

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038254**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.07.30

(21) Номер заявки

201891026

(22) Дата подачи заявки

2016.11.23(51) Int. Cl. **A61K 9/51** (2006.01)**(54) ЛЕЧЕНИЕ ОПУХОЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**(31) **1520600.6**(32) **2015.11.23**(33) **GB**(43) **2018.12.28**(86) **PCT/EP2016/078547**(87) **WO 2017/089392 2017.06.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**КАТОЛИКЕ УНИВЕРСИТЕТ
ЛЁВЕН; УНИВЕРСИТЕ ЛИБРЕ ДЕ
БРЮССЕЛЬ (BE)**

(72) Изобретатель:

**Де Влеешоувер Стивен, Ван Военсель
Маттиас, Амигхи Карим, Ваутхоз
Натали, Розьер Реми (BE)**

(74) Представитель:

Угрюмов В.М. (RU)

(56) DANHIER, FABIENNE; MESSAOUDI, KHALED; LEMAIRE, LAURENT; BENOIT, JEAN-PIERRE; LAGARCE, FREDERIC: "Combined anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNA-loaded chitosan-lipid nanocapsules decrease temozolomide resistance in glioblastoma: In vivo evaluation", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 481 (1-2), 30 January 2015 (2015-01-30), pages 154-161, XP002768151, the whole document

MALHOTRA MEENAKSHI ET AL.: "Intranasal Delivery of Chitosan-siRNA Nanoparticle Formulation to the Brain", 2 March 2014 (2014-03-02), DRUG DELIVERY SYSTEM IN: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745; VOL. 1141; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745; VOL. 1141], HUMANA PRESS, US, PAGE(S) 233-247, XP008183668, ISBN: 978-1-4939-0362-7 [retrieved on 2014-02-03] page 238, line 27 - page 241, line 28

KATAS H. ET AL.: "Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 115, no. 2, 10 October 2006 (2006-10-10), pages 216-225, XP024957660, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2006.07.021 [retrieved on 2006-10-10] page 217, column 1, last paragraph - page 218, column 1, paragraph first

VAN WOENSEL MATTHIAS ET AL.: "Development of siRNA-loaded chitosan nanoparticles targeting Galectin-1 for the treatment of glioblastoma multiforme via intranasal administration", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 227, 21 February 2016 (2016-02-21), pages 71-81, XP029466512, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2016.02.032 the whole document

(57) Изобретение в общем относится к новому составу, содержащему наночастицы, инкапсулирующие миРНК для применения технологии РНК-интерференции для сайленсинга гена галектина-1, вовлеченного в прогрессирование опухоли. Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению молекул РНК-интерференции для лечения злокачественной опухоли центральной нервной системы, более конкретно, для лечения мультиформной глиобластомы (GBM).

B1**038254****038254****B1**

Область техники настоящего изобретения

Изобретение относится к наночастицам, инкапсулирующим миРНК, для сайленсинга гена галектина-1, вовлеченного в прогрессирование опухолей. Настоящее изобретение дополнительно относится к лечению опухолей головного мозга, таких как мультиформная глиобластома (GBM), с помощью интраназальной доставки таких наночастиц.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Галектин-1 (Gal-1) представляет собой встречающийся в природе связывающий галактозу лектин, который избыточно экспрессируется в мультиформной глиобластоме (GBM). Этот лектин ассоциирован с прогрессированием опухоли, и является сильным иммунным супрессором в микроокружении опухоли.

Для ингибирования Gal-1 в GBM необходима эффективная терапия, которая достигает опухоли центральной нервной системы с ограниченными системными эффектами.

Глиомы представляют собой наиболее распространенный тип первичной опухоли головного мозга, поражающий 5-10 лиц на 100000 в год. Глиобластома (GBM) представляет собой наиболее часто встречающуюся глиому астроцитарного происхождения, которую Всемирная организация здравоохранения классифицирует как опухоль 4 степени [Louis, D.N. et al. (2007) *Acta Neuropathol.* 114, 97-109]. Современные способы лечения не могут вылечить пациентов с GBM. Оптимальная схема лечения состоит из максимальной хирургической резекции с последующей химиотерапией и лучевой терапией. Это мульти-модальное лечение дает в результате общую медианную выживаемость, составляющую 14,6 месяцев [Stupp, R. et al. (2009) *The Lancet Oncology* 10, 459-466]. Плохой прогноз спровоцировал за последние годы поиски многих новых методов лечения. Тем не менее, очень немногие достигли клинической эффективности.

Исследовали потенциал иммунотерапии в качестве нового подхода для дополнительного улучшения выживаемости пациентов с GBM. Иммунотерапия будет использовать возможности собственной иммунной системы пациента в отношении GBM. Среди пациентов с рецидивирующей злокачественной глиомой сообщалось о значимом, хотя и умеренном количестве выживших в течение длительного времени, которые выжили более чем через 24 месяца после повторной операции и вакцинации дендритных клеток [De Vleeschouwer S. (2008) *Clin. Cancer Res.* 14, 3098-3104; De Vleeschouwer, S. (2012) *Cancer Immunol Immunother.* 61, 2105-2112]. У недавно диагностированных пациентов с GBM сообщалось о средней выживаемости, составляющей 18,3 месяцев, в случае интегрированного послеоперационного радиохимиоиммунотерапевтического подхода и об уровне двухлетней выживаемости у более 42% пациентов в соответствии с данными долгосрочного анализа. Несмотря на эту клиническую выполнимость, с использованием иммунотерапии конечный результат для многих пациентов остается неизменным. Появляется общее мнение о том, что опухоли GBM являются опухолями, очень эффективно ускользающими от иммунного надзора, предрасположенными к обходу таргетных видов иммунотерапии [Weathers S.P. & Gilbert M.R. (2015) *J. Neuro Oncol.* 123, 331-337; Grauer, O.M. et al. (2009) *Brain Pathol* 19, 674-693].

В настоящее время всесторонне исследуют медиаторы, которые создают это ускользающее от иммунного надзора микроокружение опухоли. Галектин-1 (Gal-1) идентифицировали в качестве высокоактивной встречающейся в природе иммуносупрессорной молекулы, подвергающейся преимущественно положительной регуляции в GBM [Le Mercier M. et al (2010) *Brain Pathol* 20, 17-27, Toussaint, L.G, 3rd et al. (2012) *Molecular Cancer* 11, 32].

Галектин-1 может индуцировать апоптоз в активированных CD8+ Т-клетках, противодействует Т-клеточной передаче сигналов и блокирует секрецию провоспалительных цитокинов [Rubinstein, N. et al. (2004) *Cancer cell* 5, 241-251; Garin, M.I. et al. (2007) *Blood* 109, 2058-2065]. Ранее было продемонстрировано в GL261, модели глиобластомы на мышах, что истощение Gal-1 может увеличивать эффективность иммунотерапии на основе DC [Verschuere, T. et al. (2014) *Int J Cancer.* 134, 873-884]. На основании указанных данных считают, что Gal-1 представляет собой высокоактивный иммунный регулятор (в GBM). Gal-1 вовлечен не только в иммунную супрессию для прогрессирования GBM, но этому лектину также были приписаны несколько других ключевых признаков [Cam by, I. et al. (2006) *Glycobiology* 161, 37R-157R]. Положительная регуляция Gal-1 коррелирует с повышенной подвижностью клеток GBM. Посредством перестройки скелета актина Gal-1 может вводить в клетки GBM мигрирующий фенотип. Более того, было доказано, что Gal-1 стимулирует ангиогенез в микроокружении опухоли. Избыточно экспрессировать Gal-1 могут не только клетки GBM, но также эндотелиальные клетки, ассоциированные с опухолью. Функционируя в качестве модулятора для созревания фактора роста эндотелия сосудов, Gal-1 может стимулировать рост сосудов. Более того, было обнаружено, что Gal-1 функционирует в качестве медиатора химиорезистентности клеток GBM по отношению к темозоломиду, наиболее часто используемому химиотерапевтическому средству при GBM. Gal-1 может регулировать стресс эндоплазматического ретикулума для стимуляции выживаемости клеток при лечении темозоломидом [Le Mercier, M. et al. (2008) *J. Neuropathol. Ex Neurol* 67, 456-469; Le Mercier, M. et al. (2008) *Toxicol Appl. Pharm.* 229, 172-183; Croci, D.O. et al. (2014) *Cell* 156, 744-758.] Обобщенно, Gal-1 представляет собой решающий медиатор на стыке многих стимулирующих GBM явлений и, следовательно, представляет собой идеального кандидата для нацеленного воздействия.

Многие стратегии использовали для нацеленного воздействия на Gal-1. В частности, малые молеку-

лы, такие как Davanat®, OTX-008 (Anginex), характеризуются доказанной эффективностью при различных злокачественных опухолях [Astorgues-Xerri, L. et al. (2014) *Eur J Cancer* 50, 2463-2477]. Кроме малых молекул также были разработаны антитела для блокировки Gal-1. Два основных препятствия встречаются при супрессии Gal-1: нацеленное воздействие как на внутриклеточную, так и на внеклеточную фракцию Gal-1, и специфичность супрессии. Все еще обсуждается интерференция в отношении других галектинов, поскольку некоторые галектины могут характеризоваться регрессирующими опухоль свойствами. Для удовлетворения указанных требований разработка молекул на основании РНК-интерференции представляет собой очень перспективный подход. Короткие двухцепочечные молекулы малой интерферирующей РНК (миРНК) можно загрузить в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (комплекс RISC) и селективно разрушать иРНК, кодирующую Gal-1 [Schutze N. (2004) *Mol. Cell Endocrinol.* 213, 115-119]. В некоторых статьях уже продемонстрировали эффективность нацеленного воздействия миРНК на Gal-1 в клетках GBM [Le Mercier et al. 2008, оба процитированы выше]. Хотя эффективность миРНК редко бывает проблемой, главной трудностью является достижение критической концентрации в месте локализации опухоли. Наиболее перспективный способ, упомянутый в литературе, представляет собой достижение опухоли GBM посредством интравентрикулярной инъекции, при которой молекулы миРНК инфузируют с помощью осмотического мининасоса [Thakker, D.R. et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 17270-17275]. В клинических условиях системы конвекционной доставки используют для интрацеребральных инъекций в отношении опухолей головного мозга [Debinski, W. & Tatter, S.B. (2009) *Exp. Rev. Neurother.* 9, 1519-1527]. Даже с перспективными клиническими результатами этой инвазивной техники присущи осложнения. Часто наблюдаются инфекции, кровоизлияния, проблемы заживления ран и ненадежные объемы распределения. В частности, для лекарственных средств, которые необходимо вводить постоянно в долгосрочной перспективе, CED представляется бесперспективным.

В последние годы накопилось множество доказательств того, что интраназальный путь может представлять собой неинвазивный альтернативный способ введения [Pium, L. (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 1-18; Mistry, A. et al. (2009) *Int J Pharm*, 379, 146-157]. Интраназальный транспорт был описан как прямой путь от носовой полости к центральной нервной системе. Транспорт молекул по этому пути включает в себя экстра- и трансцеллюлярный транспорт через обонятельный и респираторный слизистый эпителий носовой полости. Периваскулярный и периневральный транспорт вдоль обонятельных пучков по направлению к обонятельной луковице и транспорт вдоль тройничных нервов к стволу головного мозга, вероятно, имеет первостепенное значение [Lochhead J.J. & Thorne, R.G. (2012) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 614-628]. Оттуда может произойти быстрое распространение в ЦНС. Прямой транспорт от носа к головному мозгу имеет много преимуществ, такие как лучшее соблюдение пациентом предписанного режима лечения посредством самостоятельной доставки, избегание (слишком большой) системной абсорбции и обход гематоэнцефалического барьера (BBB) [Groothuis, D.R. (2000) *Neuro Oncol*, 2, 45-59]. Этот барьер не может быть пересечен без высокой липофильности, или нацеленного воздействия на рецептор, например, трансферрина, и высокая экспрессия эффлюксного насоса предотвратит прохождение. Успешное использование интраназального пути открывает благоприятную возможность использования многих терапевтических молекул для лечения GBM и других заболеваний головного мозга [Kim, I.D. et al. (2012) *Mol. Ther.* 20, 829-839; Hashizume, R. et al. (2008) *Neuro-oncol.* 10, 112-120]. Обзор литературы описывает фармацевтические аспекты для дополнительного улучшения транспорта от носа к головному мозгу [van Woensel, M. et al. (2013) *Cancers* 5, 1020-1048], с комментариями в отношении разработки фармацевтических составов, которые улучшают транспорт, защищают активное лекарственное средство и тем самым увеличивают общую биодоступность активного соединения в ЦНС. В этом отношении составы в виде наночастиц могут предложить интересную новую многофункциональную платформу. Для улучшения транспорта от носа к головному мозгу быстро завоевывают интерес хитозановые наночастицы. Хитозан представляет собой молекулу β -(1-4)-связанного D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, которые связаны посредством гликозидных связей [Bernkop-Schnurch, A. & Dunnhaupt, (2012) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81, 463-469]. В качестве биоразлагаемого, биосовместимого, мягкого иммуногенного и малотоксичного полимера хитозан представляет идеальные характеристики, которые необходимы для будущего фармацевтического применения у людей. Более того, с мукоадгезивными и усиливающими проникновение свойствами это вспомогательное вещество кажется идеальным кандидатом для дополнительного усиления транспорта из носа в головной мозг.

Хитозан стимулирует проникновение путем временного открытия плотных контактов между эпителиальными клетками [Bonferoni, M.C. et al. (2009) *Expert Opin. Drug Deliv.* 6, 923-939; Davis, S.S. & Pium, L. (2003) *J Clin. Pharmacokinet.* 42, 1107-1128; Soane, R.J. et al. (2001) *Int. J. Pharm.* 217, 183-191]. Широко описаны способы получения хитозановых наночастиц. Ионное гелеобразование является одним из самых популярных способов из-за простоты производства и избегания вредных реагентов. Хитозан также широко исследовали в отношении его трансфекционного потенциала, в частности для доставки миРНК в цитозоле из-за эндосомального высвобождения [Katas, H. & Alpar, H.O. et al. (2006) *J. Control. Release* 15, 216-225].

V Danhier et al. (2015) *Int. J. Pharm.* 481, 154-161 раскрыты нагруженные миРНК против галектина-1

и против EGFR липидно-хитозановые частицы, полученные из хитозана с относительной молекулярной массой, составляющей 5 кДа. В патенте США № US 7964575 раскрыто применение нацеленной против галектина-1 миРНК для лечения злокачественной опухоли и обсуждается доставка посредством назальной ингаляции без дополнительного обсуждения частиц для доставки.

В Le Mercier et al. (2008) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 67, 456-469 раскрыто введение миРНК против галектина-1 в головной мозг посредством осмотических миниасосов.

В Le Mercier et al. (2008) Toxicol. Appl. Pharmacol. 229, 172-183 раскрыта трансфекция миРНК галектина в опухолевых клетках человека, которые впоследствии имплантировали мышам.

В Van Woensel (2013) Cancers 5, 1020-1048 представлен обзор составов для интраназальной доставки и обсуждаются хитозановые наночастицы с фармацевтическими активными соединениями.

В US 20130337067 раскрыты наночастицы с малой молекулярной массой (7-10 кДа) для интраназальной доставки в головной мозг и с большей молекулярной массой (50-190 кДа) для интраперитонеальной доставки. В US 20110033547 раскрыты различные типы хитозановых частиц без указания конкретных путей применения.

В Malhotra (2013) J. Pharmacol, 2013, статье 812387 раскрыты хитозановые частицы с хитозаном с молекулярной массой, составляющей 10 кДа, для интраназальной доставки.

В Malhotra 2013 помимо этого раскрыты хитозановые частицы размером 5-10 нм, полученные из хитозана с молекулярной массой, составляющей 20 кДа.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к новым составам, содержащим наночастицы, инкапсулирующие миРНК, для применения технологии РНК-интерференции для сайленсинга гена галектина-1, вовлеченного в прогрессирование опухоли. Более конкретно, настоящее изобретение относится к хитозановым наночастицам, инкапсулирующим молекулы миРНК против галектина-1, причем указанные наночастицы являются подходящими для доставки указанных молекул миРНК в головной мозг после интраназального введения. Наночастицы согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для лечения опухолей головного мозга, более конкретно для лечения опухолей центральной нервной системы, в частности мультиформной глиобластомы (GBM). Один аспект настоящего изобретения относится к хитозановым наночастицам, содержащим миРНК, нацеленно воздействующую на галектин-1 (анти-Gal1 миРНК) для применения в лечении опухолей центральной нервной системы, таких как мультиформная глиобластома, причем наночастицы вводят посредством интраназальной доставки, и при этом молекулы хитозана в наночастицах характеризуются относительной молекулярной массой, составляющей 30-200 кДа, 30-100 кДа, 30-60 кДа, 45-55 кДа.

Как правило, молекулы поперечно сшиты посредством триполифосфата натрия.

Как правило, анти-Gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).

Согласно типичным вариантам осуществления гидродинамический диаметр (z-average) частиц составляет от 100 до 200 нм.

Согласно типичным вариантам осуществления коэффициент полидисперсности частиц составляет от 0,15 до 0,40.

Согласно типичным вариантам осуществления по меньшей мере часть молекул хитозана несут одно или несколько звеньев полиэтиленгликоля или одно или несколько звеньев галактозы.

Наночастицы могут дополнительно содержать лиопротектор, такой как сахароза или трегалоза. Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения опухолей центральной нервной системы у пациента, предусматривающим стадию введения пациенту посредством интраназальной доставки эффективного количества хитозановых наночастиц, содержащих соединения миРНК, нацеленно воздействующие на галектин-1 (анти-Gal1 миРНК), причем молекулы хитозана в наночастицах характеризуются относительной молекулярной массой, составляющей 30-200 кДа.

Варианты осуществления, описанные выше для пункта формулы на второе медицинское применение, в равной степени применимы к указанным способам лечения.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям для назальной доставки, содержащим хитозановые наночастицы, содержащие соединения миРНК, нацеленно воздействующие на галектин-1 (анти-Gal1 миРНК), и вспомогательное вещество, подходящее для интраназальной доставки, причем молекулы хитозана в наночастицах характеризуются относительной молекулярной массой, составляющей 30-200 кДа. Варианты осуществления, описанные выше для пункта формулы на второе медицинское применение, в равной степени применимы к указанным фармацевтическим композициям.

Другой аспект настоящего изобретения относится к системам интраназальной доставки, содержащим упомянутые выше фармацевтические композиции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения хитозановых наночастиц. Указанные способы предусматривают следующие стадии:

1) растворение полимеров хитозана, характеризующихся молекулярной массой, составляющей 30-

200 кДа в уксуснокислом растворе;

2) растворение анти-Gal1 миРНК в растворе отрицательно заряженного соединения, подходящего для поперечного сшивания полимеров хитозана;

3) добавление раствора, содержащего анти-Gal1 миРНК и соединения для поперечного сшивания, к раствору полимеров хитозана согласно стадии 1) при перемешивании или смешивании комбинированных растворов для получения образования суспендированных хитозановых наночастиц, содержащих анти-Gal1 миРНК;

4) сбор хитозановых наночастиц с использованием фильтрования, центрифугирования или другой подходящей техники для выделения суспендированных наночастиц.

В настоящем документе анти-Gal1 миРНК, как правило, содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).

Полимеры хитозана характеризуются молекулярной массой, составляющей 30-60 кДа или 45-55 кДа.

Как правило, степень деацетилирования полимеров хитозана составляет по меньшей мере 70%.

Как правило, 30-60 мкг анти-Gal1 миРНК добавляют на мг хитозана.

Поперечно-сшивающее соединение, как правило, представляет собой триполифосфат натрия.

Как правило, массовое отношение хитозана к триполифосфату натрия составляет 2,5 -3,0.

Согласно конкретным вариантам осуществления хитозановые наночастицы, собранные на стадии 4), комбинируют с лиопротектором и впоследствии лиофилизируют. Примеры лиопротекторов представляют собой сахарозу или трегалозу.

В настоящем исследовании авторы настоящего изобретения впервые сообщают о том, как максимально концентрированные хитозановые наночастицы могут доставлять молекулы миРНК в центральную нервную систему в пределах часов после интраназального введения. Указанные наночастицы могут инкапсулировать миРНК, нацеленно воздействующую на Gal-1, в высоком процентном отношении, и защищать их от разложения. Более того, успешная доставка анти-Gal1 миРНК приводит к сниженной экспрессии Gal-1 в клетках GBM как мыши, так и человека. Настоящее изобретение показывает, что интраназальный путь представляет собой эффективный транспортный путь для доставки видов терапии на основе миРНК, нацеленно воздействующих на Gal-1, в лечении GBM.

Цель настоящего изобретения состоит в получении хитозановых наночастиц, которые инкапсулируют и защищают миРНК, специфические для нацеленного воздействия на Gal-1 в головном мозге после интраназального введения. Авторы настоящего изобретения исследовали их трансфекционный потенциал в клеточных линиях GBM мыши и человека. Более того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что настоящий состав открывает плотные контакты на эпителиальном слое, авторы настоящего изобретения также исследовали быстрое появление меченного флуорофором состава миРНК в центральной нервной системе после интраназальной инстилляцией, с преимущественным распределением на обонятельной луковице и заднем мозге; что указывает на частичный транспорт через обонятельный путь и путь тройничных нервов.

Согласно настоящему изобретению раскрыто следующее:

1. Хитозановые наночастицы, содержащие соединения миРНК, нацеленно воздействующие на галектин-1 (анти-Gal1 миРНК) для применения в лечении опухолей центральной нервной системы, в частности мультиформной глиобластомы.

2. Хитозановые наночастицы согласно утверждению 1, в которых указанная анти-Gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' [SEQ ID NO: 1]. Предпочтительно указанная анти-Gal1 миРНК характеризуется последовательностью нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80%, например, по меньшей мере с 85, 90 или 95% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' [SEQ ID NO: 1].

3. Хитозановые наночастицы согласно утверждению 1 или 2, причем гидродинамический диаметр (z-average) указанных частиц варьирует от 100 до 300 нм, предпочтительно от 100 до 200 нм.

4. Хитозановые наночастицы согласно утверждениям 1-3, причем коэффициент полидисперсности указанных частиц варьирует от 0,15 до 0,40.

5. Хитозановые наночастицы согласно утверждениям 1-4, в которых по меньшей мере часть молекул хитозана несет одно или несколько звеньев полиэтиленгликоля.

6. Хитозановые наночастицы согласно утверждениям 1-4, в которых по меньшей мере часть молекул хитозана несет одно или несколько звеньев галактозы.

7. Фармацевтический препарат, содержащий хитозановые наночастицы согласно утверждениям 1-6, причем указанный препарат дополнительно содержит лиопротектор.

8. Фармацевтический препарат согласно утверждению 7, в котором указанный лиопротектор представляет собой сахарозу, и причем отношение хитозановой наночастицы к сахарозе, как правило, варьирует от 1/2 до 1/16 или от 1/4 до 1/12, например, составляет приблизительно 1/8.

9. Фармацевтический препарат согласно утверждению 7, в котором указанный лиопротектор представляет собой трегалозу, и причем отношение хитозановой наночастицы к сахарозе, как правило, варьирует от 1/8 до 1/28 или от 1/10 до 1/20, например, составляет приблизительно 1/14.

10. Фармацевтический препарат согласно утверждениям 8 или 9, причем указанный фармацевтический препарат содержит вспомогательные вещества, подходящие для его назального введения.

11. Система интраназальной доставки, содержащая хитозановые наночастицы согласно любому из утверждений 1-6.

12. Способ получения хитозановых наночастиц согласно утверждениям 1-6, причем указанный способ предусматривает следующие стадии:

i) растворение полимеров хитозана, характеризующихся молекулярной массой, составляющей 30-200 кДа, в уксуснокислом растворе;

ii) растворение анти-Gal1 миРНК в растворе отрицательно заряженного соединения, подходящего для поперечного сшивания полимеров хитозана;

iii) добавление раствора, содержащего анти-Gal1 миРНК и поперечно-сшивающее хитозан соединение, к раствору хитозана согласно стадии (i) при перемешивании или смешивании указанных комбинированных растворов для получения образования суспендированных содержащих анти-Gal1 миРНК хитозановых наночастиц;

iv) сбор указанных содержащих анти-Gal1 миРНК хитозановых наночастиц с использованием фильтрования, центрифугирования или другой подходящей техники для выделения суспендированных наночастиц.

13. Способ согласно утверждению 12, в котором указанные полимеры хитозана характеризуются молекулярной массой, составляющей 30-60 кДа.

14. Способ согласно утверждениям 12 или 13, в котором степень деацетилирования указанных полимеров хитозана составляет по меньшей мере 70%.

15. Способ согласно утверждениям 12-14, в котором 30-60 мкг анти-Gal1 миРНК добавляют на мг хитозана.

16. Способ согласно утверждениям 12-15, в котором указанное поперечно-сшивающее хитозан соединение представляет собой триполифосфат натрия.

17. Способ согласно утверждению 16, в котором массовое отношение хитозана к триполифосфату натрия составляет 2,5-3,0.

18. Способ согласно утверждениям 12-17, в котором хитозановые наночастицы, собранные на стадии (iv), комбинируют с лиопротектором и впоследствии лиофилизируют.

19. Способ согласно утверждению 18, в котором указанный лиопротектор представляет собой сахарозу.

20. Способ согласно утверждению 18, в котором указанный лиопротектор представляет собой трегалозу.

Наночастицы для применения в трансназальной доставке, с одной стороны, должны являться достаточно большими, чтобы экранировать миРНК от разложения, и, с другой стороны, достаточно маленькими, чтобы легко транспортироваться из носовой полости к головному мозгу, и достаточно быстро высвободить свое содержимое - лекарственное средство из частицы. В отличие от современного взгляда на наночастицы для трансназальной доставки лекарственного средства, при которой небольшие наночастицы используют с хитозаном с низкой относительной молекулярной массой, примеры согласно настоящему изобретению иллюстрируют, что частицы с большей относительной молекулярной массы хитозана все еще являются эффективными, что указывает на то, что частицы попадают на целевой сайт, что разложение РНКазой является допустимым и что миРНК высвобождается достаточно быстро.

Вследствие этого, частицы, раскрытые в настоящем изобретении, можно помимо этого использовать для миРНК против других целевых генов в головном мозге. Кроме того, модель опухоли на мышах, описанная в примерах, является подходящей для дополнительной оптимизации физических параметров хитозановых наночастиц.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Экспрессия Gal-1 в клетках, культивированных в присутствии загруженных анти-Gal1 наночастиц, полученных с использованием 20 кДа или 50 кДа хитозана. (А) Изображение анализа вестерн-блоттинга Gal-1 в клеточных лизатах клеток GL261 через 4 и 7 дней после трансфекции с использованием загруженных Gal-1 миРНК наночастиц, полученных с помощью 20 кДа и 50 кДа хитозана, соответственно. (В) Этот эксперимент повторяли 3 раза и количественно определяли с помощью анализа ImageJ.

Фиг. 2. Емкость загрузки и защита от РНКаз в хитозановых наночастицах, содержащих молекулы хитозана, характеризующиеся молекулярной массой, составляющей 50 кДа. миРНК включена в очень высоком процентном отношении, без визуальной миграции свободной миРНК; более того, миРНК была защищена от РНКаз во время различных временных интервалов совместной инкубации (3 ч, 2 ч, 1 ч и 0,5 ч). Свободная миРНК быстро разлагалась. CS NP: хитозановые наночастицы, SDS: додецилсульфат натрия.

Фиг. 3. Взаимодействие хитозановых наночастиц с клетками GBM. Анализ на клеточной линии

глиобластомы мыши (А, В и С) или человека (D, E, F). Изображения иммунофлуоресценции (представленные в оттенках серого цвета) клеток GL261 (А) и первичной культуры GBM человека (D), соответственно, со светлым полем или DAPI в качестве фона, через 2 ч после инкубации с наночастицами. Указанные изображения показывают быстрое прикрепление состава на клетки; (B) Относительный анализ Gal-1/GAPDH иРНК на обработанных клетках GL261 выявил значимое снижение Gal-1 (темный столбик; с миРНК и белый столбик; без миРНК, выраженное как среднее + SD, двухфакторный дисперсионный анализ); (C) Вестерн-блоттинг обработанных клеток GL261 на 4 и 7 день после трансфекции подтверждает снижение Gal-1 на уровне белка; (E) Количественное определение шести независимых первичных культур GBM человека на 4 и 7 день после трансфекции показывает значимое снижение Gal-1 (n=6, парный t-критерий, односторонний); (F) Пример одного из результатов вестерн-блоттинга первичной культуры GBM человека на 4 и 7 день после трансфекции. *p<0,05 и **p<0,01.

Фиг. 4. Анализ методом зарастания царапины для анализа миграции на клетках GL261. Количественное определение площади царапины через 48 ч после получения царапины показывает, что клетки GL261 со сниженным Gal-1 менее активно мигрируют в царапину (n=12, выраженное как среднее + SEM, однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Бонферрони, рассчитанное как % от времени = 0) *p<0,05

Фиг. 5. Взаимодействие хитозановых наночастиц с эпителиальными клетками. (A) Представление в оттенках серого цвета изображения иммунофлуоресценции монослоя Calu-3, ядра: идентифицируемые как темно-серые точки в представлении в оттенках серого цвета (исходный цвет: синий), тубулин: невидимый в оттенках серого цвета (исходный цвет: желтый), наночастицы: идентифицируемые как светлые пятна/области в представлении в оттенках серого цвета (исходный цвет: зеленый), через 2 ч после инкубации, демонстрируя быстрое прикрепление; (B) Измерение TEER через 2 ч после инкубации с хитозановыми наночастицами, указывает на значимое временное уменьшение устойчивости, скорректированное на исходный TEER в момент времени = 0. (n=9, выраженное как среднее + SD, однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Данна); (C) Прохождение FD4 на монослое Calu-3, выраженное как % увеличения потока с течением времени, подтверждает увеличенное прохождение FD4 после применения хитозановых наночастиц (n=6, выраженный как среднее + SEM); (D) Изображение иммунофлуоресценции в отношении локализации ZO-1, через 2 ч после инкубации подтверждает временное нарушение плотного контакта (изображение представляет канал зеленого с оттенках серого, соответствующий окрашиванию Z01). **p<0,01.

Фиг. 6. Флуоресцентная микроскопия распределения/локального тропизма в микроокружении опухоли. (A) Конфокальное изображение получившей лечение мыши через 4 ч после последнего введения нагруженных меченной флуоресцеином миРНК наночастиц в центре опухоли BFP-GL261; с представленными сверху отдельными каналами цветности; это изображение подтверждает распределение посредством системной циркуляции, ассоциированной с несколькими сосудами. (B) Конфокальное изображение получившей лечение мыши через 4 ч после последнего введения нагруженных меченной флуоресцеином миРНК наночастиц на границе опухоли BFP-GL261; с представленными сверху отдельными каналами цветности; это изображение подтверждает локальное обогащение в окружении опухоли.

Фиг. 7. Специфический нокдаун Gal-1. (A) Вестерн-блоттинг мышей, получивших лечение с помощью анти-Gal1 терапии или не получивших лечение. Вестерн-блоттинг проводили для Gal-1 и Gal-3 в качестве дополнительного опухолеассоциированного белка; (B) Количественное определение вестерн-блоттинга посредством расчета интенсивности ImageJ. Этот анализ выявляет специфический нокдаун Gal-1 у получивших лечение мышей, и в меньшей степени Gal-3. (непарный односторонний t-критерий; n=10/группа; **p<0,01, * **p<0,001, показанные результаты вестерн-блоттинга принадлежат двум независимым экспериментам).

Фиг. 8. Относительный нокдаун Gal-1. (A) Анализ RT-кПЦР мышей, получивших лечение с помощью анти-Gal1 терапии или не получивших лечение. Этот анализ выявляет подтверждение нокдауна Gal-1 у получивших лечение мышей (непарный односторонний t-критерий; n=10/группа, p=0,14).

Фиг. 9. Анализ выживаемости после инокуляции опухоли GL261. Мышам интракраниально вводили инъекцию $0,5 \times 10^6$ клеток опухоли мыши GL261. Впоследствии мышей оставляли без лечения или лечили с помощью нагруженных анти-Gal1 миРНК хитозановых наночастиц в дни 5, 8, 12 и 15 после инокуляции опухоли. Снижение Gal-1 значимо увеличивало выживаемость получивших лечение мышей (n=15/группа, логарифмический ранговый критерий, **p<0,01).

Фиг. 10. Подтверждение нокдауна Gal-1 посредством иммунофлуоресценции. (A) Количественное определение у 4 получивших лечение с помощью анти-Gal1 миРНК мышей по сравнению с 5 не получившими лечение контрольными мышами. (Критерий Манна-Уитни; *p<0,05), (B) Изображения в оттенках серого цвета репрезентативных иллюстраций иммунофлуоресценции области опухоли получившей и не получившей лечение мыши, соответственно.

Подробное раскрытие настоящего изобретения Определения

В контексте настоящего изобретения 'хитозан' представляет собой молекулу β -(1-4)-связанного D-

глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, которые связаны посредством гликозидных связей. В контексте настоящего изобретения хитозан получают путем ионного гелеобразования. Молекулы хитозана, используемые в качестве исходного материала в получении указанных наночастиц, характеризуются молекулярной массой, составляющей 30-200 кДа или 30-100 кДа, например, 30-60 кДа или 45-55 кДа (например, 50 кДа).

В контексте настоящего изобретения 'хитозановые наночастицы' относится к наночастицам, например, полученным с помощью ионного гелеобразования с использованием подходящей поперечно-сшивающей молекулы, такой как триполифосфат натрия (ТРР). Хитозановые наночастицы используют для инкапсулирования молекул анти-Ga11 миРНК. Инкапсулирование молекул миРНК, например, можно достичь путем предварительной инкубации миРНК и ТРР перед образованием наночастиц. Наночастицы согласно настоящему изобретению, как правило, характеризуются гидродинамическим диаметром, составляющим 100-300 нм или 100-200 нм. Кроме того, коэффициент полидисперсности, являясь величиной распределения наночастиц по размерам, как правило, варьирует от 0,15 до 0,40, более предпочтительно от 0,2 до 0,30.

Хитозановые частицы могут представлять собой "немодифицированные" частицы или могут являться дополнительно модифицированными, например, с помощью PEG или галактозы.

В контексте настоящего изобретения "анти-Ga11 миРНК" относится к конструктору миРНК, который подвергает сайленсингу трансляцию галектина-1 (см. идентификатор входа UniProt P09382, в последний раз модифицированный 16 мая 2014 г.) Конструкторы анти-Ga11 миРНК характеризуются последовательностью нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 70, 85, 90, 95% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' [SEQ ID NO: 1] (например, 3, 2 или 1 различие в нуклеотидной последовательности).

Как проиллюстрировано в примерах согласно настоящему изобретению, использовали одну миРНК против одного гена. Предусмотрено, что можно использовать различные миРНК против галектина-1, и, кроме того, что можно использовать одну или несколько миРНК против другого гена, вовлеченного в опухоли центральной нервной системы.

В контексте настоящего изобретения термин "опухоли центральной нервной системы" относится к любой из опухолей, классифицируемых ВОЗ, как описано в Acta Neuropathologica, August 2007, 114(2), 97-109. Настоящее изобретение, в частности, относится к опухолям нейроэпителиальной ткани, таким как астроцитарные опухоли, более конкретно, к опухолям - глиобластомам, таким как мультиформная глиобластома.

"Коэффициент полидисперсности", $[\Theta]$, может относиться или к молекулярной массе $[\Theta M]$, или к степени полимеризации $[\Theta X]$. Его можно рассчитать с использованием уравнения $DM = M_w/M_n$, где M_w представляет собой средневесовую молярную массу, и M_n представляет собой среднечисловую молярную массу. Также его можно рассчитать в соответствии со степенью полимеризации согласно $\Theta X = X_w/X_n$, где X_w представляет собой средневесовую степень полимеризации, и X_n представляет собой среднечисловую степень полимеризации.

Распределение частиц по размеру описывается гидродинамическим диаметром таких частиц, причем утверждение "от x нм до y нм" указывает на то, что в пределах популяции по меньшей мере 60, 75, 80, 90 или 95% частиц характеризуются гидродинамическим диаметром в пределах указанного диапазона.

"Лечение" в контексте настоящего изобретения относится к любому параметру, который является показателем улучшения здоровья пациента. В контексте настоящего изобретения этот термин относится к таким параметрам, как уровень выживаемости после лечения, частичное или полное снижение размера или массы опухолевой ткани, уменьшение жалоб пациента (таких как припадки, тошнота, рвота, головная боль, потеря памяти, гемипарез, прогрессирующее расстройство памяти, изменение личности или неврологическое расстройство).

"Вспомогательные вещества для интраназальной доставки" описаны, например, в заявке на выдачу патента США № US 2013/0337067 и включают в себя фармацевтически приемлемые разбавители, консерванты, солибулизаторы, эмульгаторы, адъюванты и/или носители. Такие композиции представляют собой жидкости или лиофилизированные или иным образом высушенные составы и включают в себя разбавители с различным буферным содержимым (например, Tris-HCl, ацетат, фосфат), pH и ионной силой, такие добавки, как альбумин или желатин, для предотвращения абсорбции к поверхностям и детергенты (например, Tween 20™, Tween 80™, Pluronic F68™, соли желчных кислот). Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые солибулизаторы (например, глицерин, полиэтиленгликоль), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфит натрия), консерванты (например, тиомерсал, бензиловый спирт, парабены), объемобразующие вещества или модификаторы тоничности (например, лактоза, маннит).

"Интраназальная доставка" относится к экстра- и трансцеллюлярному транспорту через обонятельный и респираторный эпителий слизистой оболочки из носовой полости в головной мозг. Этот физиологический процесс подробно описан в Van Woensel et al. (2013), процитированном выше. Устройства для

интраназальной доставки являются коммерчески доступными и известны под торговыми названиями Vianase (Kurve Technologies, США) DirectHaler (Дания) или OptiMist (Норвегия).

миРНК (малая интерферирующая РНК) относится к коротким молекулам РНК для нокдауна генов, которая связывается с иРНК целевого гена. Они, как правило, составляют 20-24 нуклеотидов в длину, и их можно вводить в виде одноцепочечных молекул, а также в виде более длинных двухцепочечных молекул (например, шпилечные РНК), которые процессируются в организме до одноцепочечных молекул.

Примеры

Материал и методы.

Хитозан (Heppe Medical Chitosan, Германия) получали с точно определенной молекулярной массой, составляющей 50 кДа, измеренной как вязкость 10 мПа как 1% в 1% уксусной кислоты при 20°C. Степень деацетилирования составляла 85,2%. Триполифосфат натрия (TPP), сахароза, додецилсульфат натрия (SDS) и FITC-декстран (FD4) приобретали у Sigma-Aldrich (238503, S 9378, 71727, 46944, Сент-Луис, США). Анти-Gal1 миРНК человека: 5'GCUCGACGAUGGAUACGAAdTdT3' [SEQ ID NO: 2], мыши: 5'ACCUGUGCCUACACUUCAAdTdT3' [SEQ ID NO: 3] и скремблированную миРНК (5'GGAAAUCCCCAACAGUGAdTdT3' [SEQ ID NO: 4] приобретали у GE Dharmacon и при необходимости метили с помощью флуоресцеина или 5'-красителя 547 (индивидуальный заказ, Лафейетт, США).

Индукцированные метилхолантеном клетки глиомы GL261 сингенных мышей C57BL/6J были любезно предоставлены Dr. Eupoglu (University of Erlangen, Германия) и их культивировали, как описано в Maes, W. et al. (2013) Clin. & Dev. Immunol., 2013 Article ID 952469.

В некоторых экспериментах использовали клетки GL261, которые экспрессировали синий флуоресцентный белок (BFP). Путем лентивирусной трансдукции вводили продукцию BFP.

Первичные культуры глиобластомы получали из полученного при резекции образца от пациентов после получения информированного согласия. Вкратце, образец опухоли диссоциировали посредством 30' инкубации с коллагеназой D и ДНКазой при 37°C. Впоследствии мононуклеары выделяли на градиент Ficoll (Lymphoprep, AxisShield, Норвегия), и клетки высевали в среду RPMI при условиях 20% FCS. Клеточную линию Calu-3 приобретали в Американской коллекции типовых культур, /ATCCHTB-55, и культивировали при таких же условиях, как описано в Vllasaliu, D. et al. (2010) Int. J. Pharm. 400, 183-193.

8-10 недельных самок мышей C57BL/6J приобретали в Harlan (Horst, Нидерланды). Мышей содержали при общепринятых условиях при отсутствии патогенов. Все эксперименты одобрены комитетом по биоэтике KU Leuven, который следует международным нормам.

Получение наночастиц. Наночастицы получали с помощью ионного гелеобразования. Полимеры хитозана положительно заряжали путем растворения в буфере 0,1 М уксусной кислоты, pH 4,5. TPP выбрали в качестве поперечно-сшивающего средства для соединения между собой полимеров хитозана. Вследствие отрицательного заряда как TPP, так и фосфатов миРНК, хитозановые наночастицы образовывались спонтанно [Katas & Alrag, процитированный выше]. TPP (1 мг/мл) добавляли к хитозану (0,7 мг/мл) при постоянном перемешивании, с массовым отношением хитозана к TPP, составляющим 2,625/1. Инкапсулирование молекул миРНК достигали путем предварительной инкубации миРНК и TPP перед образованием наночастиц, с общим количеством, составляющим 24 мкг миРНК на 1 мл наночастиц. Наночастицы перемешивали в течение 30' при комнатной температуре. Впоследствии частицы собирали посредством ультрацентрифугирования при 40000×g в течение 20 мин. Осадок растворяли в буфере 0,075 М уксусной кислоты, pH 4,5 и супернатант центрифугировали снова дважды. Три осадка объединяли и лиофилизировали с помощью сахарозы в качестве лиопротектора с массовым отношением наночастица/лиопротектор, составляющим 1/8.

Определение характеристик наночастиц: Размер, заряд и стабильность. Гидродинамический диаметр (Z-average), коэффициент полидисперсности (PDI) и дзета-потенциал состава в виде наночастиц определяли с помощью динамического рассеяния лазерного излучения и лазерного доплеровского электрофореза с использованием Zetasizer nano ZS (анализатор размера частиц, молекулярной массы и дзета-потенциала) (Malvern Instruments, Великобритания). Измерения проводили после разведения 1:10 в буфере 0,075 М уксусной кислоты, pH 4,5, при 37°C в трех повторностях. Стабильность наночастиц оценивали путем консервирования при 4°C в сушильном шкафу.

Определение характеристик наночастиц: эффективность инкапсулирования миРНК. Инкапсулирование миРНК в % определяли с использованием анализа SYBR green [Pardridge, W.M. (2007) Drug Discov Today 12, 54-61]. Этот селективный краситель может излучать флуоресценцию только при связывании в спирали молекул миРНК. Частицы получали и перемешивали в течение 30'. Впоследствии частицы инкубировали с SYBR green в течение 30'. Свободную миРНК использовали для получения стандартной кривой и обнаруживали с помощью спектрофотометра для чтения планшетов для визуализации флуоресценции в черном 96-луночном планшете (Nunc), при 480 нм (длина волны возбуждения) и 520 нм (длина волны детекции). В качестве положительного контроля 0,1% SDS добавляли для разрушения ионных комплексов. В параллели процентное отношение свободной миРНК также оценивали в супернатанте после ультрацентрифугирования путем измерения флуоресцентной несвязанной миРНК.

Определение характеристик наночастиц: Защита от разложения миРНК. Защиту от разложения миРНК с помощью рибонуклеаз (РНказы) оценивали с помощью анализа на замедление подвижности в

геле. Вкратце, хитозановые наночастицы инкубировали с 0,07% рекомбинантной RNaseA (12019-021, Life Technologies) при 37°C. Далее частицы загружали на 4% агарозный гель, который получали с помощью буфера Tris/борат/EDTA (10x Ultrapure TBE, Life Technologies). Для лучшей визуализации частицы диссоциировали с помощью 0,1% SDS перед их загрузкой на гель. Равное количество свободной миРНК также инкубировали с RNaseA и загружали на гель. Миграцию миРНК усиливали путем приложения 55 В в течение 2 ч. Визуализации достигали путем окрашивания геля с помощью этидия бромид в течение 30'.

Взаимодействие с клетками глиомы. Как клетки глиомы GL261 мыши, так и клетки первичной культуры глиобластомы человека выращивали на покровном стекле. Далее частицы, нагруженные меченной флуоресцеином миРНК, инкубировали с клетками. С равными временными интервалами покровные стекла отмывали и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10'. В случае первичных культур человека дополнительное иммунофлуоресцентное окрашивание проводили, которое окрашивало их ядра с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорида (DAPI, Sigma).

Анализ трансфекции. Клетки GL261 и клетки первичной культуры глиобластомы человека культивировали вплоть до плотности, составляющей максимум 60% полной конfluenceности. Хитозановые наночастицы добавляли в условия бессывороточного культивирования в течение ночи вплоть до конечной концентрации миРНК, составляющей 20 нМ. Клетки тщательно отмывали с помощью PBS и помещали обратно в содержащие сыворотку кондиционные среды. Из этой клеточной популяции клетки глиобластомы высевали для оценки эффективности трансфекции с течением времени.

Анализ трансфекции: иРНК. Обработанные клетки собирали в разные дни после трансфекции и выделяли РНК (Miniprep, Qiagen) и осуществляли контроль качества посредством спектрофотометра (Nanodrop, Thermo Scientific). Впоследствии матрицу кДНК создавали посредством обратной полимеразной реакции (Superscript II, Invitrogen) и количественную полимеразную реакцию в режиме реального времени (RT-кПЦР) проводили на указанных образцах. Представленные ниже пары праймеров использовали для детекции галектина-1 и GAPDH в качестве конститутивного гена (табл. 1). Отношение Gal-1/GAPDH в необработанных клетках использовали как 100% исходный уровень.

Таблица 1. Пары праймеров и зонды для RT-кПЦР. Последовательности для Gal-1 и GAPDH для количественного определения количества мышинной иРНК, кодирующей Gal-1.

Ген	Праймер/зонд	последовательность	SEQ ID NO:
Галектин-1	прямой	caa tca tgg cct gtg gtc tg	5
	обратный	ctg tag gca cag gtt gtt gct g	6
	<i>Taqman</i> зонд	tcg cca gca acc tga atc tca aac ct	7
GAPDH	прямой	tca cca cca tgg aga agg c	8
	обратный	gct aag cag ttg gtg gtg ca	9
	<i>Taqman</i> зонд	atg ccc cca tgt ttg tga tgg gtg t	10

Анализ трансфекции: Белок. Обработанные клетки собирали в разные дни после трансфекции и выделяли белки (Tissue Protein Extraction Reagent, Life Technologies). Концентрацию белка определяли посредством колориметрического анализа (набор BCA, Life Technologies). Равные количества общего белка разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия и переносили на мембрану из поливинилидендифторида. Мембраны инкубировали в течение ночи с первичным антителом: кроличье антитело к галектину-1 (1:1000; Perrotech, Quebec, Канада). В качестве контроля белковой нагрузки все мембраны блоттинга окрашивали кроличьим антителом к Р-актину (1:5000; Abeam). Используемое вторичное антитело представляло собой конъюгированное с пероксидазой козы антитело к IgG кролика (1:5000; Dako). Визуализация проводили посредством хемилюминесценции (Western Lightening, Perkin Elmer). Количественное определение полос проводили с помощью программного обеспечения ImageJ.

Анализ трансфекции: Анализ миграции. Через 4 дня после трансфекции клетки GL261 помещали в 6-луночные планшеты. Клеткам позволяли прикрепиться в течение ночи и расти до монослоя. С помощью наконечника 200 мкл пипетки делали царапину, не нарушая покрытие планшета. Три независимых изображения получали от этой царапины и эксперимент проводили в четырех параллелях. Изображения получали через 12, 23 и 48 ч после получения царапины. Площадь поверхности рассчитывали посредством программного обеспечения (ImageJ) и рассчитывали как % по сравнению с исходным значением площади поверхности.

Целостность эпителиального барьера. Клетки Calu-3 высевали с плотностью, составляющей 250000 клеток на вкладыш, выращивали до монослоя на 12-луночном вкладыше Transwell (0,4 мкм вкладыш из полупрозрачного сложного полиэфира, Greiner).

Через 14 дней формировался монослой, который проявлял стабильное трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER). Для подтверждения плотного монослоя и адгезии состава на монослое проводили иммунофлуоресцентное окрашивание. После фиксации клетки пермеабелизовали в буфере

Tris/NaCl/Tween (TNT) с помощью triton-X 100 и добавляли кроличье первичное антитело к тубулину (1/100, ab15246, Abeam). Клетки тщательно отмывали и добавляли конъюгат ослиного антитела к IgG кролика с AlexaFluor 555 (1/200, A31572, Life Technologies). После чего добавляли DAPI для окрашивания ядер. В случае оценки плотного контакта авторы настоящего изобретения использовали антитело к ZO-1 в качестве первичного антитела (1/100, 33-910, Life technologies). Измерения TEER получали с использованием вольтметра EVOM (World Precision Instruments), оснащенного парой стержневых электродов. Для оценки способности хитозановых наночастиц временно нарушать целостность эпителиального барьера хитозановые наночастицы инкубировали на монослое клеток Calu-3. Измерения исходного уровня TEER выражали как 100%. Кроме того, проницаемость для макромолекул измеряли в качестве альтернативного параметра для оценки целостности эпителиального барьера. FD4 использовали в качестве гидрофильного модельного лекарственного средства, которое, наиболее вероятно, перемещается в парацеллюлярных пространствах.

In vivo введение и оценка. Для in vivo исследований распределения мышам вводили анестезию с помощью 3% изофлурана в течение периода введения. Каждой мышке вводили 8 раз 3 мкл капли с временным интервалом, составляющим 3' между каждой каплей. Введения проводили или 1 раз, или 3 раза в течение 3 дней подряд и через 4 ч после последнего введения мышей умерщвляли путем интраперитонеальной инъекции нембутала и перфузировали с помощью холодного PBS с последующей перфузией с помощью 4% формальдегида. Слизистую носовой полости и головной мозг аккуратно удаляли и фиксировали в течение дополнительных 12 ч с помощью 4% формальдегида. Слизистую носовой полости получали для изготовления срезов с помощью скальпелей и классического изготовления срезов по 5 мкм из залитых парафином блоков на микротоме. Образцы головного мозга получали для получения 200 мкм срезов с помощью вибротома путем погружения в 4% агарозу. Срезы консервировали в PBS, содержащем 0,01% азид натрия, до окрашивания и визуализации. Все образцы окрашивали с помощью DAPI в отношении ядер в качестве исходного строения. Для визуализации сосудов авторы настоящего изобретения использовали техники окрашивания. Для in vivo окрашивания сосуда вводили с помощью инъекции 50 мкг изолектина-488 внутривенно за 2 ч до умерщвления (121411, Life Technologies). Для окрашивания кровеносных сосудов на вибротомных срезах авторы настоящего изобретения блокировали с помощью TNT, содержащего блокирующий реагент (FP1012, Perkin Elmer) и пермеабелизировали с помощью Triton-X 100, и инкубировали в течение ночи с первичным кроличьим антителом к GLUT-1 (1/100, 07-1401, Merck Millipore). После тщательного отмывания с помощью TNT ослиное антитело к IgG кролика, конъюгированное с AlexaFluor 555 добавляли в течение ночи (1/200, A31572, Life Technologies), и готовили срезы для микроскопического исследования (заливочная среда Dako). Визуализацию предметных стекол проводили с помощью конфокальной микроскопии (SP8, Leica). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Инокуляция опухоли и интраназальное введение. Мышам вводили интракраниально с помощью инъекции GL261-WT или GL261-BFP опухолевые клетки, как описано ранее [Vlasaliu, D. (2010) *Int. J. Pharm.* 400, 183-193]. Вкратце, $0,5 \times 10^6$ опухолевых клеток вводили с помощью инъекции на 2 мм латерально и 2 мм назад от брегмы на глубину 3 мм ниже твердой мозговой оболочки с использованием стереотаксической рамки (Kopf Instruments, Tujunga, CA). Стереотаксическую инокуляцию проводили при стерильных условиях. Интракраниальные опухоли будут развиваться в пределах 3 недель, и мышей подвергали мониторингу три раза в неделю в отношении массы тела и оценки по шкале неврологических расстройств. Интраназальное введение проводили при анестезии с помощью 2,5% изофлурана. Одна доза для одного животного на один день составляла 24 мкл максимально концентрированных хитозановых наночастиц, как описано выше, которую вводили в виде 8 капель по 3 мкл с 3-минутными временными интервалами. Все эксперименты на животных проводили с разрешения Этического комитета KU Leuven по благосостоянию лабораторных животных.

Анализ иммунофлуоресценции. Для первой серии экспериментов по распределению авторы настоящего изобретения вводили с помощью инъекции изолектин, конъюгированный с AlexaFluor 488 (121411, Life Technologies) за 2 ч до умерщвления животного, что приводило к окрашиванию кровеносных сосудов и, более конкретно, ассоциированных с опухолью кровеносных сосудов. Меченные красителем Dye-547 анти-Gal1 мРНК интраназально вводили за 4 или 8 ч до умерщвления. Мышей умерщвляли посредством летальной инъекции нембутала и перфузировали с помощью PBS (Lonza, Бельгия) с последующей перфузией 4% параформальдегидом посредством кардиальной перфузии на 14 день после инокуляции опухоли. Головной мозг извлекали и фиксировали в течение дополнительной инкубации в течение ночи с 4% параформальдегидом. Головной мозг тщательно отмывали и фиксировали в 4% растворе агара. Впоследствии получали 200 мкм вибротомные срезы и окрашивание ядер проводили с помощью DAPI (Sigma, Бельгия) в течение 20'. Срезы готовили для микроскопического исследования и заливали с помощью флуоресцентной заливочной среды (Dako, Бельгия).

В параллели авторы настоящего изобретения также проводили эксперимент по распределению для определения того, проникает ли состав в клетки опухоли GL261. В указанных экспериментах инокулировали $0,5 \times 10^6$ BFP положительных опухолевых клеток и позволяли опухоли прогрессировать в течение 14

дней. Нагруженные мечеными флуоресцеином анти Gal-1 миРНК наночастицы вводили в течение 3 дней подряд с помощью одной дозы и умерщвляли через 4 ч после последнего введения с последующей обработкой, аналогичной описанной выше. Окрашивание архитектуры кровеносных сосудов блокировали в буфере TNB (0,1 М Tris, pH 7,4; NaCl 150 mM; 0,5% блокирующий реагент, Perkin Elmer, Бостон) в течение 2 ч при КТ. Ткани инкубировали с кроличьим антителом к GLUT-1 мыши (Millipore), разбавленным в TNB, в течение ночи при 4°C, отмывали в TNT (0,1 М Tris, pH 7,4; NaCl, 150 mM; 0,2% Triton X-100) и инкубировали со вторичным антителом к антителу кролика, конъюгированному с AlexaFluor-647 (Life Technologies), разбавленному в TNB в течение ночи при 4°C.

Оценка нокдауна Gal-1. Мыши получали за 4 интраназальных введения нагруженные анти-Gal1 миРНК наночастицы в день 5, 8, 12 и 15 после инокуляции опухоли. В день 20 или раньше, если у мышей развивались клинические признаки массивной опухолевой нагрузки, мышей умерщвляли и перфузировали с помощью PBS. Для не получивших лечение мышей зачастую умерщвление проводили до 20 дня, тогда как для получивших лечение с помощью анти-Gal1 миРНК мышей его проводили в день 20. Головной мозг выделяли и гомогенизировали в 2 мл буфера для экстракции белка из ткани (78510, Thermo Scientific). Дебрис удаляли и супернатант использовали для колориметрического анализа белка (набор BCA, Pierce, Life Technologies) и анализа вестерн-блоттинг. Для Gal-1 авторы настоящего изобретения использовали кроличье антитело к Gal-1 (1/1000; Peprotech) и для Gal-3 кроличье антитело к Gal-3 (1/1000; Abeam). В качестве контроля белковой нагрузки все мембраны блоттинга окрашивали с помощью кроличьего антитела к Р-актину (1/5000; Abeam). Использовали вторичное конъюгированное с пероксидазой козы антитело к IgG кролика (1/5000; Dako) и визуализацию проводили посредством хемилюминесценции (Western Lightening, Perkin Elmer). Количественное определение проводили с помощью программного обеспечения ImageJ. Для анализа иРНК отбирали небольшой кусочек опухоли (<30 мг) и гомогенизировали. Впоследствии РНК выделяли и готовили для RT-кПЦР, как описано ранее. В параллели авторы настоящего изобретения также оценивали нокдаун Gal-1 посредством иммунофлуоресцентного окрашивания. Вкратце, 200 мкм вибротомные срезы окрашивали в отношении Gal-1 (AF1163, R&D) посредством протокола окрашивания, как описано выше для Glut 1. Количественное определение интенсивности флуоресценции измеряли посредством ImageJ и изображали 1 репрезентативный образец для каждой группы. (фиг. 10)

Анализ выживаемости. 30 мышам инокулировали клетки GL261-WT и случайным образом делили на 2 группы. Одну группу оставляли не получившей лечение, но которую также подвергли анестезии с помощью изофлурана, а вторая группа получала 4 дозы хитозановых наночастиц, нагруженных анти-Gal1 миРНК в день 5, 8, 12 и 15 после инокуляции опухоли. Длительную выживаемость определяли как 3-кратную от медианной выживаемости контрольных мышей.

Статистика. Все данные анализировали с помощью Graphpad Prism 5.0 (Сан-Диего, Калифорния). Для сравнения двух групп проводили t-критерий Стьюдента. В случае сравнения с анти-Gal1 миРНК проводили односторонний анализ. Анализ выживаемости сравнивали с логарифмическим ранговым критерием.

Пример 1. Определение характеристик частиц.

Для выбора оптимального состава посредством процесса оценки получали несколько параметров первостепенного значения. Первый критерий выбора представлял собой размер наночастиц. Следовательно, авторы настоящего изобретения оценивали влияние молекулярной массы полимера хитозана, концентрации хитозана и скорости перемешивания на гидродинамический размер (Z-average) наночастиц (табл. 2). Пониженная молекулярная масса, повышенная скорость перемешивания и пониженная концентрация хитозана давали в результате самые маленькие частицы со средним размером, составляющим 147 нм, и коэффициентом полидисперсности, составляющим 0,27 (табл. 3). Дополнительное разбавление хитозана (<0,7 мг/мл) не привело в результате к образованию частиц (данные не показаны). На дзета-потенциал не оказывали влияние указанные параметры, и определяли, что он составлял +32 мВ. Для последующего исследования отбирали самые маленькие наночастицы; получали их с помощью 50 кДа хитозана, перемешивали при 1300 об/мин и растворяли при 0,7 мг/мл. После получения частицы собирали с помощью ультрацентрифугирования и лиофилизировали без модификации размера и дзета-потенциала частиц (табл. 2). Более того, консервирование указанных частиц показало стабильность при 4°C в сушильном шкафу в течение по меньшей мере 8 недель (данные не показаны).

Молекулярная масса цепи хитозана, скорость перемешивания при получении частиц и концентрация хитозана оказывали значимый эффект на размер полученных наночастиц. Наночастицы являлись инертными после лиофилизации с сахарозой.

Таблица 2. Критически важные параметры, которые влияют на ионное гелеобразование наночастиц

Переменная		Размер (нм ± SD)	Эффект (p-значение)
Молекулярная масса	50 кДа	162,7 ± 6,7	Да, p= 0,01 *
	90 кДа	181,5 ± 10,1	
Скорость перемешивания	700 об/мин	177,8 ± 2,5	Да, p= 0,009 *
	1300 об/мин	137 ± 4,6	
Концентрация хитозана	0,7 мг/мл	128,8 ± 5,3	Да, p= 0,0027 *
	2 мг/мл	306,1 ± 10,6	
Процесс лиофилизации	До	138,9 ± 3,6	Нет, p= 1 *
	После	140,6 ± 5,4	

* критерий Манна-Уитни # Анализ линейной регрессии.

Таблица 3. Характеристики частиц

Размер частиц (нм)	Дзета- потенциал (мВ)	Нагрузка миРНК, введенной в состав (мкг/мл)	Нагрузка миРНК (%)	Нагрузка миРНК после SDS (%)
140,6 ± 5,4	+32 мВ	24	81 ± 2,6	4,1 ± 2,4

В этой таблице описан конечный препарат наночастиц, измеренный с помощью анализатора дзета-потенциала и анализа SYBR green. Наночастицы инкапсулируют миРНК в высоком количестве с немедленным высвобождением при контакте с детергентом.

Заключение: исследование, показанное в этом примере, подтверждает возможность осуществления получения хитозановых наночастиц с помощью ионного гелеобразования, которые инкапсулируют молекулы миРНК. Частицы получают при мягких условиях, которые предотвращают разложение миРНК во время получения частиц. Более подробно, авторы настоящего изобретения описали, как частицы ведут себя при изменении критически важных параметров, например, длины полимера, скорости перемешивания и растворение хитозана (табл. 2). Следовательно, авторы настоящего изобретения описали оптимизированный протокол для концентрирования наночастиц до высокой степени. Концентрация наночастиц имеет первостепенное значение для использования транспорта из носовой полости в головной мозг. Авторы настоящего изобретения исследовали различные концентрации различных лиопротекторов и на основании растворимости и защиты в отношении наночастиц авторы настоящего изобретения выбрали сахарозу в качестве наиболее оптимального лиопротектора.

Для дополнительной оценки важности молекулярной массы молекул хитозана, используемых для получения нагруженных анти-Gal1 наночастиц эффективность трансфекции культивируемых клеток GL261 исследовали в отношении 20 нМ содержащих миРНК хитозановых наночастиц, полученных либо с помощью 20 кДа, либо с помощью 50 кДа полимера. В день 4 и день 7 после трансфекции клеток GL261 с помощью соответствующих нагруженных анти-Gal1 миРНК хитозановых наночастиц клетки собирали и лизировали. Впоследствии, экспрессию Gal-1 в клетках оценивали с помощью анализа вестерн-блоттинг соответствующих клеточных лизатов. Как показано на фиг. 1, в день 4 только хитозановые наночастицы, полученные с помощью 50 кДа хитозана, обеспечивали супрессию экспрессии Gal-1 в клетках GL261, тогда как в день 7 наблюдали супрессию экспрессии Gal-1 до сходной степени в клетках, обработанных с помощью 50 кДа и 20 кДа хитозановых наночастиц, соответственно. В общем, более немедленный эффект 50 кДа наночастиц на экспрессию Gal-1 указывает на то, что применение 50 кДа хитозана обеспечивает возможность получения нагруженных анти-Gal1 миРНК наночастиц с повышенной эффективностью трансфекции, по сравнению с применением 20 кДа хитозана. Указанные эксперименты дополнительно подтвердили выбор именно 50кДа хитозана для получения нагруженных анти-Gal1 миРНК наночастиц для применения в *in vivo* исследовании интраназального введения таких наночастиц для лечения глиобластомы (см. последующие примеры).

Пример 2. миРНК инкапсулирование и защита от разложения.

Способность хитозановых наночастиц переносить миРНК оценивали с использованием анализа SYBR green. Во избежание потери миРНК максимальную емкость загрузки, составляющую 24 мкг/мл миРНК выбирали для дополнительных исследований: авторы настоящего изобретения обнаружили, что при этом условии 81% миРНК были инкапсулированы в наночастицы. Входящая в состав миРНК немедленно высвобождалась при инкубации с 0,1% SDS, на что указывала внезапная потеря эффективности инкапсулирования (табл. 3). Более того, авторы настоящего изобретения также подтвердили высокую эффективность инкапсулирования посредством процесса концентрирования с помощью ультрацентрифугирования. После трех циклов центрифугирования авторы настоящего изобретения измерили, что 85%

флуоресцентной миРНК находились внутри осадка (данные не показаны).

Более того, защиту миРНК от разложения оценивали с помощью анализа разложения (фиг. 2). Наблюдалось отсутствие разложения миРНК, когда нагруженные миРНК наночастицы инкубировали с РНКазой при 37°C в течение нескольких периодов времени. Для лучшей визуализации частицы немедленно разрушали с помощью добавления SDS непосредственно перед их загрузкой на гель. Напротив, свободная миРНК быстро разлагалась, и ее нельзя было наблюдать. Указанные результаты подтверждают, что очень высокое процентное отношение миРНК инкапсулировано в частицы, и что указанные частицы обеспечивают превосходную защиту от разложения.

Заключение: миРНК, которая была введена в хитозановые наночастицы, находилась в прочных комплексах и не демонстрировала разложение после инкубации с РНКазой.

Пример 3. Поведение наночастиц на опухолевых клетках.

Прикрепление состава исследовали на клеточной линии GBM мыши, GL261, а также на первичных культурах GBM человека. В обоих случаях через 2 ч после совместной инкубации в бессывороточных средах наблюдали быстрое прикрепление на опухолевые клетки (фиг. 3 A+D). Для оценки того, индуцирует ли прикрепление частиц на клетки опухоли GL261 также супрессию Gal-1, проводили анализ иРНК и белка (фиг. 3 B+C). Для клеток GL261 сильное и специфическое разложение иРНК Gal-1 наблюдали вскоре после трансфекции. Через 1 неделю иРНК Gal-1 восстанавливалась. На уровне белка наблюдали сильное снижение, начиная со дня 4 после трансфекции до по меньшей мере дня 7. В параллели анализировали разложение Gal-1 первичных культур (фиг. 3 E+F). В шести независимых первичных культурах GBM было заметно сильное снижение со дня 4 до дня 7 после трансфекции.

Для дополнительного исследования биологической значимости супрессии Gal-1 оценку подвижности клеток проводили посредством анализа методом зарастания царапины. Через 48 ч после проведения царапины этот анализ выявил профиль значительно пониженной подвижности клеток GL261, когда снизили Gal-1 (фиг. 4), через 23 ч после проведения царапины проявился аналогичный профиль, хотя различие еще не было значимым (данные не показаны). Клеткам опухоли GL261 с подавленным Gal-1 было необходимо больше времени для заполнения площади поверхности, вызванную царапиной.

Заключение: Этот пример показывает быстрое прикрепление к клеткам при применении хитозановых частиц к клеткам GBM (фиг. 3). Для оценки того, поглощаются ли наряду с этим частицы клетками GBM, авторы настоящего изобретения исследовали Gal-1 на уровне иРНК и белка для мышинной клеточной линии и на уровне белка для 6 отдельных опухолевых клеточных линий. Во всех случаях авторы настоящего изобретения наблюдали ингибирование Gal-1, которое продолжалось в течение нескольких дней после однократного введения частиц, хотя клетки GBM представляют собой быстро делящиеся клетки. В качестве контроля авторы настоящего изобретения проверяли специфичность миРНК посредством вестерн-блоттинга галектина-3, при этом авторы настоящего изобретения не наблюдали снижения Gal-3. Механизм высвобождения миРНК из полимера хитозана, наиболее вероятно, основан на эффекте протонной губки, создающем повреждение лизосом путем захвата H⁺ первичными аминами полимера хитозана [Nel, A.E. et al. (2009) *Nature materials* 8, 543-557]. Более того, авторы настоящего изобретения смогли подтвердить эффект на миграцию клеток GBM, при снижении Gal-1 (фиг. 4) [Camby I. et al. (2002) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 585-596].

Пример 4. Опосредованная составом эпителиальная модуляция.

Модуляцию плотных контактов составами на основе хитозана оценивали с помощью монослоев Calu-3. Сначала авторы настоящего изобретения визуализировали дисперсное распределение хитозановых наночастиц на апикальной стороне монослоя Calu-3 (фиг. 5A). В концентрации, составляющей 0,06% хитозановых наночастиц, и через 2 ч после введения наблюдали значимое снижение сопротивления поверх монослоя. Это снижение сопротивления являлось временным и восстанавливалось не позднее чем через 24 ч после инкубации частиц (данные не показаны). Это снижение сопротивления приводило в результате к тенденции к повышенной проницаемости монослоя для небольших гидрофильных зондов, например, FD4 (фиг. 5 B+C). В соответствии с данными в литературе интернализацию плотных контактов наблюдали после введения хитозана на этот монослой (фиг. 5D). Авторы настоящего изобретения наблюдали нарушение интактного монослоя, что подвергали мониторингу с помощью окрашивания монослоя в отношении белка ZO-1.

С целью интраназального введения и достижения ЦНС необходимо временно нарушить эпителиальный слой. При физиологических условиях в слое слизистой существует тесная взаимосвязь за счет плотных контактов. Авторы настоящего изобретения наблюдали на монослое клеточной линии calu-3 значимое падение сопротивления при применении состава хитозана в концентрации 0,06 % (фиг. 5). При удалении состава сопротивление постепенно восстанавливалось и не больше чем через 24 ч сопротивление восстанавливалось до исходного уровня. Авторы настоящего изобретения отметили также, что наблюдалось устойчивое падение сопротивления в условиях среды, которое, как полагают авторы настоящего изобретения, может быть обусловлено изменением температуры, влажности и содержания CO₂, O₂, необходимым для проведения измерения сопротивления. Чтобы оценить, находит ли отражение падение сопротивления в увеличенном проходе молекул через барьер, авторы настоящего изобретения инкубировали монослой с наночастицами и FD4. Авторы настоящего изобретения наблюдали тенденцию к повы-

шенным проходам FD4. Интересно, что несмотря на это, 0,03% концентрация не приводила к падению сопротивления. Авторы настоящего изобретения попытались достичь прохода флуоресцентной миРНК, заключенной в хитозановые наночастицы. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что хитозановые частицы показали высокую аффинность в отношении сложного полиэфира, и, хотя частицы были меньше, чем внутренний размер поры (0,4 мкм), можно было наблюдать очень низкое прохождение (данные не показаны), даже без высевания клеток на вкладыш. Авторы настоящего изобретения изучали, могут ли они обнаружить открытие плотных контактов посредством иммунофлуоресцентного окрашивания. Авторы настоящего изобретения наблюдали исчезновение молекулы ZO-1 при применении хитозановых частиц через 2 ч как в условиях 0,03%, так и 0,06%, что может объяснить увеличенное прохождение в случае FD4. Указанные результаты указывают на интернализацию плотных контактов под действием стимула хитозана.

Пример 5. Транспорт к центральной нервной системе.

В качестве первого барьера для входа слизистую носовой полости оценивали путем наблюдений с помощью конфокальной микроскопии в отношении появления меченных красным красителем 547 миРНК в препаратах слизистой носовой полости контрольной не получившей лечение мыши, и мышей, умерщвленных через 4 ч и 8 ч, соответственно, после интраназального введения хитозановых наночастиц, содержащий меченные красителем 547 миРНК. У контрольных не получивших лечение мышей не могли наблюдать красный сигнал. У получивших лечение мышей авторы настоящего изобретения могли наблюдать красные наночастицы в слизистой носовой полости через 4 ч и 8 ч после введения. Чтобы дополнительно очертить в деталях прохождение через эпителиальный слой, авторы настоящего изобретения интраназально вводили хитозановые наночастицы, нагруженные меченными красным красителем 547 миРНК, мышам в течение 3 дней подряд и их умерщвляли через 4 ч после последнего введения для обработки с получением классических парафиновых срезов. Заметное присутствие меченных красителем 547 миРНК обнаруживали на слизистой носовой полости. Особенно на слое слизи присутствовала заметная концентрация, а также заметен транспорт по призматическому эпителию, в собственную пластинку слизистой оболочки. Транспорт через слизистую носовой полости, очень вероятно, кажется первичным необходимым элементом для достижения центральной нервной системы. Для дополнительной оценки транспорта к ЦНС обонятельную луковицу и задний мозг, которые являются хорошо описанными точками входа в центральную нервную систему, оценивали в отношении присутствия миРНК. Роль обонятельной луковицы в указанном транспорте оценивали с использованием данных конфокальной микроскопии в отношении появления меченной красным красителем 547 миРНК в препаратах обонятельной луковицы контрольной не получившей лечение мыши и мышей, умерщвленных через 4 ч и 8 ч, соответственно, после интраназального введения хитозановых наночастиц, содержащих меченную красителем 547 миРНК. Тщательная оценка обонятельной луковицы указывает на отсутствие флуоресценции у контрольных не получивших лечение мышей. Тем не менее, у получивших лечение мышей авторы настоящего изобретения наблюдали флуоресцентный сигнал на вершине обонятельной луковицы через 4 ч после введения. Авторы настоящего изобретения наблюдают более диффузное распределение меченной красителем 547 миРНК через 8 ч после введения. Для оценки длительного эффекта на вход на обонятельной луковице авторы настоящего изобретения также подвергали мониторингу мышей, которые получали три введения за три дня, и которых умерщвляли через 4 ч после последнего введения. В этом случае авторы настоящего изобретения наблюдают интенсивное распределение в клубочковом слое обонятельной луковицы и более диффузное распределение во внешнем плексиформном слое. Более того, авторы настоящего изобретения также оценивали транспорт к обонятельной луковице и заднему мозгу посредством сходной техники конфокальной микроскопии, которая включала в себя усиление меченной флуоресцеином миРНК с помощью конъюгированного с FITC-FITC антитела. При использовании этой техники флуоресцеин-миРНК можно наблюдать в обонятельной луковице как через 4 ч, так и через 24 ч после введения мышам нагруженных меченными флуоресцеином миРНК наночастиц. Тем не менее, присутствие миРНК наблюдали не только в области обонятельной луковицы, но также в заднем мозге как через 4 ч, так и через 24 ч после введения мышам нагруженных меченными флуоресцеином миРНК наночастиц. Оба места локализации указывают на вышеупомянутые пути. Тройничные нервы также исследовали, но не смогли обнаружить четкого присутствия флуоресцентной миРНК (данные не показаны).

В рамках *in vivo* оценки авторы настоящего изобретения подтвердили транспорт через слизистую носовой полости. Авторы настоящего изобретения наблюдали быстрое распространение состава уже через 4 ч в слизистую носовой полости, тогда как у контрольных, не получивших лечение мышей наблюдали отсутствие флуорофора. Сложно различить способ транспорта; тем не менее некоторые изображения указывают на транспорт по сосудам, подтверждая периваскулярный транспорт в ЦНС. Плотное накопление вокруг сосудистой сети может также быть источником быстрого систематического распределения. Также через 8 ч авторы настоящего изобретения все еще наблюдали флуоресценцию, присутствующую на слизистой носовой полости. Чтобы пронаблюдать длительные эффекты на слизистой оболочке авторы настоящего изобретения проводили эксперимент по распределению, в котором интраназально вводили хитозановые наночастицы, нагруженные меченной красителем 547 миРНК, в течение 3 дней подряд перед умерщвлением мыши через 4 ч после последнего введения. Указанные срезы обрабатывали путем

заливки парафином, которая выявляла высокий уровень сигнала в собственной пластинке слизистой оболочки. Кроме того, слой слизи был окрашен положительно в отношении меченной красителем 547 миРНК, и также можно было наблюдать прохождение через клетки призматического эпителия. В предварительных экспериментах по распределению авторы настоящего изобретения не наблюдали увеличение меченной флуорофором миРНК в плазме и печени через 6 ч (данные не показаны). Для оценки распределения в ЦНС авторы настоящего изобретения сначала сфокусировались на обонятельной луковице, так как она представляет собой основной путь поступления. Посредством окрашивания ядер с помощью DAPI авторы настоящего изобретения смогли четко различить клубочковый слой, который характеризуется наличием глубоких структур круглой формы, если луковицу полностью разрезать. Авторы настоящего изобретения наблюдали сильный и увеличивающийся сигнал меченной красителем 547 миРНК через 4 ч и 8 ч после введения сигнала. Более того, после 3 ежедневных введений этот сигнал был более представлен по всей области обонятельной луковицы. Указанные наблюдения четко подчеркивают важность и осуществимость прямого транспорта от носовой полости к центральной нервной системе через обонятельный путь. Далее авторы настоящего изобретения также были заинтересованы в том, чтобы обнаружить присутствие миРНК в заднем мозге в качестве альтернативного пути к ЦНС через тройничные нервы. Чтобы дополнительно усилить сигнал авторы настоящего изобретения окрашивали меченные флуоресцеином миРНК с помощью конъюгированного с FITC антитела к флуоресцеину. В указанных экспериментах сосуды обнаруживали не посредством окрашивания изолектином, а посредством окрашивания с помощью GLUT-1. Авторы настоящего изобретения не только подтвердили в указанных экспериментах присутствие в обонятельной области, но также обнаружили четкий сигнал миРНК в заднем мозге через 4 ч и 24 ч после введения сигнала. Цветные изображения, иллюстрирующие вышеупомянутые наблюдения доступны в Van Woensel et al., (2016) *J. Contr. Rel.*, 227, 71-81.

Пример 6. Распределение в микроокружении опухоли.

Как ранее продемонстрировали авторы настоящего изобретения, состав анти-Gal1 миРНК с хитозановыми наночастицами может эффективно достигать центральной нервной системы. Чтобы ответить на вопрос, можно ли достичь опухоли центральной нервной системы, авторы настоящего изобретения инокулировали мышам клетки GL261-WT и позволяли опухолям расти в течение 14 дней, пока не появится твердая масса. Использовали наблюдение с помощью конфокальной микроскопии за появлением меченой красным красителем 547 миРНК в окружении опухоли контрольной не получившей лечение мыши и мышей, умерщвленных через 4 ч и 8 ч, соответственно, после интраназального введения хитозановых наночастиц, содержащих меченную красителем 547 миРНК. Посредством окрашивания изолектином в отношении ассоциированных с опухолью кровеносных сосудов авторы настоящего изобретения смогли четко определить площадь опухоли на срезе. Сосуды были явно расширены и, казалось, не имели организованной структуры, что указывало на нарушение кровообращения и подачи кислорода. У не получивших лечение контрольных мышей можно было обнаружить отсутствие ассоциированного с миРНК флуорофора. В экспериментальной группе интраназально вводили инъекцию мышам с нагруженными красителем 547 анти-Gal1 миРНК, что соответствовало красному цвету. После однократного введения уже заметили широко распространенный сигнал в микроокружении опухоли. Через 4 ч этот сигнал казался более точечным и через 8 ч более диффузным. Это наблюдение ясно продемонстрировало возможность достижения микроокружения опухоли посредством интраназального пути. Оставался вопрос, могла ли анти-Gal1 миРНК достичь также опухолевых клеток, которые помимо кровеносных сосудов и макрофагов, являются основными популяциями клеток, которые продуцируют Gal-1 в глиоме. Следовательно, авторы настоящего изобретения вводили инъекцию GL261-BFP положительных опухолевых клеток, которые можно обнаружить с помощью конфокальной микроскопии (фиг. 6). Как в центре опухоли (фиг. 6A), так и на границе опухоли (фиг. 6B) можно обнаружить сигнал меченной флуоресцеином анти-Gal1 миРНК через 4 ч после интраназального введения нагруженных меченной флуоресцеином миРНК наночастиц. Более того, авторы настоящего изобретения также могли наблюдать сильный сигнал, ассоциированный с кровеносными сосудами, несмотря на перфузию, что указывало на присутствие в эндотелиальных клетках.

В общем, указанные результаты ясно показывают, что анти-Gal1 миРНК достигает опухолевых клеток после интраназального введения с использованием формы доставки в виде хитозановых наночастиц. Цветные изображения, иллюстрирующие вышеупомянутые наблюдения доступны в Van Woensel et al. (2016) *J. Contr. release* 227, 71-81.

Пример 7. Снижение Gal-1 внутри опухоли.

Ранее авторы настоящего изобретения наблюдали присутствие анти-Gal1 миРНК в микроокружении опухоли. Чтобы дополнительно исследовать функциональность молекул РНК-интерференции, авторы настоящего изобретения должны были определить количество Gal-1. В полученных ранее *in vitro* результатах авторы настоящего изобретения наблюдали сильное снижение Gal-1 с 4 по 7 день после трансфекции. Этот биологический метаболизм Gal-1 также наблюдали после внутриопухолевой инъекции (данные не показаны) анти-Gal1 миРНК. Следовательно, авторы настоящего изобретения вводили нагруженные анти-Gal1 миРНК наночастицы до 15 дня после инокуляции опухоли и затем умерщвляли мышей на день 20 после инокуляции опухоли. В двух независимых экспериментах авторы настоящего

изобретения наблюдали сильное снижение Gal-1 у получивших лечение мышей по сравнению с контрольными, не получившими лечение мышами. Более того, авторы настоящего изобретения также указывают, что снижался не только Gal-1, но также галектин-3 (Gal-3), который также проявляет стимулирующие опухоль свойства. Снижение содержания Gal-1 было более значительным, чем снижение содержания Gal-3, но не являлось статистически значимым ($p=0,09$). Авторы настоящего изобретения также проводили RT-кПЦР на небольшом кусочке опухоли (<30 мг) в день 20 после инокуляции опухоли. Этот анализ выявил небольшое, но не значимое снижение Gal-1 у получивших лечение животных. На основании предыдущих *in vitro* данных предположили, что иРНК снижается меньше через 5 дней после введения, чем уровни белка. (фиг. 7 и 8)

Авторы настоящего изобретения наблюдали сильное значимое уменьшение Gal-1 у получивших лечение мышей, что указывало на специфический нокдаун. Неожиданно и в отличие от *in vitro* данных (см. пример 3) *in vivo* авторы настоящего изобретения не обнаружили значимое снижение в отношении Gal-3. Это указывает на биологическое взаимное влияние между Gal-1 и Gal-3.

Более того, авторы настоящего изобретения подтвердили снижение Gal-1 посредством иммунофлуоресцентного окрашивания (фиг. 10).

Пример 8. Увеличенная выживаемость у получивших лечение мышей.

Мышам инокулировали GL261-WT и случайным образом разделяли на две группы. Авторы настоящего изобретения наблюдали пролонгированную выживаемость мышей, получивших лечение с помощью интраназального состава анти-Gal1 миРНК. Медианная выживаемость сдвигалась с 19 дней у контролей на 23 дня у получивших лечение мышей. На ранних этапах при прогрессировании заболевания можно было наблюдать лишь небольшой благоприятный результат в отношении выживаемости, но позже различия в кривых становятся более выраженными. Авторы настоящего изобретения также наблюдали выживших с длительной выживаемостью в получившей лечение группе мышей, при этом, напротив, все не получившими лечение мыши умерли (фиг. 9). Более того, авторы настоящего изобретения отмечали, что пустые частицы (не содержащие миРНК) не характеризовались эффектом на выживаемость несущих опухоль мышей, подчеркивая важность Gal-1 в прекращении или замедлении прогрессирования опухоли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Хитозановые наночастицы, содержащие миРНК и поперечно-сшитый хитозан, причем миРНК инкапсулированы в хитозановые наночастицы; молекулы хитозана в указанных наночастицах характеризуются молекулярной массой, составляющей 30-60 кДа; и гидродинамический диаметр (z-average) указанных частиц хитозана составляет 100-200 нм.
2. Хитозановые наночастицы по п.1, причем молекулы хитозана характеризуются молекулярной массой, составляющей 45-55 кДа.
3. Хитозановые наночастицы по п.1 или 2, причем коэффициент полидисперсности указанных частиц составляет 0,15-0,40.
4. Хитозановые наночастицы по любому из пп.1-3, причем хитозановые наночастицы образованы для интраназальной доставки.
5. Хитозановые наночастицы по любому из пп.1-4, причем миРНК нацеленно воздействует на ген в головном мозге.
6. Хитозановые наночастицы по п.5, причем указанный ген представляет собой галектин 1 и указанная миРНК представляет собой антигалектин 1 (анти-gal1) миРНК, нацеленно воздействующую на галектин 1.
7. Хитозановые наночастицы по п.6, причем указанная анти-gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).
8. Хитозановые наночастицы по любому из пп.1-7, причем хитозановые наночастицы предназначены для лечения нарушений в головном мозге.
9. Хитозановые наночастицы по п.8, причем нарушение в головном мозге представляет собой опухоль центральной нервной системы.
10. Хитозановые наночастицы по п.9, причем опухоль центральной нервной системы представляет собой мультиформную глиобластому.
11. Фармацевтическая композиция, предназначенная для назальной доставки, причем указанный состав содержит хитозановые наночастицы по любому из пп.1-10 и вспомогательное вещество, подходящее для интраназальной доставки.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, причем молекулы хитозана характеризуются молекулярной массой, составляющей 45-55 кДа.
13. Фармацевтическая композиция по п.11 или 12, в которой коэффициент полидисперсности указанных частиц составляет 0,15-0,40.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-13, в которой миРНК нацеленно воздействует на ген в головном мозге.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, в которой указанный ген представляет собой галектин 1 и указанная миРНК представляет собой антигалектин 1 (анти-gal1) миРНК, нацеленно воздействующую на галектин 1.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, в которой анти-gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-16, в которой указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения нарушений в головном мозге.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, в которой нарушение в головном мозге представляет собой опухоль центральной нервной системы.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, в которой опухоль центральной нервной системы представляет собой мультиформную глиобластому.

20. Способ получения хитозановых наночастиц по любому из пп.1-10, причем указанный способ предусматривает следующие стадии:

1) растворение полимеров хитозана, характеризующихся молекулярной массой, составляющей 30-60 кДа, в уксуснокислом растворе;

2) растворение миРНК в растворе отрицательно заряженного соединения, подходящего для поперечного сшивания полимеров хитозана;

3) добавление раствора, содержащего миРНК и указанное соединение для поперечного сшивания, к раствору полимеров хитозана согласно стадии 1) при перемешивании или смешивании указанных комбинированных растворов для получения образования суспендированных хитозановых наночастиц, содержащих миРНК;

4) сбор указанных хитозановых наночастиц с использованием фильтрования, центрифугирования или другой подходящей техники для выделения суспендированных наночастиц.

21. Способ по п.20, в котором указанные полимеры хитозана характеризуются молекулярной массой, составляющей 45-55 кДа,

22. Способ по п.20 или 21, в котором 30-60 мкг миРНК добавляют на мг хитозана.

23. Способ лечения нарушения у пациента, предусматривающий стадию введения указанному пациенту посредством интраназальной доставки эффективного количества хитозановых наночастиц по любому из пп.1-10.

24. Способ по п.23, при котором миРНК нацеленно воздействует на ген в головном мозге.

25. Способ по п.24, при котором указанный ген представляет собой галектин 1, и указанная миРНК представляет собой антигалектин 1 (анти-gal1) миРНК, нацеленно воздействующую на галектин 1.

26. Способ по п.25, при котором указанная анти-gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).

27. Способ по любому из пп.23-26, причем нарушение представляет собой нарушение в головном мозге пациента.

28. Способ по п.27, причем нарушение в головном мозге представляет собой опухоль центральной нервной системы.

29. Способ по п.28, причем опухоль центральной нервной системы представляет собой мультиформную глиобластому.

30. Применение хитозановых наночастиц по любому из пп.1-10 для интраназального лечения нарушения у пациента.

31. Применение по п.23, при котором миРНК нацеленно воздействует на ген в головном мозге.

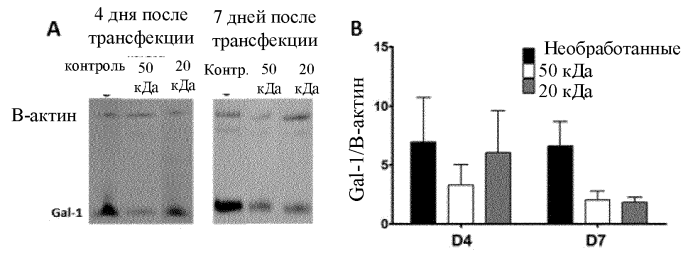
32. Применение по п.24, при котором указанный ген представляет собой галектин 1 и указанная миРНК представляет собой антигалектин 1 (анти-gal1) миРНК, нацеленно воздействующую на галектин 1.

33. Применение по п.25, при котором указанная анти-gal1 миРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере с 80% идентичностью последовательности относительно последовательности нуклеиновой кислоты 5'GCUGCCAGAUGGAUACGAA3' (SEQ ID NO: 1).

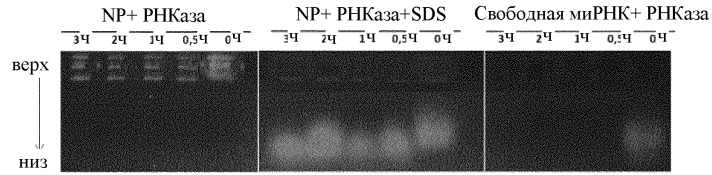
34. Применение по любому из пп.23-26, причем нарушение представляет собой нарушение в головном мозге.

35. Применение по п.27, причем нарушение в головном мозге представляет собой опухоль центральной нервной системы.

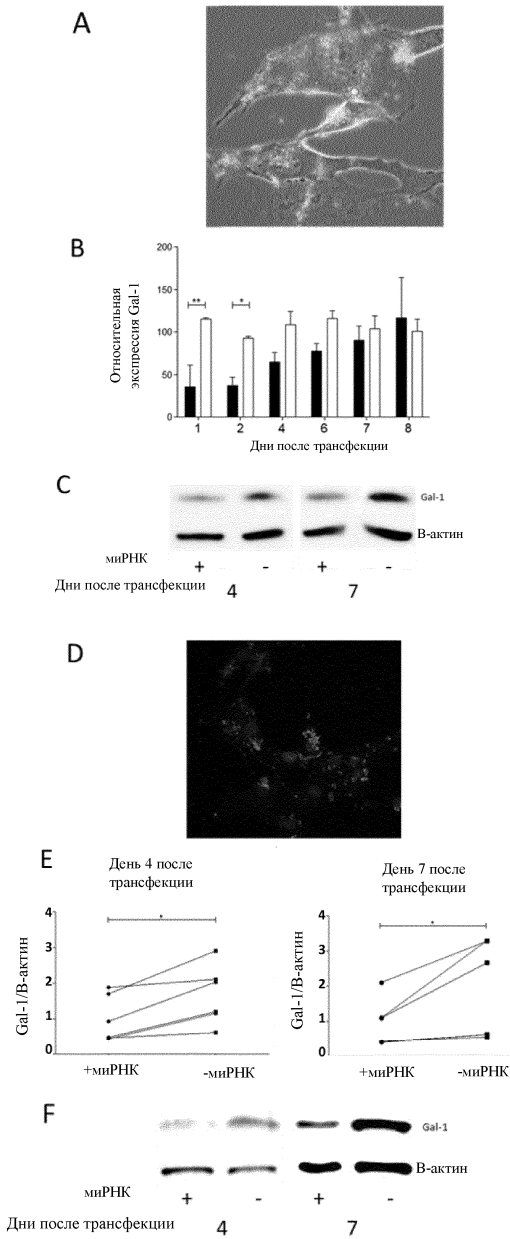
36. Применение по п.28, причем опухоль центральной нервной системы представляет собой мультиформную глиобластому.



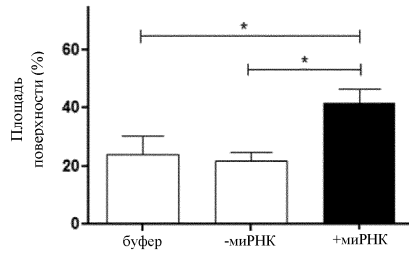
Фиг. 1



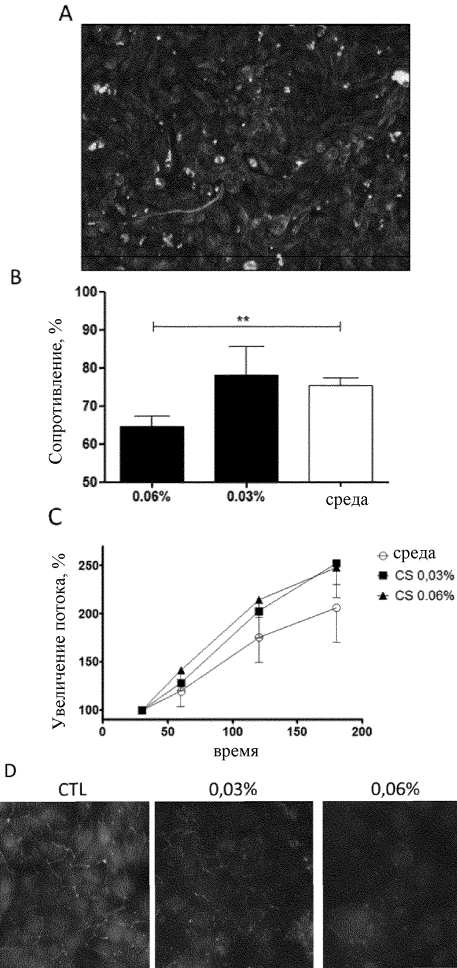
Фиг. 2



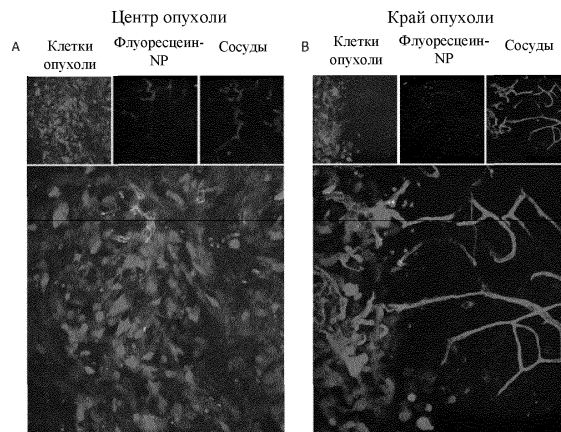
Фиг. 3



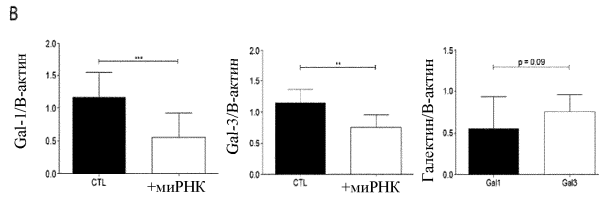
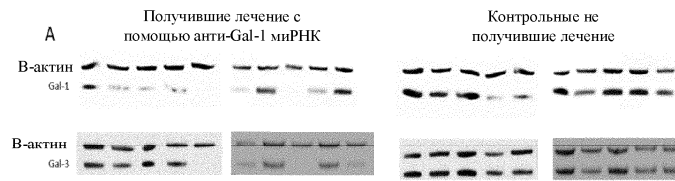
Фиг. 4



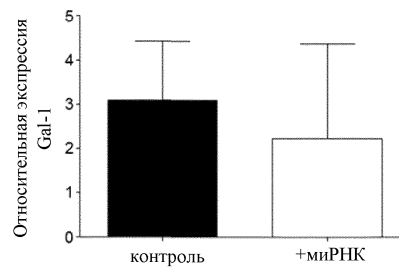
Фиг. 5



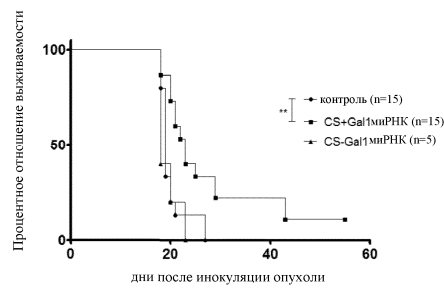
Фиг. 6



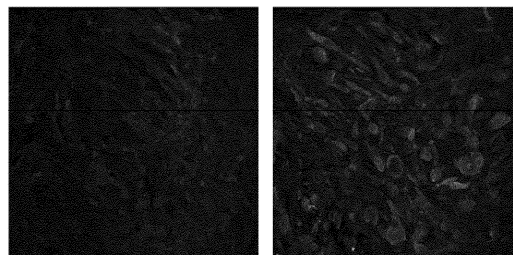
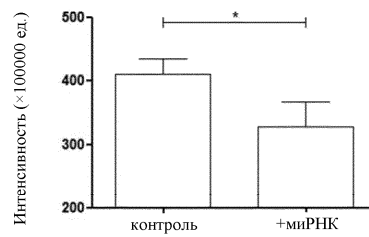
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Получившие лечение с помощью анти-Gal-1 миРНК мыши Контрольные не получившие лечение мыши

Фиг. 10

