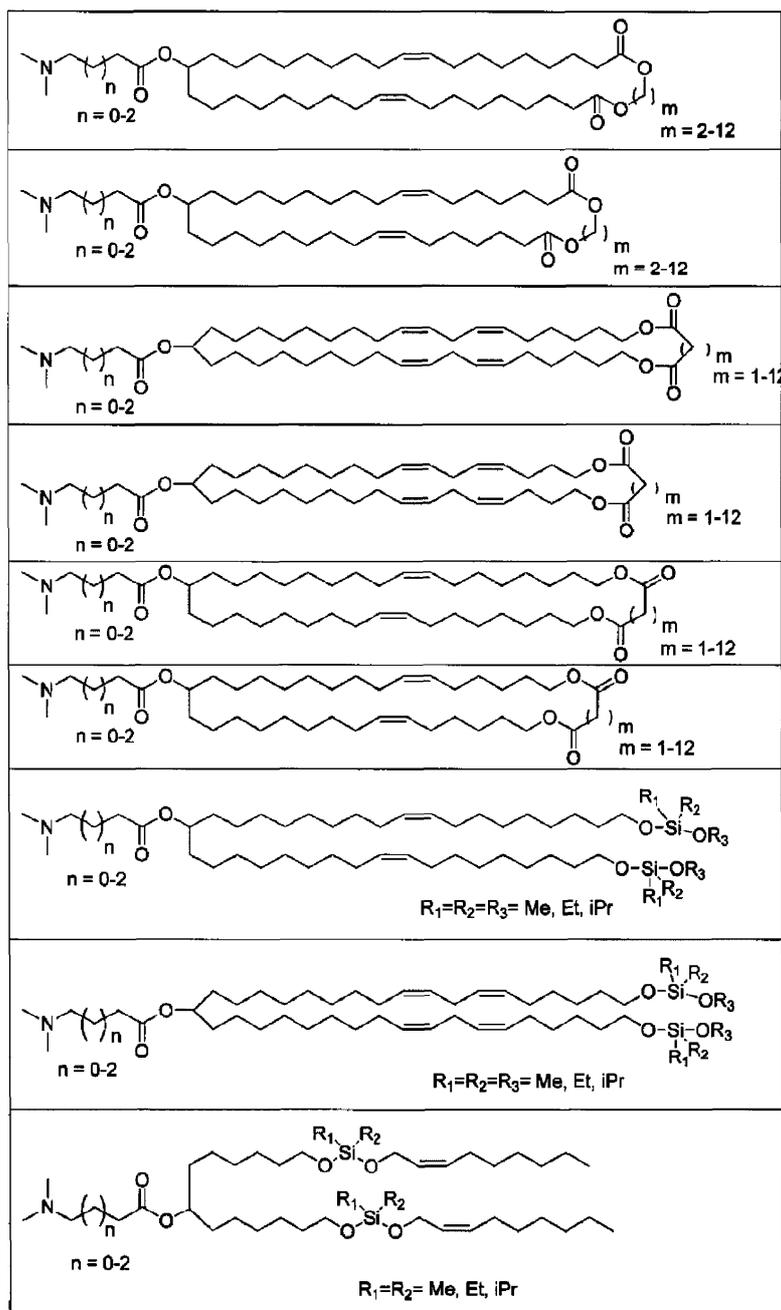


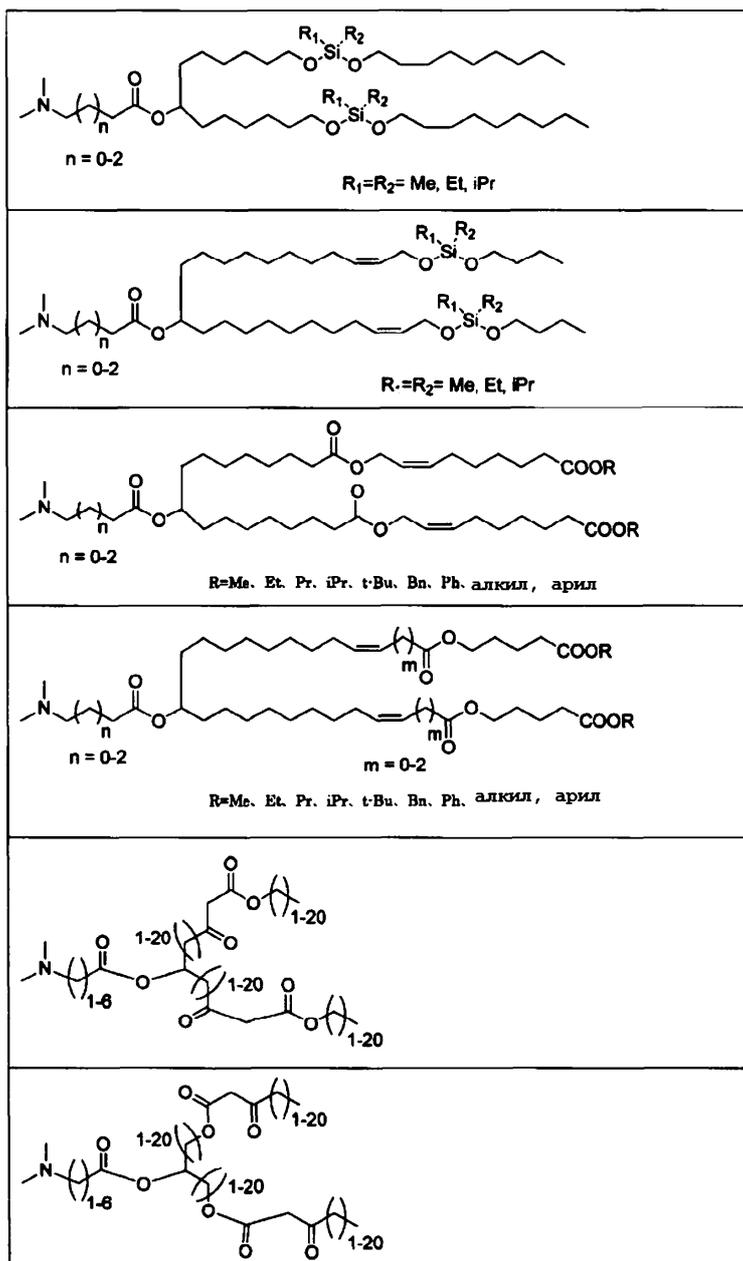


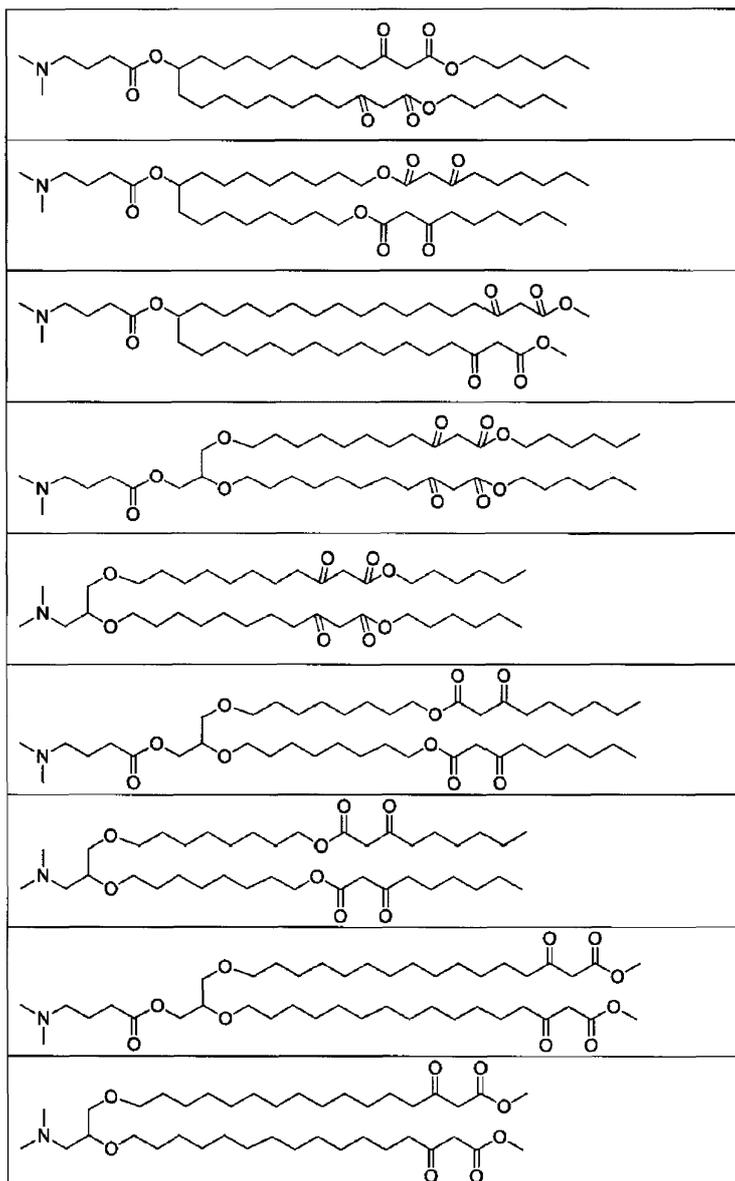


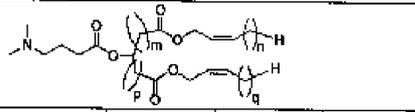
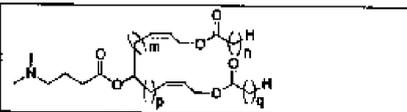




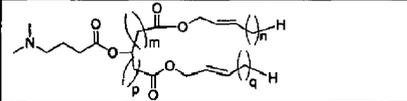
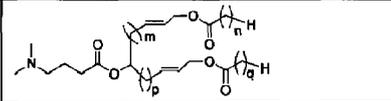




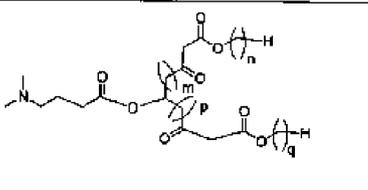
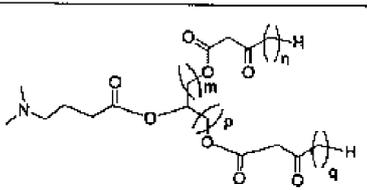


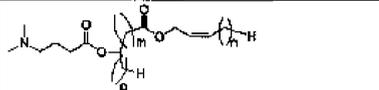
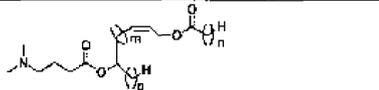
							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9

8	5	10	9	8	8	8	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	1	12	12	1	12	1
2	11	2	11	11	2	11	2
3	10	3	10	10	3	10	3
4	9	4	9	9	4	9	4
5	8	5	8	8	5	8	5
6	7	6	7	7	6	7	6
7	6	7	6	6	7	6	7
8	5	8	5	5	8	5	8
9	4	9	4	4	9	4	9
10	3	10	3	3	10	3	10
11	2	11	2	2	11	2	11
12	1	12	1	1	12	1	12
1	12	2	11	12	1	11	2
2	11	3	10	11	2	10	3
3	10	4	9	10	3	9	4
4	9	5	8	9	4	8	5
5	8	6	7	8	5	7	6
6	7	7	6	7	6	6	7
7	6	8	5	6	7	5	8
8	5	9	4	5	8	4	9
9	4	10	3	4	9	3	10
10	3	11	2	3	10	2	11
11	2	12	1	2	11	1	12
12	1	1	12	1	12	12	1
1	12	3	10	12	1	10	3
2	11	4	9	11	2	9	4
3	10	5	8	10	3	8	5
4	9	6	7	9	4	7	6
5	8	7	6	8	5	6	7
6	7	8	5	7	6	5	8
7	6	9	4	6	7	4	9

8	5	10	3	5	8	3	10
9	4	11	2	4	9	2	11
10	3	12	1	3	10	1	12
11	2	2	11	2	11	11	2
12	1	4	9	1	12	10	3
1	12	4	9	12	1	9	4
2	11	5	8	11	2	8	5
3	10	6	7	10	3	7	6
4	9	7	6	9	4	6	7
5	8	8	5	8	5	5	8
6	7	9	4	7	6	4	9
7	6	10	3	6	7	3	10
8	5	11	2	5	8	2	11
9	4	12	1	4	9	1	12
10	3	2	11	3	10	11	2
11	2	3	10	2	11	10	3
12	1	4	9	1	12	11	2
1	12	5	8	12	1	8	5
2	11	6	7	11	2	7	6
3	10	7	6	10	3	6	7
4	9	8	5	9	4	5	8
5	8	9	4	8	5	4	9
6	7	10	3	7	6	3	10
7	6	11	2	6	7	2	11
8	5	12	1	5	8	1	12
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	10	3
11	2	4	9	2	11	11	2
12	1	5	8	1	12	12	1
1	12	6	7	12	1	7	6
2	11	7	6	11	2	6	7
3	10	8	5	10	3	5	8
4	9	9	4	9	4	4	9
5	8	10	3	8	5	3	10
6	7	11	2	7	6	2	11
7	6	12	1	6	7	1	12
8	5	2	11	5	8	11	2
9	4	3	10	4	9	10	3
10	3	4	9	3	10	11	2
11	2	5	8	2	11	12	1
12	1	6	7	1	12	1	12
1	12	7	6	12	1	6	7
2	11	8	5	11	2	5	8
3	10	9	4	10	3	4	9
4	9	8	5	9	4	3	10
5	8	9	4	8	5	2	11
6	7	10	3	7	6	1	12
7	6	11	2	6	7	11	2
8	5	12	1	5	8	10	3
9	4	2	11	4	9	11	2
10	3	3	10	3	10	12	1
11	2	4	9	2	11	1	12
12	1	5	8	1	12	2	11

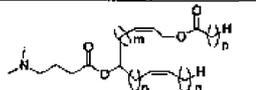
							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	13	1	13	1	13	1	13
2	12	2	12	2	12	2	12
3	11	3	11	3	11	3	11
4	10	4	10	4	10	4	10
5	9	5	9	5	9	5	9
6	8	6	8	6	8	6	8
7	7	7	7	7	7	7	7
8	6	8	6	8	6	8	6
9	5	9	5	9	5	8	5
10	4	10	4	10	4	10	4
11	3	11	3	11	3	11	3
12	2	12	2	12	2	12	2
13	1	13	1	13	1	13	1
1	13	2	12	1	13	2	12
2	12	3	11	2	12	3	11
3	11	4	10	3	11	4	10
4	10	5	9	4	10	5	9
5	9	6	8	5	9	6	8
6	8	7	7	6	8	7	7
7	7	8	6	7	7	8	6
8	6	9	5	8	6	9	5
9	5	10	4	9	5	10	4
10	4	11	3	10	4	11	3
11	3	12	2	11	3	12	2
12	2	13	1	12	2	13	1
13		1	13	13	1	1	13
1	13	3	11	1	13	3	11
2	12	4	10	2	12	4	10
3	11	5	9	3	11	5	9
4	10	6	8	4	10	6	8
5	9	7	7	5	9	7	7
6	8	8	6	6	8	8	6
7	7	9	5	7	7	9	5
8	6	10	4	8	6	10	4
9	5	11	3	9	5	11	3
10	4	12	2	10	4	12	2
11	3	13	1	11	3	13	1
12	2	1	13	12	2	1	13
13	1	2	12	13	1	2	14

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

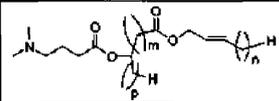
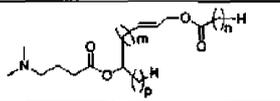
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

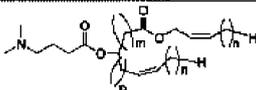
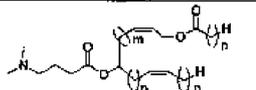
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

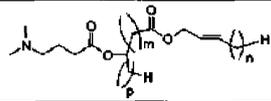
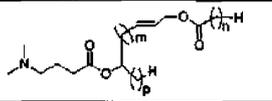
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

							
m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	6	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

							
m	n	p		m	n	p	
1	12	18		12	1	18	
2	11	18		11	2	18	
3	10	18		10	3	18	
4	9	18		9	4	18	
5	8	18		8	5	18	
6	7	18		7	6	18	
7	6	18		6	7	18	
8	5	18		5	8	18	
9	4	18		4	9	18	
10	3	18		3	10	18	
11	2	18		2	11	18	
12	1	18		1	12	18	
1	12	17		12	1	17	
2	11	17		11	2	17	
3	10	17		10	3	17	
4	9	17		9	4	17	
5	8	17		8	5	17	
6	7	17		7	6	17	
7	6	17		6	7	17	
8	5	17		5	8	17	
9	4	17		4	9	17	
10	3	17		3	10	17	
11	2	17		2	11	17	
12	1	17		1	12	17	
1	12	16		12	1	16	
2	11	16		11	2	16	
3	10	16		10	3	16	
4	9	16		9	4	16	
5	8	16		8	5	16	
6	7	16		7	6	16	
7	6	16		6	7	16	

8	5	16		5	8	16	
9	4	16		4	9	16	
10	3	16		3	10	16	
11	2	16		2	11	16	
12	1	16		1	12	16	
1	12	15		12	1	15	
2	11	15		11	2	15	
3	10	15		10	3	15	
4	9	15		9	4	15	
5	8	15		8	5	15	
6	7	15		7	6	15	
7	6	15		6	7	15	
8	5	15		5	8	15	
9	4	15		4	9	15	
10	3	15		3	10	15	
11	2	15		2	11	15	
12	1	15		1	12	15	
1	12	14		12	1	14	
2	11	14		11	2	14	
3	10	14		10	3	14	
4	9	14		9	4	14	
5	8	14		8	5	14	
6	7	14		7	6	14	
7	6	14		6	7	14	
8	5	14		5	8	14	
9	4	14		4	9	14	
10	3	14		3	10	14	
11	2	14		2	11	14	
12	1	14		1	12	14	
1	12	13		12	1	13	
2	11	13		11	2	13	
3	10	13		10	3	13	
4	9	13		9	4	13	
5	8	13		8	5	13	
6	7	13		7	6	13	
7	6	13		6	7	13	
8	5	13		5	8	13	
9	4	13		4	9	13	

10	3	13		3	10	13	
11	2	13		2	11	13	
12	1	13		1	12	13	
1	12	12		12	1	12	
2	11	12		11	2	12	
3	10	12		10	3	12	
4	9	12		9	4	12	
5	8	12		8	5	12	
6	7	12		7	6	12	
7	6	12		6	7	12	
8	5	12		5	8	12	
9	4	12		4	9	12	
10	3	12		3	10	12	
11	2	12		2	11	12	
12	1	12		1	12	12	
1	12	11		12	1	11	
2	11	11		11	2	11	
3	10	11		10	3	11	
4	9	11		9	4	11	
5	8	11		8	5	11	
6	7	11		7	6	11	
7	6	11		6	7	11	
8	5	11		5	8	11	
9	4	11		4	9	11	
10	3	11		3	10	11	
11	2	11		2	11	11	
12	1	11		1	12	11	
12	1	10		12	1	10	
1	12	10		11	2	10	
2	11	10		10	3	10	
3	10	10		9	4	10	
4	9	10		8	5	10	
5	8	10		7	6	10	
6	7	10		6	7	10	
7	6	10		5	8	10	
8	5	10		4	9	10	
9	4	10		3	10	10	
10	3	10		2	11	10	

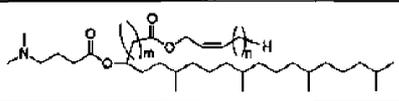
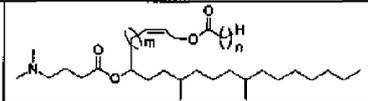
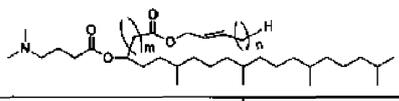
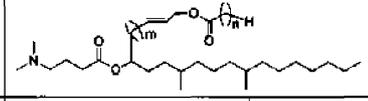
11	2	10		1	12	10	
12	1	10		12	1	10	
1	12	9		11	2	9	
2	11	9		10	3	9	
3	10	9		9	4	9	
4	9	9		8	5	9	
5	8	9		7	6	9	
6	7	9		6	7	9	
7	6	9		5	8	9	
8	5	9		4	9	9	
9	4	9		3	10	9	
10	3	9		2	11	9	
11	2	9		1	12	9	
12	1	9		12	1	9	
1	12	8		11	2	8	
2	11	8		10	3	8	
3	10	8		9	4	8	
4	9	8		8	5	8	
5	8	8		7	6	8	
6	7	8		6	7	8	
7	6	8		5	8	8	
8	5	8		4	9	8	
9	4	8		3	10	8	
10	3	8		2	11	8	
11	2	8		1	12	8	
12	1	8		12	1	8	

m	n	p	q	m	n	p	q
1	12	8	8	12	1	8	8
2	11	8	8	11	2	8	8
3	10	8	8	10	3	8	8
4	9	8	8	9	4	8	8
5	8	8	8	8	5	8	8
6	7	8	8	7	6	8	8
7	6	8	8	6	7	8	8
8	5	8	8	5	8	8	8
9	4	8	8	4	9	8	8
10	3	8	8	3	10	8	8
11	2	8	8	2	11	8	8
12	1	8	8	1	12	8	8
1	12	9	7	12	1	9	7
2	11	9	7	11	2	9	7
3	10	9	7	10	3	9	7
4	9	9	7	9	4	9	7
5	8	9	7	8	5	9	7
6	7	9	7	7	6	9	7
7	6	9	7	6	7	9	7
8	5	9	7	5	8	9	7
9	4	9	7	4	9	9	7
10	3	9	7	3	10	9	7
11	2	9	7	2	11	9	7
12	1	9	7	1	12	9	7
1	12	10	6	12	1	10	6
2	11	10	6	11	2	10	6
3	10	10	6	10	3	10	6
4	9	10	6	9	4	10	6
5	8	10	6	8	5	10	6
6	7	10	6	7	6	10	6
7	6	10	6	6	7	10	6

8	5	10	6	5	8	10	6
9	4	10	6	4	9	10	6
10	3	10	6	3	10	10	6
11	2	10	6	2	11	10	6
12	1	10	6	1	12	10	6
1	12	11	5	12	1	11	5
2	11	11	5	11	2	11	5
3	10	11	5	10	3	11	5
4	9	11	5	9	4	11	5
5	8	11	5	8	5	11	5
6	7	11	5	7	6	11	5
7	6	11	5	6	7	11	5
8	5	11	5	5	8	11	5
9	4	11	5	4	9	11	5
10	3	11	5	3	10	11	5
11	2	11	5	2	11	11	5
12	1	11	5	1	12	11	5
1	12	12	4	12	1	12	4
2	11	12	4	11	2	12	4
3	10	12	4	10	3	12	4
4	9	12	4	9	4	12	4
5	8	12	4	8	5	12	4
6	7	12	4	7	6	12	4
7	6	12	4	6	7	12	4
8	5	12	4	5	8	12	4
9	4	12	4	4	9	12	4
10	3	12	4	3	10	12	4
11	2	12	4	2	11	12	4
12	1	12	4	1	12	12	4
1	12	13	3	12	1	13	3
2	11	13	3	11	2	13	3
3	10	13	3	10	3	13	3
4	9	13	3	9	4	13	3
5	8	13	3	8	5	13	3
6	7	13	3	7	6	13	3
7	6	13	3	6	7	13	3
8	5	13	3	5	8	13	3
9	4	13	3	4	9	13	3

10	3	13	3	3	10	13	3
11	2	13	3	2	11	13	3
12	1	13	3	1	12	13	3
1	12	14	2	12	1	14	2
2	11	14	2	11	2	14	2
3	10	14	2	10	3	14	2
4	9	14	2	9	4	14	2
5	8	14	2	8	5	14	2
6	7	14	2	7	6	14	2
7	6	14	2	6	7	14	2
8	5	14	2	5	8	14	2
9	4	14	2	4	9	14	2
10	3	14	2	3	10	14	2
11	2	14	2	2	11	14	2
12	1	14	2	1	12	14	2
1	12	7	9	12	1	7	9
2	11	7	9	11	2	7	9
3	10	7	9	10	3	7	9
4	9	7	9	9	4	7	9
5	8	7	9	8	5	7	9
6	7	7	9	7	6	7	9
7	6	7	9	6	7	7	9
8	5	7	9	5	8	7	9
9	4	7	9	4	9	7	9
10	3	7	9	3	10	7	9
11	2	7	9	2	11	7	9
12	1	7	9	1	12	7	9
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	6	10	11	2	6	10
2	11	6	10	10	3	6	10
3	10	6	10	9	4	6	10
4	9	6	10	8	5	6	10
5	8	6	10	7	6	6	10
6	7	6	10	6	7	6	10
7	6	6	10	5	8	6	10
8	5	6	10	4	9	6	10
9	4	6	10	3	10	6	10
10	3	6	10	2	11	6	10

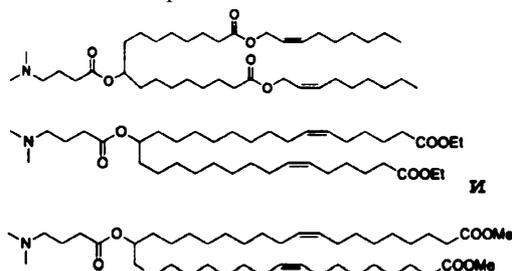
11	2	6	10	1	12	6	10
12	1	6	10	12	1	6	10
1	12	5	11	11	2	5	11
2	11	5	11	10	3	5	11
3	10	5	11	9	4	5	11
4	9	5	11	8	5	5	11
5	8	5	11	7	6	5	11
6	7	5	11	6	7	5	11
7	6	5	11	5	8	5	11
8	5	5	11	4	9	5	11
9	4	5	11	3	10	5	11
10	3	5	11	2	11	5	11
11	2	5	11	1	12	5	11
12	1	5	11	12	1	5	11
1	12	4	12	11	2	4	12
2	11	4	12	10	3	4	12
3	10	4	12	9	4	4	12
4	9	4	12	8	5	4	12
5	8	4	12	7	6	4	12
6	7	4	12	6	7	4	12
7	6	4	12	5	8	4	12
8	5	4	12	4	9	4	12
9	4	4	12	3	10	4	12
10	3	4	12	2	11	4	12
11	2	4	12	1	12	4	12
12	1	4	12	12	1	4	12

			
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
			
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12

m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12
m	n	m	n
1	12	12	1
2	11	11	2
3	10	10	3
4	9	9	4
5	8	8	5
6	7	7	6
7	6	6	7
8	5	5	8
9	4	4	9
10	3	3	10
11	2	2	11
12	1	1	12

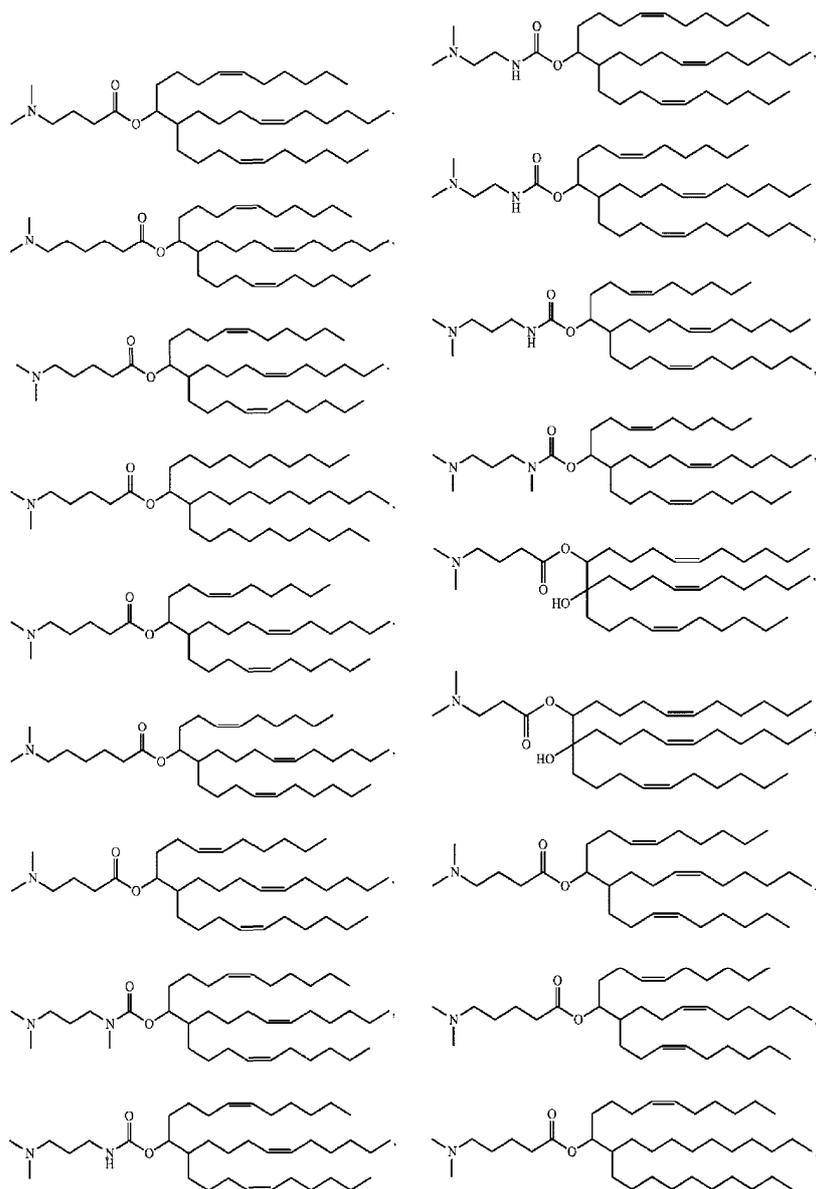
и их соли.

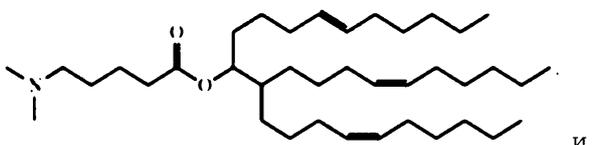
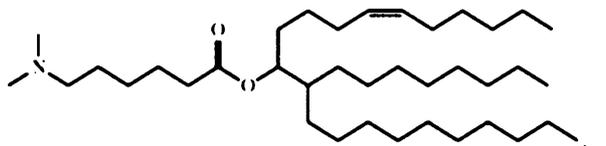
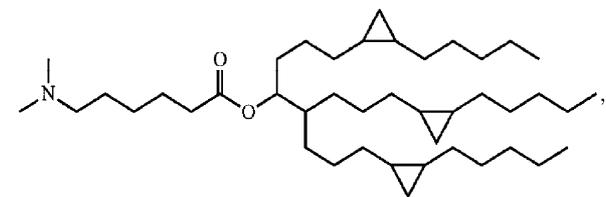
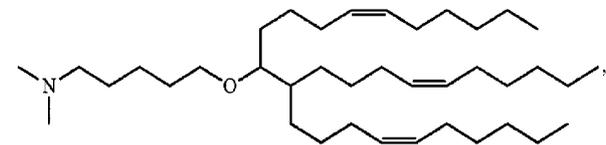
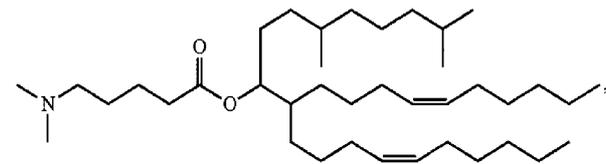
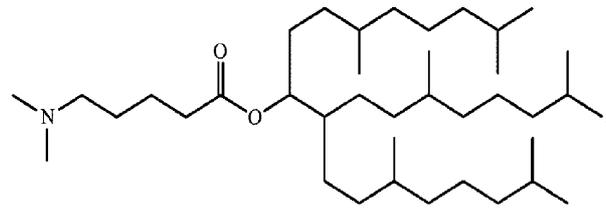
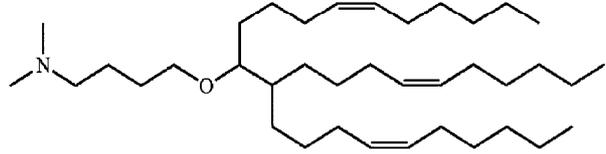
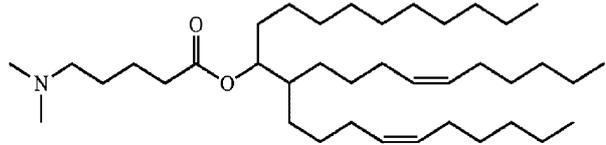
Среди вышеупомянутых катионных липидов катионные липиды, представленные следующими структурными формулами, являются более предпочтительными.



и их соли.

В другом варианте осуществления изобретения могут быть упомянуты катионные липиды, представленные следующими структурными формулами и описанные в Международной патентной заявке WO 2013/126803.



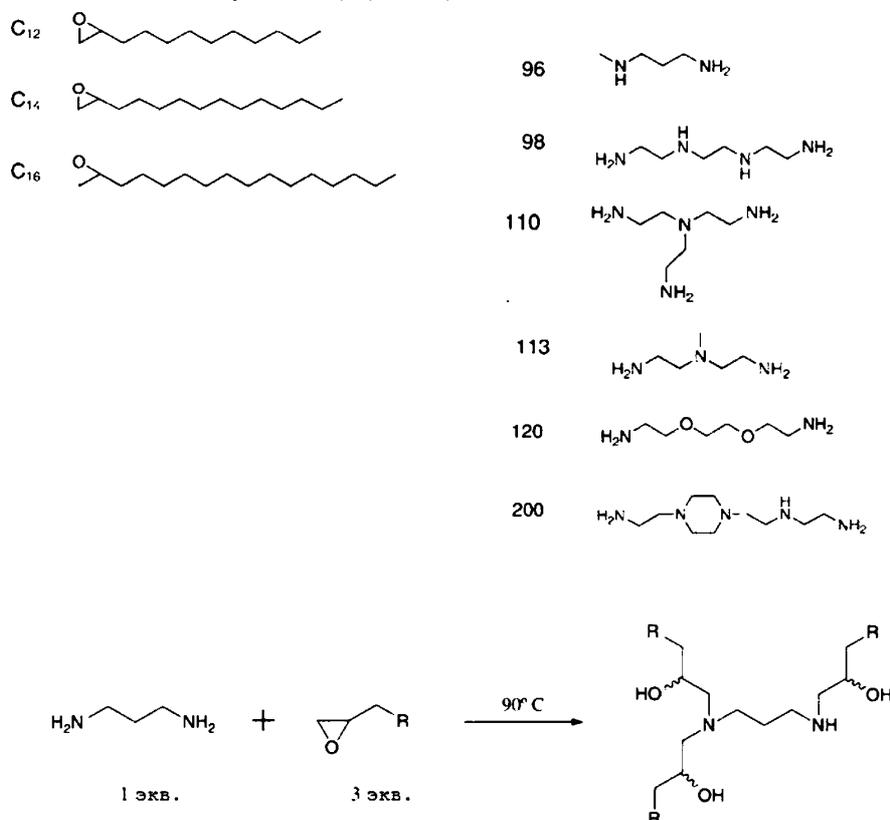


и

PK 500 (поли-L-лизин гидробромид 500-2000) PK1K (поли-L-лизин гидробромид 1000-5000)

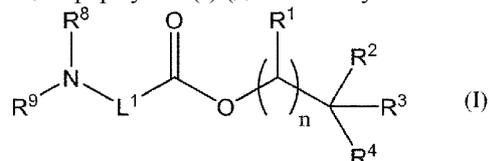
Среди вышеупомянутых катионных липидов наиболее предпочтительными являются сКК-E12, сКК-E14.

В другом варианте осуществления изобретения катионные липиды C14-98, C18-96, C14-113, C14-120, C14-120, C14-110, C16-96 и C12-200 синтезируют по следующей схеме, описанной в Love KT et al. (Proc Natl Acad Sci USA. 2010 May 25; 107(21): 9915).



Среди вышеупомянутых катионных липидов C14-110, C16-96 и C12-200 являются более предпочтительными.

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения можно упомянуть катионный липид, представленный следующей формулой (I) (далее именуемый также "Соединение (I)").



где

L^1 представляет собой C_{1-22} алкиленовую группу, C_{2-22} алкениленовую группу или C_{3-22} алкадиениленовую группу,

n представляет собой целое числом 0 или 1,

R^1 представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(3) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(4) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

R^2 представляет собой $-CH_2-O-CO-R^5$, $-CH_2-CO-O-R^5$ или $-R^5$,

R^3 представляет собой $-CH_2-O-CO-R^6$, $-CH_2-CO-O-R^6$ или $-R^6$,

R^4 представляет собой атом водорода, $-CH_2-O-CO-R^7$, $-CH_2-CO-O-R^7$ или $-R^7$,

R^5 , R^6 и R^7 каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(2) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(3) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы и R^8 и R^9 каждый независимо представляет собой C_{1-6} алкильную группу, или его соль.

L^1 представляет собой C_{1-22} алкиленовую группу, C_{2-22} алкениленовую группу или C_{3-22} алкадиениленовую группу.

L^1 предпочтительно представляет собой C_{1-22} алкиленовую группу.

L^1 более предпочтительно представляет собой C_{1-12} алкиленовую группу.

L^1 также предпочтительно представляет собой C_{1-6} алкиленовую группу.

n представляет собой целое число 0 или 1.

n предпочтительно представляет собой целое число 1.

R^1 представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(3) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(4) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы.

R^1 предпочтительно представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C_{1-22} алкильную группу (предпочтительно линейную C_{6-12} алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C_{1-22} алкильными группами (предпочтительно линейными C_{6-12} алкильными группами), или

(3) линейную C_{2-22} алкенильную группу (предпочтительно линейную C_{6-12} алкенильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C_{2-22} алкенильными группами (предпочтительно линейными C_{6-12} алкенильными группами).

R^1 особенно предпочтительно представляет собой атом водорода.

R^2 представляет собой $-CH_2-O-CO-R^5$, $-CH_2-CO-O-R^5$ или $-R^5$.

R^2 предпочтительно представляет собой $-CH_2-O-CO-R^5$ или $-R^5$.

R^2 более предпочтительно представляет собой $-CH_2-O-CO-R^5$.

R^3 представляет собой $-CH_2-O-CO-R^6$, $-CH_2-CO-O-R^6$ или $-R^6$.

R^3 предпочтительно представляет собой $-CH_2-O-CO-R^6$ или $-R^6$.

R^3 более предпочтительно представляет собой $-CH_2-O-CO-R^6$.

R^4 представляет собой атом водорода, $-CH_2-O-CO-R^7$, $-CH_2-CO-O-R^7$ или $-R^7$.

R^4 предпочтительно представляет собой атом водорода или $-CH_2-O-CO-R^7$.

R^4 более предпочтительно представляет собой $-CH_2-O-CO-R^7$.

R^5 , R^6 и R^7 каждый независимо представляет собой

(1) линейную C_{1-22} алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы,

(2) линейную C_{2-22} алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы, или

(3) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C_{1-22} алкильной группы и линейной C_{2-22} алкенильной группы.

R^5 , R^6 и R^7 каждый независимо предпочтительно представляет собой:

(1) линейную C_{1-22} алкильную группу (предпочтительно линейную C_{4-18} алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C_{1-22} алкильными группами (предпочтительно линейными C_{1-10} алкильными группами),

(2) линейную C_{2-22} алкенильную группу (предпочтительно линейную C_{4-18} алкенильную группу) или

(3) линейную C_{3-22} алкадиенильную группу (предпочтительно линейную C_{4-18} алкадиенильную группу).

R^5 , R^6 и R^7 каждый независимо более предпочтительно представляет собой:

(1) линейную C_{1-22} алкильную группу (предпочтительно линейную C_{4-18} алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C_{1-22} алкильными группами (предпочтительно линейными C_{1-10} алкильными группами), или

(2) линейную C_{2-22} алкенильную группу (предпочтительно линейную C_{4-18} алкенильную группу).

R^8 и R^9 каждый независимо представляет собой C_{1-6} алкильную группу.

R^8 и R^9 каждый независимо представляет собой C_{1-3} алкильную группу (предпочтительно, метил).

Предпочтительно соединение (I) представляет собой соединение вышеуказанной формулы (I), где

L^1 представляет собой C_{1-22} алкиленовую группу (предпочтительно C_{1-12} алкиленовую группу, более предпочтительно C_{1-6} алкиленовую группу),

n представляет собой целое число 1,

R¹ представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C₁₋₂₂алкильную группу (предпочтительно линейную C₆₋₁₂алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C₁₋₂₂алкильными группами (предпочтительно линейными C₆₋₁₂алкильными группами), или

(3) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу (предпочтительно линейную C₆₋₁₂алкенильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C₂₋₂₂алкенильными группами (предпочтительно линейными C₆₋₁₂алкенильными группами),

R² представляет собой -CH₂-O-CO-R⁵ или -R⁵,

R³ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁶ или -R⁶,

R⁴ представляет собой атом водорода или -CH₂-O-CO-R⁷,

R⁵, R⁶ и R⁷ каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C₁₋₂₂алкильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C₁₋₂₂алкильными группами (предпочтительно линейными C₁₋₁₀алкильными группами),

(2) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкенильную группу) или

(3) линейную C₃₋₂₂алкадиенильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкадиенильную группу) и

R⁸ и R⁹ каждый независимо представляет собой C₁₋₆алкильную группу (предпочтительно C₁₋₃алкильную группу, особенно предпочтительно метил).

Более предпочтительно соединение (I) представляет собой соединение вышеуказанной формулы (I), где

L¹ представляет собой C₁₋₁₂алкиленовую группу (предпочтительно C₁₋₆алкиленовую группу),

n представляет собой целое число 1,

R¹ представляет собой атом водорода,

R² представляет собой -CH₂-O-CO-R⁵,

R³ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁶,

R⁴ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁷,

R⁵, R⁶ и R⁷ каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C₁₋₂₂алкильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C₁₋₂₂алкильными группами (предпочтительно линейными C₁₋₁₀алкильными группами),

(2) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкенильную группу) или

(3) линейную C₃₋₂₂алкадиенильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкадиенильную группу) и

R⁸ и R⁹ каждый независимо представляет собой C₁₋₆алкильную группу (предпочтительно C₁₋₃алкильную группу, особенно предпочтительно метил).

Более предпочтительно соединение (I) представляет собой соединение вышеуказанной формулы (I), где

L¹ представляет собой C₁₋₆алкиленовую группу,

n представляет собой целое число 1,

R¹ представляет собой атом водорода,

R² представляет собой -CH₂-O-CO-R⁵,

R³ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁶,

R⁴ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁷,

R⁵, R⁶ и R⁷ каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C₁₋₂₂алкильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкильную группу), необязательно замещенную одной или двумя линейными C₁₋₂₂алкильными группами (предпочтительно линейными C₁₋₁₀алкильными группами), или

(2) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу (предпочтительно линейную C₄₋₁₈алкенильную группу) и

R⁸ и R⁹ каждый независимо представляет собой C₁₋₃алкильную группу (предпочтительно метил).

Соль соединения, представленного каждой вышеупомянутой структурной формулой, предпочтительно представляет собой фармакологически приемлемую соль. Их примеры включают в себя соли с неорганическими основаниями (например, соли щелочных металлов, такие как натриевая соль, калиевая соль и тому подобное; соли щелочноземельных металлов, такие как соль кальция, соль магния и тому подобное; соль алюминия, соль аммония), соли с органическими основаниями (например, соли с триметиламином, триэтиламином, пиридином, пиколином, этаноламином, диэтаноламином, триэтаноламином, трометамином [трис(гидроксиэтил)метиламином]), трет-бутиламином, циклогексиламином, бензиламином, дициклогексиламином, N,N-дибензилэтилендиамином), соли с неорганическими кислотами (например, соли с фтористоводородной кислотой, соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, йодистоводородной кислотой, азотной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой), соли с органиче-

скими кислотами (соли с муравьиной кислотой, уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, фталевой кислотой, фумаровой кислотой, щавелевой кислотой, винной кислотой, малеиновой кислотой, лимонной кислотой, янтарной кислотой, яблочной кислотой, метансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, *p*-толуолсульфоновой кислотой), соли с основными аминокислотами (соли с аргинином, лизином, орнитинном) или соли с кислотными аминокислотами (соли с аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой).

Отношение (мол.%) катионного липида к общему количеству липидов, присутствующих в липидной наночастице настоящего изобретения, составляет, например, от примерно 10 до примерно 80%, предпочтительно от примерно 20 до примерно 70%, более предпочтительно от примерно 40 до примерно 60%; однако данное соотношение не ограничивается этими примерами.

Также можно использовать только один вид вышеупомянутого катионного липида или два или более его видов можно использовать в комбинации. Когда используют несколько катионных липидов, соотношение всех катионных липидов предпочтительно является таким, как указано выше.

(с) Некатионный липид

В настоящем описании термин "некатионный липид" означает липид, который отличается от катионного липида, и представляет собой липид, который не имеет суммарного положительного электрического заряда при выбранном значении pH, таком как физиологическое значение pH и тому подобное. Примеры некатионного липида, используемого в липидной наночастице настоящего изобретения, включают в себя фосфолипид, стероиды, ПЭГ-липид и тому подобное.

Для улучшения доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или экзогенный TCR, в иммунцит-мишень фосфолипид специально не ограничивается при условии, что он стабильно поддерживает нуклеиновую кислоту и не ингибирует слияние с клеточными мембранами (с плазматической мембраной и мембраной органеллы). Так, например, могут быть упомянуты фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидная кислота, пальмитоилолеоилфосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилэтаноламин, дипальмитоилфосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин, дилиноленоилфосфатидилхолин и тому подобное.

Предпочтительные фосфолипиды включают в себя дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин (POPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE) и 4-(*N*-малеимидметил) циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal) диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE-mal), более предпочтительно DOPC, DPPC, POPC и DOPE.

Отношение (мол.%) фосфолипида к общему количеству липидов, присутствующих в липидной наночастице настоящего изобретения, может составлять, например, от примерно 0 до примерно 90%, предпочтительно от примерно 5 до примерно 30%, более предпочтительно от примерно 8 до примерно 15%.

Можно использовать только один вид вышеупомянутого фосфолипида или два или более его видов можно использовать в комбинации. Когда используют несколько фосфолипидов, соотношение всех фосфолипидов предпочтительно является таким, как указано выше.

В качестве стероидов могут быть упомянуты холестерин, 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил-(2'-гидрокси) этиловый эфир, холестерил-(4'-гидрокси) бутиловый эфир, 6-кетохолестанол, 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон и холестерил деканоат, предпочтительно холестерин.

Отношение (мол.%) стероида к общему количеству липидов, присутствующих в липидной наночастице настоящего изобретения, когда стероиды присутствуют, может составлять, например, от примерно 10 до примерно 60%, предпочтительно от примерно 12 до примерно 58%, более предпочтительно от примерно 20 до примерно 55%.

Можно использовать только один вид вышеупомянутого стероида или два или более его видов можно использовать в комбинации. Когда используют несколько стероидов, соотношение всех стероидов предпочтительно является таким, как указано выше.

В настоящем описании термин "ПЭГ-липид" означает любой комплекс полиэтиленгликоля (ПЭГ) и липида. ПЭГ-липид специально не ограничивается при условии, что он обладает эффектом подавления агрегации липидной наночастицы настоящего изобретения. Например, могут быть упомянуты ПЭГ, конъюгированный с диалкилоксипропилем (PEG-DAA), ПЭГ, конъюгированный с диацилглицерином (PEG-DAG) (например, SUNBRIGHT GM-020 (NOF CORPORATION)), ПЭГ, конъюгированный с фосфолипидами, такими как фосфатидилэтаноламин (PEG-PE), ПЭГ, конъюгированный с керамидом (PEG-Cer), ПЭГ, конъюгированный с холестерином (ПЭГ-холестерин) или его производными, или их смеси, mPEG2000-1,2-Di-O-алкил-sn-3-карбомоилглицерид (PEG-C-DMG), 1-[8'-(1,2-димиристоил-3-пропанокси)-карбоксамид-3',6-диоксаоктанил]карбомоил-сометил-поли(этиленгликоль) (2KPEG-DMG) и тому подобное. Предпочтительный ПЭГ-липид включает в себя PEG-DGA, PEG-DAA, PEG-PE, PEG-Cer, и их смесь, более предпочтительно, конъюгат PEG-DAA выбран из группы, состоящей из конъюгата ПЭГ-дидецилоксипропил, конъюгата ПЭГ-дилаурилоксипропил, конъюгата ПЭГ-димиристилоксипропил,

конъюгата ПЭГ-дипальмитилоксипропил, конъюгата ПЭГ-дистеарилоксипропил и их смесей.

В дополнение к метоксигруппе в качестве свободного конца ПЭГ для связывания Т-клеточного лиганда-мишени могут использоваться описанные ниже малеимидная группа, N-гидроксисукцинимидильная группа и тому подобное. Например, в качестве липида ПЭГ можно использовать SUNBRIGHT DSPE-0201MA или SUNBRIGHT DSPE-0201MA (NOF), имеющие функциональную группу для связывания Т-клеточного лиганда (иногда в настоящем изобретении именуемые "ПЭГ-липид с реакционноспособной концевой группой").

Отношение (мол.%) ПЭГ-липидов к общему количеству липидов, присутствующих в липидной наночастице настоящего изобретения, может составлять, например, от примерно 0 до примерно 20%, предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 5%, более предпочтительно от примерно 0,7 до примерно 2%.

Доля (мол.%) ПЭГ-липидов с реакционноспособной концевой группой в вышеупомянутых общих липидах ПЭГ составляет, например, от примерно 10 до примерно 100%, предпочтительно от примерно 20 до примерно 100%, более предпочтительно от примерно 30 до примерно 100%.

Можно использовать только один вид вышеупомянутого ПЭГ-липидов или два или более его видов можно использовать в комбинации. Когда используют несколько ПЭГ-липидов, соотношение всех ПЭГ-липидов предпочтительно является таким, как указано выше.

Липидную наночастицу настоящего изобретения применяют для переноса генов и экспрессии CAR или экзогенного TCR в иммунных клетках, в частности в Т-клетках, которые отвечают за клеточный иммунитет при приобретенном иммунитете, NK-клетках, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и тому подобном, которые отвечают за врожденный иммунитет, и NKT-клетках, которые представляют собой Т-клетки, обладающие свойствами NK-клеток. Следовательно, липидная наночастица настоящего изобретения может дополнительно содержать лиганд, который может нацеливать липидную наночастицу на иммунные клетки, в частности, на Т-клетки, для эффективной доставки в целевые иммунные клетки, особенно *in vivo*.

(d) Лиганд, способный нацеливать липидную наночастицу на Т-клетку

Лиганд, способный нацеливать липидную наночастицу настоящего изобретения на Т-клетки, специально не ограничивается при условии, что он может специфично распознавать поверхностные молекулы, которые специфично или высоко экспрессируются в Т-клетках. Предпочтительно он включает в себя те лиганды, которые содержат один или несколько антигенсвязывающих доменов антител против CD3, CD4, CD8 или CD28, и более предпочтительно, он включает в себя те лиганды, которые содержат антигенсвязывающие домены анти-CD3-антитела и/или анти-CD28-антитела. Особенно предпочтительным примером доставки в Т-клетки *in vivo* является вариант, который содержит только антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела. Здесь термин "антигенсвязывающий домен" является синонимом антигенсвязывающего домена, который составляет вышеупомянутый CAR. Однако, поскольку CAR необходимо получать в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей его, возникают ограничения, и во многих случаях обычно используются одноцепочечные антитела. Поскольку антигенсвязывающий домен в качестве нацеливающего на Т-клетки лиганда находится в липидной наночастице настоящего изобретения в состоянии белка, не только одноцепочечные антитела, но также любые другие фрагменты антител, такие как полные молекулы антител, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, восстановленное антитело (rIgG), dsFv, sFv, диатело, триатело и тому подобное, также могут быть предпочтительно использованы. Предпочтительно использовать Fab' без Fc-фрагмента, особенно для доставки к целевому иммунному клетке *in vivo*. Эти фрагменты антител можно получить обработкой полноразмерного антитела (например, IgG) восстановителем (например, 2-меркаптоэтанолом, дитиотреитолом) или пептидазой (например, папаином, пепсином, фицином) или с использованием операции генетической рекомбинации.

Когда нацеливающий на Т-клетки лиганд представляет собой полную молекулу антитела, можно использовать коммерчески доступные анти-CD3, CD4, CD8, CD28 антитела и т.д., или лиганд можно выделить из культуры клеток, продуцирующих антитело. С другой стороны, когда лиганд представляет собой любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов (фрагмент антитела), нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенсвязывающий домен, такой как анти-CD3, CD4, CD8, CD28 антитела и т.д., выделяют таким же образом, как в случае нуклеиновой кислоты, кодирующей антигенсвязывающий домен, составляющий указанный CAR, и антигенсвязывающий домен может быть получен рекомбинантным путем с использованием того же метода.

В липидной наночастице настоящего изобретения нацеливающий на Т-клетки лиганд может связываться с внешней оболочкой любым способом, при условии, что он присутствует на поверхности липидной наночастицы. Например, когда в качестве некатерного липида присутствует ПЭГ-липид с реакционноспособной концевой группой, лиганд может быть добавлен к концу ПЭГ. Например, липидные наночастицы, меченные лигандом (антителом), могут быть получены путем взаимодействия ПЭГ-липидов (например, SUNBRIGHT DSPE-0200MA) с малеимидной группой на его конце, с тиольной группой вышеупомянутого восстанавливающего антитела (иногда именуется как "антитело-ЛНЧ").

Когда липидную наночастицу настоящего изобретения используют для переноса гена в иммунные клетки, отличные от Т-клеток, такие как NK-клетки и дендритные клетки, липидную наночастицу можно эффективно доставлять даже в отсутствие на поверхности липидной наночастицы лиганда для нацелива-

ния на эти иммунные клетки. Также можно иметь на поверхности липидной наночастицы подходящий нацеливающий лиганд для молекул, экспрессируемых на поверхности каждой иммунной клетки. Например, в случае НК-клеток могут быть упомянуты без ограничений те лиганды, которые содержат антиген-связывающие домены антител против CD16 и CD56.

2. Получение липидной наночастицы настоящего изобретения

Липидная наночастица настоящего изобретения может быть получена, например, способом, описанным в Патенте США US 9404127. Когда липидная наночастица дополнительно содержит нацеливающий на Т-клетки лиганд, она может быть получена путем химического присоединения нацеливающего на Т-клетки лиганда после получения липидных наночастиц. Как описано, например, в Международной патентной заявке WO 2016/021683, готовят раствор органического растворителя из вышеупомянутых компонентов (b) и (c), раствор органического растворителя смешивают с водой или буферным раствором (a) для получения липидных наночастиц, а затем проводят химическое присоединение нацеливающего на Т-клетки лиганда связан, чтобы получить такие же связанные с лигандом наночастицы. Отношение смешивания (молярное отношение) катионного липида, фосфолипида, холестерина и ПЭГ-липидов составляет, например, 40-60:0 к 20:0 к 50:0 к 5, но данное соотношение не ограничивается этим примером. Когда ПЭГ-липид смешивают в виде некатионного липида и нацеливающий на Т-клетки лиганд добавляют к концу ПЭГ, соотношение в смеси (молярное соотношение) ПЭГ-липидов и лиганда может составлять, например, от 20:1 до 1:20. Вышеупомянутый ПЭГ-липид может содержать ПЭГ с реакционноспособной концевой группой в соотношении (мол.%) от примерно 10 до примерно 100%. Вышеупомянутое смешивание может быть проведено с использованием пипетки, системы микрожидкостного смешивания (например, микрожидкостной системы Asia (Sytris)) или аппарата Nanoassembler (Precision Nanosystems)). Полученные липидные частицы могут быть подвергнуты очистке гель-фильтрацией, диализом или стерильной фильтрацией.

Концентрация всего липидного компонента в растворе органического растворителя предпочтительно составляет от 0,5 до 100 мг/мл.

В качестве органического растворителя можно указать, например, метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол, 1-бутанол, трет-бутанол, ацетон, ацетонитрил, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид или их смесь. Органический растворитель может содержать от 0 до 20% воды или буферного раствора. В качестве буферного раствора используются кислотные буферные растворы (например, ацетатный буферный раствор, цитратный буферный раствор) или нейтральные буферные растворы (например, буферный раствор 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты, (HEPES), буферный раствор трис(гидроксиэтил)аминометана (Tris), фосфатный буферный раствор, фосфатно-солевой буфер (ФСБ)).

В случае, когда для перемешивания используется система микрожидкостного смешивания, предпочтительно отдается смешиванию 1 части по объему раствора органического растворителя с 1-5 частями по объему воды или буферного раствора. Кроме того, в указанной системе скорость потока смеси (смеси раствора органического растворителя и воды или буферного раствора) предпочтительно составляет от 0,1 до 10 мл/мин, а температура предпочтительно составляет от 4 до 45°C.

Когда дисперсию липидных частиц получают, как описано выше, составляющие дисперсию компоненты, (a) - (d), могут быть получены путем добавления нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, или экзогенный TCR в воду или буферный раствор. Предпочтительным является добавление нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы сделать концентрацию ее активного ингредиента в воде или буферном растворе от 0,05 до 2,0 мг/мл.

Кроме того, липидную наночастицу настоящего изобретения можно также получить путем смешивания дисперсии липидных частиц с нуклеиновой кислотой способом, известным в данной области техники.

В липидной наночастице настоящего изобретения содержание нуклеиновой кислоты предпочтительно составляет 1-20 мас.%. Содержание может быть измерено с помощью набора реагентов QuantiTMRibogreen® (Invitrogen). В липидной наночастице настоящего изобретения коэффициент инкапсуляции нуклеиновой кислоты может быть рассчитан на основе разницы в интенсивности флуоресценции при добавлении или без добавления поверхностно-активного вещества (например, Triton-X100).

Дисперсионная среда может быть заменена водой или буферным раствором путем диализа. Для диализа используют ультрафильтрационную мембрану с отсецием по молекулярной массе от 10 до 20К. Диализ проводят при температуре от 4°C до комнатной температуры. Диализ может проводиться повторно. Для диализа может использоваться тангенциальная поточная фильтрация.

Соотношение (массовое соотношение) нуклеиновой кислоты и липида в липидной наночастице настоящего изобретения, полученной, как указано выше, составляет от примерно 0,01 до примерно 0,2.

Средний размер частиц липидной наночастицы настоящего изобретения предпочтительно составляет от 10 до 200 нм. Средний размер частиц липидов можно рассчитать, используя, например, прибор Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) с анализом кумулянтов с функцией автокорреляции.

3. Введение в иммунцит ex vivo с помощью липидной наночастицы настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения иммунцитов ex vivo, экспрессирующих

CAR или экзогенный TCR, путем приведения в контакт иммуноцитов, полученных от живых организмов (в настоящем описании также называемых "иммуноцитами *ex vivo*"), с липидной наночастицей настоящего изобретения и введения нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или экзогенный TCR, в Т-клетки и иммуноциты *ex vivo*, полученные этим способом. Используемый здесь термин "иммуноцит" специально не ограничивается, при условии, что он представляет собой клетку, способную повредить клетку-мишень (патогенную клетку), такую как раковая клетка и т.п., с помощью какого-либо механизма действия (то есть иммунную эффекторную клетку). Примеры иммуноцитов включают в себя Т-клетки, которые отвечают за клеточный иммунитет при приобретенном иммунитете, НК-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и т.д., которые отвечают за врожденный иммунитет, и НКТ-клетки, которые являются Т-клетками со свойствами НК-клеток. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноцит может представлять собой Т-клетку. Т-клетка, полученная от живого организма, также именуется в настоящем описании как "Т-клетка *ex vivo*". В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноцит может отвечать за врожденный иммунитет, например, это НК-клетки, макрофаги, дендритные клетки и тому подобное. Считается, что Т-клетки подвергаются значительному риску возникновения РТПХ при аллогенной (алло) трансплантации, даже если тип HLA является совместимым, в то время как считается, что алло-НК-клетки и т.д. не вызывают РТПХ. Таким образом, получение иммуноцитов *ex vivo* с различными HLA-типами позволяет использовать их для аллотрансплантации без дополнительной подготовки. CAR-НК клетка описана, например, в заявке на патент США US 2016/0096892, Mol Ther. 25 (8): 1769-1781 (2017) и тому подобном, и CAR-дендритная клетка, CAR-макрофага и тому подобное описаны, например, в Международной патентной заявке WO 2017/019848, eLIFE. 2018 e36688 и тому подобном.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для индукции экспрессии CAR или экзогенного TCR, содержащихся в липидной наночастице настоящего изобретения.

Иммуноцит (например, Т-клетка), в который вводится липидная наночастица настоящего изобретения, может представлять собой изолированный конкретный иммуноцит (например, Т-клетку) или, например, популяцию неоднородных клеток, таких как лимфоциты и клетки-предшественники лимфоцитов, включая плюрипотентные клетки, при условии, что они представляют собой популяцию клеток, содержащую иммуноцит (например, Т-клетку) или клетку-предшественник. В настоящем изобретении термин "лимфоцит" означает один из подтипов лейкоцитов в иммунной системе позвоночных. Примеры лимфоцитов включают в себя Т-клетки, В-клетки и натуральные клетки-киллеры (НК-клетки), предпочтительно, выделенные и очищенные Т-клетки. В настоящем изобретении "Т-клетка" представляет собой один тип лейкоцитов, обнаруживаемых в лимфатических органах, периферической крови и т.п., и относится к одной категории лимфоцитов, характеризующейся дифференцировкой и созреванием, главным образом в тимусной железе и экспрессией TCR. Примеры Т-клеток, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают в себя цитотоксические Т-клетки (CTL), которые являются CD8-позитивными клетками, хелперные Т-клетки, которые являются CD4-позитивными клетками, регуляторные Т-клетки и эффекторные Т-клетки, и предпочтительно цитотоксические Т-клетки.

Вышеупомянутый лимфоцит может быть получен, например, из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови человека или млекопитающего, не являющегося человеком. Когда иммуноцит *ex vivo* (например, Т-клетка *ex vivo*), введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения, применяется для лечения заболеваний, таких как рак, популяцию клеток предпочтительно получают от подлежащего лечению индивидуума или от донора с проведением HLA типирования для выявления совместимости с тем субъектом, который будет подвергаться лечению.

Примеры клеток-предшественников лимфоцитов, включая плюрипотентные клетки, включают в себя эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки), эмбриональные раковые клетки (EC-клетки), эмбриональные зародышевые клетки (EG-клетки), гемопоэтические стволовые клетки, плюрипотентные клетки-предшественники, которые утратили потенциал самообновления (мультипотентный предшественник: MMP), обычные миелолифоидные клетки-предшественники (MLP), миелоидные клетки-предшественники (MP), гранулоцитарные мононуклеарные клетки-предшественники (GMP), клетки-предшественники макрофаг-дендритных клеток (MDP), клетки-предшественники дендритных клеток (DCP) и тому подобное. Недифференцированные клетки, такие как плюрипотентные клетки и тому подобное, могут быть дифференцированы в различные иммуноциты, например, Т-клетки, способом, известным в данной области техники.

Способ приведения в контакт иммуноцитов *ex vivo* с липидной наночастицей настоящего изобретения специально не ограничивается, и, например, липидную наночастицу настоящего изобретения можно добавлять в стандартную среду для иммуноцитов. Альтернативно, для повышения эффективности введения, например, можно использовать метод совместного осаждения фосфатом кальция, метод ПЭГ, метод электропорации, метод микроинъекции, метод липофекции и тому подобное.

Когда липидная наночастица по настоящему изобретению, в частности, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенный TCR в качестве активного ингредиента, экспрессия эндогенной α -цепи

TCR и β -цепи TCR, которые в норме экспрессируются T-клеткой, может подавляться миРНК для увеличение экспрессии экзогенного TCR, ингибирования образования неправильно спаренного TCR или ингибирования аутореактивности. Когда вышеуказанную нуклеиновую кислоту используют в данном способе, то, чтобы избежать влияния миРНК на экзогенный TCR, последовательность оснований нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR, предпочтительно представляет собой последовательность (последовательность типа преобразования кодонов), отличную от последовательности оснований, соответствующей РНК на которую действует миРНК, которая подавляет экспрессию эндогенных цепей TCR α и TCR β . Способ для этого описан, например, в Международной патентной заявке WO 2008/153029. Вышеупомянутая последовательность оснований может быть получена путем введения молчащей мутации в естественную нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, или путем химического синтеза искусственно сконструированной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, чтобы избежать неправильного спаривания с эндогенной цепью TCR, часть или все константные области нуклеиновой кислоты, кодирующей экзогенный TCR, могут быть заменены константной областью, полученной от животного, отличного от человека, например мыши.

4. Лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу настоящего изобретения или иммуноцит *ex vivo*, введенный с липидной наночастицей

Настоящее изобретение относится к лекарственному средству, содержащему липидную наночастицу настоящего изобретения или иммуноцит *ex vivo* (например, T-клетку *ex vivo*), введенный с липидной наночастицей (далее сокращенно обозначаемое как "лекарственное средство настоящего изобретения").

4-1. Лекарственное средство, содержащее иммуноцит *ex vivo*, введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения

Путем экспрессии CAR или экзогенного TCR иммуноцит (например, T-клетка), введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения, может специфично распознавать клетки, экспрессирующие поверхностный антиген, специфично распознаваемые CAR или экзогенным TCR, и уничтожать их (например, путем индукции апоптоза). Таким образом, благодаря содержанию в качестве поверхностного антигена нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или экзогенного TCR, который распознает поверхностную молекулу, специфично экспрессируемую или проявляющую повышенную экспрессию в больной клетке, такой как раковая клетка, в качестве активного ингредиента, иммуноцит *ex vivo* введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения можно применять для профилактики или лечения таких заболеваний, как рак и тому подобное, и его можно безопасно вводить млекопитающим (человеку или другому млекопитающему (например, мыши, крысе, хомяку, кролику, кошке, собаке, корове, овце, обезьяне, предпочтительно человеку)).

4-2. Лекарственное средство, содержащее липидную наночастицу настоящего изобретения

Лекарственное средство настоящего изобретения, содержащее липидную наночастицу настоящего изобретения, предпочтительно получают в виде фармацевтической композиции путем смешивания липидной наночастицы с известными фармацевтически приемлемыми носителями (включая вспомогательное вещество, разбавитель, объемобразующий агент, связующее вещество, смазывающее вещество, агент для улучшения текучести, дезинтегрант, поверхностно-активное вещество и тому подобное) и обычными добавками и тому подобным. Вспомогательные вещества хорошо известны специалистам в данной области техники и включают в себя, например, фосфатно-солевой буфер (например, 0,01 М фосфат, 0,138 М NaCl, 0,0027 М KCl, pH 7,4), водные растворы, содержащие соли минеральных кислот, такие как гидрохлорид, гидробромат, фосфат, сульфат и тому подобное, солевые растворы, растворы глицерола, этанола и тому подобное и соли органических кислот, такие как ацетат, пропионат, малонат, бензоат и тому подобное. Кроме того, также могут быть использованы адъюванты, такие как смачивающий агент или эмульгатор, и pH-буферные агенты. Кроме того, могут быть использованы вспомогательные вещества для приготовления, такие как суспендирующий агент, консервант, стабилизатор и диспергирующий агент. Альтернативно, вышеупомянутая фармацевтическая композиция может находиться в сухой форме, которую перед использованием восстанавливают подходящей стерильной жидкостью. Фармацевтическая композиция может вводиться перорально или парентерально, системно или местно, в зависимости от формы, в которой она приготовлена (пероральные агенты, такие как таблетка, пилюля, капсула, порошок, гранулы, сироп, эмульсия, суспензия и тому подобное; парентеральные агенты, такие как инъекция, капельное переливание, наружный препарат, суппозиторий и тому подобное). Для парентерального введения доступны внутривенное введение, внутрикожное введение, подкожное введение, ректальное введение, чрезкожное введение и тому подобное. При применении в форме для инъекций также могут быть добавлены приемлемый буферный агент, солюбилизующий агент, изотонический агент и тому подобное.

Доза лекарственного средства настоящего изобретения, содержащего липидную наночастицу настоящего изобретения, находится, например, в диапазоне от 0,001 до 10 мг количества нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR или экзогенный TCR, на 1 кг массы тела на дозу. Например, при введении пациенту-человеку доза находится в диапазоне от 0,0001 до 50 мг для пациента весом 60 кг. Вышеупомянутая дозировка является примером, и дозировка может быть соответствующим образом выбрана в зависи-

мости от типа используемой нуклеиновой кислоты, пути введения, возраста, массы, симптомов и т.д. субъекта или пациента, которому проводится введение.

Путем введения млекопитающему (например, человеку или другому млекопитающему (например, мышь, крысе, хомяку, кролику, кошке, собаке, корове, овце, обезьяне), предпочтительно человеку) лекарственного средства настоящего изобретения, содержащего липидную наночастицу настоящего изобретения, можно индуцировать экспрессию CAR или экзогенного TCR в иммунocyтах, например, T-клетке (в настоящем описании также именуемых "иммуноцит *in vivo*" или "T-клетка *in vivo*") в организме животного. Иммуноцит *in vivo* специфично распознает раковые клетки и тому подобное, экспрессирующие поверхностный антиген, распознаваемый CAR или экзогенным TCR, и уничтожает пораженные клетки, тем самым оказывая профилактическое или терапевтическое действие против заболевания.

В случае лекарственного средства, содержащего в качестве активного ингредиента иммуноцит *ex vivo*, введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения, иммуноцит можно культивировать и/или стимулировать с использованием подходящей среды и/или стимулирующей молекулы перед введением субъекту. Стимулирующая молекула включает в себя без ограничений цитокины, подходящие белки и другие компоненты. В случае T-клеток примеры цитокинов включают в себя IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, ИФН- γ и тому подобное, и, предпочтительно, можно использовать IL-2. Хотя концентрация IL-2 в среде специально не ограничивается, она составляет, например, предпочтительно от 0,01 до 1×10^5 Ед/мл, более предпочтительно от 1 до 1×10^4 Ед/мл. Примеры подходящего белка включают в себя лиганд CD3, лиганд CD28 и анти-IL-4 антитело. Также могут быть добавлены факторы, стимулирующие лимфоциты, такие как лектины. Кроме того, в среду могут быть добавлены сыворотка или плазма крови. Хотя количества этих добавок в среду конкретно специально не ограничивается, в качестве примера можно привести от 0 до 20 об.%, а количество используемой сыворотки или плазмы крови может быть изменено в зависимости от стадии культивирования. Например, концентрация в сыворотке или плазме может уменьшаться поэтапно. Сыворотка и плазма могут быть получены из крови субъекта, подлежащего лечению, или из крови другого субъекта, но первый вариант является более предпочтительным с точки зрения безопасности.

Лекарственное средство, содержащее в качестве активного ингредиента иммуноцит *ex vivo*, введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения, предпочтительно вводится субъекту парентерально. Парентеральные способы введения включают в себя внутривенное, артериальное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное и подкожное введение. В то время как доза выбирается в соответствии с состоянием, массой тела, возрастом и т.д. субъекта, введение субъекту с массой тела 60 кг как правило осуществляют в такой дозе, чтобы она содержала 1×10^6 - 1×10^{10} клеток, предпочтительно 1×10^7 - 1×10^9 клеток, более предпочтительно 5×10^7 - 5×10^8 клеток на дозу. Лекарственное средство можно вводить в виде одной дозы или нескольких доз. Лекарственное средство настоящего изобретения, содержащее в качестве активного ингредиента иммуноцит *ex vivo*, введенный с липидной наночастицей настоящего изобретения, может находиться в известной форме, подходящей для парентерального введения, такой как инъекционный или инфузионный агент. Лекарственное средство при необходимости может содержать фармацевтически приемлемый наполнитель. Фармацевтически приемлемый наполнитель включает в себя те носители, которые описаны выше. Лекарственное средство может содержать физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), среду и т.д. для поддержания стабильности клеток. Среда специально не ограничивается, и ее примеры включают в себя без ограничений среды RPMI, AIM-V, X-VIVO10 и тому подобное. Кроме того, фармацевтически приемлемый носитель (например, человеческий сывороточный альбумин), консервант и тому подобное можно добавлять в лекарственное средство для стабилизации.

Лекарственное средство настоящего изобретения может представлять собой профилактическое или терапевтическое лекарственное средство против рака. Рак, являющийся целью применения лекарственного средства настоящего изобретения, специально не ограничивается. Его примеры включают в себя без ограничений острый лимфоцитарный рак, альвеолярную рабдомиосаркому, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга (например, медуллобластома), рак молочной железы, ануса, анального канала или аноректальный рак, рак глаза, рак межпеченочного желчного протока, рак суставов, рак шейки матки, желчного пузыря или плевры, рак носа, полости носа или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, хронический миелогенный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, фибросаркому, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), гипоглотарингальный рак, рак почки, рак гортани, лейкоз (например, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз), опухоль жидких тканей, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), лимфому (например, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому), злокачественную мезотелиому, мастоцитому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника и брыжейки, фарингеальный рак, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, солидную опухоль, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеочка и тому подобное.

Настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на примеры, которые являются только примерами и не ограничивают настоящее изобретение.

Примеры

Пример 1. Восстановительная обработка антитела

9,21 мг/мл анти-CD3 антитела (Bio X Cell) (111 мкл) смешивали с 10 мМ водным раствором ДТТ (12,3 мкл). Аналогично, 6,73 мг/мл антитела IgG2a (Bio X Cell) (149 мкл) смешивали с 10 мМ водным раствором ДТТ (16,6 мкл). Смесь каждого антитела и ДТТ перемешивали на вортексе для проведения реакции при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь фракционировали при помощи ВЭЖХ (колонка: TSKgel G2000SWXL 7,8 мм×30 см, TOSOH, подвижная фаза: ФСБ), получая раствор фракции, содержащей восстановленное антитело. Раствор фракции ультрацентрифугировали с использованием фильтра Amicon 0,5 мл-10К. Концентрации белка антитела и тиольной группы в концентрациях измеряли по поглощению при длине волны 230 нм и флуоресцентной колориметрической реакции с N-(7-диметиламино-4-метилкумарин-3-ил)малеимидом (DACM) соответственно. Выход восстановленного анти-CD3-антитела составил 176 мкл с концентрацией белка 1,75 мг/мл, концентрацией тиольной группы 5,14 мкМ, а выход восстановленного антитела IgG2a составил 86 мкл с концентрацией белка 5,19 мг/мл, концентрацией тиольной группы 45,1 мкМ.

Пример 2. Получение малеимид-ЛНЧ

Липидную смесь (катионный липид: DPPC: холестерин: SUNBRIGHT GM-020: SUNBRIGHT DSPE-020 MA=60:10,6:28:1,4:1, молярное соотношение) растворяли в 90% EtOH, 10% воды с получением раствора липидов с концентрацией 7,0 мг/мл. В качестве катионного липида 3-((5-(диметиламино)пентаноил)окси)-2,2-бис(((3-пентилоктаноил)окси)метил)пропил 3-пентилоктаноат (соединение 7), описанный в Международной патентной заявке WO 2016/021683, и N,N,N-триметил-5-оксо-5-(3-((3-пентилоктаноил)окси)-2,2-бис(((3-пентилоктаноил)окси)метил)пропокси)пентан-1-йодид аммония (соединение 8) смешивали при соотношении 59,1:0,9 (молярное соотношение) и использовали. мРНК, кодирующую распознающий CD19 CAR, имеющий в качестве доменов внутриклеточной трансдукции сигнала 4-1BB и CD3 ζ , растворяли в буфере 10 мМ 2-морфолиноэтансульфоновой кислоты (MES) (pH 5,0) с получением раствора нуклеиновой кислоты с концентрацией 0,2 мг/мл. Полученный раствор липидов и раствор нуклеиновой кислоты смешивали при комнатной температуре с помощью аппарата Nano-assembler (Precision Nanosystems) при соотношении скоростей потока 3 мл/мин:6 мл/мин с получением дисперсии, содержащей композицию. Полученную дисперсию диализовали с использованием кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (молекулярная масса фракции 20k, Thermo Scientific) против воды при комнатной температуре в течение 1 ч и против ФСБ при температуре 4°C в течение 48 ч. Затем диализат фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр (Iwaki) и хранили при температуре 4°C.

Пример 3. Реакция связывания восстановленного антитела и малеимид-ЛНЧ

Дисперсию малеимид-ЛНЧ смешивали с раствором восстановленного антитела до 1/20 молярной концентрации восстановленного антитела к малеимиду и оставляли при комнатной температуре в течение 4 ч. После этого смесь хранили при температуре 4°C до этапа очистки.

Пример 4. Гель-фильтрационная очистка антитела-ЛНЧ

Реакционную смесь восстановленного антитела и малеимид-ЛНЧ загружали на колонку для гель-фильтрации Sepharose CL-4B (каталожный номер 17-0150-01/GE Healthcare) и фракционировали с Д-ФСБ (-) в качестве подвижной фазы. Затем концентрацию белка в каждой фракции измеряли для идентификации фракции, содержащей целевое антитело-ЛНЧ. Антитело-ЛНЧ фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр и хранили при температуре 4°C.

Пример 5. Ex vivo трансфекция CD8⁺ Т-клеток

От мышей линии C57BL/6J получали селезенку и диспергировали ее в лизирующем буфере АСК (Biosource), чтобы получить мышинный спленоцит. Полученный мышинный спленоцит культивировали в полной среде RPMI 1640, содержащей 1 нг/мл интерлейкина 7 и 2 мкг/мл конкавалина А, в течение 2 дней, и мышинные CD8⁺ Т-клетки отделяли путем удаления мертвых клеток с использованием центрифугирования в градиенте плотности фикола и обработки с использованием набора реагентов для выделения CD8-отрицательных Т-клеток (Stemcell Technologies). Полученные мышинные CD8⁺ Т-клетки диспергировали и культивировали в полной среде RPMI 1640, содержащей 10 нг/мл интерлейкина 2 и антитела-ЛНЧ, для трансфекции мышинных CD8⁺ Т-клеток CAR или экзогенным TCR.

Таким же образом CD8⁺ Т-клетки отделяли от приобретенных культивируемых первичных Т-клеток человека, и трансфицировали человеческие CD8⁺ Т-клетки CAR или экзогенным TCR.

Пример 6. Оценка цитотоксичности CAR-Т-клеток in vitro

Клетки линии K562 хронического миелоидного лейкоза человека, принудительно экспрессирующие CD19, которые были клетками, подлежащими оценке на цитотоксичность, метили мембранным красителем PKH-26 (Sigma-Aldrich), промывали средой RPMI, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, диспергировали до концентрации 1×10^5 клеток/мл в среде и культивировали. Меченые клетки для оценки цитотоксичности помещали в 96-луночный планшет и культивировали. Клетки смешивали с CAR-Т-клетками, культивировали при температуре 37°C в течение 3 ч, окрашивают аннексином V-

бриллиантовым фиолетовым 421 (BioLegend) и для количественной оценки апоптозных клеток проводили проточную цитометрию.

Пример 7. Оценка противораковой активности *in vivo*

Клетки K562-CD19, стабильно экспрессирующие люциферазу, вводили 6-недельным мышам NOD-SCID через хвостовую вену, и мышей содержали в течение 1 недели для получения мышинной модели гематологического рака. Затем мышам через хвостовую вену один раз в неделю в течение 3 недель вводили 1×10^6 CAR-T-клеток человека, полученных *ex vivo* трансфекцией нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, с использованием антитела-ЛНЧ. Уменьшение количества раковых клеток CAR-T-клетками оценивается путем измерения с использованием системы визуализации люминесценции *in vivo* IVIS (PerkinElmer).

Пример 8. Получение малеимид-ЛНЧ с использованием катионного липида

Липидную смесь (катионный липид:DPPC:холестерин:SUNBRIGHT GM-020:SUNBRIGHT DSPE-020 MA=60:10,6:28:1,4:1, молярное соотношение) растворяли в 90% EtOH, 10% 25 mM ацетатном буфере pH 4,0, чтобы получить раствор липидов с концентрацией 10 мг/мл. В качестве катионного липида использовали 3-((5-(диметиламино)пентаноил)окси)-2,2-бис(((9Z)-тетрадека-9-еноилокси)метил)пропил (9Z)-тетрадека-9-еноат (соединение 12), 2-(((4-(диметиламино)бутаноил)окси)метил)-2-((додеканоилокси)метил)пропан-1,3-диил(9Z,9'Z)бис-тетрадека-9-еноат (соединение 21) и 2-(((4,5-дибутилнаноилокси)метил)-2-(((5-(диметиламино)пентаноил)окси)метил)пропан-1,3-диилдидеканоат (соединение 35).

pcDNA3.1-hCD19CAR, кодирующий распознающий CD19 CAR, растворяли в буфере 10 mM 2-морфолиноэтансульфоновой кислоты (MES) (pH 5,5) с получением раствора нуклеиновой кислоты с концентрацией 0,2 мг/мл. pcDNA3.1-hCD19CAR получали путем интеграции последовательности CD19 IgG4 28z, описанной в Международной патентной заявке WO 2013/126712, в сайт множественного клонирования плазмиды pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific). Полученный раствор липидов и раствор нуклеиновой кислоты смешивали при комнатной температуре с помощью аппарата Nanoassembl (Precision Nanosystems) при соотношении скоростей потока 3 мл/мин:6 мл/мин с получением дисперсии, содержащей композицию. Полученную дисперсию диализовали с использованием кассеты для диализа Slide-A-Lyzer (молекулярная масса фракции 20k, Thermo Scientific) против воды при комнатной температуре в течение 1 ч и против ФСБ при температуре 4°C в течение 48 ч. Затем диализат фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр (Iwaki) и хранили при температуре 4°C.

Измерение концентрации нуклеиновой кислоты малеимид-ЛНЧ и расчет предполагаемой концентрации малеимида

Малеимид-ЛНЧ растворяли в 0,5% Triton X-100, и концентрацию пДНК измеряли с использованием набора реагентов для анализа дцДНК Quant-iT™ PicoGreen™ (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию пДНК, измеренную без добавления Triton X-100, принимали за концентрацию пДНК, не инкапсулированной в ЛНЧ, и рассчитывали коэффициент инкапсуляции пДНК в ЛНЧ. Предполагаемая концентрация малеимида была рассчитана путем умножения измеренной концентрации пДНК на коэффициент загрузки малеимид-ПЭГ-липид (DSPE-020MA). Полученные значения приведены в табл. 1.

Таблица 1

Малеимид-ЛНЧ	Концентрация пДНК (мкг/мл)	Коэффициент инкапсуляции пДНК	Предполагаемая концентрация малеимида (мкМ)
Соединение 12- pcDNA3.1- hCD19CAR	193	94%	66,0
Соединение 21- pcDNA3.1- hCD19CAR	253	89%	86,2
Соединение 35- pcDNA3.1- hCD19CAR	169	95%	57,7

Реакция связывания двух видов смешанных восстановленных антител и малеимид-ЛНЧ

Равные количества антитела против CD3 человека (BE0001-2, BioXCell) и антитела против CD28 человека/обезьяны (BE0248, BioXCell), восстановленных ДТТ, смешивали в молярном количестве 1/20 с малеимидом малеимид-ЛНЧ. Концентрации и объемы малеимид-ЛНЧ и восстановленных антител показаны в табл. 2. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч и затем хранили при температуре 4°C до этапа очистки.

Таблица 2

Малеимид-ЛНЧ	Предполагаемая концентрация малеимида (мкМ)	Объем ЛНЧ (мл)	Масса смешанных антител (мкг)	Объем раствора смешанных антител (мкл)
Соединение 12- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	66,0	1,5	742	176
Соединение 21- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	86,2	0,27	175	43
Соединение 35- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	57,7	0,3	130	32

Гель-фильтрационная очистка антитела-ЛНЧ

Реакционную смесь восстановленного антитела и малеимида-ЛНЧ загружали на колонку для гель-фильтрации Sepharose CL-4B (каталожный номер 17-0150-01/GE Healthcare) и фракционировали с D-ФСБ (-) в качестве подвижной фазы. Затем концентрацию белка в каждой фракции измеряли для идентификации фракции, содержащей целевое антитело-ЛНЧ. Антитело-ЛНЧ фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр и хранили при температуре 4°C. Размер частиц полученного антитела-LNP измеряли с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Концентрации нуклеиновой кислоты и белка антитела измеряли с использованием набора реагентов для анализа дцДНК Quant-iT™ PicoGreen™ (Thermo Fisher Scientific) и набора реагентов для дериватизации амина ATTO-TAG™ FQ (Thermo Fisher Scientific), соответственно. Значения результатов каждого анализа приведены в табл. 3.

Таблица 3

Пример антитела-ЛНЧ	Размер частиц (нм)	Концентрация нуклеиновой кислоты (мкг/мл)	Концентрация антитела (мкг/мл)
hCD3/hCD28-Соединение 12- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	119	69	94
hCD3/hCD28-Соединение 21- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	95	65	82
hCD3/hCD28-Соединение 35- <i>pcDNA3.1-hCD19CAR</i>	98	49	38

Пример 9. Проведение трансфекции CD19 CAR в культивируемые первичные Т-клетки человека с использованием антитела-ЛНЧ

Рап-Т-клетки человека (рап-Т-клетки периферической крови человека AccuCell, отрицательный отбор) получали в концентрации $1,1 \times 10^6$ клеток/мл в среде и высевали в 96-луночный планшет в количестве 90 мкл/лунку. В качестве среды использовали X-VIVO10 (Lonza), дополненную рекомбинантным IL-2 (Thermo Fisher Scientific) в концентрации 30 нг/мл. Затем в среду добавляли 10 мкл антитела-ЛНЧ, разведенную ФСБ до концентрации 30 мкг/мл *pcDNA3.1-hCD19CAR*, и клетки культивировали при температуре 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 3 и 6 дней.

Оценка экспрессии CD19CAR методом проточной цитометрии

Культивируемые первичные Т-клетки человека, культивируемые в 96-луночном планшете, собирали в 1,5-мл пробирку, добавляли рекомбинантный белок CD19 человека, Fc Chimera Active, биотин (Abcam) (2 мкл) и выдерживали эту смесь на льду в течение 30 мин. Затем добавляли промывочный раствор Cell Wash (BD) с 200 мкл 1% ФБС, смесь дважды промывали центрифугированием при 300×g в течение 5 мин, супернатант удаляли и клетки диспергировали в 100 мкл 1% ФБС, Cell Wash. К клеточным дисперсиям добавляли 0,2 мкл бриллиантового фиолетового 421 и стрептавидин и после смешивания пипетированием дисперсии выдерживали на льду в течение 30 мин. Окрашенные клетки промывали три раза 200 мкл 1% ФБС Cell Wash и центрифугировали, фильтровали, диспергировали в 200 мкл 1% ФБС Cell Wash,

и анализ с помощью проточной цитометрии выполнялся на клеточном анализаторе LSRFortessa (BD).

Результаты анализа экспрессии CD19 CAR с помощью проточной цитометрии в культивируемых первичных Т-клетках человека, трансфицированных hCD3/hCD28-Соединение 12-pcDNA3.1-hCD19CAR, показаны на фиг. 1. Доля CD19-CAR-позитивных клеток через 3 и 6 дней после добавление антитела-ЛНЧ составляла 51,9 и 41,7% соответственно, и CAR-позитивные клетки были получены с достаточной эффективностью по сравнению с переносом гена вирусным вектором.

Результаты анализа экспрессии CAR19 CD19 с помощью проточной цитометрии в культивируемых первичных Т-клетках человека, трансфицированных hCD3/hCD28-Соединение 21-pcDNA3.1-hCD19CAR и hCD3/hCD28-Соединение 35-pcDNA3.1-hCD19CAR, показаны на фиг. 2. Доля VD19-CAR-позитивных клеток через 3 дня после добавления антитела-ЛНЧ составляла 5,12 и 47,2% соответственно.

Пример 10. Оценка цитотоксичности в отношении рака при культивировании первичных Т-клеток человека, трансфицированных CD19 CAR с помощью антитела-ЛНЧ

Линию пре-В-клеток человека NALM-6 и линию Daudi клеток лимфомы Беркитта человека, меченные набором реагентов для анализа цитотоксичности DELFIA (Perkin Elmer), в качестве клеток-мишеней, высевали при плотности клеток 1×10^4 клеток/100 мкл/лунка в 96-луночный планшет с U-образным дном. В качестве среды использовали среду RPMI, содержащую 10% ФБС, (без фенолового красного). Затем культивируемые первичные Т-клетки человека, трансфицированные CD19CAR с помощью hCD3/hCD28-Соединение 12-pcDNA3.1-hCD19CAR способом, описанным в другом разделе (доля CD19CAR-позитивных клеток через 3 дня после добавления антитела-ЛНЧ: 19%), добавляли в качестве эффекторных клеток путем диспергирования в 100 мкл среды таким образом, чтобы отношение числа клеток к клеткам-мишеням составляло от 0 до 16. Через 3 ч после смешивания клеток-мишеней и эффекторных клеток отбирали 20 мкл культурального супернатанта. Раствор европия (Eu) (20 мкл) добавляли к отобранному культуральному супернатанту, и показатель цитотоксичности рассчитывали по интенсивности флуоресценции, испускаемой комплексом хелатирующего агента TDA и Eu, высвобождаемым из поврежденной клетки-мишени.

Показатель цитотоксичности в отношении линий Nalm-6 и Daudi при добавлении первичных Т-клеток человека, трансфицированных CD19 CAR, приведен на фиг. 3.

Пример 11. Получение восстановленного Fab'

Восстановленный Fab' для конъюгации с малеимид-ЛНЧ получали из антитела против CD3s мыши (BE0001-1, BioXCell) и антитела против CD28 мыши (BE0015-1, BioXCell) с использованием набора реагентов Pierce F(ab')₂ Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific). 1 мл F(ab')₂ с концентрацией 1,75 мг/мл был получен из 7,86 мг/мл антитела против CD3s мыши (0,5 мл). 0,62 мл F(ab')₂ с концентрацией 0,97 мг/мл было получено из 3,86 мг/мл антитела против CD28 мыши (0,5 мл). Каждый препарат F(ab')₂ смешивали с 2-аминоэтантриол-п-толуолсульфонатом в качестве восстановителя в концентрации 40 мМ, и смесь выдерживали при температуре 37°C в течение 1 ч. Полученный Fab' очищали с помощью обессоливающих спин-колонок Zeba, 7K MWCO-0,5 мл (Thermo Fischer Scientific) и хранили при температуре 4°C до реакции с малеимид-ЛНЧ. Концентрации белка Fab' и тиольной группы измеряли по поглощению при длине волны 230 нм и флуоресцентной колориметрической реакции с N-(7-диметиламино-4-метилкумарин-3-ил)малеимидом (DASM) соответственно.

Пример 12. Реакция связывания восстановленного Fab' и малеимид-ЛНЧ

Восстановленный Fab' антитела против CD3ε мыши и Fab' антитела против CD28 мыши смешивали в молярном соотношении 1/20 с малеимидом малеимид-ЛНЧ, полученных вышеупомянутым способом. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 4 ч и затем хранили при температуре 4°C до этапа очистки.

Пример 13. Гель-фильтрационная очистка восстановленного Fab'-ЛНЧ

Реакционную смесь восстановленного Fab' и малеимид-ЛНЧ загружали на колонку для гель-фильтрации Sepharose CL-4B (каталожный номер 17-0150-01/GE Healthcare) и фракционировали с D-PBS (-) в качестве подвижной фазы. Затем концентрацию белка в каждой фракции измеряли, чтобы идентифицировать фракцию, содержащую целевой Fab'-ЛНЧ. Fab'-ЛНЧ фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр и хранили при температуре 4°C. Размер частиц полученного антитела-ЛНЧ измеряли с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Концентрации нуклеиновой кислоты и белка антитела измеряли с использованием набора реагентов для анализа дцДНК Quant-iT™ PicoGreen™ (Thermo Fisher Scientific) и набора для дериватизации амина ATTO-TAG™ FQ (Thermo Fisher Scientific) соответственно.

Промышленная применимость

Липидная наночастица настоящего изобретения может эффективно вводить CAR или экзогенный TCR избирательно в Т-клетки не только *ex vivo*, но также и *in vivo* и, таким образом, может обеспечивать терапию CAR-Т-клетками или TCR-Т-клетками с низкими производственными затратами. Кроме того, поскольку не применяется вирусный вектор, можно избежать проблемы антигенности вирусных белков, и эта липидная наночастица является чрезвычайно полезной в качестве новой платформы для иммунотерапии рака.

Настоящая заявка основана на патентной заявке No. 2017-252616, поданной в Японии (дата подачи: 27 декабря 2017 г.), содержание которой полностью включено в настоящую заявку путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная наночастица для профилактики или лечения рака, содержащая следующие элементы (a)-(c):

(a) нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор или экзогенный Т-клеточный рецептор;

(b) катионный липид и

(c) некаатионный липид,

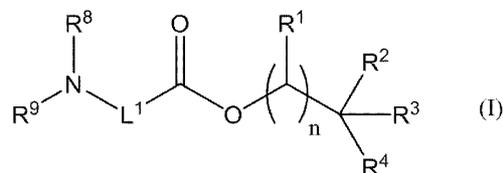
где вышеуказанная липидная наночастица имеет лиганд, который может быть нацелен на Т-клетки на поверхности,

где лиганд связывается с внешней оболочкой липидной наночастицы, таким образом он присутствует на поверхности липидной наночастицы,

где лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен одного или нескольких антител, выбранных из группы, состоящей из анти-CD3 антитела, анти-CD4 антитела, анти-CD8 антитела и анти-CD28 антитела; и

где липидная наночастица вводит ген химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора в Т-клетку *in vivo* для индукции его экспрессии.

2. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанный катионный липид представляет собой соединение, представленное структурной формулой (I)



где

L¹ представляет собой C₁₋₂₂алкиленовую группу, C₂₋₂₂алкениленовую группу или C₃₋₂₂алкадиениленовую группу,

n представляет собой целое число 0 или 1,

R¹ представляет собой:

(1) атом водорода,

(2) линейную C₁₋₂₂алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы,

(3) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы, или

(4) линейную C₃₋₂₂алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы,

R² представляет собой -CH₂-O-CO-R⁵, -CH₂-CO-O-R⁵ или -R⁵,

R³ представляет собой -CH₂-O-CO-R⁶, -CH₂-CO-O-R⁶ или -R⁶,

R⁴ представляет собой атом водорода, -CH₂-O-CO-R⁷, -CH₂-CO-O-R⁷ или -R⁷,

R⁵, R⁶ и R⁷ каждый независимо представляет собой:

(1) линейную C₁₋₂₂алкильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы,

(2) линейную C₂₋₂₂алкенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы, или

(3) линейную C₃₋₂₂алкадиенильную группу, необязательно замещенную одним или двумя заместителями, выбранными из линейной C₁₋₂₂алкильной группы и линейной C₂₋₂₂алкенильной группы,

R⁸ и R⁹ каждый независимо представляет собой C₁₋₆алкильную группу

или его соль.

3. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанная нуклеиновая кислота представляет собой мРНК или ДНК.

4. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанный некаатионный липид представляет собой фосфолипид, холестерин и/или ПЭГ липид.

5. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанный лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела и/или анти-CD28 антитела.

6. Липидная наночастица по п.1, где вышеуказанный лиганд представляет собой лиганд, содержащий антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела.

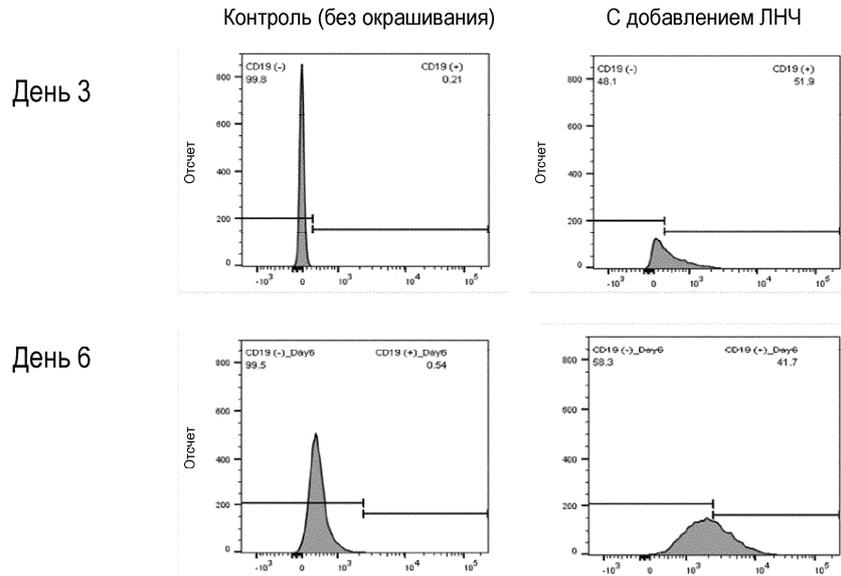
7. Лекарственное средство для профилактики или лечения рака, содержащее липидную наночастицу по п.1.

8. Способ экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора в Т-клетке млекопитающего *in vivo*, включающий в себя введение млекопитающему липидной наночастицы по п.1.

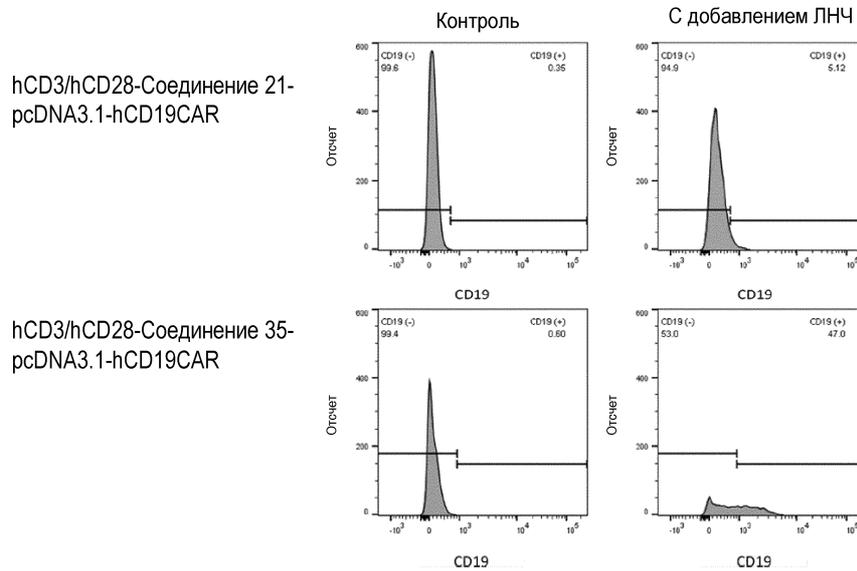
9. Способ предотвращения или лечения рака у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему липидной наночастицы по п.1.

10. Применение липидной наночастицы по п.1 при производстве лекарственного средства для профилактики или лечения рака.

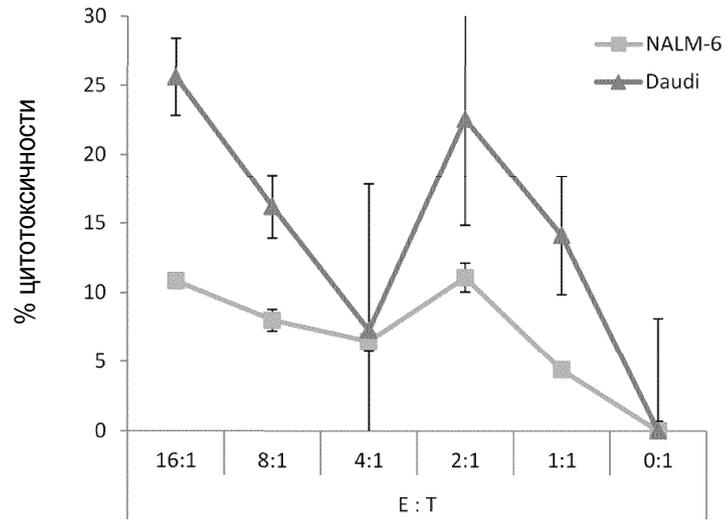
11. Композиция для индукции экспрессии химерного антигенного рецептора или экзогенного Т-клеточного рецептора, содержащая липидную наночастицу по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

