



УКРАЇНА

(19) UA (11) 97143 (13) C2

(51) МПК (2011.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 48/00

A61P 37/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ НОСІЯ ДЛЯ СВОЄЧАСНОЇ ДОСТАВКИ мІРНК

1

2

(21) а200910735

(22) 26.03.2008

(24) 10.01.2012

(86) РСТ/JP2008/055730, 26.03.2008

(31) 2007-079944

(32) 26.03.2007

(33) JP

(46) 10.01.2012, Бюл.№ 1, 2012 р.

(72) ТАКЕУТІ ХІРОФУМІ, JP, ХІРА ЯСУЮКІ, JP,
НАКАНО КОДЗІ, JP, ТОЙОБУКУ ХІДЕКАЗУ, JP(73) ТАКЕУТІ ХІРОФУМІ, JP, ОЦУКА ФАРМАСЬО-
ТІКАЛ КО., ЛТД., JP

(56) JP 11-292795 A, 26.10.1999

JP 10-313872 A, 02.12.1998

WO 2006/002538 A, 12.01.2006

(57) 1. Композиція носія для доставки мІРНК, що містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з холестерину і його похідних, і (С) аліфатичний первинний амін.

2. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1, у якій компонент (А) являє собою діацилфосфатидилхолін, у якому ацильна група містить від 4 до 23 атомів вуглецю.

3. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1 або 2, у якій компонент (В) являє собою холестерин.

4. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1, у якій компонент (С) являє собою алкіламін, що містить від 10 до 20 атомів вуглецю.

5. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1, у якій компонент (А) являє собою щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з

диміристоїлфосфатидилхоліну, дипальмітоїлфосфатидилхоліну і дистеароїлфосфатидилхоліну, компонент (В) являє собою холестерин, а компонент (С) являє собою стеариламін.

6. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1, у якій молярне співвідношення компонент (А):компонент (В):компонент (С) становить 5-9:1-5:1.

7. Композиція носія для доставки мІРНК за п. 1, що являє собою ліпосомальний препарат, у якому ліпосомальна мембрана утворена компонентами від (А) до (С).

8. Композиція для доставки мІРНК, що містить нуклеїнову кислоту і композицію носія для доставки мІРНК за п. 1.

9. Композиція для доставки мІРНК за п. 8, яка являє собою ліпосомальний препарат.

10. Спосіб введення мІРНК, що включає стадію введення мІРНК в клітини шляхом приведення композиції для доставки мІРНК за п. 8 у контакт із клітинами.

11. Спосіб введення мІРНК за п. 10, у якому клітини являють собою клітини, які культивуються, клітини, виділені з живих організмів, або клітини, що існують у живих організмах.

12. Застосування композиції, що містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з холестерину і його похідних, і (С) аліфатичний первинний амін, для одержання носія для доставки мІРНК.

Даний винахід стосується композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти, яка здатна ефективно доставити нуклеїнову кислоту в клітини при

введенні нуклеїнової кислоти в клітини, узяті у тварини, або організми, і яка, крім цього, має низь-

(19) UA (11) 97143 (13) C2

ку токсичність і високу безпеку; і до композиції для доставки нуклеїнової кислоти.

У результаті недавніх розробок в галузі біотехнології були знайдені різні типи нуклеїнових кислот, які здійснюють фізіологічно активну діяльність усередині клітин. Наприклад, відомо, що мала інтерферуюча РНК (міРНК (siRNA)) викликає розкладання мРНК гена-мішені, що існує усередині клітин, і придушує експресію даного гена-мішені (РНК-інтерференція). Інгібуюча дія відносно експресії гена-мішені внаслідок РНК-інтерференції застосовна для полегшення або лікування симптомів захворювання, викликаного нерегулярною експресією конкретних генів або груп генів, і очікується розробка терапевтичних агентів із застосуванням міРНК. Для застосування нуклеїнових кислот, включаючи міРНК як терапевтичні агенти, важливо, щоб міРНК діяла в клітині-мішені, і, отже, необхідно розробити ефективні методики доставки нуклеїнових кислот у клітини-мішені.

Як про методику доставки молекул екзогенних нуклеїнових кислот або генів у клітини відомо про використання носія (вектора). Вектори включають вірусні вектори і невірусні вектори. Вірусні вектори мають високу ефективність перенесення генів, однак, існують різні невідомі аспекти безпеки, що включають патогенність, імуногенність і цитотоксичність. У зв'язку з цим очікують розробки більш безпечних невірусних векторів.

Наприклад, як невірусний носій для доставки нуклеїнової кислоти, що сприяє доставці нуклеїнової кислоти, такої як міРНК, у клітини, у патентному документі 1 був описаний катіонний ліпід з визначеною структурою. Однак, у катіонного ліпиду, описаного в патентному документі 1, є недолік, який полягає в тому, що він виявляє токсичність при введенні в клітини, які культивуються, або живі організми. Крім цього, у патентному документі 2 як композиція носія, що має порівняно низьку токсичність і здатна доставити міРНК у клітини, описана композиція, яка містить амфіфільну сполуку і полікатион. Однак у композиції, описаній в патентному документі 2, також є проблема відносно безпеки, оскільки її цитотоксичність перестає бути знехтувано малою при введенні в клітини значної кількості міРНК.

У світлі попереднього рівня техніки було бажано розробити композицію носія для нуклеїнової кислоти, що має низьку токсичність і здатна ефективно доставляти в клітини нуклеїнову кислоту, таку як міРНК.

[Патентний документ 1] Японська не розглянута патентна публікація № 2002-529439.

[Патентний документ 2] Японська не розглянута патентна публікація № 2005-508394.

Таким чином, задачею даного винаходу є вирішення вищевказаних проблем попереднього рівня техніки. Більш точно, задача даного винаходу полягає в наданні композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти, яка здатна ефективно доставити нуклеїнову кислоту в клітини при введенні нуклеїнової кислоти, такої як міРНК, у клітини, взяті у тварин, або тваринам, і яка, крім того, має низьку токсичність і високу безпеку; і композиції для доставки нуклеїнової кислоти, що містить компо-

зицію носія і нуклеїнову кислоту. Крім того, ще однією задачею даного винаходу є надання способу введення в клітини нуклеїнової кислоти, що дозволяє ефективно доставляти в клітини нуклеїнову кислоту з високою безпекою.

Автори даного винаходу провели інтенсивні дослідження для досягнення зазначеної вище задачі і знайшли, що композиція, яка містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) холестерин і/або його похідне і (С) аліфатичний первинний амін, має низьку токсичність і високу безпеку, здатна ефективно доставляти нуклеїнову кислоту в клітини і, отже, застосовна як носій для доставки нуклеїнової кислоти. Крім того, ними знайдено, що можна додати чудових властивостей безпеки і здатності для введення нуклеїнової кислоти за рахунок використання композиції, що містить компоненти від (А) до (С), після одержання на їхній основі ліпосомальної форми. Даний винахід був довершений шляхом здійснення додаткового поліпшення на основі даних відкриттів.

Конкретніше, у даному винаході надані наступні варіанти здійснення.

Абзац 1. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти, що містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з холестерину і його похідних, і (С) аліфатичний первинний амін.

Абзац 2. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, у якій компонент (А) являє собою діацилфосфатидилхолін, у якому ацильна група містить від 4 до 23 атомів вуглецю.

Абзац 3. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1 або 2, у якій компонент (В) являє собою холестерин.

Абзац 4. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, у якій компонент (С) являє собою алкіламін, що містить від 10 до 20 атомів вуглецю.

Абзац 5. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, у якій компонент (А) являє собою щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з диміристоїлфосфатидилхоліну, дипальмітоїлфосфатидилхоліну і дистеароїлфосфатидилхоліну, компонент (В) являє собою холестерин, а компонент (С) являє собою стеариламін.

Абзац 6. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, у якій молярне співвідношення компонентів (А):компонент (В):компонент (С) становить 5-9:1-5:1.

Абзац 7. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, що являє собою носій для доставки міРНК.

Абзац 8. Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1, що являє собою ліпосомальний препарат, у якому ліпосомальна мембрана утворена компонентами від (А) до (С).

Абзац 9. Композиція для доставки нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту і композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 1.

Абзац 10. Композиція для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 9, у якій нуклеїнова кислота являє собою міРНК.

Абзац 11. Композиція для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 9, що являє собою ліпосомальний препарат.

Абзац 12. Спосіб введення нуклеїнової кислоти, що включає стадію введення нуклеїнової кислоти в клітини шляхом приведення композиції для доставки нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 9 у контакт із клітинами.

Абзац 13. Спосіб введення нуклеїнової кислоти відповідно до абзацу 12, у якому клітини являють собою клітини, які культивуються, клітини, виділені з живих організмів, або клітини, що існують у живих організмах.

Абзац 14. Застосування композиції, що містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) щонайменше один компонент, вибраний із групи, яка складається з холестерину і його похідних, і (С) аліфатичний первинний амін, для одержання носія для доставки нуклеїнової кислоти.

Абзац 15. Застосування відповідно до абзацу 14, у якому носій використовують для доставки міРНК.

Перевага композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти і композиції для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу полягає в тому, що вони можуть ефективно доставляти в клітини нуклеїнову кислоту, забезпечуючи, таким чином, корисну функцію даної нуклеїнової кислоти в клітинах, і, крім того, мають низьку токсичність і високу безпеку. Отже, композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти і композиція для доставки нуклеїнової кислоти застосовні для лікування різних захворювань за рахунок введення нуклеїнової кислоти, зокрема, лікування тяжко виліковних захворювань, що важко піддаються лікуванню за допомогою низькомолекулярної сполуки.

Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти і композиція для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу особливо переважні для введення в клітини міРНК, оскільки може ефективно придушуватися індукція експресії інтерферону, яка є побічною дією міРНК.

Більш того, перевага композиції для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу полягає також у тому, що дана композиція може зберігатися в ліофілізованому стані, оскільки її можна піддавати обробці ліофільним сушінням.

На фіг. 1 приведені результати тестового прикладу 1, тобто результати оцінки впливу композиції для доставки нуклеїнової кислоти на безпеку для клітин.

На фіг. 2 приведені результати оцінки введення міРНК у клітини за допомогою кожної з композицій для доставки нуклеїнової кислоти в тестовому прикладі 2. По лінії ординат на фіг. 2 вказана середня інтенсивність флуоресценції на одну клітину.

На фіг. 3 приведені результати оцінки введення міРНК у клітини, коли концентрація складових ліпідів (DSPC, холестерину і стеариламіну) носія для доставки нуклеїнової кислоти змінюється в

композиції для доставки нуклеїнової кислоти в тестовому прикладі 2.

На фіг. 4 приведені результати інгібування індукції інтерферону при дії міРНК-вмісної композиції для доставки нуклеїнової кислоти в тестовому прикладі 3.

Носій для доставки нуклеїнової кислоти

Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти винаходу містить (А) діацилфосфатидилхолін, (В) холестерин і/або його похідне, і (С) аліфатичний первинний амін.

Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти винаходу використовується як носій нуклеїнової кислоти для доставки (введення) у клітини нуклеїнової кислоти.

Тип і структура нуклеїнової кислоти, для якої використовується композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу не обмежується доти, поки потрібно її введення в клітини. Конкретні приклади подібних нуклеїнових кислот включають міРНК, мРНК, тРНК, рРНК, қДНК, міРНК (мікроРНК), рибозим, "антисмисловий" олігодеоксинуклеотид, олігонуклеотидну пастку, плазмідну РНК, пептидонуклеїнову кислоту, триплекс-твірний олігонуклеотид (ТФО), аптамер і гени. Зокрема, композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу має корисну особливість придушувати індукцію експресії інтерферону, яка є побічною дією міРНК і, таким чином, вона застосовна для доставки в клітини міРНК. Нуклеїнові кислоти, для яких використовують композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу, можуть бути виділені з людей, тварин, рослин, бактерій і вірусів і, крім того, її можна одержати хімічним синтезом. Крім цього, дані нуклеїнові кислоти можуть бути одно-, дво-або тринитковими і їхня молекулярна маса особливо не обмежена. Крім того, нуклеїнові кислоти можуть бути модифіковані хімічними сполуками або ферментами білками. У даному винаході дані нуклеїнові кислоти можуть бути використані окремо або можна використовувати сполучення двох або більше їхніх видів.

Діацилфосфатидилхолін (який надалі називається іноді "компонент А"), використовуваний у композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти за винаходом, особливо не обмежений доти, поки він є фармакологічно прийнятним, і його приклади включають діацилфосфатидилхолін, ацильна група в якому містить від 4 до 23 атомів вуглецю. Кількість атомів вуглецю в двох ацильних групах, що є частиною діацилфосфатидилхоліну, може бути однаковою або різною.

Конкретні приклади діацилфосфатидилхоліну, використовуваного в даному винаході, включають ділауроїлфосфатидилхолін, диміристоїлфосфатидилхолін, дипальмітоїлфосфатидилхолін, дистеароїлфосфатидилхолін, діолеоїлфосфатидилхолін, дилінолеоїлфосфатидилхолін, міристоїлпальмітоїлфосфатидилхолін, міристоїлстеароїлфосфатидилхолін, пальмітоїлстеароїлфосфатидилхолін, дибутилоїлфосфатидилхолін, дигексаноїлфосфатидилхолін, дигептаноїлфосфатидилхолін, дидеканоїлфосфатидилхолін, дифтаноїлфосфатидилхолін, дидодецилфосфатидилхолін,

діейкозеноїлфосфатидилхолін, дигенікозаноїлфосфатидилхолін, діерукоїлфосфатидилхолін, діарахідоноїлфосфатидилхолін і біс(трикозадіноїл)фосфатидилхолін. З числа даних діацилфосфатидилхолінів переважним є діацилфосфатидилхолін, ацильні групи в якому містять від 12 до 18 атомів вуглецю; більш переважний діацилфосфатидилхолін, ацильні групи в якому містять від 13 до 17 атомів вуглецю, такий як диміристоїлфосфатидилхолін, дипальмітоїлфосфатидилхолін, дистеароїлфосфатидилхолін, міристоїлпальмітоїлфосфатидилхолін, міристоїлстеароїлфосфатидилхолін і пальмітоїлстеароїлфосфатидилхолін; особливо переважні диміристоїлфосфатидилхолін, дипальмітоїлфосфатидилхолін і дистеароїлфосфатидилхолін, а найбільш переважний дистеароїлфосфатидилхолін. Дані діацилфосфатидилхоліни можна використовувати окремо або можна використовувати сполучення двох або більше їхніх видів.

Холестерин і/або його похідне (яке надалі називається іноді "компонент (В)»), використовуваний у композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу, особливо не обмежений доти, поки він є фармакологічно прийнятним. Похідне холестерину являє собою катіонний ліпід з холестериновим каркасом і його конкретні приклади включають 3β -[N-(N',N'-диметиламіноетан)карбамоїл]холестерин (DC-Chol), йодид 3β -[N',N',N'-триметиламіноетан]холестерин (TC-Chol), біс(гуанідіум)тренхолестерозу (BGTC), N-холестерилоксикарбоніл-3,7-діазанонан-1,9-діамін, N^4 -спермінхолестерилкарбамат (GL-67), N-[N⁴-3-амінопропілспермідин]холестерилкарбамат (GL-78), N^4 -спермінхолестерилкарбоксамід (GL-90), N¹,N⁸-біс(аргінінкарбоксамід)-N⁴-спермідинхолестерилкарбамат і N-[N¹,N⁴,N⁸-трис(3-амінопропіл)спермідин]холестерилкарбамат (GL-96). У даному винаході компонент (В) переважно являє собою холестерин. У даному винаході як компонент (В) можна використовувати холестерин і його похідні окремо або можна використовувати сполучення двох або більше їхніх видів.

Аліфатичний первинний амін (який надалі називається іноді "компонент (С)»), використовуваний у композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу, особливо не обмежений доти, поки він є фармакологічно прийнятним, і його приклади включають алкіламін, алкільна група в якому містить від 10 до 20 атомів вуглецю.

Конкретні приклади аліфатичного первинного аміну, використовуваного в даному винаході, включають лауриламін, міристиламін, пальмітоїламін, стеариламін, олеїламін, деканоїламін і фтаноїламін. З числа даних аліфатичних первинних амінів переважним є алкіламін, алкільна група в якому містить від 12 до 18 атомів вуглецю; більш переважними є стеариламін, олеїламін і пальмітоїламін, а особливо переважний стеариламін. Дані діаліфатичні первинні аміни можна використовувати окремо або можна використовувати сполучення двох або більше їхніх видів.

Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу може містити сполучення компонентів від (А) до (С). У світлі подальшого підвищення ефективності доставки нуклеїнової кислоти в клітини і низької токсичності за рахунок використання наступних сполучень переважним є сполучення (А) діацилфосфатидилхоліну, ацильна група в якому містить від 4 до 23 атомів вуглецю, (В) холестерину і/або його похідного і (С) алкіламіну, що містить від 10 до 20 атомів вуглецю, а більш переважним є сполучення (А) диміристоїлфосфатидилхоліну, дипальмітоїлфосфатидилхоліну і/або дистеароїлфосфатидилхоліну, (В) холестерину і (С) стеариламіну.

У композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу співвідношення компонентів від (А) до (С) особливо не обмежене. Наприклад, молярне співвідношення компонентів (А):компонент (В):компонент (С) становить 5-9:1-5:1, переважно, 6-9:1-4:1, а більш переважно, 7-8:2-3:1. Ефективність доставки нуклеїнової кислоти в клітини і низьку токсичність можна додатково підвищити за рахунок відповідності даному молярному співвідношенню.

Загальна кількість компонентів від (А) до (С) з розрахунку на загальну кількість композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу становить, наприклад, від 1 до 100 % мас, переважно, від 20 до 90 % мас, а більш переважно - від 30 до 70 % мас.

Крім компонентів від (А) до (С), композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу може, також містити інші катіонні ліпіди. Конкретні приклади катіонного ліпіду включають катіонні ліпіди, зв'язані зі стероїдом, таким як скваламін, 3а,7а,12а-трис(3-амінопропокси)-5 β -холан-24-N,N-біс(3-амінопропіл)амін, 3а,7а,12а-трис(3-амінопропокси)-5 β -холан-24-(N-(N-(3-амінопропіл)-3-амінопропіл)амін), 3а,7а,12а-трис(3-азидопропокси)-5 β -холан-24-N,N-біс(2-ціаноетил)амін і 3а,7а,12а-трис(3-азидопропокси)-5 β -холан-24-(N-(бензилоксикарбоніл)-N-(3-гідроксипропіл)амін)); катіонні ліпіди, зв'язані з холевою кислотою, такі як зонтичні спермінові кон'югати; катіонні ліпіди, зв'язані зі стеролглікозидом; катіонні ліпіди, зв'язані зі стероїдсапоїном, і катіонні ліпіди типу четвертинної амонієвої солі, такі як диметилдіоктадециламонійбромід (DDAB), 1,2-диміристоїл-3-триметиламонійпропан, 1,2-діолеїл-3-триметиламонійпропан (DOTAP), 1,2-діолеїл-3-триметиламонійпропанметилсульфат, 1,2-дистеароїл-3-триметиламонійпропан, гідрохлорид N-(1-(2,3-біс(олеїлокси)пропіл)-N,N,N-триметиламонію (DOTMA), диміристоїлпропілдиметилгідроксіетиламонійбромід (DMRIE), діолеїлоксипропілдиметилгідроксіетиламонійбромід (DORIE), диметилдидодециламонійбромід, гідрохлорид N-(а-триметиламонійацетил)дидодецил-D-глутаміну, гідрохлорид N-(а-триметиламонійацетил)-O,O'-біс (1H,1H,2H,2H-перфтордецил)-L-глутаміну, гідрохлорид O,O'-дидодеканоїл-N-(а-триметиламонійацетил)діетаноламіну, метилаліл-дидодециламонійбромід, гідрохлорид N-(p-w-

триметиламонійбутилоксибензоїл}дидодецил-L-глутаміну, 9-(w-триметиламонійбутил)-3,6-біс(додеканоїл)карбазолбромід, гідрохлорид диметилдіоктадециламонію, N-w-триметиламонійдеканоїлдигексадецил-D-глутамінбромід, N-{p-(w-триметиламонійгексилокси)бензоїл}дитетрадецил-L-глутамінбромід, p-(w-триметиламонійдецилокси)-p'-октилоксіазобензолбромід (MC-1-0810), p-(w-(b-гідроксіетил)диметиламонійдецилокси)-p'-октилоксіазобензолбромід (MC-3-0810), O,O',O''-тридодеканоїл-N-(w-триметиламонійдеканоїл)трис(гідроксиметил)амінометанбромід (TC-1-12), 1,2-дилаурилгліцеро-3-етилфосфохолін, 1,2-диміристоїлгліцеро-3-етилфосфохолін, 1,2-дипальмітоїлгліцеро-3-етилфосфохолін, 1,2-дистеароїлгліцеро-3-етилфосфохолін, 1,2-діолеоїлгліцеро-3-етилфосфохолін і 1-пальмітоїл-2-олеоїлгліцеро-3-етилфосфохолін.

У даному винаході, у випадку вмісту катіонних ліпідів, що відрізняються від компонентів від (A) до (C), частка даного катіонного ліпиду особливо не обмежена доти, поки це не робить несприятливого впливу на ефекти винаходу. Частка катіонного ліпиду становить від 1 до 10 масових частин, переважно, від 2 до 8 масових частин, а більш переважно, від 4 до 6 масових частин на 100 масових частин загальної кількості компонентів від (A) до (C).

Крім того, композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу в разі потреби може включати жирну основу. Включення жирної основи і застосування її характеристик дає можливість регулювати ефективність нуклеїнової кислоти, яку потрібно ввести за допомогою композиції носія для доставки. Наприклад, корекція питомої маси композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти за рахунок включення жирної основи регулює контакт між нуклеїновою кислотою і композицією носія для доставки нуклеїнової кислоти і дає можливість поліпшити ефективність уведення *in vitro*. Крім того, наприклад, уводячи як жирну основу сполуку з функцією чутливості до температури, можна викликати флуктуацію на поверхні клітини за рахунок руйнування ядра композиції носія нуклеїнової кислоти в даних температурних умовах, внаслідок чого можна поліпшити ефективність уведення нуклеїнової кислоти. Крім того, наприклад, уводячи як жирну основу сполуку з властивістю зовнішньої стимуляції розпаду, можна викликати флуктуацію на поверхні клітини за рахунок руйнування ядра композиції носія нуклеїнової кислоти, викликаного зовнішньою стимуляцією, внаслідок чого можна поліпшити ефективність уведення нуклеїнової кислоти.

Приклади жирної основи, що вводиться в композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу, включають перфторвуглець, перфторпентан, перфтороктилбромід, перфторгексан, перфтортрибутиламін, соєву олію, рафіновану соєву олію, гідровану соєву олію, неомилену соєву олію, сквален, рицинову олію, гвоздикову олію, сорбітантріолеат, терпентинову олію, саф-

порову олію, жирну кислоту із сафлорової олії, олеїнову кислоту, кокосове масло, ріпакову олію, сивушну олію, маслинову олію, лляну олію, кунжутну олію, хлорофілову олію, кртонову олію, бергамотну олію, кедрову олію, апельсинову олію, фенхелеву олію, евкалиптову олію, кукурудзяну олію, лавандову олію, солодку олію майорану, лимонну олію, бавовняну олію, масло яєчного жовтка, масло рози, хвойне масло, мигдальну олію, арахісове масло, олію камелії, біле камфорне масло, олію звичайної ромашки, коричну олію, олію перцевої м'яти, етерифіковану кукурудзяну олію, хлібне масло, олію римської ромашки, зміїну олію, олію кучерявої м'яти, соняшникову олію, масло какао, олію зародків пшениці, цинкооксидну пасту, гідровану олію, гідровану рослинну олію, легке вазелінове масло, вазелінове масло, тригліцерид середньоланцюжкових жирних кислот, норкове масло, олію апельсинових кірок, поліоксіетиленову рицинову олію, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 10, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 100, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 20, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 40, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 5, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 50, поліоксіетиленову гідровану рицинову олію 60, поліоксил 35 рицинової олії і технологічне масло. З числа даних жирних основ перфторпентан має температурну чутливість і, крім того, має властивість переходити в леткий стан при 29,5 °C. Крім цього, перфторгексан, перфтороктилбромід і перфтортрибутиламін мають властивість зовнішнього стимулювання руйнування і мають властивість викликати кавітацію на ядрі композиції носія при зовнішній стимуляції, такий як стимуляція, викликана опроміненням ультразвуком, приводячи, таким чином, до руйнування ядра.

У тому випадку, коли композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти містить жирну основу, частка даної жирної основи особливо не обмежена доти, поки не виявляється несприятливого впливу на ефекти винаходу. Частка жирної основи становить від 0,1 до 50 масових частин, переважно, від 1 до 30 масових частин, а більш переважно, від 5 до 20 масових частин на 100 масових частин загальної кількості компонентів від (A) до (C).

Крім того, у разі потреби композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу може включати мембранно-фузогенний ліпід (ліпід-хелпер). З'являється можливість додатково підвищити ефективність доставки нуклеїнової кислоти в клітини за рахунок вмісту подібних мембранно-фузогенних ліпідів. Приклади мембранно-фузогенного ліпиду включають діолеоїлфосфатидилетаноламін, діолеоїлфосфатидилхолін, трансфосфатидилфосфатидилетаноламін, 1,2-біс(10,12-трикозадіноїл)фосфоетаноламін, 1,2-діелаїдоїлфосфоетаноламін, 1,2-дигексадецилфосфоетаноламін, 1,2-дигексаноїлфосфоетаноламін, 1,2-ділауроїлфосфоетаноламін, 1,2-ділінолеоїлфосфоетаноламін, 1,2-диміристоїлфосфоетаноламін, 1,2-діолеоїлфосфоетаноламін, 1,2-

дипальмітоолеїлфосфоетаноламін, 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін, 1,2-
 дифітаноїлфосфоетаноламін, 1,2-
 дистеароїлфосфоетаноламін, 1-пальмітоїл-2-
 олеїлфосфоетаноламін, 1-пальмітоїл-2-(10,12-
 трикозадіноїл)фосфоетаноламін, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-капроїламін, 1,2-
 дипальмітоїл фосфоетаноламін-N-капроїламін,
 1,2-діолеїлфосфоетаноламін-N,N-диметил, 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N,N-диметил, 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-додеканоїл, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-додеканоїл, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-додеканіламін, 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-додеканіламін,
 1,2-діолеїлфосфоетаноламін-N-глутарил, 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-глутарил, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-лактозу, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-[4-(п-
 малеїмідметил)циклогексан-е-карбоксілат], дипа-
 льмітоїлфосфоетаноламін-N-[4-(п-
 малеїмідметил)циклогексан-е-карбоксілат], 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-[4-(п-
 малеїмідфеніл)бутирамід], 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-[4-(п-
 малеїмідфеніл)бутират], 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-метил, дипальмітоїл-
 фосфоетаноламін-N-метил, 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-[3
 -(-2-піридилітіо)пропіонат], 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-[3-(2-
 піридилітіо)пропіонат], 1,2-
 діолеїлфосфоетаноламін-N-(сукциніл) і 1,2-
 дипальмітоїлфосфоетаноламін-N-(сукциніл). 3
 числа даних мембранно-фузогенних ліпідів в ком-
 позиції носія для доставки нуклеїнової кислоти
 винаходу переважно використовують діолеїлфо-
 сфатидилетаноламін.

У випадку, коли в композиції носія для достав-
 ки нуклеїнової кислоти міститься мембранно-
 фузогенний ліпід, частка даного мембранно-
 фузогенного ліпиду особливо не обмежена доти,
 поки на ефекти винаходу не виявляється несприя-
 тливого впливу. Частка мембранно-фузогенного
 ліпиду становить від 1 до 500 масових частин, пе-
 реважно, від 10 до 250 масових частин, а більш
 переважно, від 25 до 100 масових частин з розра-
 хунку на загальну кількість компонентів від (А) до
 (С).

Композиція носія для доставки нуклеїнової ки-
 слоти даного винаходу може включати різні доба-
 вки, такі як ізотонуючі агенти, ексципієнти, розрі-
 джувачі, загусники, стабілізатори, буферні агенти і
 консерванти; і водні розчинники, такі як очищена
 вода, водний розчин сахариду, буферний розчин,
 фізіологічний сольовий розчин, водний розчин
 полімеру, вода, що не містить РНКаз, у відповід-
 ності зі своєю формою. Кількості добавок і водних
 розчинників можна установити придатним чином
 відповідно до форми носія для доставки нуклеїно-
 вої кислоти.

Форма композиції носія для доставки нуклеї-
 нової кислоти даного винаходу особливо не обме-
 жена доти, поки вона здатна включати цільову
 нуклеїнову кислоту, яку необхідно доставити в

клітини, і дана композиція переважно знаходиться
 у формі ліпосоми.

Коли композиція носія для доставки нуклеїно-
 вої кислоти даного винаходу має ліпосомальну
 форму, компоненти від (А) до (С) і інші ліпіди, до-
 дані на вибір, утворюють ліпосомальну мембрану.
 При утворенні ліпосоми вона може являти собою
 невеликі одношарові пухирці (SUV), великі одно-
 шарові пухирці (LUV) або багатшарові пухирці
 (MLV). Крім того, діаметр частинок можна придат-
 ним чином установити відповідно до типу клітин,
 які потрібно доставити, наприклад, діаметр части-
 нок становить від 20 до 100 нм для SUV, від 200
 до 1000 нм для LUV і від 400 до 3500 нм для MLV.
 Діаметр частинок визначають методом динамічно-
 го світлорозсіювання.

Одержання ліпосоми і регулювання діаметра її
 частинок здійснюють відповідно до методів, що
 відомі фахівцю в даній галузі. Більш конкретно,
 ліпосому можна одержати при використанні мас-
 ляної фази, що містить компоненти від (А) до (С), і
 водняної фази (водний розчинник) методом тонкої
 плівки, методом випарювання з оберненою фа-
 зою, методом уведення простого ефіру, методом
 поверхнево-активної речовини і методом нагрі-
 вання. Крім того, діаметр частинок можна регулю-
 вати методом екструзії, Френч-прес методом і ме-
 тодом гомогенізації. Композицію носія для
 доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу
 одержують, змішуючи компоненти (А) і (В) і, у разі
 потреби, інші компоненти, і відповідним чином
 одержуючи з даної суміші препарат відповідно до
 бажаної форми.

Композиція для доставки нуклеїнової кислоти

Композиція для доставки нуклеїнової кислоти
 даного винаходу включає композицію носія для
 доставки нуклеїнової кислоти і нуклеїнову кислоту.
 Таким чином, композицію носія для доставки нук-
 леїнової кислоти використовують для введення
 нуклеїнової кислоти, що міститься в даній компо-
 зиції, у клітини, які стають мішенню доставки.

У випадку, коли композиція носія для доставки
 нуклеїнової кислоти являє собою ліпосомальну
 форму, у композиції для доставки нуклеїнової ки-
 слоти нуклеїнова кислота може існувати в стані
 включення у водну фазу ліпосоми, або в стані
 зв'язування з зовнішньою або внутрішньою сторо-
 ною ліпосомальної мембрани за допомогою іонно-
 го або гідрофобного зв'язку. Крім цього, якщо ком-
 позиція носія для доставки нуклеїнової кислоти
 являє собою неліпосомальну форму, у композиції
 для доставки нуклеїнової кислоти необхідно лише
 одержати комплекс нуклеїнової кислоти з іншими
 компонентами композиції носія для доставки нук-
 леїнової кислоти за допомогою іонного або гідро-
 фобного зв'язку.

Композицію для доставки нуклеїнової кислоти
 винаходу одержують, змішуючи композицію носія
 для доставки нуклеїнової кислоти і нуклеїнову ки-
 слоту і додаючи даній суміші бажаної форми, або
 одержують, змішуючи нуклеїнову кислоту і компо-
 ненти композиції носія для доставки нуклеїнової
 кислоти в будь-якому порядку.

В композиції для доставки нуклеїнової кислоти
 даного винаходу співвідношення концентрацій

компонентів суміші нуклеїнової кислоти і композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти змінюється в залежності від природи нуклеїнової кислоти, використовуваної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти і природи клітин у мішені для доставки. Пропорція нуклеїнової кислоти становить від $1,0 \times 10^{-5}$ до $1,0$ масової частини, переважно, від $1,0 \times 10^{-4}$ до $1,0 \times 10^{-1}$ масової частини, а більш переважно, від $1,0 \times 10^{-3}$ до $1,0 \times 10^{-2}$ масової частини на 100 масових частин від загальної кількості компонентів від (А) до (С), що містяться в композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти.

Крім того, загальна кількість компонентів від (А) до (С), що містяться в композиції для доставки нуклеїнової кислоти, становить від 10 до 90 % мас, переважно, від 30 до 80 % мас, а більш переважно, від 40 до 60 % мас. з розрахунку на загальну кількість композиції.

Композиція носія для доставки нуклеїнової кислоти винаходу може включати різні добавки, такі як ізотонуючі агенти, ексципієнти, розріджувачі, загусники, стабілізатори, буферний агент і консерванти, і водні розчинники, такі як очищена вода, водний розчин сахариду, буфер, фізіологічний сольовий розчин, у відповідності зі своєю формою. Кількість добавок і водних розчинників можна належним чином установити відповідно до форми носія для доставки нуклеїнової кислоти.

У даному винаході приклади клітин, у які доставляють нуклеїнову кислоту, включають клітини, які культивуються, клітини, отримані з живих організмів (включаючи стійкі клітинні лінії), і клітини, що існують у живих організмах, таких як людський.

Форма композиції для доставки нуклеїнової кислоти особливо не обмежена доти, поки використовують належну кількість композиції для доставки нуклеїнової кислоти для того, щоб привести її в контакт із клітинами-мішенями, у які вводять дану нуклеїнову кислоту. Коли нуклеїнову кислоту доставляють у клітини, що існують у живому організмі, такому як людський, приклади застосування включають безпосереднє уливання в тканини; внутрішньовенні, підшкірні, внутрішньом'язові, внутрішньоочеревинні, внутрішньоочні, дигестивні органічні і ендодонтичні ін'єкції; введення шляхом інгаляції в носову порожнину, ротову порожнину і легені; пероральне введення; черезшкірне введення через шкіру; і мукозальне введення через мембрану слизової оболонки порожнини рота, мембрану слизової оболонки піхви, мембрану слизової оболонки ока, мембрану слизової оболонки прямої кишки і мембрану слизової оболонки матки. Альтернативним чином, у випадку, коли нуклеїнову кислоту доставляють у клітини, виділені з живих організмів і клітин, які культивуються, використовують метод вирощування клітин у присутності відповідної кількості композиції для доставки нуклеїнової кислоти, доданої до інкубування. Крім цього, коли нуклеїнову кислоту доставляють у клітини, виділені з живих організмів або клітин, які культивуються, нуклеїнову кислоту можна також доставити в клітини навіть у присутності сироватки.

Кількість композиції для доставки нуклеїнової кислоти винаходу, застосовуваної до клітин-мішеней, визначають відповідно до типу використовуваної нуклеїнової кислоти, типом композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти і природою клітин-мішеней. Наприклад, якщо мішенню для доставки є клітини в людському організмі, до пацієнта, від якого очікують одержання терапевтичної користі за рахунок уведення даної нуклеїнової кислоти, застосовують терапевтично ефективну кількість композиції для доставки нуклеїнової кислоти винаходу.

Приклади

Тепер винахід буде описаний докладно на основі прикладів і тому подібного, але даний винахід цим не обмежується. У наступних прикладах дисцеарілфосфатидилхолін має скорочення "DSPC", дипальмітоїлфосфатидилхолін має скорочення "DPPC", а диміристоїлфосфатидилхолін має скорочення "DMPC". У наступних тестових прикладах 1 і 2 як міПНК використовували GL3-міПНК (міПНК до люциферази світлячка; Dharmascon Co., Boulder, CO, США; чутлива молекула: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTd, нечутлива молекула: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTd). У тестовому прикладі 3 як міПНК використовували MMP-9-міПНК людини (Samchully Pharm. Co., Ltd, Korea; чутлива молекула: 5'-CCAACUAUGACCAGGAUAAdTdT-3', нечутлива молекула: 5'-UUAUCCUGGUCAUAGUUGGdTdT-3').

Приклад 1

Одержання DSPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

DSPC, холестерин і стеариламін зважували в молярному співвідношенні 7:3:1, а потім розчиняли в хлороформі з застосуванням уловлюючої колби. Розчин сушили при зниженому тиску за допомогою роторного випарника, одержуючи ліпідну тонку мембрану. Після додавання до розчину DEPC-обробленої води (виробленої Ambion Co.: вода, що не містить РНКаз) таким чином, щоб концентрація DSPC складала в ній 30 мг/мл, установлювали діаметр частинок отриманого розчину пропусканням через мембрану з діаметром пор 100 нм за допомогою екструдера, одержуючи композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти в катіонній ліпосомальній формі.

Приклад 2

Одержання DPPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

За аналогією з прикладом 1, за винятком того, що замість DSPC використовували DPPC, одержували композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти в катіонній ліпосомальній формі.

Приклад 3

Одержання DMPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

За аналогією з прикладом 1, за винятком того, що замість DSPC використовували DMPC, одержували композицію носія для доставки нуклеїнової кислоти в катіонній ліпосомальній формі.

Приклад 4

Одержання DSPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

Одержували розчин, що містить міРНК у концентрації 2 мкМ (розчин міРНК) із застосуванням розчину, отриманого 20-кратним розведенням 20×Tris-ЕДТО (ТІ) буфера (який виробляється Invitrogen Co.) DEPC-обробленою водою (яка виробляється Ambion Co., вода, що не містить РНКаз). Потім змішували однакову кількість композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти з прикладу 1 і розчину міРНК, одержуючи ліпоплекс (комплекс), одержуючи, таким чином, композицію для доставки нуклеїнової кислоти.

Приклад 5

Одержання DPPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

Одержували розчин, що містить міРНК у концентрації 2 мкМ (розчин міРНК) із застосуванням розчину, отриманого 20-кратним розведенням 20×Tris-ЕДТО (ТІ) буфера (який виробляється Invitrogen Co.) DEPC-обробленою водою (яка виробляється Ambion Co., вода, що не містить РНКаз). Потім змішували однакову кількість композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти з прикладу 2 і розчину міРНК, одержуючи ліпоплекс (комплекс), одержуючи, таким чином, композицію для доставки нуклеїнової кислоти.

Приклад 6

Одержання DMPC-вмісної композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти

Одержували розчин, що містить міРНК у концентрації 2 мкМ (розчин міРНК) із застосуванням розчину, отриманого 20-кратним розведенням 20×Tris-ЕДТО (ТІ) буфера (який виробляється Invitrogen Co.) DEPC-обробленою водою (яка виробляється Ambion Co., вода, що не містить РНКаз). Потім змішували однакову кількість композиції носія для доставки нуклеїнової кислоти з прикладу 3 і розчину міРНК, одержуючи ліпоплекс (комплекс), одержуючи, таким чином, композицію для доставки нуклеїнової кислоти.

Тестовий приклад 1 Тест на оцінку безпеки для клітин

Оцінку проводили з застосуванням MTS-тесту. Для MTS-тесту застосовували CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, який вироблений Promega Co. Більш точно, клітини A594 (ATCC, США) інокулювали в кількості $3,16 \times 10^4$ клітин/ямку в 200 мкл модифікованого середовища Дульбекко (DMEM), що містить 10 % об. плідної телячої сироватки (FBS), у 96-ямковому планшеті і інкубували при 37 °C протягом 24 годин. Після 3-кратного промивання буферним сольовим розчином Хенка (HBSS) дане середовище заміняли на DMEM без FBS, після чого в кожну ямку додавали 20 мкл кожної з композицій для доставки нуклеїнової кислоти з прикладів 4-6 і інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 4 годин. Потім надосадову рідину культури в ямках заміняли на DMEM з 10 % об. FBS і знову інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 20 годин. У кожну ямку додавали 20 мкл MTS реагенту (метантіосульфونات) і 100 мкл середовища DMEM з 10 % об. FBS, інкубували протягом 2 годин з наступним визначенням поглинання при 492 нм і подальшим підрахунком життєздатності клітин. Життєздатність клітин розраховували, приймаючи поглинання при

492 нм, визначене без додавання композиції для доставки нуклеїнової кислоти, що інкубували в приведених вище умовах, за 100 %.

Результати приведені на фіг. 1. Як показано на фіг. 1, мабуть, що всі композиції для доставки нуклеїнової кислоти з прикладів 4-6 мають низьку цитотоксичність і високу безпеку. Зокрема, було підтверджено, що у випадку композицій для доставки нуклеїнової кислоти з застосуванням DSPC, або DPPC як діацилфосфатидилхоліну (прикладі 4 або 5) безпека була досить високою.

Тестовий приклад 2 Тест на оцінку ефективності доставки міРНК у клітини

Оцінку внутрішньоклітинного введення міРНК проводили, вимірюючи інтенсивність флуоресценції FITC-міченої міРНК із застосуванням проточної цитометрії. У даному тесті використовували композицію для доставки нуклеїнової кислоти, отриману з попередньо міченої FITC міРНК. Більш точно, клітини A594 (ATCC, США) інокулювали в кількості 5×10^5 клітин/ямку в 500 мкл DMEM, що містить 10 % об. FBS у 24-ямковому планшеті і інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 24 годин. Після триразового промивання HBSS середовище заміняли на DMEM, яке не містить FBS, а потім 0,05 мл кожної з композицій для доставки нуклеїнової кислоти з прикладів 4-6 додавали в кожну ямку і інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 4 годин. Потім надосадову рідину культури в ямках заміняли на DMEM з 10 % об. FBS і знову інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 20 годин. Кожну ямку однократно промивали HBSS і додавали 0,2 мл CellScrubBuffer (Gene Therapy Systems, Inc.) з наступним інкубуванням при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 15 хвилин. Ямки знову 2 рази промивали HBSS, а клітини, що прилипили до дна ямок, відділяли з застосуванням трипсину і збирали центрифугуванням, а потім отримані клітини суспендували в HBSS. Дану суспензію фільтрували через мембрану з діаметром пор 41 мкм. Інтенсивність флуоресценції клітин вимірювали методом проточної цитометрії через 2 години і 24 годин після додавання композицій для доставки нуклеїнової кислоти. Як контроль вимірювали інтенсивність флуоресценції контрольної композиції для доставки нуклеїнової кислоти, отриманої змішуванням розчину Lipofectamine 2000™ (Invitrogen), часто використовуюваного як комерційно доступний вектор гена, розведеного середовищем OptiMEM до 0,1 мг/мл і розчину міРНК, розведеного TE буфером до концентрації 2 мкМ, в об'ємному співвідношенні 1:1, за аналогією з описаним вище способом.

Результати представлені на фіг. 2. На підставі цих результатів було доведено, що міРНК вводиться в клітини у випадку будь-якої з композицій для доставки нуклеїнової кислоти з прикладів 4-6. Зокрема, у випадку композицій для доставки нуклеїнової кислоти з застосуванням DSPC або DMPC як діацилфосфатидилхоліну (прикладі 4 і 6) стає очевидно, що введення міРНК через 2 години після додавання було істотно великим у порівнянні з Lipofectamine 2000™ (Invitrogen), часто використовуваним як комерційно доступний вектор

гена, і що дані композиції мають сприятливі характеристики відносно чудової швидкодії.

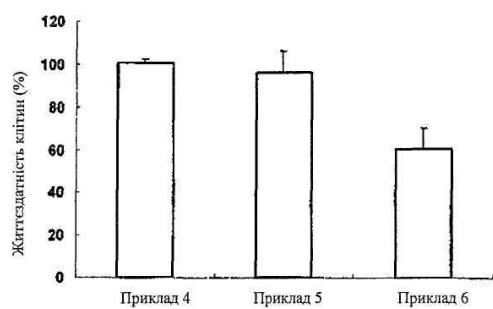
Крім того, аналогічно прикладу 1 був отриманий носій для доставки нуклеїнової кислоти з концентрацією DSPC від 7,5 до 30 мг/мл із застосуванням DSPC, холестерину і стеарил аміну (при молярному співвідношенні DSPC:холестерин:стеариламін=7:3:1, які далі узагальнено названі "складовий ліпід носія для доставки нуклеїнової кислоти"). Ліпоплекс (комплекс) одержували, змішуючи рівний об'єм даного носія для доставки нуклеїнової кислоти і ТЕ буфера, що містить 200 нм міРНК, і одержували композицію для доставки нуклеїнової кислоти. З застосуванням отриманої в такий спосіб композиції для доставки нуклеїнової кислоти проводили оцінку введення міРНК у клітини за аналогією з описаним вище. Результати представлені на фіг. 3. З цих результатів видно, що коли концентрація складового ліпиду носія для доставки нуклеїнової кислоти змінювалася, відповідно змінювалася кількість нуклеїнової кислоти, що вводиться в клітини за допомогою композиції для доставки нуклеїнової кислоти. Крім того, було знайдено, що складовий ліпід носія для доставки нуклеїнової кислоти виявляє низьке значення кількості введеної міРНК через 24 години після додавання в порівнянні з 2 годинами після додавання при будь-якій концентрації, і що зникнення міРНК починалося через 24 години після додавання. Отже, дані результати показують також, що можна доставляти міРНК у клітини протягом короткого 2-годинного проміжку часу після додавання при використанні DSPC, холестерину і стеариламіну як носія для доставки нуклеїнової кислоти, і що дані композиції мають сприятливі характеристики відносно чудової швидкодії.

Тестовий приклад 3 Тест на оцінку інгібування індукції інтерферону

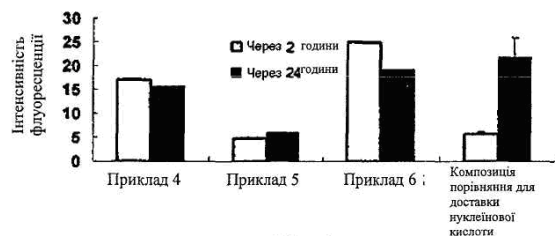
Клітини A594 (ATCC, США) інокулювали в кількості 5×10^5 клітин/ямку в 500 мкл DMEM, що містить 10 % об. FBS, у 24-ячковому планшеті і інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 24 годин. Після триразового промивання HBSS

у кожен ямку додавали 450 мкл середовища DMEM, яке не містить FBS, крім цього, у кожен ямку додавали 50 мкл композиції для доставки нуклеїнової кислоти з прикладу 4 і інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 4 годин. Потім надосадову рідину культури в ямках заміняли на DMEM з 10 % об. FBS і знову інкубували при 37 °C в присутності 5 % CO₂ протягом 20 годин. Після триразового промивання ямок HBSS клітини, що прилипли до дна ямок, відділяли з застосуванням трипсину і збирали центрифугуванням. РНК екстрагували з отриманих клітин за допомогою Rneasy Plus Mini (Qiagen), а потім транскрипцією одержували кДНК за допомогою QutantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Використовуючи отриману кДНК, QutantiTectPrimer Assay (Qiagen) і iCycler і (Bio-RAD), методом ПЛР у реальному масштабі часу визначали кількість мРНК IFIT-1, що являє собою інтерферон-індукуючий ген. Як контроль визначали кількість мРНК IFIT-1 у контрольній композиції для доставки нуклеїнової кислоти, отриманої змішуванням розчину Lipofectamine 2000™ (Invitrogen), що часто використовують як комерційно доступний вектор гена, розведеного середовищем OptiMEM до 0,1 мг/мл, і розчину міРНК, розведеного ТЕ буфером до концентрації 2 мкм, в об'ємному співвідношенні 1:1 за аналогією з описаним вище. Як ген "домашнього господарства" для точного підрахунку використовували 18 рРНК. Крім того, як холостий досвід здійснювали підрахунок мРНК IFIT-1 в описаних вище умовах без додавання композиції для доставки нуклеїнової кислоти.

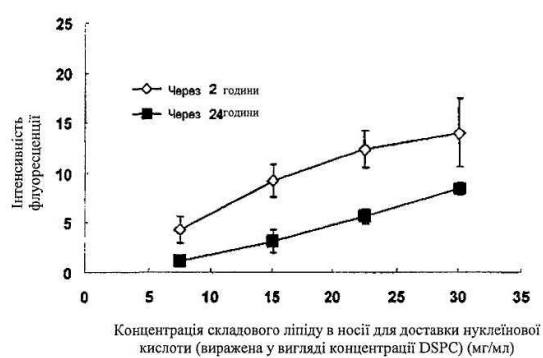
Результати представлені на фіг. 4. Композиція для доставки нуклеїнової кислоти з прикладу 4 із застосуванням DSPC указує на істотно невисоку індукцію інтерферону в порівнянні з контрольною композицією для доставки нуклеїнової кислоти з застосуванням Lipofectamine™ аміну 2000. Дані результати вказують на те, що можна інгібувати індукцію інтерферону, що являє собою побічну дію міРНК, із застосуванням композиції для доставки нуклеїнової кислоти даного винаходу.



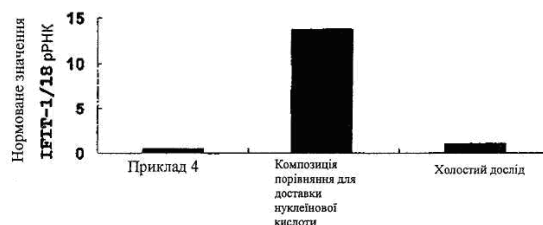
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4