

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039755**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.03.10

(21) Номер заявки

201890079

(22) Дата подачи заявки

2016.06.22(51) Int. Cl. **C12N 5/0786** (2010.01)**A61K 38/42** (2006.01)**A61K 47/48** (2006.01)**A61K 35/15** (2015.01)

(54) КЛЕТОЧНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ АКТИВНОГО ИНГРЕДИЕНТА

(31) **412787**(32) **2015.06.22**(33) **PL**(43) **2018.07.31**(86) **PCT/EP2016/064484**(87) **WO 2016/207257 2016.12.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

СЕЛЛИС АГ (СН)

(72) Изобретатель:

**Круль Магдалена (PL), Бенни Ирен,
Байокко Паола (IT), Рыгель Томаш
(PL), Боффи Альберто (IT)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) JAE-A HAN ET AL.: "Ferritin protein cage nanoparticles as versatile antigen delivery nanoplatfoms for dendritic cell (DC)-based vaccine development", NANOMEDICINE: NANOTECHNOLOGY, BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 10, no. 3, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 561-569, XP055303599, NL ISSN: 1549-9634, DOI: 10.1016/j.nano.2013.11.003 the whole document

XU F. ET AL.: "Long-circulation of hemoglobin-loaded polymeric nanoparticles as oxygen carriers with modulated surface

charges", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 377, no. 1-2, 30 July 2009 (2009-07-30), pages 199-206, XP026281940, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2009.05.015 [retrieved on 2009-05-18] the whole document

JINHYANG CHOI ET AL.: "Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 33, no. 16, 9 February 2012 (2012-02-09), pages 4195-4203, XP028474951, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.02.022 [retrieved on 2012-02-13] the whole document

TRACY R. DANIELS ET AL.: "The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS, vol. 1820, no. 3, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 291-317, XP055133141, ISSN: 0304-4165, DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.07.016 the whole document

PARISA YOUSEFPOUR ET AL.: "Co-opting biology to deliver drugs", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING., vol. 111, no. 9, 21 July 2014 (2014-07-21), pages 1699-1716, XP055302919, US ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.25307 the whole document

(57) Изобретение относится к выделенной клеточной системе для направленной доставки, содержащей клетку, представляющую собой CD45⁺ лейкоцит, при этом в указанной клетке содержится комплекс по меньшей одной железосвязывающего белка с активным ингредиентом, а также способам получения такой выделенной клеточной системы для направленной доставки и применениям такой системы для терапии, в частности для терапии рака.

039755
B1

039755
B1

Настоящее изобретение относится к выделенной клеточной системе для направленной доставки, содержащей клетку, представляющую собой CD45⁺ лейкоцит, причем в указанной клетке содержится комплекс по меньшей мере одного железосвязывающего белка с активным ингредиентом, а также к способам получения такой клеточной системы для направленной доставки и применениям такой системы для терапии, в частности для терапии рака.

Уровень техники

Существующие на сегодняшний день инструменты визуализации способны обнаруживать большие метастазы (размером более 0,5-1 см). Тем не менее, с их помощью редко обнаруживают раннее распространение метастатических опухолевых клеток. Метастазы человека размером менее 0,5 см лишены сосудов и, следовательно, в них отсутствует надлежащая подача крови и кислорода. Это означает, что доставка контрастных агентов через кровотоки с целью маркировки таких метастаз и их визуализации невозможна. При микрометастазах распространенной особенностью является наличие гипоксии, при этом гипоксическая фракция, в которой кровообращение незначительно или отсутствует, может достигать 90% (Li et al., 2012, *Journal of Solid Tumors*, 2 (2): 28-33). Таким образом, тяжелую степень гипоксии рассматривают как общую особенность микрометастаз.

Нацеливание по меньшей мере на одну метастазу, скрытую среди большой популяции нормальных (здоровых) клеток, представляется уникальной задачей, поскольку доступу к микрометастазам препятствует несколько биологических барьеров, плохое кровоснабжение; дополнительными трудностями являются небольшие размеры микрометастаз и их распространение в органах.

По этой же причине микрометастазы часто не отвечают на терапию. В то время как солидные опухоли, из которых возникают микрометастазы, зачастую хорошо реагируют на традиционную терапию, в местах возникновения первичной опухоли или метастаз зачастую происходит возобновление роста. Это представляет собой серьезную проблему в области клинической онкологии (Muthana et al., 2012, *Cancer Res.*, 73 (2), 490-495). Данная особенность связана с особенностями микроокружения солидных опухолей, которые ограничивают проникновение лекарственного средства, и в связи с этим лекарственные средства проникают в опухоль с концентрацией меньше эффективной (Hobbs, et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 4607-4612). Это вызвано неполноценностью сосудистой сети, которая приводит к: высокой гетерогенности раковых клеток, низкому кислородному потенциалу (гипоксии), низкому pH и низкой концентрации глюкозы в массе опухоли (Kizaka-Kondoh, et al., 2003, *Cancer Sci.* 94 (12): 1021-1028). Кроме того, быстрая пролиферация опухолевых клеток в некоторых областях может опережать темпы роста нового кровеносного сосуда, способствуя образованию гипоксической области (Lewis and Murdoch, 2005, *Am. J. Pathol.* 167 (3): 627-635). Такую аномальную архитектуру сосудов и впоследствии их нарушенную функцию, приводящую к опухолевой гипоксии, ассоциируют с более злокачественным фенотипом клеток и плохой выживаемостью у пациентов, страдающих от солидных опухолей, и она приводит как к безрезультатному лечению вследствие пониженного поглощения лекарственных средств, так и к изменениям в раковых клетках, индуцируемым гипоксией (Sun, et al., 2012, *Clin. Cancer Res.* 18 (3): 758-770; Sullivan et al., 2008 *Mol. Cancer Ther.* 7 (7): 1961-1973, Kizaka-Kondoh, et al., 2003, *Cancer Sci.* 94 (12): 1021-1028). Более того, химиотерапия или лучевая терапия обуславливают дополнительное образование больших областей гипоксии в опухоли, что затрудняет лечение опухоли. Тот факт, что эффективность противораковой терапии ограничивается наличием гипоксических опухолевых клеток, привел к внедрению разнообразных терапевтических подходов, направленных на преодоление этой проблемы. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что клетки, представляющие собой CD45⁺ лейкоцит, в частности активированные макрофаги, могут поглощать активные ингредиенты, которые образуют комплекс по меньшей мере с одним железосвязывающим белком *in vitro*, и доставлять эти комплексы к поверхности или внутрь клеток, предпочтительно к поверхности или внутрь клеток опухоли *in vivo*. На основе этого наблюдения авторы настоящего изобретения преодолели по меньшей мере одну из вышеперечисленных проблем предшествующего уровня техники. Таким образом, система для направленной доставки согласно настоящему изобретению обеспечивает, в частности, по меньшей мере одно из следующих преимуществ: (i) специфическую доставку одного или более активных ингредиентов в ткани, которые привлекают вышеупомянутые CD45⁺ лейкоциты, предпочтительно в пораженные заболеванием клетки, (ii) защиту активных ингредиентов от инактивации в кровотоке или при выведении из организма, (iii) доставку активных ингредиентов предпочтительно в клетки слабо- или невазкуляризованных областей заболевания, например, метастазы, гипоксические области в более крупных опухолях, ревматические очаги поражения, аваскулярные раневые дефекты кожного покрова, (iv) пониженную токсичность активного ингредиента, (v) доставку активных ингредиентов со слабой фармакокинетикой, (vi) уменьшение побочных эффектов лекарственных средств вследствие их направленной доставки, (vii) более высокую эффективность лечения при более низких дозах лекарственных средств вследствие направленной доставки и/или (viii) более низкий риск повреждения местной ткани в участке введения лекарственного средства вследствие введения лекарственного средства, связанного с железосвязывающим белком, который нагружен внутри CD45⁺ лейкоцита (Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. 2015, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93: 52-79).

Краткое описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной доставки, содержащей клетку, представляющую собой CD45⁺ лейкоцит, которая предпочтительно может интернализировать железосвязывающий белок, причем в указанной клетке содержится комплекс по меньшей мере одного железосвязывающего белка с по меньшей мере одним активным ингредиентом.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к способу получения выделенной системы для направленной доставки согласно первому аспекту настоящего изобретения, включающему стадии:

- a) обеспечения железосвязывающего белка, предпочтительно очищенного;
- b) ковалентного или нековалентного связывания активного ингредиента с железосвязывающим белком и/или инкапсулирования активного ингредиента в железосвязывающем белке;
- c) обеспечения клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, и
- d) инкубации указанной клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, в присутствии комплекса железосвязывающего белка с активным ингредиентом, полученного на стадии b), до тех пор, пока указанная клетка, представляющая собой CD45⁺ лейкоцит, по меньшей мере частично, не будет нагружена указанным комплексом железосвязывающего белка с указанным активным ингредиентом, полученным на стадии b).

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной доставки согласно первому аспекту настоящего изобретения для применения в качестве лекарственного средства.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенную систему для направленной доставки согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель и/или подходящее вспомогательное вещество(а).

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной доставки согласно первому аспекту настоящего изобретения для применения в предотвращении/лечении опухоли, предпочтительно солидной опухоли, предпочтительно рака груди, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака легких, рака толстой кишки, или опухоли, имеющей гипоксические области, областей воспалительного заболевания или ишемических областей, в частности, в раневых дефектах кожного покрова, или областях после инфаркта органов (сердца), или ишемии сетчатки.

Подробное описание предпочтительных вариантов реализации

До того как настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут варьировать. Следует также понимать, что применяемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понятны специалисту в данной области техники.

Ниже будут описаны компоненты настоящего изобретения. Эти компоненты перечислены в конкретных вариантах реализации, тем не менее следует понимать, что их можно комбинировать любым способом и в любом количестве для создания дополнительных вариантов реализации. Различные описанные примеры и предпочтительные варианты реализации не должны толковаться как ограничивающие настоящее изобретение только однозначно описанными вариантами реализации. Это описание следует понимать как поддерживающее и охватывающее варианты реализации, которые объединяют однозначно описанные варианты реализации с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных компонентов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных компонентов в данной заявке следует рассматривать как раскрытые описанием настоящей заявки в случае, когда контекст не указывает на иное.

В тексте настоящего описания изобретения приводятся ссылки на несколько документов. Каждый из приведенных в настоящей заявке документов (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), независимо от того, расположены ли они ранее или далее по тексту, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Ничто в настоящем документе не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не предоставляет права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения.

Определения.

Для практического применения настоящего изобретения до тех пор, пока не указано иное, используют общепринятые методы химии, биохимии и рекомбинантной ДНК, которые объясняются в литературе в данной области техники (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook и др. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

На протяжении всего описания изобретения и последующей формулы изобретения в случае, если контекст явно не указывает на иное, слово "содержать" и его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа или стадии или группы целых чисел или

стадий. В контексте настоящего описания изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественные ссылки до тех пор, пока контекст явно не указывает иное.

Термин "направленная доставка лекарственного средства" относится к доставке активного ингредиента в организм пациента, которая приводит к повышенной концентрации указанного активного ингредиента в определенной области тела по сравнению с другими областями тела этого пациента. Предпочтительно относительные концентрации сравниваются между пораженной(ыми) заболеванием областью(ями) тела и другими областями тела, которые одинаково снабжаются кровью. В предпочтительных вариантах реализации концентрация активного ингредиента в заданном числе клеток или заданном биопсийном объеме, полученном из пораженной заболеванием области, по меньшей мере на 10% выше по сравнению с идентичным числом клеток или биопсийным объемом, полученным из непораженной заболеванием области после введения указанной системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению, предпочтительно через 2-24 ч. В более предпочтительном варианте концентрация активного ингредиента в пораженной заболеванием области тела пациента по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере на 1000% выше, чем в непораженной заболеванием области тела после введения системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению, предпочтительно через 2-24 ч. В том случае, когда оценку осуществляют на основе распределения во всему телу, предпочтительно, чтобы по меньшей мере 5% активного ингредиента, вводимого пациенту, доставлялось в пораженную заболеванием область тела, предпочтительно по меньшей мере 10%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 15%. Направленная доставка указанного активного ингредиента ограничивает потенциальное вредное воздействие активного ингредиента на пораженную заболеванием область тела.

Термины "система для направленной доставки лекарственных средств" или "система для направленной доставки" в настоящей заявке применяют в качестве синонимов, и они относятся к системе, которая может доставлять активный ингредиент в область-мишень, т.е. может осуществлять направленную доставку, предпочтительно внутрь тела пациента.

Термины "активный ингредиент" или "лекарственное средство" в контексте настоящего изобретения применяют в качестве синонимов, и они относятся к любому соединению, которое модифицирует или модулирует клеточную активность или может активироваться, т.е. пролекарству, для модификации или модуляции клеточной активности предпочтительно в теле пациента. Примеры таких активных ингредиентов включают так называемые "малые молекулы" и пептиды. Термин "малая молекула" в контексте настоящего изобретения применяют для обозначения углеводорода с молекулярной массой менее 1,500 г/моль или к фармацевтически активными радиоактивными изотопами. Предпочтительные лекарственные средства, которые можно применять, включают противораковые лекарственные средства, фармацевтически активные радиоактивные изотопы или ферригидрит.

Термин "пролекарство", применяемый в контексте настоящего изобретения, относится к любому активному ингредиенту, который после введения метаболизируется или иным образом превращается в биологически активный или более активный ингредиент (или лекарственное средство) в отношении по меньшей мере одного свойства. По сравнению с лекарственным средством пролекарство химически модифицируется таким образом, что делает его менее активным или неактивным относительно лекарственного средства, однако указанная химическая модификация такова, что соответствующее лекарственное средство образуется посредством метаболических или других биологических процессов после того, как пролекарство вводят пациенту. Пролекарство при сравнении с активным лекарственным средством может, например, обладать измененной метаболической стабильностью или измененными транспортными характеристиками, меньшим количеством побочных эффектов или более низкой токсичностью, или улучшенным вкусом (например, см. ссылку Nogrady, 1985, Medicinal Chemistry Biochemical Approach, Oxford University Press, New York, pages 388-392, включенную в настоящий документ посредством ссылки). Пролекарство можно синтезировать с применением реагентов, отличных от соответствующего лекарственного средства.

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" в настоящем документе применяют взаимозаменяемо, и под ними понимают полимерную или олигомерную макромолекулу, получаемую из нуклеотидных мономеров. Нуклеотидные мономеры состоят из нуклеинового основания, пятиуглеродного сахара (такого как, но не ограничиваясь им, рибозы или 2'-дезоксирибозы) и от одной до трех фосфатных групп. Обычно полинуклеотид образуется посредством фосфодиэфирных связей между отдельными нуклеотидными мономерами. В контексте настоящего изобретения упомянутые молекулы нуклеиновых кислот включают, но не ограничиваются ими, рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и их смеси, такие как, например, РНК-ДНК-гибриды. Нуклеиновые кислоты можно, например, синтезировать химически, например, в соответствии с фосфотриэфирным методом (см., на-

пример, Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) *Chemical Reviews*, 90, 543-584).

"Аптамеры" представляют собой нуклеиновые кислоты, которые с высокой аффинностью связываются с полипептидом. Аптамеры можно выделить при помощи методов селекции, таких как SELEmir146-a (см., например, Jayasena (1999) *Clin. Chem.*, 45, 1628-50; Klug and Famulok (1994) *M. Mol. Biol. Rep.*, 20, 97-107, патент США № 5582981), из большого пула различных молекул одноцепочечных РНК. Аптамеры также можно синтезировать и отобрать в форме их зеркального отображения, например, в виде L-рибонуклеотида (Nolte et al., 1996) *Nat. Biotechnol.*, 14, 1116-9; Klussmann et al. (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14, 1112-5). Выделенные таким образом формы наделены тем преимуществом, что они не разлагаются встречающимися в природе рибонуклеазами и, следовательно, обладают большей стабильностью.

Термин "пептид" или "полипептид" в контексте настоящего изобретения применяют взаимозаменяемо для обозначения цепи по меньшей мере двух аминокислот, связанных при помощи пептидных связей. Таким образом, термин "пептид" в контексте настоящего изобретения также применяют для обозначения аминокислотных цепей с более чем 50, более чем 100 или более чем 150 аминокислотами.

Термин "антитело", применяемый в контексте настоящего изобретения, относится к гликопротеину, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулина; термины антитело и иммуноглобулин часто применяют взаимозаменяемо. Антитело относится к молекуле белка, продуцируемой плазматическими клетками, и иммунная система применяет его для идентификации и нейтрализации посторонних объектов, таких как бактерии и вирусы. Антитело распознает уникальную часть чужеродной мишени - ее антиген.

В контексте настоящего описания термин "фрагмент антитела" относится по меньшей мере к одному фрагменту антитела, которое сохраняет способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, которые включает в себя термин "фрагмент антитела", включают фрагмент антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент антитела с тяжелой цепью, однодоменное антитело (sdAb), переменный одноцепочечный фрагмент (scFv), переменный фрагмент (Fv), V_H-домен, V_L-домен, однодоменное антитело, нанотело, IgNAR (новый иммуноглобулиновый антигеновый рецептор), двойной-scFv, биспецифический активатор Т-клеток (BITE), молекулу для повторного нацеливания с двойной аффинностью (DART), триатело (triple body), диатело, одноцепочечное диатело, альтернативный скаффолд-белок и его гибридный белок.

Термин "диатело", применяемое в настоящем описании, относится к гибриднему белку или двухвалентному антителу, которые могут связывать различные антигены. Диатело состоит из двух одиночных белковых цепей, которые содержат фрагменты антитела, а именно переменные фрагменты. Диатела содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в той же полипептидной цепи (V_H-V_L или V_L-V_H). Используя короткий пептид, соединяющий два переменных домена, указанные домены вынуждены соединиться (образовывать пару) с комплементарным доменом другой цепи и, таким образом, создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут нацеливаться на одни и те же (моноспецифические) или разные антигены (биспецифические).

"Однодоменное антитело" относится к фрагментам антител, состоящим из одиночного мономерно-переменного домена антитела. В буквальном смысле они содержат только мономерные переменные области тяжелой цепи антител, продуцируемые у верблюдов или хрящевых рыб. Вследствие их различного происхождения они также относятся к V_HN- или V_NAR-(новые переменные антигенные рецепторы)фрагментам. В альтернативном варианте однодоменные антитела можно получить путем полимеризации переменных доменов обычных мышинных или человеческих антител с применением генной инженерии. Их молекулярная масса составляет приблизительно 12-15 кДа и, таким образом, они являются наименьшими фрагментами антител, которые могут распознавать антигены. Другие примеры включают нанотела или наноантитела.

Термин "миметик антитела", применяемое в контексте настоящего описания, относится к соединениям, которые могут специфически связывать антигены аналогично антителу, однако с точки зрения структуры они не относятся к антителам. Обычно миметики антител представляют собой искусственные пептиды или белки с молярной массой приблизительно 3-20 кДа, которые содержат один, два или более экспонированных доменов, специфически связывающихся с антигеном. Примеры, в частности, включают LACI-D1 (ассоциированный с липопротеином ингибитор коагуляции); аффилины, т.е. человеческий γ -В-кристаллин или человеческий убиквитин; цистатин; Sac7D, полученный из *Sulfolobus acidocaldarius*; липокалин и антикалины, полученные из липокалинов; DARPiны (сконструированные анкириновые повторные домены); SH3-домен Fyn; домен Kunitz ингибиторов протеазы; монотела, например, 10-й домен фибронектина типа III; аднектины: кноттины (цистеиновый узел минимизированных белков); атримеры; евитела (evibodies), например, связующие на основе CTLA4; аффитела, например, трехспиральный пучок из Z-домена белка A, полученного из *Staphylococcus aureus*; транстела, например, человеческий трансферрин; тетранектины, т.е. мономерный или тримерный домен лектина С-типа человека; микротела, например, ингибитор II трипсина; аффилины; белки с armadillo-повторами. Нуклеиновые кислоты и малые молекулы иногда также рассматривают в качестве миметиков антител (аптамеров), но не рассматривают искусственные антитела, фрагменты антител и гибридные белки, составленные из них. Характерными преимуществами по сравнению с антителами являются лучшая растворимость, лучшее проникновение в ткани, устойчивость к теплу и ферментам и сравнительно низкие издержки производства.

Термин "идентичность последовательности" применяют на протяжении всего описания при сравнении полипептидных и нуклеотидных последовательностей. В случае, когда сравнивают две последовательности и не указана референсная (эталонная) последовательность, в сравнении с которой рассчитывается процент идентичности последовательности, идентичность последовательности следует рассчитывать со ссылкой на более длинную из двух последовательностей, подлежащих сравнению, если конкретно не указано иное. Если указана референсная последовательность, то идентичность последовательности определяют на основе полной длины референсной последовательности, обозначаемой SEQ ID, если конкретно не указано иное. Например, при сравнении полипептидной последовательности, состоящей из 200 аминокислот, с референсной полипептидной последовательностью длиной 300 аминокислот максимальный процент идентичности последовательности может составлять 66,6% (200/300), тогда как для последовательности длиной 150 аминокислот максимальный процент идентичности последовательности может составлять 50% (150/300). Если 15 из этих 150 аминокислот отличаются от соответствующих аминокислот референсной последовательности длиной 300 аминокислот, уровень идентичности последовательностей снижается до 45%. Сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, т.е. процент идентичности последовательности, можно определить при помощи выравнивания последовательностей. Такие выравнивания можно проводить при помощи нескольких алгоритмов, известных в данной области техники, предпочтительно при помощи математического алгоритма Карлина и Альтшуля (Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877), при помощи hmmalign (пакет HMMER, <http://hmmerr.wustl.edu/>) или с помощью алгоритма CLUSTAL (Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) Nucleic Acids Res., 22, 4673-80), доступного, например, по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>, или по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, или по адресу http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html. Предпочтительными параметрами для применения служат параметры по умолчанию, поскольку они установлены <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> или <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Степень идентичности последовательности (совпадение последовательностей) можно рассчитать с применением, например, BLAST, BLAT или BlastZ (или BlastX). Поиск белков с применением BLAST выполняют при помощи программы BLASTP, вес выравнивания = 50, длина слова = 3. Чтобы получить gapped-выравнивание для сравнительных целей, применяют Gapped BLAST, описанный у Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST применяют параметры по умолчанию для соответствующих программ. Анализ совпадения последовательностей можно дополнить установленными методами картирования гомологов, такими как Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-I62), или с применением Марковских случайных полей. Также можно применять структурные выравнивания для множественных последовательностей белков и/или структур с применением информации, полученной по результатам поиска в базах данных последовательностей, доступных гомологов с трехмерными структурами и определяемых пользователем ограничений (Pei J., Grishin N.V.: PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. Bioinformatics 2007, 23: 802-808; 3DCoffee@igs: веб-сервер для комбинирования последовательностей и структур при множественном выравнивании последовательностей. Poirrot O., Suhre K., Abergel C., O'Toole E., Notredame C. Nucleic Acid Res. 2004 Jul 1; 32:W37-40). В том случае, когда в настоящей заявке упоминаются проценты идентичности последовательности, эти проценты рассчитываются относительно полной длины более длинной последовательности, если конкретно не указано иное.

Термин "лейкоцит" в контексте настоящего изобретения применяют для обозначения клеток иммунной системы, которые участвуют в защите организма как от инфекционного заболевания, так и от чужеродных агентов. Все лейкоциты образуются в костном мозге и происходят из мультипотентных клеток, известных как гематopoэтические стволовые клетки. Лейкоциты обнаруживают во всех областях тела, включая кровь и лимфатическую систему. Все лейкоциты имеют ядра, которые отличают их от других клеток крови, безъядерных эритроцитов и тромбоцитов. По типу лейкоциты можно классифицировать общепринятым образом. Их классификация по двум парам самых больших категорий основана либо на структуре (гранулоциты или агранулоциты), либо на линии клеточного деления (миелоидные клетки или лимфоидные клетки). Эти самые большие категории можно дополнительно разделить на пять основных типов (подкатегорий): нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты. Такие типы отличаются по своим физическими и функциональными характеристиками. Моноциты и нейтрофилы представляют собой фагоциты. Можно классифицировать и другие подтипы; например, среди лимфоцитов имеются В-клетки, Т-клетки и природные клетки-киллеры (НК-клетки). Гранулоциты отличаются от агранулоцитов по форме ядра (дольная в сравнении с круглой, т.е. полиморфноядерные в сравнении с моноядерными) и по гранулам цитоплазмы (присутствующим или отсутствующим или, что точнее, видимым в световой микроскоп или таким образом не видимым). Другая дихотомия - по линии дифференцировки: миелоидные клетки (нейтрофилы, моноциты, эозинофилы и базофилы) отличаются от лимфоидных клеток (лимфоцитов) гематopoэтической линией дифференцировки (линией дифференцировки клеток).

Авторы настоящего изобретения наблюдали, что экспрессия CD45⁺ характерна для клеток лейкоцитов, которые являются подходящими для применения в контексте системы для направленной

доставки согласно настоящему изобретению, в частности, поскольку клетки, представляющие собой CD45⁺ лейкоцит, притягиваются к определенным тканям и клеткам в теле и они могут доставлять комплексы по меньшей мере одного железосвязывающего белка с по меньшей мере одним активным ингредиентом к поверхности или внутрь клеток. Квалифицированному специалисту будет понятно, что клетки, представляющие собой CD45⁺ лейкоцит, кроме случаев происхождения из клонов, представляют собой смешанную популяцию различных лейкоцитов, которые обладают общим свойством экспрессии поверхностного антигена CD45⁺. Соответственно, субпопуляцию клеток в разнообразной группе CD45⁺ лейкоцитов характеризуют на протяжении всего описания при помощи дополнительных функциональных и/или структурных характеристик. Термин "CD45⁺" указывает, что большинство клеток в популяции клеток или, по существу, все клетки экспрессируют поверхностный антиген CD45⁺. В этом контексте, а также со ссылкой на другие клеточные поверхностные антигены, термин "экспрессирует" указывает на то, что поверхностный антиген продуцируется в клетке и экспонируется на поверхности клетки с возможностью обнаружения. Уровень экспрессии и, таким образом, количество поверхностных антигенов, экспонированных на поверхности клетки с возможностью обнаружения, может сильно варьироваться у разных лейкоцитов. В целом клетка считается положительной, т.е. ее обозначают как "+", для клеточного поверхностного антигена, если по меньшей мере 5, предпочтительно по меньшей мере 10 копий поверхностного антигена экспонируются на поверхности указанной клетки с возможностью обнаружения. Квалифицированный специалист хорошо осведомлен о том, как обнаруживать, количественно определять и производить отбор клеток, которые являются положительными (или отрицательными) для данного клеточного поверхностного антигена. Предпочтительные способы включают метод сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В этой технологии флуоресцентно меченые антитела применяют для связывания с клеточными поверхностными антигенами популяции клеток, причем указанные клетки затем выделяют в отдельные клетки и на основе интенсивности флуоресценции, измеренной для указанной отдельной клетки, характеризуют как положительные или отрицательные для данного клеточного поверхностного антигена. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указывается, что экспрессия данного белка является высокой или низкой. Это означает, что белок экспрессируется с возможностью обнаружения в обоих случаях, т.е. "+", однако, на разных уровнях. Высокая и низкая экспрессия соответственно будет означать разные абсолютные количества белков на клетку для разных белков. Таким образом, можно считать, что данный белок экспрессируется на высоких уровнях, если имеется более 500 обнаруживаемых копий этого белка на клетку, и экспрессируется на низких уровнях, если имеется от 1 до 50 обнаруживаемых копий этого белка на клетку. Тем не менее, можно считать, что другой белок экспрессируется на высоких уровнях, если имеется более 5000 обнаруживаемых копий, и экспрессируется на низких уровнях, если имеется от 1 до 500 обнаруживаемых копий на клетку. В данном уровне техники хорошо известно, каким образом можно количественно определить количество белков, экспрессируемых или продуцируемых в клетке, применяя метод проточной цитометрии и метод с применением микроносителей Becton Dickinson Quantibrite™ (см., например, Pannu, K.K., 2001, *Cytometry*, 2001, Dec. 1, 45 (4): 250-8) или метод масс-спектрометрии (см., например, Milo, R., 2013, *Bioessays*, 35 (12): 1050-1055). Для целей настоящего изобретения термин "высокая экспрессия" данного белка относится к обнаруживаемой экспрессии этого белка, которая составляет по меньшей мере 70% от самого высокого уровня экспрессии, т.е. числа копий на клетку, в популяции здоровых CD45⁺ лейкоцитов. Термин "низкая экспрессия" данного белка относится к обнаруживаемой экспрессии этого белка, которая составляет 30% или менее от самого высокого уровня экспрессии, т.е. числа копий этого белка на клетку, в популяции здоровых CD45⁺ лейкоцитов. Предпочтительно "наивысший уровень экспрессии" определяют как среднее значение наивысших уровней экспрессии, обнаруживаемых в здоровых CD45⁺ лейкоцитах у разных субъектов. В некоторых вариантах реализации предпочтительные субпопуляции клеток характеризуются как "продуцирующие" данный белок. Под этим понимается, что указанный белок не обязательно обнаруживается на поверхности клетки, он может и присутствовать только внутри клетки. Квалифицированный специалист хорошо осведомлен о том, как обнаруживать и/или количественно определять образование белка внутри клетки и/или как выбирать клетки, продуцирующие такие белки.

Термин "дифференцированный моноцит" применяют в контексте настоящего изобретения для обозначения моноцита, дифференцированного от коммитированного предшественника, обозначаемого как предшественник макрофагов дендритных клеток (DC) (MDP), который в основном содержится в костном мозге (но может также присутствовать в селезенке) и дифференцироваться в либо дендритные клетки, либо в макрофаги. У мышей они состоят из двух основных субпопуляций: (i) CD11b⁺ клетка с высокой экспрессией CX3CR1, низкой экспрессией CCR2 и Ly6C⁺, и (ii) CD11b⁺ клетка с низкой экспрессией CX3CR1, высокой экспрессией CCR2 и Ly6C⁺. После выхода из костного мозга мышинные Ly6C⁺ моноциты в кровотоке дифференцируются в Ly6C⁺ моноциты. Аналогичным образом при дифференцировке моноцитов человека считается, что классические моноциты CD14⁺⁺ выходят из костного мозга и дифференцируются в промежуточные CD14⁺⁺CD16⁺ моноциты и затем до неклассических CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов в периферическом кровотоке (Yang et al., 2014; *Biomark Res.* 2 (1), 10.1186/2050-7771-2-1).

Макрофаги представляют собой резидентные тканевые профессиональные фагоциты и антигенпрезентирующие клетки (APC), которые отличаются от циркулирующих моноцитов периферической крови

(PBM). Термин "активированный макрофаг" применяют в контексте настоящего изобретения для обозначения любого поляризованного макрофага. Активацию макрофагов обычно достигают путем инкубации с интерлейкинами, цитокинами и/или факторами роста. В частности, IL-4 и M-CSF можно применять в качестве активирующих агентов. Активированные макрофаги разных фенотипов классифицируют на M1-макрофаги, классически активированные макрофаги (СAM), и M2-макрофаги, альтернативно активированные макрофаги (AAM). Классически активированные M1-макрофаги включают иммунные эффекторные клетки с острым воспалительным фенотипом. Они очень агрессивны в отношении бактерий и продуцируют большое количество лимфокинов (Murray and Wynn, 2011, J. Leukoc. Biol., 89 (4): 557-63). Альтернативно активированные, противовоспалительные M2-макрофаги можно разделить по меньшей мере на три подгруппы. Эти подтипы обладают множеством различных функций, включая регуляцию иммунитета, поддержание толерантности и восстановление тканей/заживление раневых поражений. Термин "M1-индуктор" в контексте настоящего изобретения применяют для обозначения соединения, которое управляет дифференцировкой PBM до макрофагов типа M1. Термин "M2-индуктор" в контексте настоящего изобретения применяют для обозначения соединения, которое управляет дифференцировкой PBM до макрофагов типа M2. Квалифицированному специалисту известно большое число способов стимулирования дифференцировки в M1- или M2-макрофаги.

Термин "фагоцитоз макрофагами" представляет собой процесс, посредством которого макрофаг поглощает твердую частицу с образованием внутреннего везикула, известного как фагосома.

Применяемый термин "железосвязывающий белок" относится к белку, который нековалентно связывает ион железа. Примеры таких белков включают ферритин, гемоглобин, трансферрин и лактоферрин. Железосвязывающие белки связываются рецепторами клеточной поверхности, которые способствуют интернализации этих белков в клетки.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной доставки, содержащей клетку, представляющую собой CD45⁺ лейкоцит, которая предпочтительно может интернализировать железосвязывающий белок, причем в указанной клетке содержится комплекс по меньшей мере одного железосвязывающего белка с по меньшей мере одним активным ингредиентом.

Способность данной клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, или клеточной популяции интернализировать железосвязывающие белки зависит от экспрессии рецепторов, участвующих в таком процессе интернализации. Рецепторы, которые приводят к интернализации ферритина, включают, например, TfR, CXCR4, CD163 и TIM-2. Квалифицированный специалист хорошо осведомлен о том, каким образом измерять количество поглощений железосвязывающего белка, и предпочтительный способ измерения такого поглощения описан ниже в разделе "Примеры". Авторы настоящего изобретения также отметили, что субпопуляции CD45⁺ клеток-лейкоцитов обладают определенной склонностью к интернализации одного железосвязывающего белка по сравнению с другим железосвязывающим белком и, таким образом, можно достигнуть более высоких концентраций комплекса и/или обеспечить меньшую утечку указанного комплекса из этих клеток. Такие субпопуляции CD45⁺ лейкоцитов более подробно описаны ниже.

Фраза "комплекс по меньшей мере одного железосвязывающего белка с активным ингредиентом", применяемая в контексте настоящего изобретения, относится к композиции, в которой по меньшей мере молекула активного ингредиента ковалентно или нековалентно связана по меньшей мере с одним железосвязывающим белком. Ковалентное или нековалентное связывание между по меньшей мере одним железосвязывающим белком и еще одним активным ингредиентом может быть прямым или косвенным. В последнем случае указанный активный ингредиент связан с железосвязывающим белком через линкер или спейсер. Линкеры или спейсеры известны специалисту в данной области техники, как, например, полиаланин, полиглицин, углеводы, (CH₂)_n-группы или полипептидные линкеры. Таким образом, специалист в данной области техники сможет выбрать соответствующий подходящий линкер(ы) или спейсер(ы) в зависимости от соответствующего варианта применения. В случае, если железосвязывающие белки образуют кейджи, наподобие, например, ферритина, то термин "комплекс" также включает каркасную структуру (enclosure) активных ингредиентов внутри кейджа даже при отсутствии ковалентной или нековалентной связи между белком(ами) и активным соединением(ями). Образование комплекса позволяет переносить активный ингредиент в клетку в том случае, когда указанная клетка интернализует железосвязывающий белок. Следовательно предпочтительно, чтобы активные ингредиенты связывались с железосвязывающим белком таким образом, чтобы он не препятствовал механизму переноса. Квалифицированный специалист может легко это исследовать с применением анализов на определение поглощения, известных в данной области техники и описанных в ниже в разделе "Примеры". Предпочтительно, чтобы указанный комплекс был достаточно стабильным для того, чтобы выдержать процесс переноса в клетке до области-мишени в организме. Следовательно предпочтительно, чтобы указанный комплекс, нежели чем активный ингредиент по отдельности, доставлялся к поверхности клеток или внутрь клеток в области-мишени. Это свойство также уменьшает возможные вредные воздействия, например, цитотоксичность активного ингредиента в отношении CD45⁺ лейкоцита. Если активные ингредиенты ковалентно присоединены к железосвязывающим белкам, такое присоединение предпочтительно осуществляется посредством аминокислотных остатков, которые, как известно, расположены в поверх-

ностных областях, которые не участвуют в связывании с клеточными рецепторами, необходимыми для клеточного поглощения железосвязывающих белков. Железосвязывающие белки, применяемые в контексте настоящего изобретения, могут образовывать стабильные нековалентно связанные комплексы с широким спектром активных ингредиентов.

CD45⁺ лейкоцит, получаемый от пациента, который подлежит в таком случае лечению клеткой, нагруженной комплексом, будет аутологичен для пациента. Также предполагается, что пациентов типировать по МНС до лечения с применением системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению, и что тип клетки лейкоцита, применяемый для данного пациента, совместим с МНС пациента. В этих двух предпочтительных вариантах реализации CD45⁺ лейкоцит представляет собой первичную клетку, или его получают из первичной клетки, прошедшей небольшое число стадий дифференцировки. В альтернативном варианте CD45⁺ лейкоцит можно получить из иммортализованной, однако предпочтительно нетрансформированной линии CD45⁺ клетки-лейкоцита. Таким образом, кровь, применяемая для CD45⁺ лейкоцитов, предпочтительно для выделения макрофагов, предпочтительно получают от пациента, подлежащего лечению, или здорового донора. В альтернативном варианте кровь можно получить из банка крови. В настоящем документе также рассматривается применение пуповинной крови.

Авторы настоящего изобретения отметили, что субпопуляция CD45⁺ лейкоцитов, которые можно получить из CD34⁺ гематопоэтической клетки-предшественника, являются особенно подходящими для специфической доставки активного ингредиента к мишени. Соответственно, предпочтительно, чтобы лейкоциты, применяемые для получения системы для направленной доставки, были получены из CD34⁺ гематопоэтических клеток-предшественников. Квалифицированный специалист хорошо осведомлен о том, как выбирать CD34⁺ гематопоэтические клетки-предшественники и как дифференцировать такие клетки в лейкоциты.

Предпочтительно CD45⁺ лейкоцит выбран из группы, состоящей из моноцита, дифференцированного моноцита, лимфоцита и гранулоцита. Предпочтительные субпопуляции в этих общих категориях лейкоцитов в дальнейшем определяют по структурным параметрам, например, наличие или отсутствие данного белка, функциональные свойства и/или способ их образования/дифференцировки. Как было указано выше, система для направленной доставки согласно настоящему изобретению по-прежнему обеспечивает описанные выше преимущества в случае, если в популяции клеток не каждая клетка обладает определенным свойством при условии, что большинство клеток в этой популяции обладает этим свойством. Таким образом, в дальнейшем описывается свойство одной предпочтительной клетки системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению. Квалифицированному специалисту будет понятно, что фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению будет содержать миллионы клеток и что не каждая клетка в популяции будет иметь функциональные и/или структурные свойства, описанные в настоящем документе, но что фармацевтическую композицию, тем не менее, можно применять для лечения заболевания в случае, если большинство клеток обладают соответствующими функциональными и/или структурными свойствами.

Авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что субпопуляции CD45⁺ лейкоцитов обладают особенно предпочтительными свойствами, включая, среди прочего, эффективность поглощения комплекса и/или количество поглощенного комплекса в целом, способность удерживать комплекс в клетке, т.е. устранять возможность утечки и нецелевого высвобождения активного ингредиента, эффективность поглощения конкретного железосвязывающего белка и/или нацеливания на конкретные ткани или клетки и, таким образом, являются подходящим для лечения или улучшения конкретного заболевания. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что, например, CD45⁺ лейкоциты, которые экспрессируют по меньшей мере один из следующих антигенов: CD204, CD206, CD200R, CCR2, предпочтительно поглощают ферритин в сравнении с поглощением других железосвязывающих белков. Таким образом в случае, если железосвязывающий белок в комплексе представляет собой ферритин, предпочтительно выбирать CD45⁺ лейкоциты, которые экспрессируют по меньшей мере один из следующих антигенов: CD204, CD206, CD200R, CCR2. Соответственно, предпочтительно реализации настоящего изобретения

(i) моноцит представляет собой CD11b⁺ моноцит, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из CD11b⁺CD14⁺ моноцита, CD11b⁺CD16⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺CD16⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺МНСII⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺CD115⁺ моноцита, CD11b⁺CD114⁺ моноцита, CD11b⁺CD116⁺ моноцита, CD11b⁺CCR1⁺ моноцита, CD11b⁺CCR2⁺ моноцита, CD11b⁺CX3CR⁺ моноцита, CD11b⁺CXR4⁺ моноцита, CD11b⁺CXR6⁺ моноцита и CD11b⁺CD14⁺CD33⁺ моноцита;

(ii) дифференцированный моноцит выбран из группы, состоящей из макрофага, активированного макрофага, предпочтительно CD11b⁺ макрофага, в более предпочтительном варианте CD11b⁺CD16⁺ макрофага, CD11b⁺CD32⁺ макрофага, CD11b⁺CD64⁺ макрофага, CD11b⁺CD68⁺ макрофага, предпочтительно CD11b⁺CD86⁺ M1-макрофага, предпочтительно продуцирующего индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS) и/или секретирующего интерлейкин 12 (IL-12), или предпочтительно CD11b⁺CCR2⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD204⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD206⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD204⁺CD206⁺ M2-макрофага, CD11b⁺ M2-макрофага с низкой или высокой экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости типа II⁺ (МНСII⁺), CD11b⁺CD200R⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD163⁺ M2-макрофага или активированного макрофага, продуцирующего и/или секретирующего аргиназу-1 и/или интерлейкин 10

(IL-10); или дендритной клетки, предпочтительно с экспрессией CD11bCD11c, CD11bCD80, CD11cCD80, CD11cCD86, CD11cMHCII и CD11cCD123, предпочтительно дифференцированный моноцит не является ксантомной клеткой, экспрессирующей лектин-подобный рецептор 1 окисленного липопротеина низкой плотности (Lox1⁺), рецептор СХС-хемокинов типа 7 (СХСХ7⁺) и ядерный фактор 2, подобный эритроидному деривату-2 (NRF2⁺). Ксантомная (пенистая) клетка - это тип макрофага, который локализуется в жировых отложениях на стенках кровеносных сосудов, где они поглощают липопротеины низкой плотности и нагружаются липидами, что и придает им пенистый вид. Эти клетки секретируют различные вещества, участвующие в росте бляшек, а их гибель провоцирует воспаление, что тем самым способствует сердечно-сосудистым заболеваниям;

(iii) моноцит или активированный моноцит, экспрессирующий по меньшей мере один рецептор хемокина, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из CCR1, CCR2⁺, CXCR4⁺ и CXCR6⁺, или по меньшей мере один рецептор фактора роста, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CD115), рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (CD114) и рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (состоящего из CD116 и CD131); моноциты с такими характеристиками являются особенно подходящими для лечения воспалительных состояний и рака;

(iv) лимфоцит выбран из группы, состоящей из CD3⁺ и CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцита, или CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺CD20⁺, CD19⁺CD21⁺, CD20⁺CD21⁺ или CD19⁺CD20⁺CD21⁺В-лимфоцита; или

(v) гранулоцит выбран из группы, состоящей из нейтрофила, предпочтительно CD66b⁺ нейтрофила, эозинофила и базофила, предпочтительно CD193⁺ эозинофила.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению активированный макрофаг

(i) можно получить путем инкубации *in vitro* моноцита или макрофага или их предшественников с фактором, который может изменять маркеры экспрессии на поверхности макрофагов, предпочтительно

(a) по меньшей мере с одним М1-индуктором,

(b) по меньшей мере с одним М2-индуктором,

(c) или с фактором, который может изменять способность макрофагов секретировать цитокины, предпочтительно IL-10 и IL-12, хемокины и/или продуцировать iNOS, аргиназу или другие иммуномодулирующие ферменты; примерами таких факторов являются активированные тромбоциты, IL-4, IL-10, IL-13, иммунный комплекс антигена и антитела, IgG, термический активируемый γ -глобулин, глюкокортикостероид, фактор роста опухоли- β (TGF- β), IL-1R, лиганд 2 СС-хемокина (CCL-2), IL-6, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), агонист рецептора γ , активирующего пролиферацию пероксисом (PPAR γ), фактор ингибирования лейкоцитов (LIF), аденозин, гельминтная и грибковая инфекции, липополисахарид (LPS), интерферон γ (INF- γ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и вирусная и бактериальная инфекции; в этом отношении было отмечено, что активация моноцита с М1-индуктором, в частности LPS, будет вызывать экспрессию в клетке iNOS, что активация моноцита М1-индуктором, в частности LPS, не будет вызывать экспрессию в клетке аргиназы-1, что активация моноцита с М2-индуктором, в частности IL-4, будет вызывать экспрессию в клетке аргиназы-1 и что активация моноцита с М2-индуктором, в частности IL-4, не будет вызывать в клетке экспрессию iNOS,

(ii) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: CD64, CD86, CD16, CD32, высокой экспрессией молекул МНСII и/или продуцированием iNOS и/или IL-12;

(iii) можно получить путем инкубации *in vitro* моноцита или макрофага с фактором, который может индуцировать способность макрофага к фагоцитозу, например, IL-18, опсонинами (например, полученными из комплемента белками, такими как iC3b, иммуноглобулином G), пептидом, связанным с геном кальцитонина (CGRP), липополисахаридом (LPS), интерфероном γ (INF- γ), гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF), вирусной и/или бактериальной инфекцией;

(iv) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: CD204, CD206, CD200R; CCR2, рецептора трансферрина (TfR), рецептора 4 СХС-хемокина (СХСХ4), CD163 и/или домена Т-клеточного иммуноглобулина и домена муцина 2 (TIM-2), и/или проявляет низкую экспрессию молекул МНСII; активированные макрофаги, обладающие этими свойствами, являются особенно подходящими для комплексов, содержащих ферритин в качестве железосвязывающего белка;

(v) обладает способностью к фагоцитозу и/или

(vi) может секретировать цитокины, предпочтительно IL-12 или IL-10, или продуцировать индуцибельную синтетазу оксида азота (iNOS) (или другие провоспалительные соединения), аргиназу или другие иммуносупрессивные/противовоспалительные соединения.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению М1-индуктор для дифференцировки макрофагов в М1-макрофаги выбран из группы, состоящей из липополисахарида (LPS), интерферона γ (INF- γ), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и вирусной и бактериальной инфекции, а М2-индуктор для дифференциров-

ки макрофагов в М2-макрофаги выбран из группы, состоящей из IL-4, IL-10, IL-13, иммунного комплекса антигена и антитела, IgG, термически активируемого γ -глобулина, глюкокортикостероида, фактора роста опухоли β (TGF- β), IL-1R, лиганда 2 СС-хемокина (CCL-2), IL-6, макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), агониста рецептора γ , активирующего пролиферацию пероксисом (PPAR γ), фактора ингибирования лейкоцитов (LIF), аденозина, гельминтной и грибковой инфекции.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комплекс, нагруженный как М1-макрофагами, так и М2-макрофагами, является подходящим для направленной доставки активного агента в гипоксические ткани, предпочтительно в опухоль или ее метастазы. В целом авторы изобретения наблюдали, что от 3 до 5% вводимых М1-макрофагов локализовались в участке опухоли, в то время как приблизительно 35% М2-макрофагов продемонстрировали специфическое нацеливание на опухоль. Тем не менее, это общее преимущество М2-макрофагов исчезало при применении комплекса, содержащего гемоглобин и лекарственное средство, поскольку значимо большие количества данного комплекса можно нагружать в М1-макрофаги, но не в М2-макрофаги. В целом этот специфический тропизм делает М2-макрофаги более подходящими для лечения опухолей и заболеваний, характеризующихся гипоксической тканью.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению моноцит

- (i) можно получить из CD34⁺ гематопозитической клетки-предшественника;
- (ii) можно получить путем инкубации *in vitro* моноцитов по меньшей мере с одним индуктором, предпочтительно М1- или М2-индуктором, в более предпочтительном варианте по меньшей мере одним М2-индуктором;
- (iii) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD33⁺ и/или CD115⁺;
- (iv) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CXCR4⁺, CD14⁺ и/или CD16⁺; и/или
- (v) обладает способностью к фагоцитозу.

В данном варианте реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению М1-индуктор для дифференцировки моноцитов выбран из группы, состоящей из LPS, INF- γ , GM-CSF или вирусной или бактериальной инфекции, или М2-индуктор для дифференцировки моноцитов выбран из группы, состоящей из IL-4, IL-10, IL-13, иммунного комплекса антигена и антитела, IgG, термически активируемых γ -глобулинов, глюкокортикостероидов, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, агониста PPAR γ , фактора ингибирования лейкоцитов (LIF), среды, кондиционированной раковыми клетками, раковых клеток, аденозина и гельминтной или грибковой инфекции.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что моноциты являются подходящими для направленной доставки активного агента в гипоксические ткани, предпочтительно опухоль или ее метастазы, тогда как моноциты, обработанные при помощи М2-активаторов, являются более подходящими для направленной доставки активного агента в гипоксические ткани, предпочтительно опухоль или ее метастазы. Этот специфический тропизм делает моноциты, обработанные при помощи М2-активаторов, более подходящими для лечения участков опухоли и гипоксических участков.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению лимфоцит

- (i) получают из крови, селезенки или костного мозга, или его можно получить из CD34⁺ клетки-предшественника, как это известно квалифицированному специалисту, а также как это описано, например, у Lefort and Kim, 2010, J. Vis. Exp. 40: 2017; Tassone and Fidler, 2012, Methods in Molecular Biology 882: 351-357; Kouro et al. 2005, Current Protocols in Immunology, 66: F22F.1: 22F.1.1-22F.1.9;
- (ii) является иммунологически компетентным лимфоцитом;
- (iii) экспрессирует антигенспецифичный Т-клеточный рецептор и/или
- (iv) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: (a) CD3⁺ и CD4⁺ или CD8⁺ или (b): CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺CD20⁺, CD19⁺CD21⁺, CD20⁺CD21⁺ или CD19⁺CD20⁺CD21⁺ антигена, и предпочтительно может продуцировать иммуноглобулины.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению гранулоцит

- (i) получают из крови, селезенки или костного мозга, или его можно получить из CD34⁺ клетки-предшественника, как это описано, например, у Kuhs et al. 2015, Curr. Protoc. Immunol. 111: 7,23-1-7,23,16; Coquery et al. 2012, Cytometry A 81 (9): 806-814; Swemydas and Lionakis 2013, J. Vis. Exp. 11: 50586;
- (ii) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих: CD66b⁺ и/или CD193⁺;
- (iii) представляет собой полиморфноядерный лейкоцит, характеризующийся наличием гранул в своей цитоплазме; и/или
- (iii) характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺ и/или CXCR4⁺.

Предпочтительно реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению железосвязывающий белок выбран из группы, состоящей из ферритина, предпочтительно ферритина тяжелого (H) типа, ферритина легкого (L) типа и/или митохондриального ферритина; гемоглобина, предпочтительно гемоглобина A, гемоглобина AS, гемоглобина SC, гемоглобина C, гемоглобина D, гемоглобина E, гемоглобина F, гемоглобина H; комплекса гемоглобин-гаптоглобин, гемопексина, трансферрина и лактоферрина. Термины ферритин; гемоглобин, предпочтительно гемоглобин A, гемоглобин AS, гемоглобин SC, гемоглобин C, гемоглобин D, гемоглобин E, гемоглобин F, гемоглобин H; комплекс гемоглобин-гаптоглобин, гемопексин, трансферрин и лактоферрин включает в себя структурные варианты встречающихся в природе белков и, таким образом, он относится к белкам, которые обладают по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 80%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 85%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 90%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 95%, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 100% способностью соответствующего белка дикого типа связывать ион(ы) железа. Железосвязывающие белки, применяемые в контексте настоящего изобретения, предпочтительно происходят от млекопитающего, в более предпочтительном варианте от мыши, крысы, собаки, обезьяны, в частности шимпанзе или человека, в наиболее предпочтительном варианте имеют человеческое происхождение. Консенсусные последовательности предпочтительных железосвязывающих белков, применяемых в контексте настоящего изобретения, показаны ниже на фиг. 1. Предпочтительные структурные варианты основаны на последовательностях, указанных на фиг. 1. Остатки, отмеченные X, варьируются между различными ферритинами млекопитающих, трансферринами и гемоглобинами. Изменение этих остатков не оказывает решающего значения на способность указанных белков связываться с ионами железа. Соответственно, предпочтительно, чтобы мутации или делеции аминокислот влияли по меньшей мере на один остаток, отмеченный X.

Белки плазмы всегда были привилегированными носителями для доставки активных фармацевтических ингредиентов в терапии рака. Таким образом, альбумин, самый распространенный белок плазмы, в настоящее время применяют в терапевтических протоколах для доставки таксановых молекул и производных доксорубина (Larsen M.T. et al., 2016, Mol. Cell. Ther. 27, 4: 3).

Человеческие белки трансферрин и ферритин рассматривались в качестве эффективных носителей для доставки малых молекул или токсинных конъюгатов для специфического нацеливания на раковые клетки. На сегодняшний день, несмотря на значительные усилия, медицинские учреждения так и не получили эффективные комплексы лекарственных средств с трансферрином или ферритином (Luck A.N. et al., 2013, Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (8): 1012-9).

Ферритин имеет архитектуру в виде кейджа и обладает способностью связывать железо, и его можно применять для того, чтобы инкапсулировать лекарственные средства внутри его полости. Ферритины не содержатся в большом количестве в плазме, но их можно легко получить с высоким выходом в качестве рекомбинантных белков в общих векторах экспрессии белков, таких как клетках *Escherichia coli*. Ферритины с H- или L-цепями кодируются как малый белок, находящийся в виде мономера (21 кДа и 19 кДа для H и L цепей соответственно), который способен собираться в 24-мерный комплекс с образованием кейдж-подобной структуры, которая ограничивает его полость диаметром 8 нм. Авторы настоящего изобретения в контексте работы согласно настоящему изобретению отметили, что гомополимеры H-ферритина представляют собой предпочтительную белковую конструкцию для специфической доставки инкапсулированных лекарственных средств в CD45⁺ клетки-лейкоциты, экспрессирующие TfR. Кроме того, H-ферритин нацеливает комплекс активных ингредиентов на ядро клетки (и, следовательно, непосредственно доставляет ДНК-связывающие белки в ядро).

Очищенный трансферрин можно эффективно конъюгировать с некоторыми противораковыми лекарственными средствами посредством ковалентных линкеров, которые соответствующим образом высвобождаются внутри клеток (Beyer U. et al., 1998, J. Med. Chem. 41 (15): 2701-2708). В случае трансферрина, только лизиновые группы на поверхности белка уже доступны для ковалентного присоединения.

В прошлом гемоглобин рассматривали в качестве возможного носителя для лекарственных средств вследствие его универсальности при химической конъюгации с лекарственными средствами, его наличия в большом количестве и относительной стабильности в крови (Somatogen, 1993, публикация WO 1993008842 A1). Тем не менее, отсутствие свойств нацеливания на рецепторы не способствовало его биомедицинским применениям, отличным от применения в качестве заменителей крови или агента против серповидно-клеточной анемии. На самом деле Hb может распознаваться только эпитопами CD163 на лейкоцитах (гаптоглобиновый/гемоглобиновый рецептор), в особенности моноцитарно-макрофагального происхождения. CD45⁺ лейкоцит, в частности макрофаг для доставки белка, описанный в данной заявке, двигает центральную часть молекулы гемоглобина в качестве специфического к мишени носителя лекарственного средства. Гемоглобин можно ковалентно легко связать с соответствующими конъюгатами лекарственных средств, он может размещать гидрофобные молекулы лекарственных средств в кармане для связывания гема или даже переносить малые цитотоксические молекулы, связанные с гемовым железом. Hb можно легко модифицировать путем селективного присоединения соответствующего конъюгата лекарственного средства к остатку цистеина в положении 93 β-цепей, единственному титруемому цис-

теину на поверхности указанного белка. Малеимид-функционализированные лекарственные средства, такие как ингибитор тубулина монометилауристин (ММАЕ) или пирролбензодиазепиновый димер (РВД), лекарственное средство, образующее кросс-сшивки с ДНК, являются наиболее важными примерами чрезвычайно сильных цитотоксических препаратов, которые можно легко и специфическим образом присоединить к соответствующему остатку цистеина в положении 93 β -цепей.

В альтернативном варианте остатки лизина на поверхности Hb (по меньшей мере 10 титруемых остатков лизина на тетрамер Hb) можно легко конъюгировать с лекарственным средством при помощи расщепляемых сукцинимидных линкеров. Гемоглобин также обладает уникальной способностью к высвобождению нековалентно связанной гемовой группы при кислых значениях pH. В пустом гемовом кармане получаемого таким образом апогемоглобина может размещаться нескольких гидрофобных молекул, как это показано в случае паклитаксела (Meng Z. et al., 2015 J. Pharm. Sci. 104 (3): 1045-55).

Каким бы ни был способ конъюгации/адсорбции/связывания, гемоглобин (Hb), трансферрин (Tf) и ферритины представлены в настоящих изобретениях как преимущественные носители лекарственного средства, нагруженные в соответствующие клеточные системы, обладающие свойствами нацеливания на опухоль, например активированные макрофаги. Легкая, быстрая, дешевая и безопасная процедура очистки таких белков также обеспечивает огромную добавленную стоимость.

На основе последовательностей ферритинов H-типа, ферритинов L-типа, α -цепей гемоглобина, β -цепей гемоглобина и трансферринов млекопитающих определяли консенсусную последовательность для каждого из этих белков. Они показаны на фиг. 1 в SEQ ID №: 2, 7, 9, 14, 16, 20 и 25 соответственно. Исходя из этого, а также на основе анализа делеции и структурного анализа, раскрытого в предшествующем уровне техники, определяли минимальный фрагмент для ферритинов H-типа, ферритинов L-типа, α -цепей гемоглобина и β -цепей гемоглобина, который достаточен для поглощения CD45⁺ лейкоцитами. Они показаны в SEQ ID №: 1, 3, 5 (ферритин H-типа); 8, 10, 12 (ферритин L-типа), 15 и 17 (α -цепь гемоглобина) и 19 и 21 (β -цепь гемоглобина). Трансферрин содержит расположенные в N-концевой области и C-концевой области домены, которые необходимы для связывания железа и поглощения CD45⁺ лейкоцитами в случае, если они состоят из одного полипептида и расположены на расстоянии от 100 до 450 аминокислот друг от друга, предпочтительно от 150 до 400, в более предпочтительном варианте от 200 до 350 аминокислот друг от друга и в более предпочтительном варианте от 250 до 320 аминокислот друг от друга. N-концевой домен содержит аминокислоты от 1 до 82 полноразмерного консенсусной последовательности трансферрина (SEQ ID №: 25) или полноразмерного человеческого трансферрина (SEQ ID №: 28). C-концевой домен содержит аминокислоты с 396 до 510 полноразмерной консенсусной последовательности трансферрина (SEQ ID №: 25) или полноразмерного человеческого трансферрина (SEQ ID №: 28). В каждом случае, когда X указывается в консенсусной последовательности, он независимо обозначает любую аминокислоту и характеризует аминокислоту, которая не является или только является слабо консервативной среди ферритинов H-типа млекопитающих, которые можно подвергать мутациям без ущерба или с незначительным ущербом в отношении железосвязывающих свойств соответствующего железосвязывающего белка. Предпочтительно, чтобы X в каждом случае принимал значение аминокислоты соответствующего человеческого железосвязывающего белка, выравненной с X. Эту информацию можно взять, например, из фиг. 1, где показаны выравнивания консенсусных последовательностей с человеческим, а в некоторых случаях мышинными белками.

Предпочтительные ферритины H-типа содержат или состоят из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID №: 1, и их вариантов, обладающих по меньшей мере 70% аминокислотной идентичностью, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 75% аминокислотной идентичностью, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 80% аминокислотной идентичностью, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 85% аминокислотной идентичностью, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью, в более предпочтительном варианте по меньшей мере 95% аминокислотной идентичностью и в каждом случае по меньшей мере 70% способностью ферритина H-типа, состоящего из аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID №: 1, поглощаться CD45⁺ лейкоцитами, предпочтительно M2-лейкоцитами. В SEQ ID №: 1 X в положении 5 может присутствовать или отсутствовать, в случае присутствия он означает любую аминокислоту, предпочтительно Ile, X в положении 6 означает любую аминокислоту, предпочтительно Asn, X в положении 14 означает любую аминокислоту, предпочтительно Trp, X в положении 24 означает любую аминокислоту, предпочтительно Trp или Cys, X в положении 66 означает любую аминокислоту, предпочтительно Phe, X в положении 68 означает любую аминокислоту, предпочтительно Gln, X в положении 75 означает любую аминокислоту, предпочтительно Arg или Cys, X в положении 90 означает любую аминокислоту, предпочтительно His, X в положении 94 означает любую аминокислоту, предпочтительно Ser или Asn, X в положении 120 может присутствовать или отсутствовать, в случае присутствия он означает любую аминокислоту, предпочтительно His или Trp, в более предпочтительном варианте His, X в положении 123 означает любую аминокислоту, предпочтительно Asn или Ser, в более предпочтительном варианте Asn, X в положении 128 означает любую аминокислоту, предпочтительно Ala или Ser, в более предпочтительном варианте Ala.

изобретении, содержит по меньшей мере N-концевой домен, соответствующий SEQ ID №: 26, и C-концевой домен, соответствующий SEQ ID №: 27. Предпочтительный трансферрин содержит белки, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №: 26 и 27, а также их варианты, обладающие по меньшей мере 70% аминокислотной идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 75% аминокислотной идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 80% аминокислотной идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 85% аминокислотной идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 90% аминокислотной идентичностью, более предпочтительно по меньшей мере 95% аминокислотной идентичностью и в каждом случае по меньшей мере 70% способностью трансферрина, состоящего из аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID №: 26 и 27 соответственно, поглощаться CD45⁺ лейкоцитами, предпочтительно M1-макрофагами.

Предпочтительные ферритины также включают белки, которые независимо от данной аминокислотной последовательности собираются в структуру из 24 субъединиц, образующую белковый модуль в виде четырехспирального пучка, соответствующую выравниванию заданных последовательностей отдаленно родственных белков, что определяют при помощи трехмерных структурных выравниваний.

Авторы настоящего изобретения неожиданно наблюдали, что лимфоциты и M2-макрофаги лучше поглощают комплексы, содержащие по меньшей мере один ферритин и по меньшей мере один активный ингредиент, что M1-макрофаги лучше поглощают комплексы, содержащие по меньшей мере один гемоглобин и по меньшей мере один активный ингредиент, и что макрофаги лучше поглощают комплексы, содержащие по меньшей мере один трансферрин и по меньшей мере один активный ингредиент. Соответственно, на основе тканевого и клеточного тропизма CD45⁺ лейкоцитов моноциты, M1- и M2-макрофаги, гранулоциты и лимфоциты, описанные выше, комплексы, содержащие по меньшей мере один ферритин и по меньшей мере один активный ингредиент, применяют для нагрузки M2-макрофагов, лимфоцитов или моноцитов в случае, если необходим тропизм M2-макрофагов, лимфоцитов или моноцитов, а комплексы, содержащие по меньшей мере один гемоглобин и по меньшей мере один активный ингредиент, применяют для нагрузки M1-макрофагов в случае, если необходим тропизм M1-макрофагов.

В предпочтительном варианте реализации системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению активный ингредиент выбран из группы, состоящей из белка, нуклеиновой кислоты, химического небелкового соединения, не являющегося нуклеиновой кислотой, с молекулярной массой менее чем 1,5 кДа, более предпочтительно менее чем 1 кДа, предпочтительно противоракового лекарственного средства, в частности цитостатического лекарственного средства, цитотоксического лекарственного средства и его пролекарства; противоартериосклеротического лекарственного средства; и противовоспалительного лекарственного средства; и фотосенсибилизирующего соединения; вируса, в частности онколитического вируса; и радиоизотопа, излучающего α - или β -лучи, который также излучает γ -лучи в количестве, вызывающем повреждение клеток, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из лютеция-177, иттербия-90, йода-131, самария-153, фосфора-32, цезия-131, палладия-103, радия-233, йода-125 и бора-10, или α -лучи в количестве, вызывающем повреждение клеток, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из актиния-225, висмута-213, свинца-212 и полония-212.

Предпочтительные противораковые лекарственные средства выбраны из лекарственного средства, индуцирующего апоптоз/аутофагию или некроз. Лекарственное средство, индуцирующее апоптоз/аутофагию или некроз, может представлять собой любое лекарственное средство, которое может эффективно индуцировать апоптоз/аутофагию или некроз даже в клетках с аномальной пролиферацией. Эти лекарственные средства предпочтительно применяют в комплексах по меньшей мере с одним ферритином.

Предпочтительные противораковые лекарственные средства выбраны из группы, состоящей из индуцирующего апоптоз лекарственного средства, алкилирующего вещества, антиметаболитов, антибиотиков, эпотилонов, агонистов и антагонистов ядерного рецептора, антиандрогена, антиэстрогена, соединения платины, гормона, антигормона, интерферона, ингибитора зависимых от клеточного цикла протеинкиназ (CDK), ингибитора циклооксигеназ и/или липоксигеназ, биогенной жирной кислоты, производного биогенной жирной кислоты, включая простаноиды и лейкотриены, ингибитора протеинкиназ, ингибитора протеинфосфатаз, ингибитора липидкиназ, координационного комплекса платины, этиленмина, метилмеламина, триазина, винкаалкалоида, пиримидинового аналога, пуринового аналога, алкилсульфоната, аналога фолиевой кислоты, антрацендиона, замещенной мочевины и производного метилгидразина, эндиинового антибиотика, ингибитора полимеризации тубулина, такого как майтанзиноид или производное ауристинина, ингибитора иммунных контрольных точек и ингибитора опухолеспецифического белка или маркера, предпочтительно ингибитора диссоциации Rho-GDP, более предпочтительно Gtp94.

Другие предпочтительные противораковые лекарственные средства выберут из группы, состоящей из ацедиасульфата, акларубицина, амбазона, аминоклотетимида, L-аспарагиназы, азатиоприна, банксантрона, бендамустина, блеомицина, бусульфана, фолината кальция, карбоплатина, карпецитабина, кармустина, целекоксиба, хлорамбуцила, цисплатина, кладрибина, циклофосамида, цитарабина, дакарбазина, дактиномицина, дапсона, даунорубицина, дибромпропамидина, диэтилстильбестрола, доцетаксела, доксорубицина, эндиинового, эпирубицина, эпотилона B, эпотилона D, эстрамуцинфосфата, эстроген,

этинилэстрадиола, этопозиды, флавопиридола, флоксуридина, флударабина, фторурацила, флюоксиместерона, флутамид фосфоэстрола, фуразолидона, гемцитабина, аналога гонадотропин-высвобождающего гормона, гексаметилмеламин, гидроксикарбамида, гидроксиметилнитрофурантоина, гидроксипрогестерона, гидроксимочевина, идарубицина, идоксуридина, ифосфамида, интерферона α , иринотекана, лейпролида, ломустина, лютротекана, мафенида сульфатоламида, мехлорэтамину, медроксипрогестерона ацетата, мегастролацетата, мелфалана, мепакрина, меркаптопурина, метотрексата, метронидазола, митомицина С, митопозиды, митотана, митоксантрона, митрамицина, налидиксовой кислоты, нифуратела, нифуроксазида, нифуралазина, нифуртимокса, нимустина, ниноразола, нитрофурантоина, азотистых ипритов, олеомуцина, оксолиновой кислоты, пентамидина, пентостатина, феназопиридина, фталилсульфатиазола, пипобромана, преднимустина, преднизона, преуссина, прокарбазина, пириметамина, ралтитрекседа, рапамицина, рофекоксиба, розиглиазона, салазосульфепиридина, скрифлавиниума хлорида, семустина, стрептозоцина, сульфакарбамида, сульфациетамида, сульфаклопиридазина, сульфадиазина, сульфадикрамыда, сульфадиметоксина, сульфазидола, сульфазуразола, сульфагуанидина, сульфагуанола, сульфаметизола, сульфаметоксазола, котримоксазола, сульфаметоксидиазина, сульфаметоксипиридазина, сульфаметосола, сульфаниламида, сульфаперирина, сульфафеназола, сульфатиазола, сульфисомидина, стаурополина, тамоксифена, таксола, тенипозиды, тертипозиды, тесолоктона, тестостеронпропионата, тиогуанина, тиотепа, тинидазола, топотекана, триазиквона, тресульфана, триметоприма, трифосфамида, UCN-01, винбластину, винкристину, виндезину, винбластину, винорелбину и зорубицину, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из ауристатины, баноксантрона, бендамустины, хлорамбуцила, халицеамицины, циклофосфамида, динемидина А, майтансина, мелфалана, мертансина и неоказиностазина, в наиболее предпочтительном варианте баноксантрона, бендамустины, хлорамбуцила, циклофосфамида, пирролобензодиазепина и мелфалана.

Особенно предпочтительно, чтобы противораковое лекарственное средство представляло собой белок, ингибирующий пролиферацию, предпочтительно ингибитор клеточного цикла, или антитело или миметик антитела, который специфически связывается с мишенью на поверхности клетки или внутри нее в ткани-мишени, которая модулирует статус заболевания указанной клетки, предпочтительно с белком, способствующим пролиферации, или нуклеиновую кислоту, предпочтительно кодирующую белок, ингибирующий пролиферацию, или антитело или миметик антитела, который специфически связывается с мишенью на поверхности клетки или внутри нее в ткани-мишени, которая модулирует статус заболевания указанной клетки, предпочтительно с белком, способствующим пролиферации, или мРНК или ДНК-фермент.

Предпочтительными примерами антител, которые следует применять в контексте настоящего изобретения, являются одноцепочечные антитела, фрагменты антител, нанотела, легкие или тяжелые цепи, переменные легкие или переменные тяжелые цепи, или диатела. Предпочтительные фрагменты антител включают фрагмент антигенсвязывающего фрагмента (Fab), Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, антитело с тяжелой цепью, однодоменное антитело (sdAb), переменный одноцепочечный фрагмент (scFv), переменный фрагмент (Fv), V_H-домен, V_L-домен, однодоменное антитело, нанотело, IgNAR (новый иммуноглобулиновый антигеновый рецептор), двойной-scFv, биспецифический активатор Т-клеток (BiTE), молекулу для повторного нацеливания с двойной аффинностью (DART), триатело (triple body), диатело, одноцепочечное диатело и их гибридные белки.

В случае, если активный ингредиент представляет собой нуклеиновую кислоту, то предпочтительно, чтобы он представлял собой мРНК, miRNA, ДНК-фермент или нуклеиновую кислоту, кодирующую фармацевтически активный белок, например антитело, миметик антитела, цитокин, превращающий пролекарство фермент или им подобные.

Как было указано выше, система для направленной доставки согласно настоящему изобретению является особенно подходящей для доставки активных ингредиентов в гипоксические области. Применение активных ингредиентов, которые активируются в условиях гипоксии, добавляет дополнительную специфичность нацеливанию и/или дополнительно снижает неблагоприятные воздействия указанных активных ингредиентов. Таким образом, в особенно предпочтительных вариантах реализации активный ингредиент представляет собой активируемое гипоксией пролекарство. В основе всех активируемых гипоксией пролекарств лежит наличие одного из пяти различных химических фрагментов (нитрогруппы, хинины, ароматические и алифатические N-оксиды и переходные металлы), которые под воздействием ферментов восстанавливаются при гипоксических условиях в ткани. Активируемые гипоксией пролекарства представляют собой любое пролекарство, которое менее активно или неактивно при сравнении с соответствующим лекарственным средством, и включает лекарственное средство и по меньшей мере одну биологически разрушаемую группу. Такие активируемые гипоксией пролекарства включают все пролекарства, активируемые различными восстанавливающими агентами и восстанавливающими ферментами, включая без ограничений переносящие одиночные электроны ферменты (такие как редуктаза цитохрома P450) и ферменты, переносящие два электрона (или переносящие гидрид). Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения активируемое гипоксией пролекарство представляет собой TH-302. Способы синтеза TH-302 описаны в заявке PCT WO 07/002931 и WO 08/083101. Предпочтительно примеры таких пролекарств выбраны из группы I класса, состоящей из

N-оксидов бензотриазина, апазиковна (EO9), тирапазамина (TPN) и SN30000; или группы II класса, состоящей из нитросоединений PR-104A, TH-302, TH-4000 и AQ4N.

В предпочтительном варианте реализации выделенной системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению связь(и) между железосвязывающим белком(ами) и активным ингредиентом, содержащимся в комплексе, является ковалентной и/или нековалентной; и/или указанный активный ингредиент, содержащийся в комплексе, захватывается/инкапсулируется железосвязывающим белком, предпочтительно ферритином или его мультимерами. В одном варианте реализации ковалентное и/или нековалентное присоединение осуществляют косвенно через линкер или спейсер. В случае, если необходимо образование ковалентных связей, для ковалентного присоединения активных ингредиентов непосредственно или косвенно по меньшей мере к одному железосвязывающему белку применяют подходящие тиольные, amino- или карбоксильные группы железосвязывающих белков. Также предполагается, что в комплексе содержатся различные активные ингредиенты. Например, один тип активного ингредиента может быть связан с железосвязывающим белком (связан нековалентно), тогда как другой тип является инкапсулированным. В данном подходе используют различные скорости высвобождения активных ингредиентов из железосвязывающего белка, доставляемых в ткань-мишень и/или клетки-мишени. Например, производные лекарственного средства, действующие в качестве активного ингредиента, можно ковалентно присоединить к молекуле ферритина либо на поверхности 24-мера, либо во внутренней полости, используя реакционную способность соответствующих тиольных, amino- или карбоксильных групп. Типы таких подходящих реакций хорошо известны в данной области техники, и специалист в данной области техники может провести их для конкретного активного ингредиента без какой-либо дополнительной работы. Примеры таких реакций описаны у Behrens C.R., Liu B. *Methods for site-specific drug conjugation to antibodies*. *MAbs*. 2014 Jan-Feb;6(1):46-53.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения выделенной системы для направленной доставки согласно настоящему изобретению, включающему стадии:

- a) обеспечения очищенного железосвязывающего белка, определенного выше;
- b) ковалентного или нековалентного связывания активного ингредиента с железосвязывающим белком и/или инкапсулирования активного ингредиента в железосвязывающем белке;
- c) обеспечения клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, определенной выше; а также
- d) инкубации CD45⁺ клетки-лейкоцита в присутствии комплекса железосвязывающего белка с активным ингредиентом, полученного на стадии b), до тех пор, пока клетка, представляющая собой CD45⁺ лейкоцит, не будет по меньшей мере частично, предпочтительно полностью, нагружена комплексом железосвязывающего белка с активным ингредиентом, полученным на стадии b).

Образование аддукта между белком и фрагментом лекарственного средства может происходить по пути нековалентного связывания молекулы лекарственного средства с белком-мишенью, и его можно описать следующим образом: в случае ферритина лекарственные средства обычно можно инкапсулировать во внутреннюю полость (физическое удержание), используя свойства ассоциации и диссоциации самой макромолекулы ферритина. Молекулы лекарственного средства удерживаются на месте путем нековалентных взаимодействий с аминокислотными остатками на внутренней поверхности. Макромолекулы гемоглобина также обладают возможностью нековалентного связывания выбранных молекул лекарственного средства, которые могут размещаться в кармане для связывания гема самого гемоглобина. Карман может замещать гем, и его можно заменить лекарственными средствами с соответствующим профилем гидрофобности. Еще в одном аспекте все белки, рассматриваемые в настоящем изобретении, можно ковалентно присоединить к молекулам лекарственного средства, модифицированным при помощи конкретных активных линкерных фрагментов, реакционноспособных в отношении тиольных или аминогрупп самого белка. Фактически, ферритины или гемоглобин можно связывать с лекарственными средствами, реакционноспособными в отношении цистеина и тиола, несущими расщепляемый линкер на основе пептида (например, чувствительная к катепсину валин-цитруллиновая последовательность и парааминобензилкарбаматный спейсер). В качестве важнейшего примера применяли антимиотический агент монотетилауристатин E (ММАЕ). Линкер на основе пептида стабильно связывает белок с цитотоксическим соединением, так что лекарственное средство не может легко высвободиться из белка в физиологических условиях, и помогает предотвратить токсичность в отношении здоровых клеток и обеспечить эффективность дозировки. Образующий таким образом аддукт лекарственного средства и белка может присоединяться к выбранным типам рецепторов, т.е. CD163 для гемоглобина и TfR для ферритина или трансферрина соответственно. После связывания указанный аддукт белка и лекарственного средства интернализируется путем эндоцитоза и, таким образом, избирательно поглощается клетками-мишенями. Везикула, содержащая лекарственное средство, является гибридной (слитой) с лизосомами и лизосомальными цистеиновыми протеазами, в частности, катепсин В начинает разрушать валин-цитруллиновый линкер, а ММАЕ больше не является связанным с антителом и высвобождается непосредственно в среду опухоли.

В альтернативном варианте DM1-SMCC представляет собой эффективное производное мертансина с линкером, который специфически связывается с лизиновыми остатками, образуя ковалентный комплекс с ферритином, гемоглобином или трансферрином в реакции, которая была успешно описана для

антител. В частности, гемоглобин, ферритин или трансферрин могут вступать в реакцию с DM1-SMCC, таким образом обеспечивая аддукт ковалентно связанного белка и лекарственного средства, который может расщепляться внутри клеток и высвобождать активное лекарственное средство зависящим от времени образом. Подавление динамики микротрубочек при помощи DM1 индуцирует блок митотического цикла и гибель клеток.

Термин "полностью нагруженный" применяют в контексте настоящего изобретения для обозначения максимального количества железосвязывающего белка, предпочтительно ферритина, образующего комплекс с активным ингредиентом, который может поглощаться CD45⁺ клеткой-лейкоцитом, предпочтительно макрофагом, более предпочтительно активированным макрофагом.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной доставки согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенную систему для направленной доставки согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель и/или подходящее вспомогательное вещество(а). Поскольку выделенная система для направленной доставки содержит живые клетки, предпочтительно, чтобы носители и вспомогательные вещества были выбраны таким образом, чтобы поддерживать клетки живыми.

"Фармацевтически приемлемые" средства одобрены регулирующим органом федерального правительства или правительства штата, или они перечислены в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных, более конкретно у людей.

В контексте настоящего описания термин "носитель" относится к фармакологически неактивному веществу, такому как, но не ограничиваясь ими, разбавитель, вспомогательное вещество, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы, физиологические буферные растворы или среды-носители, с которыми вводят терапевтически активный ингредиент. Такие фармацевтические носители могут быть жидкими или твердыми. Жидкий носитель включает, но не ограничивается ими, стерильные жидкости, такие как солевые растворы в воде и маслах, включая, но не ограничиваясь ими, масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и им подобные. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в особенности для растворов для инъекций. Солевой раствор является предпочтительным носителем в случае, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" E.W. Martin.

Подходящие фармацевтические "вспомогательные вещества" включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и им подобные.

"Поверхностно-активные вещества" включают анионные, катионные и неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как, но не ограничиваясь ими, дезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, Triton X-100 и полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65 и полисорбат 80.

"Стабилизаторы" включают, но не ограничиваются ими, маннит, сахарозу, трегалозу, альбумин, а также антагонистов протеаз и/или нуклеаз.

"Физиологический буферный раствор" включает, но не ограничивается ими, раствор хлорида натрия, деминерализованную воду, а также подходящие органические или неорганические буферные растворы, такие как, но не ограничиваясь ими, фосфатный буфер, цитратный буфер, трис-буфер (трис(гидроксиэтил)аминометан), буфер HEPES ([4-(2-гидроксиэтил)пиперазино]этансульфоновая кислота) или буфер MOPS (3-морфолино-1-пропансульфоновая кислота). Выбор соответствующего буфера в целом зависит от необходимой молярности буфера. Фосфатный буфер является подходящим, например, для растворов для инъекций и инфузий.

Термин "адъювант" относится к агентам, которые усиливают, стимулируют, активируют, увеличивают или модулируют иммунный ответ на активный ингредиент композиции либо на клеточном, либо на гуморальном уровне, например, иммунологические адъюванты стимулируют ответ иммунной системы на фактический антиген, но сами по себе не обладают иммунологическим эффектом. Примеры таких адъювантов включают, но не ограничиваются ими, неорганические адъюванты (например, соли неорганических металлов, такие как фосфат алюминия или гидроксид алюминия), органические адъюванты (например, сапонины или сквален), адъюванты на масляной основе (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), цитокины (например, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, GM-CSF и INF- γ), адъюванты в виде частиц (например, иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), липосомы или биологически разлагаемые микросферы), виросомы, бактериальные адъюванты (например, монофосфориллипид A или мурамиловые пептиды), синтетические адъюванты (например, неионные блоксополимеры, аналоги мурамиловых пептидов или синтетический липид A) или синтетические полинуклеотидные адъюванты (например, полиаргинин или полилизин).

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной системе для направленной достав-

ки согласно настоящему изобретению для применения в предотвращении/лечении опухолей, предпочтительно солидной опухоли, предпочтительно рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака легких, рака толстой кишки или опухоли, имеющей гипоксические области, областей воспалительного заболевания или ишемических областей в раневых дефектах кожного покрова, других раневых дефектов или областей после инфаркта органов (сердца) или ишемии сетчатки.

В контексте настоящего описания термин "лечение" включает все виды профилактических и/или терапевтических вмешательств, разрешенных с медицинской точки зрения для лечения, временную ремиссию, предотвращение и т.д. для различных целей, включая задержку или остановку развития заболевания, регресс или исчезновение очага поражения, предотвращение начала развития заболевания или ингибирование рецидива.

Система для направленной доставки согласно настоящему изобретению обеспечивает доставку к опухоли активных ингредиентов, которые обычно не могут достичь опухоли (например, вследствие проблем с растворимостью). Это также позволяет доставлять активные ингредиенты в гипоксические опухоли или в гипоксические области опухоли. Такая система также обеспечивает доставку активного ингредиента в любую область в организме, подвергаемой воздействию гипоксических состояний, например, во время ишемических инцидентов, или в которой происходит воспалительный процесс.

Как было упомянуто выше, в настоящем изобретении также предложен способ направленной доставки лекарственного средства в опухолевую массу. Данный способ включает получение CD45⁺ лейкоцитов, предпочтительно активированных макрофагов, который обеспечивает высокоэффективное поглощение макрофагами железосвязывающего белка (ферритина, гемоглобина и/или трансферрина), при этом указанный ферритин, гемоглобин и/или трансферрин несут активный ингредиент (например, лекарственное средство/пролекарство), нацеливание на опухоль и перенос железосвязывающего белка в раковую клетку, где происходит высвобождение указанного активного ингредиента.

В настоящем изобретении используются CD45⁺ лейкоциты, предпочтительно активированные макрофаги, нагруженные железосвязывающими белками, связанными с лекарственным средством/пролекарством, в качестве системы для доставки для нацеливания на опухоль. Неудовлетворительный ответ опухолей на химиотерапию или трудности с их обнаружением с применением методов визуализации в основном связаны с изменениями в проникновении противораковых лекарственных средств в гипоксические области вследствие слабой сосудистой сети. Тем не менее, эти аваскулярные участки привлекают CD45⁺ лейкоциты, предпочтительно активированные макрофаги, для миграции даже в удаленные от кровеносных сосудов области. Следовательно, они образуют систему для доставки частиц к опухолевой массе. Перспективным примером таких частиц является железосвязывающий белок. Однако при их применении в качестве единственных агентов они не достигают гипоксических областей аналогично другим соединениям и накапливаются в других органах.

Авторы настоящего изобретения связывали противораковые лекарственные средства, активируемые гипоксией пролекарства (для целей лечения) или изотопы с гемоглобином или трансферрином, применяя химические методы, и нагружали ими CD45⁺ лейкоциты (моноциты, макрофаги, лимфоциты и/или гранулоциты), предпочтительно активированные макрофаги, обрабатывая клетки раствором железосвязывающего белка, как это описано в примерах. Авторы изобретения наблюдали, что после введения животному нагруженные CD45⁺ лейкоциты, предпочтительно активированные макрофаги мигрируют в гипоксические участки опухоли и высвобождают в раковых клетках железосвязывающий белок с инкапсулированными активными ингредиентами. Этот способ позволяет осуществить точное введение активных ингредиентов в участок опухоли (особенно в гипоксические области), избегая их накопления в других органах.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - в секции (А) показан минимальный активный фрагмент консенсусной аминокислотной последовательности среди Н-цепей ферритинов млекопитающих и две полноразмерные консенсусные последовательности на основе нескольких Н-цепей ферритинов млекопитающих (см. SEQ ID №: 1, 2 и 7 соответственно), а также минимальная и полноразмерная аминокислотная последовательность Н-цепи мышинового (SEQ ID №: 3 и 4) и человеческого (SEQ ID №: 5 и 6) ферритина. В секции (В) показан минимальный активный фрагмент консенсусной аминокислотной последовательности среди L-цепей ферритинов млекопитающих и две полноразмерные консенсусные последовательности на основе нескольких L-цепей ферритинов млекопитающих (см. SEQ ID №: 8, 9 и 14 соответственно), а также минимальная и полноразмерная аминокислотная последовательность L-цепи мышинового (SEQ ID №: 10 и 11) и человеческого (SEQ ID №: 12 и 13) ферритина. В секции (С) показан минимальный активный фрагмент консенсусной аминокислотной последовательности среди α-цепей гемоглобина млекопитающих и одна полноразмерная консенсусная последовательность на основе нескольких α-цепей гемоглобина млекопитающих (см. SEQ ID №: 15 и 16 соответственно), а также минимальная и полноразмерная аминокислотная последовательность α-цепи человеческого гемоглобина (SEQ ID №: 17 и 18). В секции (D) показан минимальный активный фрагмент консенсусной аминокислотной последовательности β-цепей гемоглобина млекопитающих и полноразмерные консенсусные последовательности на основе нескольких β-цепей

гемоглобина млекопитающих (см. SEQ ID №: 19 и 20 соответственно), а также минимальная и полноразмерная аминокислотная последовательность β -цепи человеческого гемоглобина (SEQ ID №: 21 и 22). В секции (E) показан N- и C-концевой минимальный активный фрагмент консенсусной аминокислотной последовательности среди трансферринов млекопитающих (SEQ ID №: 23 и 24) и полноразмерные консенсусные последовательности на основе нескольких трансферринов млекопитающих (SEQ ID №: 25), а также N- и C-концевой минимальный активный фрагмент человеческого трансферрина (SEQ ID №: 26 и 27) и полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого трансферрина (SEQ ID №: 28). В консенсусных последовательностях X указывает на переменное положение и обозначает любую встречающуюся в природе аминокислоту. Предпочтительно в каждом случае X в зависимости от другого X обозначает аминокислоту, присутствующую в человеческом белке.

Фиг. 2 - показан макрофаг внутри опухолевой массы мыши (окрашивали TRITC перед инъекцией, нагружали меченым при помощи FITC ферритином (FITC-ферритином)).

Фиг. 3 - показано изображение конфокальной микроскопии опухолевой ткани мыши с инъекцией клетками рака молочной железы, и учитывая в.в. введенные макрофаги, нагруженные FITC-ферритином (астерикс), четко заметно не только по макрофагам, но и по раковым клеткам, что FITC-ферритин распространяется по всей опухолевой массе.

Фиг. 4 - показаны моментальные снимки в одном канале сигнала (в исходном канале зеленого сигнала, преобразованном в изображение в градациях серого) с применением конфокальной микроскопии макрофагов (обозначенные *, нагруженные FITC-ферритином) и раковой клетки (обозначена стрелкой, окрашена при помощи красной метки и, следовательно, ее не наблюдают в канале зеленого сигнала перед поглощением ферритина) *in vitro*, полученные в начальный момент времени (A), и по истечении времени, достаточного для заполнения раковой клетки ферритином (B). Осуществлялся динамический перенос FITC-ферритина в раковую клетку (с накоплением сначала в везикулах, затем распространяясь по всей цитоплазме, как видно на этом изображении (клетка появилась в канале зеленого сигнала)).

Фиг. 5 - показана выживаемость мышей, получавших плацебо и макрофаги, нагруженные связанным с ферритином мелфаланом и связанным с ферритином хлорамбуцилом.

Фиг. 6 - показан апоптоз опухолевых клеток, вызванный обработкой циклофосфамидом и циклофосфамидом, инкапсулированных в ферритинах, которыми нагружают макрофаги (представлены в одинаковых дозах).

Фиг. 7 - показаны МРТ-изображения опухоли молочной железы мыши. Мышь получала лечение (в момент времени 0 ч) макрофагами (в/в инъекция), нагруженными ферритином Fh. Затем наблюдали увеличенный диаметр кровеносных сосудов (стрелка), заполненных инъецированными макрофагами (дают значимое снижение T2-сигнала), и после чего макрофаги распространялись по ткани (пятноподобный рисунок, стрелки). Эти изменения (в те же моменты времени) наблюдали у всех исследуемых мышей.

Фиг. 8 - показано поглощение ферритина, гемоглобина и трансферрина макрофагами, поглощение ферритина и гемоглобина моноцитами и поглощение ферритина лимфоцитами и гранулоцитами.

Фиг. 9 - показана стабильность накопления ферритина макрофагами.

Фиг. 10 - показан перенос ферритина, гемоглобина и трансферрина из макрофага в различные раковые клетки.

Фиг. 11 - показан перенос ферритина из макрофага в раковые и нераковые клетки.

Фиг. 12 - показан перенос ферритина с инкапсулированным пролекарством, активируемым гипоксией, из макрофага в раковые клетки.

Фиг. 13 - показан апоптоз в раковых клетках, которые получали ферритин с различными инкапсулированными противораковыми агентами из совместно культивированных макрофагов или растворимого ферритина с тем же самым агентом.

Фиг. 14 - показан перенос ферритина, гемоглобина и трансферрина из моноцита в различные раковые клетки.

Фиг. 15 - показан перенос ферритина и гемоглобина из гранулоцита в различные раковые клетки.

Фиг. 16 - показан перенос ферритина и гемоглобина и трансферрина из лимфоцита в различные раковые клетки.

Фиг. 17 - показано изображение, полученное с применением двухфотонной микроскопии, показывающее опухоль, полученную от мыши, которая получала предварительно меченые (до введения) макрофаги, содержащие FITC-ферритин.

Фиг. 18 - показано изображение всего тела мышей, которые внутривенно получали меченые макрофаги, на котором показано их накопление в опухолевом участке и их распределение в других органах.

Фиг. 19 - показана миграция макрофагов в гипоксическую ткань, поперечный срез опухоли, полученной от мыши, которой внутривенно вводили предварительно меченые макрофаги, гипоксические области опухоли визуализируют при помощи маркера гипоксии - пимонидазолана.

Фиг. 20 - показана наблюдаемая локализация везикул, содержащих меченый при помощи FITC ферритин (круглые объекты) в микроокружении внутри опухолевой массы. Макрофаги, содержащие меченый при помощи FITC ферритин, мышам вводили внутривенно.

Фиг. 21 - показан регистрируемый при помощи ПЭТ сигнал, получаемый по результатам анализа

всего тела мышей с метастатическим раком 4T1. Мыши внутривенно получали макрофаги, нагруженные 18F-FDG. Накопление сигнала увеличивается в легких мышей с микрометастазами (подтверждается патологическим исследованием). У мышей, получавших просто 18F-FDG, или у мышей без рака 4T1 регистрируемый при помощи ПЭТ сигнал был более низким.

Примеры

Пример 1. Активация макрофагов.

Макрофаги для применения согласно настоящему изобретению получали, дифференцировали и активировали следующим образом.

Для того чтобы активировать макрофаги, изначально их получают из предшественников костного мозга (например, см. документ Weischenfeld and Porse, 2008, CSH Protoc, doi. 10.1101/pdb.prot.5080) или моноцитов крови. В альтернативном варианте их можно получить из брюшины. Способы выделения, культивирования, дифференцировки и поляризации/активации макрофагов хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, они подробно описаны у MurRAY et al. (Immunity, 2014, 41 (1): 14-20).

При такой практической реализации настоящего изобретения макрофаги костно-мозгового происхождения получали от BALB/c или C57B1/6 мыши, однако макрофаги, полученные из моноцитов собачьей крови, или коммерчески доступные линии макрофагальных клеток (мышинные клетки моноцитарно-макрофагальной линии дифференцировки RAW 264,7, J744, человеческие THP-1, U937 или линия собачьих клеток DH82).

Вкратце, такие макрофаги костно-мозгового происхождения высевают в пластиковую чашку Петри с 5 мл среды (3 мл клеток на чашку): DMEM:F12 + глутамин/глутамакс + 10% ФСБ + пенициллин/стрептомицин и 20% кондиционированной среды L929 или M-CSF (50 нг/мл). В течение последующих пяти дней указанную среду дополняют фактором роста и одним из активирующих соединений или их комбинацией в виде одного цитокинового коктейля.

В альтернативном варианте макрофаги культивировали в среде для образования M1/M2-макрофагов ("M1/M2 Macrophage Generation Medium", компания Promocell) или в эквивалентной коммерчески доступной или самостоятельно приготовленной среде, содержащей все необходимые цитокины и интерлейкины, чтобы считать их активированными.

Для получения макрофагов из моноцитов крови, свежую кровь (не старше 12 ч) осаждают с применением системы Nystoraque 1077 или ей эквивалентной, а лейкоциты (или в альтернативном варианте только лейкоциты, собранные из банка крови) в соответствующее количество предварительно нагретой среды для присоединения моноцитов (или ей эквивалентной, например, DMEM/RPMI, дополненной M-CSF), например, 15 мл указанной среды на колбу T-75. Плотность посева должна составлять 1-2 млн/см² для мононуклеарных клеток при содержании моноцитов $\geq 25\%$ и 1,5-3 млн/см² при содержании моноцитов $< 25\%$. Затем клетки инкубируют в течение 1-1,5 ч в 5% CO₂ и при 37°C в инкубаторе без каких-либо дополнительных манипуляций.

После присоединения клеток их промывают по меньшей мере дважды и затем к указанным клеткам добавляют соответствующее количество полной "DFX-среды для образования M1- или M2-макрофагов" (например, 20 мл на колбу T-75), и клетки инкубируют в течение 6 дней при 37°C и 5% CO₂ без изменения среды. Для того чтобы активировать макрофаги, всю среду следует заменить средой, дополненной активирующим соединением.

Активирующими соединениями, применяемыми в настоящем изобретении (для клеток костно-мозгового происхождения или для активации клеток, полученных из линий моноцитарно-макрофагальных клеток), являются следующие: IL-4 (20 нг/мл), ИФН- γ (по меньшей мере 20 нг/мл), липополисахариды (LPS) (по меньшей мере 10 нг/мл), IL-13 (по меньшей мере 20 нг/мл), IL-10 (по меньшей мере 20 нг/мл), дексаметазон (по меньшей мере 20 мкг/мл), окисленные ЛПНП (oxLDL) (по меньшей мере 20 нг/мл), ФНО- α (20 нг/мл), TGF- β (20 нг/мл), кортизол (150-300 нг/мл) или их комбинации в виде одного цитокинового коктейля. Для того чтобы получить неактивированные макрофаги, активирующее соединение не добавляли.

Обратного процесса поляризации/активации макрофагов (от классически активированных до альтернативно активированных) можно достигнуть, например, культивируя макрофаги в соответствующих цитокинах, перечисленных выше, в течение по меньшей мере 48 ч.

Пример 2. Выделение моноцитов.

Для получения моноцитов для данной практической реализации настоящего изобретения моноциты костно-мозгового происхождения или моноциты селезенки получали от BALB/c или C57B1/6 мыши, однако применяли моноцит собачьей крови или коммерчески доступные линии моноцитарных клеток (мышинные клетки моноцитарно-макрофагальной линии дифференцировки RAW 264,7, J744, человеческие THP-1, U937 или линия собачьих клеток DH82).

Для получения моноцитов крови свежезаготовленную кровь (не старше 12 ч) осаждают с применением системы Nystoraque 1077 или ей эквивалентной, а лейкоциты высевают в соответствующем количестве предварительно нагретой среды для присоединения моноцитов (или ей эквивалентной, например,

DMEM/RPMI, дополненной 20 нг/мл M-CSF), например, 15 мл указанной среды на колбу Т-75. В альтернативном варианте можно применять только лейкоциты, собранные из банка крови (лейкоцитарная пленка). Плотность посева должна составлять 1-2 млн/см² для мононуклеарных клеток при содержании моноцитов $\geq 25\%$ и 1,5-3 млн/см² при содержании моноцитов $< 25\%$. Затем клетки инкубируют в течение 1-1,5 ч в 5% CO₂ и при 37°C в инкубаторе без каких-либо дополнительных манипуляций. После присоединения клеток их промывают по меньшей мере дважды, а адгезивные клетки считают моноцитами.

Для получения моноцитов костно-мозгового происхождения для данной практической реализации настоящего изобретения макрофаги костно-мозгового происхождения получали от BALB/c или C57B1/6 мыши. Вкратце, такие предшественники костно-мозгового происхождения высевают в пластиковую чашку Петри с 5 мл среды (3 мл клеток на чашку): DMEM:F12 + глутамин/глутамакс + 10% ФБС + пенициллин/стрептомицин и 20% кондиционированной среды L929 или 20 нг/мл M-CSF. Спустя 2 дня добавляют 5 мл стандартной среды. Затем через 2 дня добавляют 0,5 мл/чашку кондиционированной среды L929. Адгезивные клетки считают моноцитами.

Для получения моноцитов селезенки для данной практической реализации настоящего изобретения селезенку механически диссоциировали для получения суспензии отдельных клеток и пропускали через сетчатый фильтр с размером пор 70 мкм. Клетки центрифугировали и удаляли супернатант. После лизиса эритроцитов моноциты выделяли, применяя метод очистки с магнитными микроносителями, например, протокол для EasySep Mouse Monocyte Enrichment Kit, и соответствующий магнит.

Для получения лучшего эффекта от нагрузки их белком и миграции перед применением их можно предварительно обработать стимулирующими веществами для активации макрофагов IL-4 (20 нг/мл), ИФН- γ (по меньшей мере 20 нг/мл), LPS (по меньшей мере 10 нг/мл), IL-13 (по меньшей мере 20 нг/мл), IL-10 (по меньшей мере 20 нг/мл), дексаметазон (по меньшей мере 20 мкг/мл), oxLDL (по меньшей мере 20 нг/мл), ФНО- α (20 нг/мл), TGF- β (20 нг/мл), кортизол (150-300 нг/мл) или их комбинациями в виде одного цитокинового коктейля.

Пример 3. Выделение гранулоцитов.

Для получения гранулоцитарных клеток из крови 9 частей крови разводили 1 частью ACD-буфера (содержащим 0,17 М d-глюкозы, 0,10 М лимонной кислоты, 0,11 М тринатрийцитрата). Полученную на этой стадии кровь дополнительно разбавляли ФБС в соотношении 1:1 и центрифугировали. После удаления плазмы и лейкоцитарной пленки оставшиеся клетки смешивали с ФБС до 80% исходного объема, полученного на первой стадии (ACD-кровь), затем разбавляли холодной дистиллированной водой в соотношении 4:12. Затем добавляли 6 частей 2,7% раствора NaCl и центрифугировали. После удаления супернатанта клеток повторно суспендировали в среде RPMI-1640. Эти клетки считали гранулоцитами.

Пример 4. Выделение лимфоцитов.

Для получения лимфоцитов селезенки для данной практической реализации настоящего изобретения селезенку механически диссоциировали для получения суспензии отдельных клеток и пропускали через сетчатый фильтр с размером пор 70 мкм. Клетки центрифугировали и удаляли супернатант. После лизиса эритроцитов лимфоциты выделяли, применяя метод очистки с магнитными микроносителями, например, протокол для EasySep Mouse CD4+ Enrichment Kit, и соответствующий магнит.

Пример 5. Получение ферритиновых комплексов.

Для включения в молекулы ферритинов противораковых лекарственных средств (например, классических лекарственных средств наподобие циклофосфамида, хлорамбуцила, мелфалана, бендамустина, баноксантрона или активируемого гипоксией пролекарства наподобие TH-302), ферритины следует получать до лечения макрофагами. Вкратце, рекомбинантные мышинные белки, соответствующие SEQ ID №: 4 (фиг. 1) получают следующим образом.

Вектор экспрессии pET-22b, содержащий синтетический ген, кодирующий белок ферритин SEQ ID №: 4, трансформировали в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру *E. coli* выращивали при 37°C до величины OD₆₀₀ 0,6 в 1 л бульона Лурия-Бертани (LB) с добавлением ампициллина (100 мг/л). Экспрессию белка индуцировали добавлением 1 mM изопропилтио-b-D-галактозида (IPTG), и указанную культуру инкубировали в течение ночи. Клетки собирали путем центрифугирования (15000 g в течение 15 мин) и суспендировали в 20 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 мг/мл ДНКазы, 10 mM MgCl₂ и разрушали ультразвуком. Лизат центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин и супернатант обрабатывали в течение 10 мин при 50°C, центрифугировали для удаления денатурированных белков, а затем при 70°C в течение 10 мин повторно центрифугировали. В указанный супернатант добавляли 30% (NH₄)₂SO₄ при 4°C, перемешивая в течение 1 ч, и центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин. В супернатант добавляли 70% (NH₄)₂SO₄ при 4°C, перемешивая в течение 1 ч, и центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин. Осадок повторно суспендировали в 20 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl и диализовали в течение ночи при 4°C против того же буфера. Белок нагружали в гель-фильтрационную колонку HILOAD 26/600 SUPER-DEX 200 (GE-Healthcare) и затем фильтровали в стерильных условиях и хранили при 4°C. (фиг. 9) Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, применяя молярный коэффициент экстинкции 21000 M⁻¹cm⁻¹ и при помощи анализа Брэдфорда, измеряя поглощение при длине волны 595 нм.

Указанные ферритины включают рекомбинантные Н- и/или L-гомополимеры белков ферритинов млекопитающих.

Ферритины, полученные так, как описано выше, очищают при помощи стандартных способов для получения продукта доклинического уровня, не содержащего эндотоксин (см., например: Cesi et al., 2011, *Extremophiles* 15 (3): 431-439; Vanucci et al. 2012, *Int. J. Nanomed.* 7: 1489-1509). Вкратце, ферритин, хранящийся в стерильном растворе, содержащем 20 мМ Hepes pH 7,5, разбавляют до конечной концентрации 24-мера в 4 мкМ в кислом растворе (конечный pH <3,0) или, в альтернативном варианте, в растворе при сильно основных значениях pH (pH >9,5) (см., например, Pontillo et al., 2016), что позволяет осуществить диссоциацию мультимера. Лекарственные средства растворяют при очень высоких концентрациях в соответствующем растворителе и затем в небольшом объеме добавляют к раствору ферритина с 200-молярным избытком. Затем pH нейтрализуют добавлением соответствующих количеств растворов NaOH/HCl для обеспечения восстановления мультимера. Существующие экспериментальные методы показывают, что три/четыре промывки с применением ФСБ (стадии концентрирования) при критической для 100 кДа концентрации позволяют быстро и полностью устранить как соразтворители, так и не инкапсулированные лекарственные средства, и полностью восстановить нагруженные лекарственным средством ферритины со структурой в виде нанокейджей. Полученный таким образом комплекс ферритин-лекарственное средство затем быстро замораживали в жидком азоте и лиофилизировали.

В зависимости от выбора соразтворителя и присущих молекулам лекарственного средства химических свойств можно оценить, что вплоть до 150-180 молекул лекарственного средства могут быть захвачены/адсорбированы в 24-мерном ферритиновом кейдже.

Лекарственные средства также можно ковалентно присоединить к боковыми цепям аминокислот ферритина (лизинами или цистеинами) путем соответствующего выбора активируемых фенолгидразон, сукцинимидом или малеимидом лекарственных средств. Соответственно, i) производное фенолгидразона может отрывать и высвобождать лекарственное средство с поверхности ферритина, ii) связанные с лизином производные могут активироваться после полного разложения белка до аминокислот, или iii) связанное с цистеином производное может высвободиться в клетке посредством редуктивного гидролиза тиоэфирной связи малеимида.

Пример 6. Получение комплексов соединений с гемоглобином.

Человеческий гемоглобин получают из свежезаготовленных эритроцитов, как это описано у Rossi-Fanelli et al. (*Archives of biochemistry and biophysics* 77:478-492, 1958). Вкратце, гепаринизированную кровь, полученную от здоровых доноров, центрифугировали при 1600 об/мин в течение 30 мин (4°C) для осаждения эритроцитов. Лейкоцитарную пленку аккуратно удаляли путем аспирации эритроцитов, трижды промывали путем повторного суспендирования эритроцитов в изотоническом 0,9% соляном растворе и центрифугирования при 1600 об/мин в течение 30 мин при 4°C. После заключительной стадии промывки и центрифугирования соляным раствором осадок эритроцитов повторно суспендировали в дистиллированной воде, забуференной при pH 7,2, 5 мМ фосфатным буфером калия (PB, pH 7,2) и оставляли лизироваться при 4°C в течение ночи при осторожном перемешивании. Диализованный лизат эритроцитов затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 30 мин при 4°C и супернатант непосредственно загружали в систему для исследования АКТА, оборудованную колонкой XK 26/40, заполненную смолой Q-sepharose XL (GE Healthcare) при комнатной температуре. Колонки уравнивали буфером А (20 мМ Tris-HCl, pH 8,2) при скорости потока 12 мл/мин и три раза промывали тем же буфером. Элюирование в режиме линейного градиента осуществляли путем изменения состава подвижной фазы от 100% буфера А до 75% буфера В (20 мМ Tris-Cl, плюс 0,2 М NaCl, pH 8,20) с последующим режимом ступенчатого градиента с 100% буфером В. После элюирования применяли коллектор фракций для сбора белковых фракций. Полученный таким образом белок анализировали методом ДСН-ПААГ-электрофореза и хранили в замороженном виде при -80°C.

Человеческий гемоглобин (SEQ ID №: 18 или 22, см. фиг. 1) можно ковалентно легко связать с соответствующими конъюгатами лекарственных средств, он может размещать гидрофобные молекулы лекарственного средства в кармане для связывания гема или даже переносить малые цитотоксические молекулы, связанные с гемовым железом. Hb можно легко модифицировать путем селективного присоединения соответствующего конъюгата лекарственного средства к остатку цистеина в положении 93 β-цепей, к единственно титруемому цистеину на поверхности указанного белка.

Малеимид-функционализированные лекарственные средства, такие как ингибитор тубулина монометилауристин (ММАЕ), или сукцинимид-функционализированный аналог мертансина (DM1-SMCC) являются наиболее важными примерами чрезвычайно сильных цитотоксических препаратов, которые можно легко и специфическим образом присоединить к соответствующему остатку цистеина в положении 93 β-цепей (для малеимид-функционализированных лекарственных средств) или по меньшей мере к одному остатку лизина (сукцинимид-функционализированные лекарственные средства) соответственно. Конъюгацию таких лекарственных средств удобно проводили с человеческим гемоглобином согласно следующим процедурам.

Аналог ауристината Е, малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензоилоксикарбонил-

монометил ауристатин Е (vcMMAE), получали от компании MedChem Express (Принстон, Нью-Джерси). Аддукт гемоглобина и vcMMAE получали следующим образом.

Раствор человеческого гемоглобина доводили до концентрации гема в 120 мкМ реакционным буфером (50 мМ фосфатного буфера с pH 6,8, содержащего 0,1 мМ ЭДТА) и конъюгировали с 10-кратным молярным избытком vcMMAE в присутствии 20% об./об. раствора ацетонитрила при 4°C в течение ночи. Малеймидные группы эффективно и специфически вступают в реакцию со свободными (восстановленными) сульфгидрилами при pH 6,5-7,5 с образованием стабильных тиоэфирных связей. Избыток vcMMAE очищали и буфер заменяли на ФСБ Дюльбеккю (Д-ФСБ) с применением концентратора для ультрафильтрации PM 100. Выход при конъюгации составлял приблизительно 80% от общего количества цистеинов. Образование конъюгата vcMMAE подтверждали при помощи анализа с применением жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS-анализ) и путем титрования остаточной свободной тиоловой группы с п-хлормеркурибензоатом. Концентрации конъюгатов Hb-vcMMAE определяли с применением спектроскопического анализа в УФ- и видимой области.

Аналог мертансина DM1-SMCC (Alb Technology Ltd, Хендерсон, штат Невада, США), функционализированный для ковалентного присоединения лизина, получали следующим образом. Раствор человеческого гемоглобина доводили до концентрации гема в 400 мкМ реакционным буфером (0,1 мМ фосфатного буфера с pH 7,4, содержащего 0,5 мМ ЭДТА) и конъюгировали с 20-кратным молярным избытком DM1-SMCC в присутствии 10% об./об. раствора ДМСО при 4°C в течение 16 ч. Реакционноспособный в отношении амина сукцинимидиловый эфир присоединяется к аминам, что приводит к получению ковалентного аддукта с лизиновыми группами на поверхности указанного белка. Избыток DM1-SMCC удаляли и буфер заменяли на Д-ФСБ с применением концентратора для ультрафильтрации PM 100. Выход при конъюгации составлял приблизительно 2,4 молекулы мертансина на тетрамер гемоглобина. Образование конъюгата DM1-SMCC подтверждали при помощи LC-MS-анализа. Концентрации конъюгатов Hb-DM1-SMCC определяли с применением спектроскопического анализа в УФ- и видимой области.

Пример 7. Получение комплексов соединений с трансферрином.

Сыворотку получали от здорового донора и добавляли избыток железа в присутствии ионов цитрата в качестве хелатора и бикарбонат, который облегчает связывание железа с трансферрином. Реакционная смесь содержала 6,5 мг бикарбоната натрия и 153,16 лимоннокислого железа при pH 8, 4°C в течение 1 ч на 100 мл сыворотки. Альбумин затем осаждали при помощи риванола (4%) путем добавления спиртового раствора к образцу сыворотки в соотношении 3,5 об./об. при 4°C и pH 9,4 в течение 2 ч. Затем указанный раствор центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин и в конце фильтровали через фильтр на фильтрующем шприце с размером пор 0,8 мкм. Избыток риванола затем удаляли методом гель-фильтрации на колонке Sephadex G-25 в сульфате аммония при концентрации 0,025 М. Затем сначала проводили осаждение 50% насыщенным сульфатом аммония при pH 6,5 с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин (удаление иммуноглобулина). Затем проводили второе осаждение в 80% насыщенном сульфате аммония, что позволяло восстановить осадок трансферрина. Твердый осадок затем растворяли в буфере 0,06 М буфера Tris HCl, pH 8, содержащем 1 М NaCl. Раствор диализовали в том же буфере для обеспечения полного удаления сульфата аммония. Затем раствор белка концентрировали с применением центробежного центрифугального концентратора PM50 вплоть до 10-15 мг/мл (рассчитанная по методу Брэдфорда) и загружали на гель-фильтрационную колонку Sephadex G-100 (2,4×80 см), уравновешенную в 1 М NaCl, скорость потока 15 мл/ч. Методом ДСН-ПААГ-электрофореза оценили чистоту полученного таким образом трансферрина на уровне 88-90%. Затем в качестве конечной стадии очистки применяли метод ионообменной хроматографии с применением анионита DEAE Sephadex A-50. Образец трансферрина загружали в колонку, уравновешенную 0,06 М Tris HCl при pH 8 и элюировали в режиме линейного градиента концентрации с применением буфера для элюирования, 0,3 М Tris HCl, pH 8. Чистота белка составляла выше 98% с выходом приблизительно 150 мг на 100 мл сыворотки.

Человеческий голотрансферрин (SEQ ID №: 28, фиг. 1), аналогично гемоглобину, можно ковалентным образом легко связать с соответствующими конъюгатами лекарственных средств, хотя в данном случае возможны модификации только по лизину по причине отсутствия свободно тиреуемых цистеиновых групп. Таким образом, сукцинимид-функционализированный аналог мертансина (DM1-SMCC) применяют для ковалентного присоединения по меньшей мере к одному остатку лизина (сукцинимид-функционализированное лекарственное средство). Ковалентную конъюгацию указанного лекарственного средства с трансферрином проводили согласно следующей процедуре.

Аналог мертансина DM1-SMCC (Alb Technology Ltd, Хендерсон, штат Невада, США), функционализированный для ковалентного присоединения лизина, получали следующим образом. Раствор трансферрина доводили до концентрации гема в 100 мкМ реакционным буфером (0,1 мМ фосфатного буфера с pH 7,4, в данном случае без ЭДТА вследствие возможных эффектов хелатирования железа) и конъюгировали с применением 20-кратного молярного избытка DM1-SMCC в присутствии 8% об./об. раствора ДМСО при 4°C в течение 16 ч. Реакционноспособный в отношении амина сукцинимидиловый эфир присоединяется к аминам, что приводит к получению ковалентного аддукта с лизиновыми группами на по-

верхности указанного белка. Избыток DM1-SMCC удаляли и буфер заменяли на Д-ФСБ с применением концентратора для ультрафильтрации PM 100. Выход при конъюгации составлял приблизительно 1,5 молекулы мертансина на трансферриновый димер. Образование конъюгата DM1-SMCC подтверждали при помощи LC-MS-анализа. Концентрации конъюгатов трансферрин-DM1-SMCC определяли с применением спектроскопического анализа в УФ- и видимой области.

Пример 8. Получение нагруженных ферритином клеток.

Полученные клетки инкубируют в растворе ферритина в течение времени и при концентрации, достаточной для обеспечения надлежащего соотношения ферритин/клетка для их полной загрузки, а также для обеспечения надлежащего содержания лекарственного средства для получения терапевтического эффекта. Указанное время и концентрация могут варьироваться в зависимости от числа молекул, инкапсулированных/адсорбированных в ферритиновом кейдже, состояния активации клеток, условий и количеств их предполагаемых введений.

Например, для обеспечения надлежащей загрузки ферритинами клетки инкубируют в течение 1-4 ч в растворе ферритина с концентрацией 0,2 мг/мл в стандартных условиях культивирования. Диапазон концентрации ферритина может варьироваться по меньшей мере от 0,01 до 4 мг/мл, так же как и время инкубации (от 5 мин до 6 ч или более). Регулируя время и концентрацию загрузки клеток ферритином, следует учитывать влияние ферритина и условия лечения на жизнеспособность клеток. Клетки, полученные указанным выше образом, очень легко поглощают ферритины за относительно короткое время (в минутах, фиг. 8). Как только они поглощают ферритины, высвобождение указанными клетками ферритинов в среду для культивирования не происходит (фиг. 9).

Тем не менее, специалист в данной области техники способен отрегулировать вышеуказанные условия и оптимизировать протокол для собственных целей в собственной лаборатории.

Пример 9. Получение нагруженных гемоглобином клеток.

Полученные клетки инкубируют в растворе гемоглобина в течение времени и при концентрации, достаточной для обеспечения надлежащего соотношения гемоглобин/клетка для их полной загрузки, а также для обеспечения надлежащего содержания лекарственного средства для получения терапевтического эффекта. Указанное время и концентрация могут варьироваться в зависимости от числа молекул, связанных с молекулой гемоглобина, состояния активации клеток, условий и количеств их предполагаемых введений.

Например, для обеспечения надлежащей загрузки гемоглобинами клетки инкубируют в течение 1-4 ч в растворе гемоглобина с концентрацией 0,1 мг/мл в стандартных условиях культивирования. Диапазон концентрации гемоглобина может варьироваться по меньшей мере от 0,01 до 0,2 мг/мл, так же как и время инкубации (от 5 мин до 4 ч или более). Регулируя время и концентрацию загрузки клеток гемоглобином, следует учитывать влияние гемоглобина и условия лечения на жизнеспособность клеток. Клетки, полученные указанным выше образом, очень легко поглощают молекулы гемоглобина за относительно короткое время (в минутах, фиг. 8).

Тем не менее, специалист в данной области техники способен отрегулировать вышеуказанные условия и оптимизировать протокол для собственных целей в собственной лаборатории.

Пример 10. Получение нагруженных трансферрином клеток.

Полученные клетки инкубируют в растворе трансферрина в течение времени и при концентрации, достаточной для обеспечения надлежащего соотношения трансферрин/клетка для их полной загрузки, а также для обеспечения надлежащего содержания лекарственного средства для получения терапевтического эффекта. Указанное время и концентрация могут варьироваться в зависимости от числа молекул, связанных с молекулой трансферрина, состояния активации клеток, условий и количеств их предполагаемых введений.

Например, для обеспечения надлежащей загрузки трансферринами, клетки инкубируют в течение 1-4 ч в растворе трансферрина с концентрацией 0,1 мг/мл в стандартных условиях культивирования. Диапазон концентрации трансферрина может варьироваться по меньшей мере от 0,01 до 0,2 мг/мл, так же как и время инкубации (от 5 мин до 4 ч или более). Регулируя время и концентрацию загрузки клеток трансферрином, следует учитывать влияние трансферрина и условия лечения на жизнеспособность клеток. Клетки, полученные указанным выше образом, очень легко поглощают молекулы трансферрина за относительно короткое время (в минутах, фиг. 8).

Тем не менее, специалист в данной области техники способен отрегулировать вышеуказанные условия и оптимизировать протокол для собственных целей в собственной лаборатории.

Пример 11. Комплекс ферритина/гемоглобина/трансферрина с макрофагом в качестве подходящего инструмента для доставки в раковые клетки.

Макрофаги из примера 1, полученные так, как описано в примерах 8, 9 и 10, очень легко переносят ферритины, гемоглобины, трансферрины в раковые клетки: клетки рака молочной железы мыши, рака толстой кишки, рака молочной железы собак, рак груди человека, поджелудочной железы и мочевого пузыря (фиг. 4, 10). Более того, этот перенос гораздо более специфичен в отношении раковых клеток, чем для нераковых клеток (фиг. 11). Однако в случае раковых клеток соотношение обоих типов клеток имеет решающее значение. Чем больше макрофагов, тем лучше и быстрее осуществляется перенос. Наи-

более эффективный перенос в раковые клетки наблюдали в случае, когда соотношение макрофагов и раковых клеток составляло 1:1 или более.

Этот перенос происходил не только в случае, когда конъюгацию белковых носителей проводили с флуоресцентной меткой (например, FITC или Alexa610), но и также в том случае, когда их конъюгацию/инкапсулирование осуществляли с другими соединениями, например противораковыми лекарственными средствами (на фиг. 12 показан этот перенос ферритина, инкапсулированного с флуоресцентным активируемым гипоксией пролекарством - баноксантроном). Такой перенос соединений, конъюгированных с противораковыми лекарственными средствами, создавал эффект, индуцирующий апоптоз в раковых клетках (фиг. 6, 13).

Пример 12. Комплекс ферритина/гемоглобина/трансферрина с моноцитом в качестве подходящего инструмента для доставки в раковые клетки.

Моноциты из примера 2, полученные так, как описано в примерах 8, 9 и 10, очень легко переносят ферритины, гемоглобины, трансферрины в раковые клетки (фиг. 14). Тем не менее, соотношение обоих типов клеток имеет решающее значение. Чем больше моноцитов, тем лучше и быстрее осуществляется перенос. Наиболее эффективный перенос в раковые клетки наблюдали в случае, когда соотношение моноцитов и раковых клеток составляло 1:1 или более.

Пример 13. Комплекс ферритина/гемоглобина/трансферрина с гранулоцитами в качестве подходящего инструмента для доставки в раковые клетки.

Гранулоциты из примера 3, полученные так, как описано в примерах 8, 9 и 10, очень легко переносят ферритины, гемоглобины, трансферрины в раковые клетки (фиг. 15). Тем не менее, соотношение обоих типов клеток имеет решающее значение. Чем больше гранулоцитов, тем лучше и быстрее осуществляется перенос. Наиболее эффективный перенос в раковые клетки наблюдали в случае, когда соотношение моноцитов и раковых клеток составляло 1:1 или более.

Пример 14. Комплекс ферритина/гемоглобина/трансферрина с лимфоцитом в качестве подходящего инструмента для доставки в раковые клетки.

Лимфоциты из примера 4, полученные так, как описано в примерах 8, 9 и 10, очень легко переносят ферритины, гемоглобины, трансферрины в раковые клетки (фиг. 16). Тем не менее, соотношение обоих типов клеток имеет решающее значение. Чем больше лимфоцитов, тем лучше и быстрее осуществляется перенос. Наиболее эффективный перенос в раковые клетки наблюдали в случае, когда соотношение лимфоцитов и раковых клеток составляло 1:1 или более.

Пример 15. Комплекс лейкоцита с белком-носителем в качестве агента для направленной доставки лекарственного средства в гипоксические области.

Макрофаги, полученные так, как это указано выше, инъецировали в хвостовую вену животного с опухолью (соответствующее количество макрофагов следует отрегулировать под размер опухоли, стадию развития и наличие метастаз). Как показано на фиг. 2 и 17, они специфическим образом достигают опухоли (через несколько часов), а также распространяются по другим органам всего тела животного (фиг. 18). Более того, как показано на фиг. 19, в гипоксической модели они также могут мигрировать в аваскулярные и гипоксические участки и переносить белки-носители в раковые клетки (фиг. 3 и 20).

Для целей визуализации в хвостовую вену животного с опухолью молочной железы или раком толстой кишки инъецировали от 1 до 50 миллионов макрофагов. До этого на макрофаги предварительно наносили метку при помощи Cell Tracker и нагружали их FITC-ферритином (как показано в примере 8). Применяя метод двухфотонной микроскопии опухолевых масс через 8 ч после введения макрофагов, обнаруживали присутствие макрофагов с FITC-ферритином (фиг. 17). Их специфическое нацеливание на опухоль, а также и их миграция в другие органы, была представлена с применением визуализации всего тела животных (Международная информационная служба по вопросам ветеринарии, IVIS) после предварительного нанесения метки на макрофаги с применением цитоплазматического красителя DIR (фиг. 18).

Мышам с опухолью (300000-500000 клеток ЕМТ6, инъецированных через кожу в боковой области) в.в. инъецировали от 1 до 10 миллионов макрофагов, нагруженных ферритином с инкапсулированным циклофосфамидом, мелфаланом и ферритином с инкапсулированным хлорамбуцилом. Авторы настоящего изобретения делали 3 инъекции макрофагов на каждый третий день (в день 5, 8 и 11 после инъекции раковых клеток или на день 7, 10 и 13 после инъекции раковых клеток) или пять последовательных инъекций каждый день и наблюдали увеличение выживаемости мышей (фиг. 5).

Пример 16. Комплекс лейкоцита с белком-носителем или меченый лейкоцит в качестве подходящего инструмента для визуализации.

Нацеливание системы для направленной доставки, описанной в настоящем изобретении, может сопровождаться присоединением ферритина к контрастному агенту. Как показано на фиг. 21, после инъекции 1-50 мл макрофагов, нагруженных ферритином с присоединенным, как это описано в примере 8, контрастным агентом (в данном случае ферригидритом, однако те же результаты получают и с изотопом, например ¹²³I), или меченных при помощи изотопа (в данном случае ¹⁸F-FDG) (фиг. 21), их можно легко обнаружить методами ЯМР-томографии, ПЭТ или ОЭКТ. В данном примере (фиг. 7) мышей с опухолью молочной железы визуализировали с применением МРТ через 3, 22 и 24 ч после в.в. инъекции макрофагов, нагруженных ферритином Fh. Мышь получала лечение (в момент времени 0 ч) макрофагами. Затем

наблюдали увеличенный диаметр кровеносных сосудов (стрелка), заполненных инъецированными макрофагами (дают значимое снижение T2-сигнала), и после чего макрофаги распространялись по ткани (пятноподобный рисунок, стрелки). Эти изменения (в те же моменты времени) наблюдали у всех исследованных мышей.

На макрофаги также наносили метку ^{18}F -FDG (5-50 млн) и визуализировали с применением ПЭТ в течение 1 ч после в.в. введения мышам с опухолью. Этим мышам инокулировали линией метастатических клеток 4T1 за 3 недели до эксперимента и подтверждали наличие метастаз в легких, печени и селезенке гистопатологическим методом. На фиг. 21 видно, что макрофаги мигрировали в области с метастатическими опухолями, что позволяет их визуализировать при помощи ПЭТ.

Хотя вышеприведенное письменное описание настоящего изобретения позволяет специалисту обычной квалификации создавать и применять то, что в настоящее время считается наилучшим способом, специалисты обычной квалификации поймут и оценят существование вариаций, комбинаций и эквивалентов конкретного варианта реализации, способа и примеров настоящего документа. Следовательно, настоящее изобретение не должно ограничиваться описанным выше вариантом реализации, способом и примерами, но и всеми вариантами и способами, входящих в объем и сущность настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к следующим аспектам и предпочтительным вариантам реализации этих аспектов. Приведенные выше определения также относятся к нижеследующим аспектам и вариантам реализаций.

1. Система для направленной доставки, содержащая активированный макрофаг, нагруженный ферритином, несущим активный ингредиент.

2. Система для направленной доставки согласно варианту реализации № 1, в которой указанный активный ингредиент, который несет ферритин, представляет собой противораковое лекарственное средство.

3. Система для направленной доставки согласно варианту реализации № 2, в которой указанное противораковое лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, индуцирующее апоптоз.

4. Система для направленной доставки согласно варианту реализации № 2, в которой указанное противораковое лекарственное средство выбрано из группы, содержащей циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, бендамустин и баноксантрон.

5. Система для направленной доставки согласно варианту реализации № 1, в которой указанный активный ингредиент представляет собой активируемое гипоксией пролекарство.

6. Система для направленной доставки согласно варианту реализации № 5, в которой указанное активируемое гипоксией пролекарство представляет собой ТН-302.

7. Способ получения системы для направленной доставки, содержащей активированный макрофаг, нагруженный ферритином, несущим активный ингредиент, включающий стадии:

- a) очистки ферритина;
- b) обеспечения ферритина, несущего активный ингредиент, путем связывания ферритина с указанным активным ингредиентом;
- c) активации выделенных макрофагов;
- d) инкубации макрофагов в растворе ферритина, несущего активный ингредиент, полученного на стадии b), в течение времени и при концентрации ферритина, достаточной для обеспечения полной загрузки макрофагов ферритином, несущим активный ингредиент.

8. Способ согласно варианту реализации № 7, в котором активированные макрофаги представляют собой макрофаги костно-мозгового происхождения.

9. Способ согласно варианту реализации № 7, в котором активированные макрофаги представляют собой макрофаги, которые происходят из клеток крови.

10. Способ согласно варианту реализации № 7, в котором активированные макрофаги получают из линий макрофагальных клеток.

11. Способ по любому одному из вариантов реализации № 7-10, в котором активированные макрофаги представляют собой макрофаги, поляризованные до M1 или M2.

12. Способ согласно варианту реализации № 11, в котором активированные макрофаги поляризованы до M2.

13. Способ согласно варианту реализации № 11, в котором активированные макрофаги подвергались манипуляциям (воздействиям) с учетом метаболизма железа.

14. Способ по любому одному из вариантов реализации № 7-13, в котором указанный активный ингредиент, который несет ферритин, представляет собой противораковое лекарственное средство.

15. Способ согласно варианту реализации № 14, в котором указанное противораковое лекарственное средство представляет собой лекарство, индуцирующее апоптоз/аутофагию или некроз.

16. Способ согласно варианту реализации № 14, в котором указанное противораковое лекарственное средство выбрано из группы, содержащей циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, бендамустин и баноксантрон.

17. Способ согласно любому одному из вариантов реализации № 7-13, в котором указанный актив-

ный ингредиент представляет собой активируемое гипоксией пролекарство.

18. Способ согласно варианту реализации № 17, в котором указанное активируемое гипоксией пролекарство представляет собой ТН-302.

19. Система для направленной доставки, определенная в любом из вариантов реализации № 1-7, для применения в качестве системы для направленной доставки противоракового лекарственного средства.

20. Система для направленной доставки, определенная в любом из вариантов реализации № 1-7, для применения в предотвращении/лечении роста солидной опухоли.

21. Применение системы для направленной доставки, определенной в любом из вариантов реализации № 1-7, в лечении воспалительного заболевания.

22. Применение системы для направленной доставки, определенной в любом из вариантов реализации № 1-7, в лечении или для визуализации ишемических областей.

Предпочтительно реализации настоящее изобретение не включает предмет изобретения вышеупомянутых пп.1-22.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная система для направленной доставки для опосредованной CD45⁺ лейкоцитом доставки лекарственного средства, содержащая клетку, представляющую собой CD45⁺ лейкоцит, содержащая в указанной клетке комплекс по меньшей мере одного железосвязывающего белка с лекарственным средством.

2. Выделенная система для направленной доставки по п.1, отличающаяся тем, что указанную клетку, представляющую собой лейкоцит, получают из CD34⁺ гематопозитической клетки-предшественника.

3. Выделенная система для направленной доставки по п.1 или 2, отличающаяся тем, что указанный лейкоцит выбран из группы, состоящей из моноцита, дифференцированного моноцита, лимфоцита и гранулоцита, при этом предпочтительно

(i) указанный моноцит представляет собой CD11b⁺ моноцит, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из CD11b⁺CD14⁺ моноцита, CD11b⁺CD16⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺CD16⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺MHCII⁺ моноцита, CD11b⁺CD14⁺CD115⁺ моноцита, CD11b⁺CD114⁺ моноцита, CD11b⁺CD116⁺ моноцита, CD11b⁺CCR1⁺ моноцита, CD11b⁺CCR2⁺ моноцита, CD11b⁺CX3CR⁺ моноцита, CD11b⁺CXR4⁺ моноцита, CD11b⁺CXR6⁺ моноцита и CD11b⁺CD14⁺CD33⁺ моноцита;

(ii) указанный дифференцированный моноцит выбран из группы, состоящей из макрофага, активированного макрофага, предпочтительно CD11b⁺ макрофага, более предпочтительно CD11b⁺CD16⁺ макрофага, CD11b⁺CD32⁺ макрофага, CD11b⁺CD64⁺ макрофага, CD11b⁺CD68⁺ макрофага, предпочтительно CD11b⁺CD86⁺ M1-макрофага, предпочтительно продуцирующего iNOS и/или секретирующего интерлейкин 12 (IL-12), или предпочтительно CD11b⁺CCR2⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD204⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD206⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD204⁺CD206⁺ M2-макрофага, CD11b⁺ M2-макрофага с низкой или высокой экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости типа II⁺ (MHCII⁺), CD11b⁺CD200R⁺ M2-макрофага, CD11b⁺CD163⁺ M2-макрофага или активированного макрофага, продуцирующего аргиназу и/или секретирующего интерлейкин 10 (IL-10); или дендритной клетки, предпочтительно с экспрессией CD11bCD11c, CD11bCD80, CD11cCD80, CD11cCD86, CD11cMHCII и CD11cCD123, предпочтительно дифференцированный моноцит не является ксантомной клеткой, экспрессирующей Lox1⁺, CXCR7⁺ и NRF2⁺;

(iii) моноцит или активированный моноцит, экспрессирующий по меньшей мере один рецептор хемокина, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из CCR1, CCR2⁺, CXR4⁺ и CXR6⁺, или по меньшей мере один рецептор фактора роста, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (CD115), рецептора гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (CD114) и рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (состоящего из CD116 и CD131); моноциты с такими характеристиками являются особенно подходящими для лечения воспалительных состояний и рака;

(iv) указанный лимфоцит выбран из группы, состоящей из CD3⁺ и CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцита или CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺CD20⁺, CD19⁺CD21⁺, CD20⁺CD21⁺ или CD19⁺CD20⁺CD21⁺ В-лимфоцита; или

(v) указанный гранулоцит выбран из группы, состоящей из нейтрофила, предпочтительно CD66b⁺ нейтрофила, эозинофила и базофила, предпочтительно CD193⁺ эозинофила.

4. Выделенная система для направленной доставки по п.3, отличающаяся тем, что указанный активированный макрофаг дополнительно характеризуется признаком, выбранным из следующих:

(i) активированный макрофаг получен путем инкубации *in vitro* моноцита или макрофага с фактором, который может изменять маркеры экспрессии на макрофагах, предпочтительно

(a) по меньшей мере с одним M1-индуктором,

(b) по меньшей мере с одним M2-индуктором,

(c) или с фактором, который может изменять способность макрофагов секретировать цитокины, предпочтительно IL-10 и IL-12, хемокины и/или продуцировать iNOS, аргиназу или другие иммуномоду-

лирующие ферменты;

(ii) активированный макрофаг характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: CD64, CD86, CD16, CD32, высокой экспрессией молекул МНСII и/или продукцией iNOS и/или IL-12;

(iii) активированный макрофаг получен путем инкубации *in vitro* моноцита или макрофага с фактором, который способен индуцировать способность макрофага к фагоцитозу;

(iv) активированный макрофаг характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: CD204, CD206, CD200R; CCR2, рецептора трансферрина (TfR), рецептора 4 CXС-хемокина (CXCR4), CD163 и/или домена Т-клеточного иммуноглобулина и домена муцина 2 (TIM-2) и/или проявляет низкую экспрессию молекул МНСII;

(v) активированный макрофаг обладает способностью к фагоцитозу и/или

(vi) активированный макрофаг обладает способностью секретировать цитокины, предпочтительно IL-12 или IL-10, или продуцировать индуцибельную синтетазу оксида азота (iNOS) (или другие провоспалительные соединения), аргиназу или другие иммуносупрессивные/противовоспалительные соединения, при этом предпочтительно

(i) указанный M1-индуктор выбран из группы, состоящей из LPS, INF- γ , GM-CSF и вирусной и бактериальной инфекции, или

(ii) указанный M2-индуктор выбран из группы, состоящей из IL-4, IL-10, IL-13, иммунного комплекса антигена и антитела, IgG, термически активируемого γ -глобулина, глюкокортикостероида, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, агониста PPAR γ , фактора ингибирования лейкоцитов, аденозина, гельминтной и грибковой инфекции.

5. Выделенная система для направленной доставки по п.3, отличающаяся тем, что указанный моноцит дополнительно характеризуется признаком, выбранным из следующих:

(i) моноцит получен из CD34⁺ гематопозитической клетки-предшественника;

(ii) моноцит получен путем инкубации *in vitro* моноцитов по меньшей мере с одним индуктором, предпочтительно M1- или M2-индуктором, более предпочтительно по меньшей мере одним M2-индуктором;

(iii) моноцит характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CD14⁺, CD16⁺, CD33⁺ и/или CD115⁺;

(iv) моноцит характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺, CXCR4⁺, CD14⁺ и/или CD16⁺; и/или

(v) моноцит обладает способностью к фагоцитозу, при этом предпочтительно

(i) указанный M1-индуктор выбран из группы, состоящей из LPS, INF- γ , GM-CSF или вирусной или бактериальной инфекции;

(ii) указанный M2-индуктор выбран из группы, состоящей из IL-4, IL-10, IL-13, иммунного комплекса антигена и антитела, IgG, термически активируемых γ -глобулинов, глюкокортикостероидов, TGF- β , IL-1R, CCL-2, IL-6, M-CSF, агониста PPAR γ , фактора ингибирования лейкоцитов, среды, кондиционированной раковыми клетками, раковых клеток, аденозина и гельминтной или грибковой инфекции.

6. Выделенная система для направленной доставки по п.3, отличающаяся тем, что указанный лимфоцит дополнительно характеризуется признаком, выбранным из следующих:

(i) лимфоцит получен из крови, селезенки или костного мозга или получен из CD34⁺ клетки-предшественника;

(ii) лимфоцит является иммунологически компетентным лимфоцитом;

(iii) лимфоцит экспрессирует антигенспецифичные Т-клеточные рецепторы и/или

(iv) лимфоцит характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих антигенов:

(a) CD3⁺ и CD4⁺ или CD8⁺ или

(b) CD19⁺, CD20⁺, CD21⁺, CD19⁺CD20⁺, CD19⁺CD21⁺, CD20⁺CD21⁺ или CD19⁺CD20⁺CD21⁺ антигена и предпочтительно может продуцировать иммуноглобулины;

или отличающаяся тем, что указанный гранулоцит дополнительно характеризуется признаком, выбранным из

(i) гранулоцит получен из крови, селезенки или костного мозга или получен из CD34⁺ клетки-предшественника;

(ii) гранулоцит характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих: CD66b⁺ и/или CD193⁺;

(iii) гранулоцит представляет собой полиморфноядерный лейкоцит, характеризующийся наличием гранул в своей цитоплазме; и/или

(iii) гранулоцит характеризуется экспрессией по меньшей мере одного из следующих: TfR⁺, CD163⁺, TIM-2⁺ и/или CXCR4⁺.

7. Выделенная система для направленной доставки по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что

(i) указанный железосвязывающий белок выбран из группы, состоящей из ферритина, предпочтительно ферритина тяжелого (H) типа, ферритина легкого (L) типа и/или митохондриального ферритина;

гемоглобина, предпочтительно гемоглобина А, гемоглобина AS, гемоглобина SC, гемоглобина С, гемоглобина D, гемоглобина Е, гемоглобина F, гемоглобина H; комплекса гемоглобин-гаптоглобин, гемопексина, трансферрина и лактоферрина;

(ii) указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из белка, нуклеиновой кислоты, химического небелкового соединения, не являющегося нуклеиновой кислотой, с молекулярной массой менее чем 1 кДа, предпочтительно противоракового лекарственного средства, в частности цитостатического лекарственного средства, цитотоксического лекарственного средства и их пролекарств; противоартериосклеротического лекарственного средства; противовоспалительного лекарственного средства; и фотосенсибилизирующего соединения; вируса, в частности онколитического вируса; и радиоизотопа, излучающего α - или β -лучи, который также излучает γ -лучи в количестве, вызывающем повреждение клеток, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из лютеция-177, иттербия-90, йода-131, самария-153, фосфора-32, цезия-131, палладия-103, радия-233, йода-125 и бора-10, или α -лучи в количестве, вызывающем повреждение клеток, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из актиния-225, висмута-213, свинца-212 и полония-212, при этом предпочтительно указанное противораковое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из индуцирующего апоптоз лекарственного средства, алкилирующего вещества, антимаболитов, антибиотиков, эпотилонов, агонистов и антагонистов ядерного рецептора, антиандрогена, антиэстрогена, соединения платины, гормона, антигормона, интерферона, ингибитора зависимых от клеточного цикла протеинкиназ (CDK), ингибитора циклооксигеназы и/или липоксигеназы, биогенной жирной кислоты, производного биогенной жирной кислоты, включая простаноиды и лейкотриены, ингибитора протеинкиназ, ингибитора протеинфосфатаз, ингибитора липидкиназы, координационного комплекса платины, этиленмина, метилмеламин, триазина, винкаалкалоида, пиримидинового аналога, пуринового аналога, алкилсульфоната, аналога фолиевой кислоты, антрацендиона, замещенной мочевины и производного метилгидразина, эндиинового антибиотика, майтанзиноида, производного ауристатиона, ингибитора иммунных контрольных точек, ингибитора опухолеспецифического белка или маркера, предпочтительно ингибитора диссоциации Rho-GDP, более предпочтительно Ggr94, или указанное противораковое лекарственное средство представляет собой ацедиасульффон, акларубицин, амбазон, аминоклотеимид, L-аспарагиназу, азатиоприн, баноксантрон, бендамустин, блеомицин, бусульфан, фолиат кальция, карбоплатин, карпецитабин, кармустин, целекоксиб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, дапсон, даунорубицин, дибромпропамидин, диэтилстильбестрол, доцетаксел, доксорубицин, ендины, эпирубицин, эпотилон В, эпотилон D, эстрамуцинфосфат, эстроген, этинилэстрадиол, эпопозид, флавопиридол, флоксурин, флударабин, фторурацил, флюоксиместерон, флутамид фосфоэстрола, фуразолидон, гемцитабин, аналог гонадотропин-высвобождающего гормона, гексаметилмеламин, гидроксикарбамид, гидроксиметилнитрофурантоин, гидроксипрогестеронкапроат, гидроксимочевину, идарубицин, идоксуридин, ифосфамид, интерферон α , иринотекан, лейпролид, ломустин, лортотекан, мафенид сульфатоламид, мехлорэтамин, медроксипрогестерон ацетат, мегастроллацетат, мелфалан, мепакрин, меркаптопурин, метотрексат, метронидазол, митомицин С, митоподозид, митоган, митоксантрон, митрамицин, налидиксовую кислоту, нифурател, нифуроксазид, нифуралазин, нифуртимокс, нимустин, ниноразол, нитрофурантоин, азотистые иприты, олеомуцин, оксолиновую кислоту, пентамидин, пентостатин, феназопирин, фталилсульфатазол, пипоброман, преднимустин, преднизон, преуссин, прокарбазин, пириметамин, ралтитрексед, рапамицин, рофекоксиб, розиглитазон, салазосульфациридин, скрифлавиниум хлорид, семустин, стрептозоцин, сульфакварбамид, сульфациетамид, сульфаклопиридазин, сульфадиазин, сульфадиметоксин, сульфадиметоксин, сульфазидол, сульфазуразол, сульфазуанидин, сульфазуанол, сульфаметизол, сульфаметоксазол, котримоксазол, сульфаметоксидиазин, сульфаметоксипиридазин, сульфамоксол, сульфаниламид, сульфапериин, сульфазеназол, сульфатиазол, сульфисомидин, стауроспорин, тамоксифен, таксол, тенипозид, тертипозид, тестолактон, тестостеронпропионат, тиогуанин, тиотепу, тинидазол, топотекан, триазиквон, треосульфат, триметоприм, трифосфамид, UCN-01, винбластин, винкристин, виндезин, винбластин, винорелбин и зорубицин, предпочтительно выбранное из группы, состоящей из ауристатиона, баноксантрона, бендамустина, хлорамбуцила, халицеамицина, динемидина А, майтансина, мелфалана, мертансина, неоказиностатина; белок, ингибирующий пролиферацию, предпочтительно ингибитор клеточного цикла или антитело или антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с белком, способствующим пролиферации, или нуклеиновую кислоту, предпочтительно кодирующую белок, ингибирующий пролиферацию, или антитело или антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с белком, способствующим пролиферации, или миРНК, или ДНК-фермент.

8. Выделенная система для направленной доставки по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой активируемое гипоксией пролекарство, предпочтительно выбранное из группы, состоящей N-оксидов бензотриазина, апазиквона (EO9), тирапазамина (TPN), SN30000, PR-104A, TH-302, TH-4000, AQ4N.

9. Выделенная система для направленной доставки по любому из пп.1-8, дополнительно характеризующаяся признаком, выбранным из следующих:

(i) связь(и) между указанным железосвязывающим белком(ами) и указанным лекарственным средством, содержащимися в указанном комплексе, является ковалентной и/или нековалентной; и/или

(ii) указанное лекарственное средство, содержащееся в указанном комплексе, захвачено/инкапсулировано указанным железосвязывающим белком или его мультимерами.

10. Способ получения выделенной системы для направленной доставки по любому из пп.1-9, включающий стадии:

- a) обеспечение очищенного железосвязывающего белка;
- b) ковалентное или нековалентное связывание лекарственного средства с железосвязывающим белком и/или инкапсуляция лекарственного средства в железосвязывающем белке;
- c) обеспечение клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, и
- d) инкубация указанной клетки, представляющей собой CD45⁺ лейкоцит, в присутствии железосвязывающего белка, полученного на стадии b), до тех пор, пока указанная клетка, представляющая собой CD45⁺ лейкоцит, не будет, по меньшей мере частично, нагружена указанным железосвязывающим белком, полученным на стадии b).

11. Применение выделенной системы для направленной доставки по любому из пп.1-9 в качестве лекарственного средства.

12. Фармацевтическая композиция для доставки лекарственного средства в ткани, которые привлекают CD45⁺ лейкоциты, содержащая выделенную систему для направленной доставки по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель и/или подходящее вспомогательное вещество(а).

13. Применение выделенной системы для направленной доставки по любому из пп.1-9 для предотвращения или лечения опухолей, воспалительного заболевания или областей ишемии в раневых дефектах кожного покрова или после инфаркта органов (сердца) или ишемии сетчатки.

14. Применение выделенной системы для направленной доставки по п.13, отличающееся тем, что указанная опухоль представляет собой солидную опухоль, предпочтительно рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак легких, рак толстой кишки или опухоль, имеющую гипоксические области.

A) N-цепи ферритина млекопитающих (SEQ ID NO: 1 - 7)

```

Ma_min -----SEAAKRFQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLXD IKKFDXDDWESGLNAMECALIKLEY
Ma_Fer_H MTTASXSQVQNYXQSEAAKRFQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLXD IKKFDXDDWESGLNAMECALIKLEY
Ma_min_Fer_H -----AEAAINRQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLQD IKKFDXDDWESGLNAMECALIHLKS
Ma_Fer_H MTTASPSQVQNYHQDAEAAINRQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLQD IKKFDXDDWESGLNAMECALIHLKS
H_min_Fer_H -----SEAA NRQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLQD IKKFDXDDWESGLNAMECALIHLKN
H_Fer_H MTTASPSQVQNYHQDSEAA NRQINLELMSAYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEERBEHAEKLMKLNQRRGRITLQD IKKFDXDDWESGLNAMECALIHLKN
:..* *****
Ma_min_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETXYLXEQVKXIKEL----- (SEQ ID NO: 1)
Ma_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETXYLXEQVKXIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGSDDXXX (SEQ ID NO: 2)
Ma_min_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETXYLSEQVRSIKEL----- (SEQ ID NO: 3)
Ma_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETXYLSEQVRSIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGHGDES (SEQ ID NO: 4)
H_min_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKAIKEL----- (SEQ ID NO: 5)
H_Fer_H VNQSLELHLKLATDKNDPHLCDFIETHYLNQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGSDDNES (SEQ ID NO: 6)
:..* *****
MTTASXSQVR QNYXQSEAA NRQINLELX ASYVYLSMSY YFDRDDVALK NFAKYFLHQ SHHEERBEHAKL MKLNQRRGR IXLDDIKKPD CDDWESGLNA MECALIKLEKNVN QSLELHLKLA TDKNDPHLCD
FIETHYLNQ VXXIKELGDH VTNLRKMGAP ESGLAEYLF DKHTLGSDD XX (SEQ ID NO: 7)

```

B) L-цепи ферритина млекопитающих (SEQ ID NO: 8 - 14)

```

Ma_min_L -----NYSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGGXFFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
Ma_Fer_L MTSQIRQNSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGGXFFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
Ma_min_Fer_L -----NYSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGFDFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
Ma_Fer_L MTSQIRQNSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGFDFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
H_min_Fer_L -----NYSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGFDFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
H_Fer_L MTSQIRQNSYTXVEAAVNKLVNHLRASVYTLISLGFDFDRDDVALEGVXHFRELAEBEKREGERLLXQNRGGRALFDQXXKPKXDEWGTXXAMXAXAXEKXINQA
*****
Ma_min_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAG----- (SEQ ID NO: 8)
Ma_Fer_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAGQPXQXVQXSLGEYLFPERLTLKHD (SEQ ID NO: 9)
Ma_min_Fer_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAG----- (SEQ ID NO: 10)
Ma_Fer_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAGQPXQXVQXSLGEYLFPERLTLKHD (SEQ ID NO: 11)
H_min_Fer_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAG----- (SEQ ID NO: 12)
H_Fer_L LLDLHALGSARADPHXCDPFLXHXLDXEVKLIKMKXHLNLRXAGQPXQXVQXSLGEYLFPERLTLKHD (SEQ ID NO: 13)
*****
MTSQIRQNSY TXVEAAVNRL VNLHLRASVY TLYSLGGXFFDR DDVALEGVGH FPRELAEBEKR EGAERLLXQ NRGGRALFQ DVQKPAQDEW GKTAEAMEAA LALEKLNLAQAL LDHLHALGSAR TDPHXCDPFLX
NHFLDXEVKLIK MKXHLNLRXAGQPX QXVQXSLG EYLFPERLTLK HD (SEQ ID NO: 14)

```

C) Альфа цепи человеческого гемоглобина (SEQ ID NO: 15 - 18)

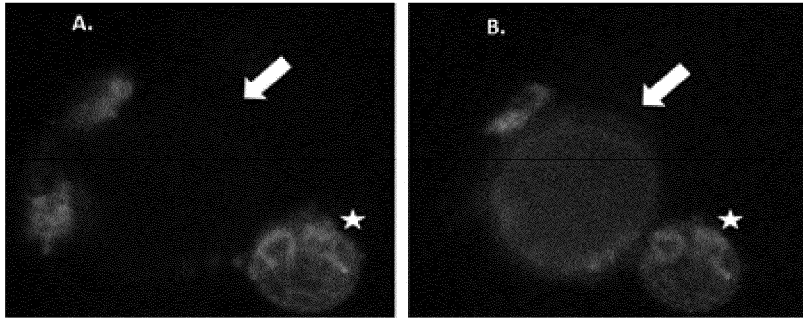
Ma_min -----VGHXGEYGAEALEKXFLSFXXTKYFPHFDLSHGSAVXKHGKVKVAXLTVAVHVDKXPNALSALXDLHAHKLVDPVNFKLLSHCLXVTL
Ma_aHem XXLSPADKINVKAXWYVGHXGEYGAEALEKXFLSFXXTKYFPHFDLSHGSAVXKHGKVKVAXLTVAVHVDKXPNALSALXDLHAHKLVDPVNFKLLSHCLXVTL
H_min_aHem -----VGHXGEYGAEALEKXFLSFXXTKYFPHFDLSHGSAVXKHGKVKVAXLTVAVHVDKXPNALSALXDLHAHKLVDPVNFKLLSHCLXVTL
H_aHem MVLSPADKINVKAWGKVGAGHAGEYGAEALEKXFLSFXXTKYFPHFDLSHGSAVXKHGKVKVAXLTVAVHVDKXPNALSALXDLHAHKLVDPVNFKLLSHCLXVTL

D) Бета цепи человеческого гемоглобина (SEQ ID NO: 19 - 22)

Ma_min bHem -----GKVVVDEVXXEXXXXLVLVYYPWTRQRFESFGDLXSDXDAVMGNPKVKAHKKKKVLGAFSDGLAHLDNKXKXVFATLSELHCDKLVDPXNFRLLGNV
Ma_bHem MVHLTPREKXXVTAXWGVVDEVXXEXXXXLVLVYYPWTRQRFESFGDLXSDXDAVMGNPKVKAHKKKKVLGAFSDGLAHLDNKXKXVFATLSELHCDKLVDPXNFRLLGNV
H_min_bHem -----GKVVVDEVGGEALGRLLVYYPWTRQRFLESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLAFAVSDGLAHLDNKXKXVFATLSELHCDKLVDPXNFRLLGNV
H_bHem MVHLTPREKSAVTALWGVVDEVGGEALGRLLVYYPWTRQRFLESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLAFAVSDGLAHLDNKXKXVFATLSELHCDKLVDPXNFRLLGNV

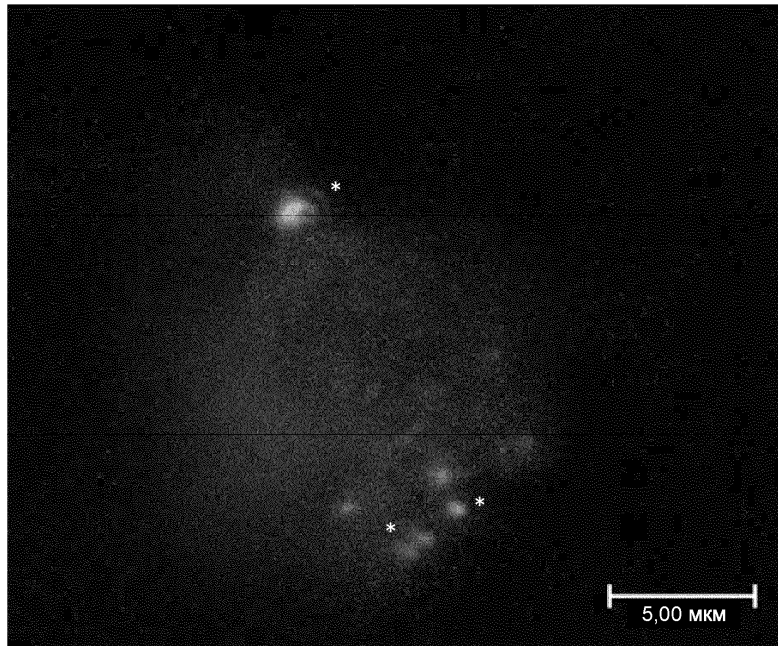
E) Трансферрины млекопитающих (SEQ ID NO: 23 - 28)

Ma_Transferrin_N MKLAVGALXXCAVLKLC LAVPDRXXRWCAVXXHEATKQSPFDHMKXVIPSDGPSVACVCKKASXXDCIRAXAXNEAXVT-----
Ma_Transferrin_C MKLAVGALXXCAVLKLC LAVPDRXXRWCAVXXHEATKQSPFDHMKXVIPSDGPSVACVCKKASXXDCIRAXAXNEAXVTLDAXLVXXAYLAPXNLKXVVAEFGXSSXXDPQTFYXXVAVV
Ma_Transferrin_H MKLAVGALLVCAVLGCL LAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSPFDHMKXVIPSDGPSVACVCKKASYLDCIRATAANEADAVT-----
H_Transferrin_N MRLAVGALLVCAVLGCL LAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSPFDHMKXVIPSDGPSVACVCKKASYLDCIRATAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNMLKPVVAEFGXSKEDQTFYVAVAVV
H_Transferrin_C MRLAVGALLVCAVLGCL LAVPDKTVRWCAVSEHEATKQSPFDHMKXVIPSDGPSVACVCKKASYLDCIRATAANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNMLKPVVAEFGXSKEDQTFYVAVAVV

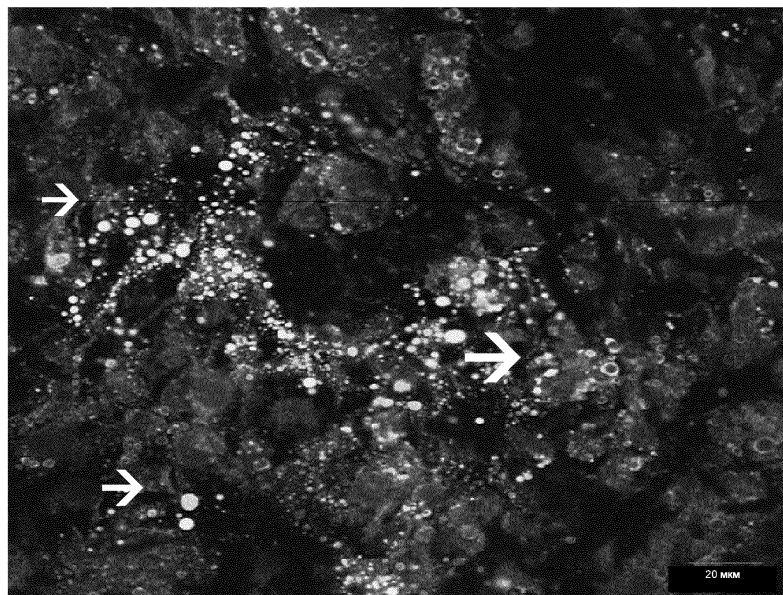


Фиг. 2

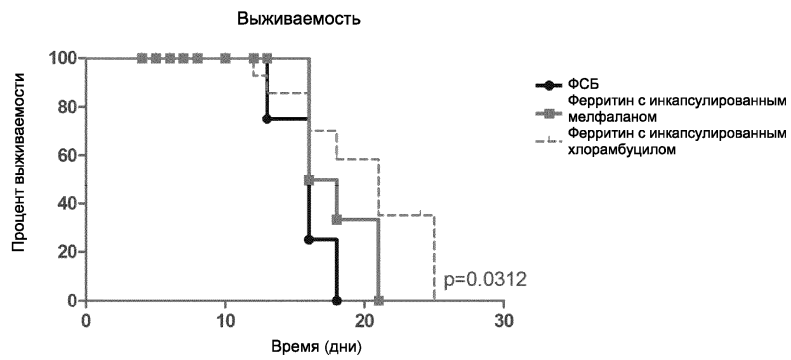
Фиг. 1



Фиг. 3

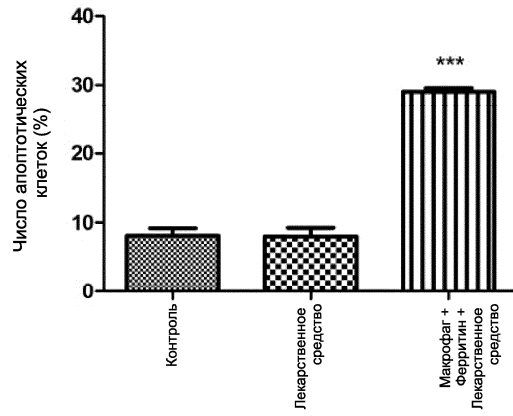


Фиг. 4

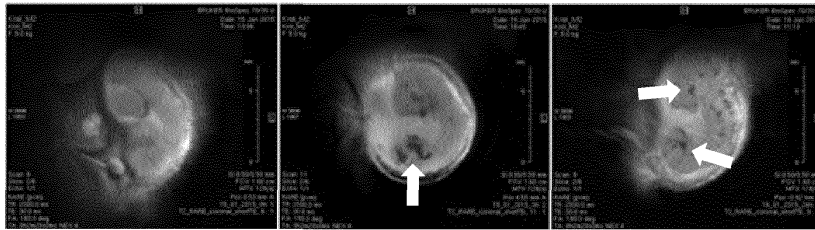


Фиг. 5

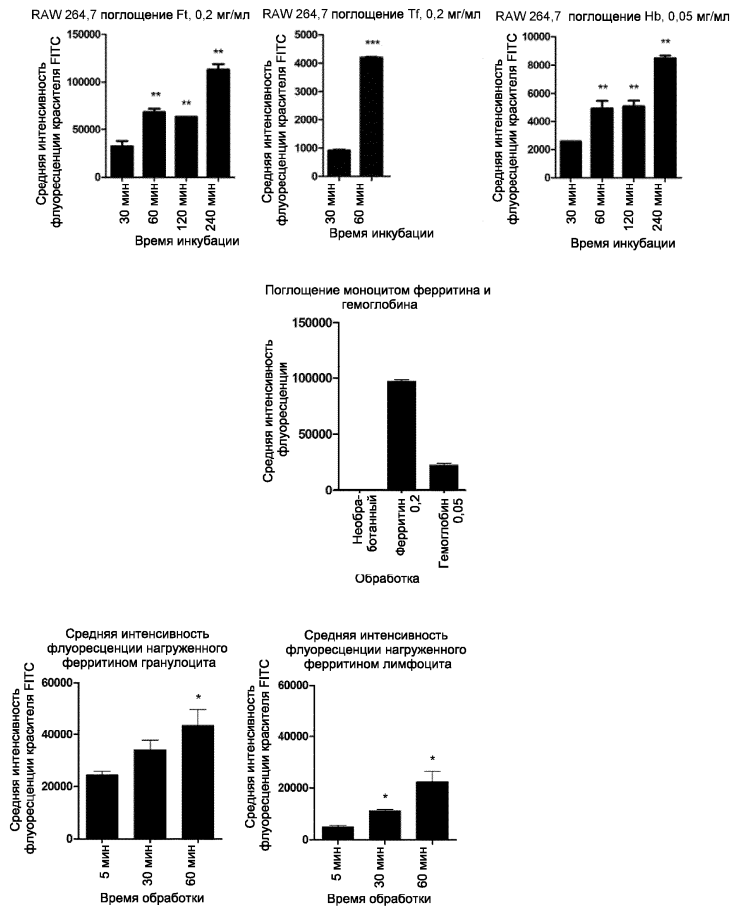
Апоптоз раковых клеток (вследствие обработки циклофосфамидом)



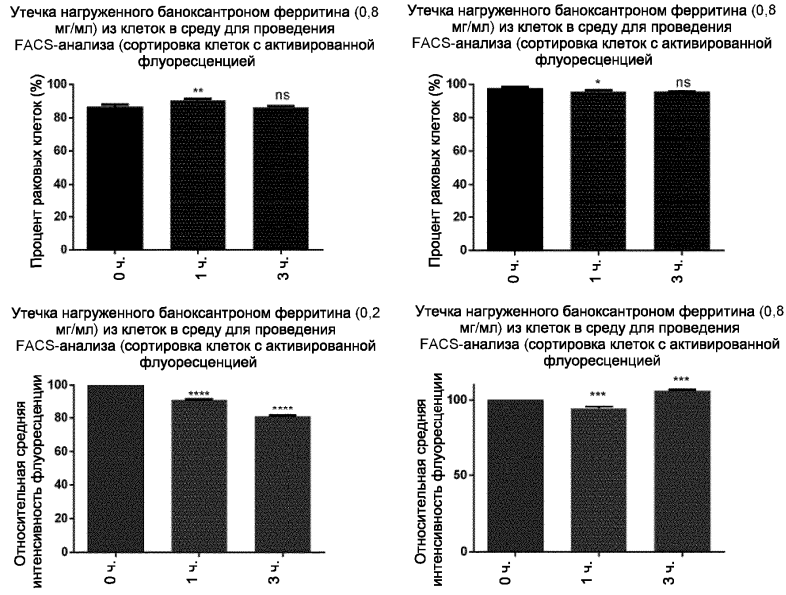
Условия
Фиг. 6



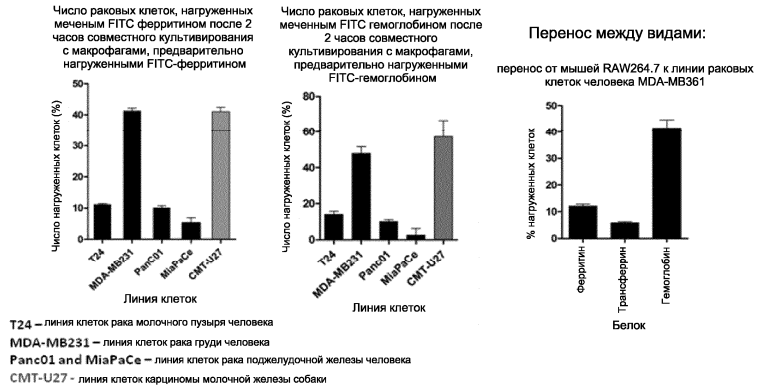
Фиг. 7



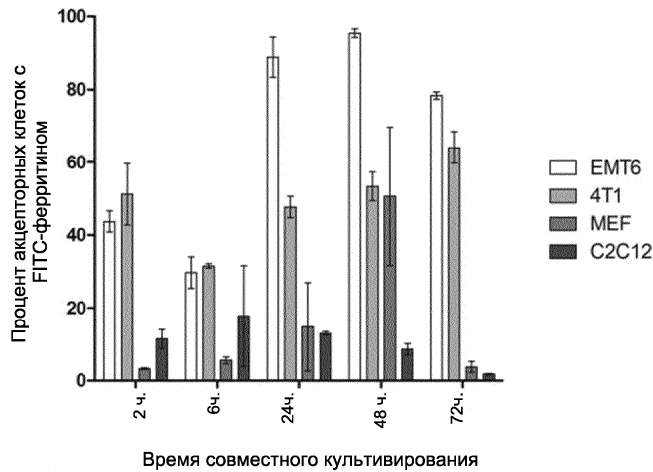
Фиг. 8



Фиг. 9



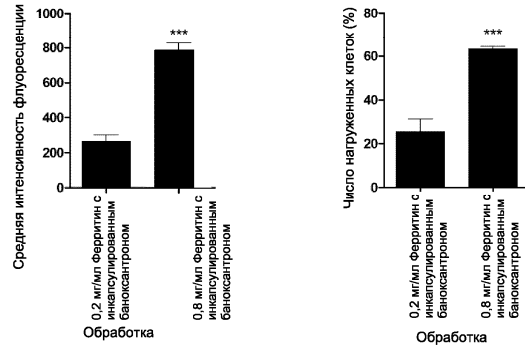
Фиг. 10



Фиг. 11

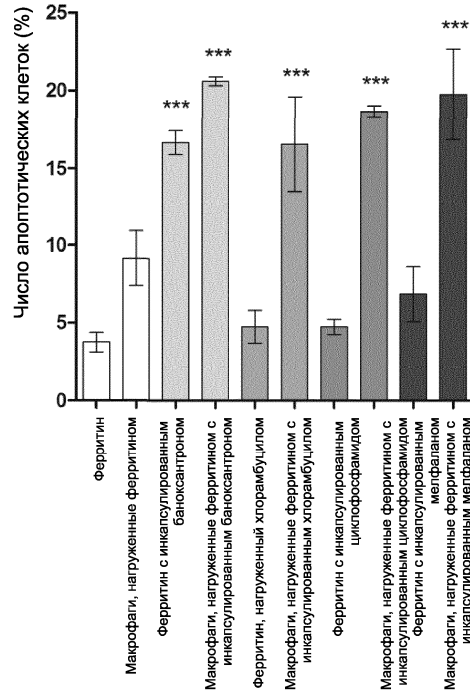
Клетки EMT6, нагруженные ферритином с инкапсулированным баноксантроном (0,2 мг/мл ферритина – 0,65 мг баноксантрона) после 2 часов совместного культивирования с клетками RAW264.7, предварительно нагруженными ферритином с инкапсулированным баноксантроном

Клетки EMT6, нагруженные ферритином с инкапсулированным баноксантроном (0,2 мг/мл ферритина – 0,65 мг баноксантрона) после 2 часов совместного культивирования с клетками RAW264.7, предварительно нагруженными ферритином с инкапсулированным баноксантроном



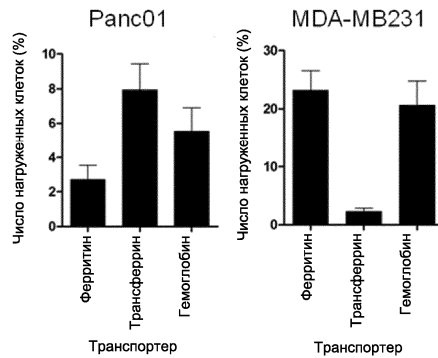
Фиг. 12

4T1



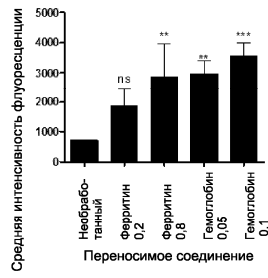
Фиг. 13

% клеток, получающих меченый FITC железосвязывающий белок из моноцитов человека вследствие совместного культивирования

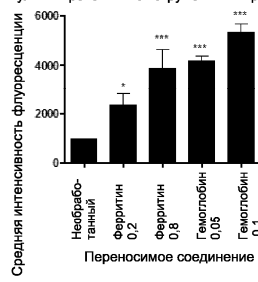


Фиг. 14

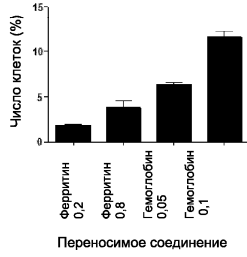
Средняя интенсивность флуоресценции клеток СМТ-U27, культивируемых с нагруженными гранулоцитами



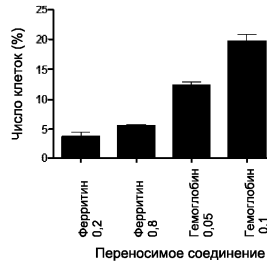
Средняя интенсивность флуоресценции клеток СМТ-U309, культивируемых с нагруженными гранулоцитами



Число клеток СМТ-U27, культивируемых с нагруженными гранулоцитами

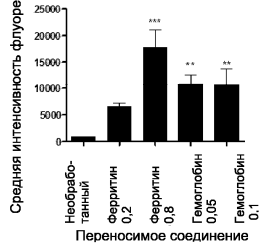


Число клеток СМТ-U309, культивируемых с нагруженными гранулоцитами

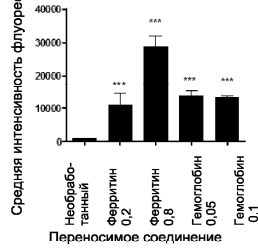


Фиг. 15

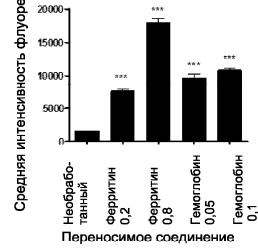
Средняя интенсивность флуоресценции клеток EMT6, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



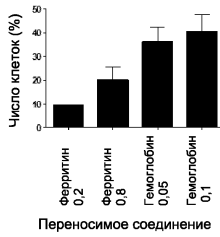
Средняя интенсивность флуоресценции клеток 4Т1, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



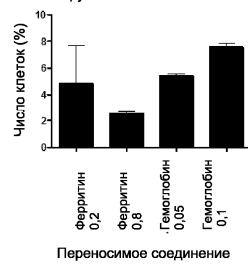
Средняя интенсивность флуоресценции клеток СТ26, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



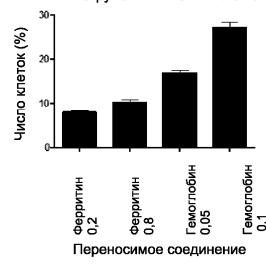
Число клеток EMT6, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



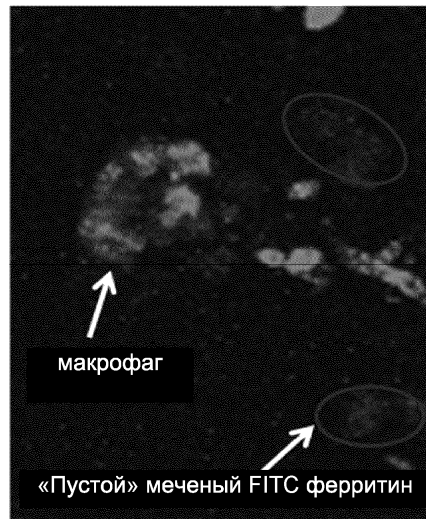
Число клеток 4Т1, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



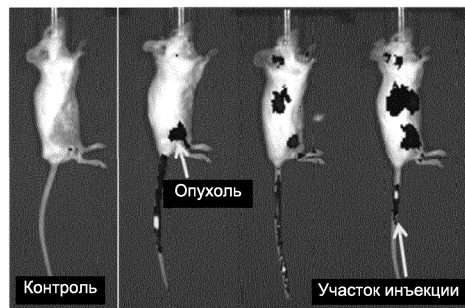
Число клеток СТ26, культивируемых с нагруженными CD4+ клетками



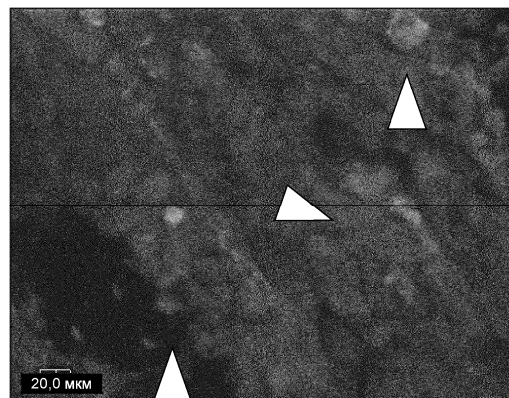
Фиг. 16



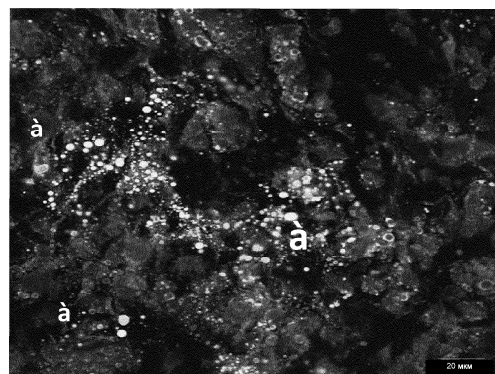
Фиг. 17



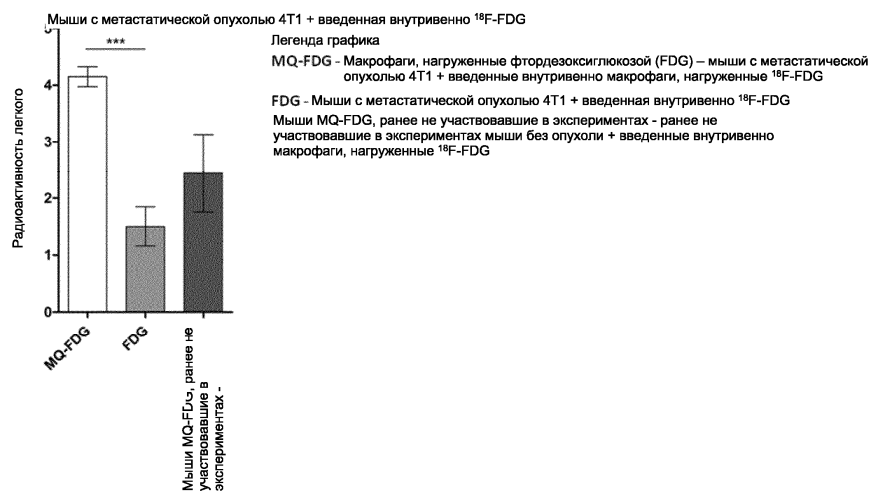
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

