

(11) Patent numeris: **4475**

(51) Int. Cl.⁶: **A61K 31/70**

(21) Paraiškos numeris: **97-027**

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 02 28**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1998 09 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1999 02 25**

(72) Išradėjas:

Virmantas Stunžėnas, LT

(73) Patent savininkas:

Virmantas Stunžėnas, Žaliųjų ežerų g. 1-13, 2021 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Informacinės ribonukleino rūgšties panaudojimas vaistinėse medžiagose, skirtose padidinti šios ribonukleino rūgšties koduojamo baltymo kiekį paciento ląstelėse

(57) Referatas:

Išradimas skirtas i-RNR panaudojimui bioaktyviose medžiagose, tarp jų - gydymui, profilaktikai, kosmetinei priežiūrai skirtose kompozicijose, reguliuojančiose fiziologines ir imunines reakcijas. Išradimo esmę sudaro tai, kad panaudojamas RNR, išskirtų iš ląstelių ir įleistų į paciento organizmą, sugebėjimas funkcionuoti kaip baltymų matrica bioaktyvių medžiagų gamybai ir naudojimui. Pasirinktų RNR kiekio recipiento organizme reguliavimas suteikia šias galimybes:

- įleidžiant į organizmą pasirinktas RNR, galima užtikrinti arba padidinti recipiento organizme reikiamų baltymų junginių arba kitų medžiagų, kurių sintezėje dalyvauja baltymų junginiai, gamybą;
- įleidžiant į organizmą pasirinktas RNR, koduojančias antigeninių medžiagų baltymus, galima sumažinti imuninį atsaką į konkrečius baltymus, jų junginius arba kitas imunogeniškas medžiagas (tarp jų transplantuojami organai, ląstelės), kurių sudėtyje yra tam tikri baltymai;
- pašalinant iš naudojamų antigeninių medžiagų RNR, koduojančias antigeninių medžiagų baltymus, galima padidinti imuninį atsaką į konkrečius baltymus, jų junginius arba kitas imunogeniškas medžiagas (pavyzdžiui, pirmuonis, helmintus, virusus, vėžines ląsteles).

Informacinės ribonukleino rūgšties panaudojimas vaistinėse medžiagose, skirtose padidinti šios ribonukleino rūgšties koduojamo baltymo kiekį paciento ląstelėse

Technikos sritis

Išradimas skirtas ribonukleino rūgščių panaudojimui vaistinėse medžiagose, tarp jų gydymui, profilaktikai, kosmetinei priežiūrai skirtose kompozicijose, vakcinose, transplantantuose.

Technikos lygis

Ribonukleino rūgštis (toliau RNR) yra vientisas, nesišakojantis biopolimeras, sudarytas iš ribonukleotidų. RNR, tiesiogiai dalyvaujanti baltymų sintezėje, yra trijų rūšių: ribosominė, transportinė ir informacinė. Pagrindinė iš jų - informacinė RNR (toliau iRNR)- sintezuojama ant DNR matricos ir perduoda visą informaciją apie baltymo aminorūgščių seką į baltymo sintezės vietą, kur šios RNR pagrindu, dalyvaujant ribosominei RNR ir transportinei RNR, sintezuojami baltymai (Lewin B. Genes 1983, New York; Saenger W. Principles of nucleic acid structure 1984, New York, Berlin).

Kaip vieną iš akivaizdžiausių analogų galima nurodyti pačių baltymų panaudojimą vaistinėse medžiagose. Baltymai, baltymų junginiai yra vieni svarbiausių organizmo struktūrinių ir funkcinių elementų. Baltymų junginiai (hormonai, imunoglobulinai, fermentai ir antibiotikai) labai plačiai naudojami gydymui, kosmetinei priežiūrai. Šie junginiai yra tiesiogiai įleidžiami į paciento organizmą. Tačiau net ir nedidelės baltymo molekulės, 5000 molekulinės masės ar net mažesnės, sukelia imuniteto reakciją ir antikūnų gamybą (Фримель Х., Брок И. Основы иммунологии. 1986, Москва.). Būtent, didesnio dydžio baltymų junginiai dalyvauja imuniteto valdyme (imunoglobulinai, interferonai, interleukinai, jų receptoriai) arba beveik visose svarbiausiose organizmo fiziologinėse reakcijose (fermentai, hormonai, ląstelių receptoriai) (Freund M., Link H., Schmidt R.E., Welte K. Cytokines in hemopoiesis, oncology and AIDS II 1992 Berlin). Todėl daugelio baltymų junginių panaudojimas gydomųjų medžiagų gamyboje yra

apsunkintas arba neįmanomas dėl didelio baltymų junginių imunogeniškumo arba jų nestabilumo išskyrus juos iš ląstelės.

Specifinį imuniteto slopinimą galima pasiekti, naudojant baltymų, prieš kuriuos norima sukurti recipiento imuniteto toleranciją, tirpalus (Vidard L., Colorusso L.J. & Benacerraf B. Specific T-cell tolerance may be preceded by a primary response. *Immunology*. 1994, p5627-5631.; Buelow R., Burlingham W.J. & Clayberger C. Immunomodulation by soluble HLA class I. *Transplantation*. 1995, p649-654.; Ziegler-Heitbrock H.W.L. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *Journal of Inflammation*. 1995, p13-26). Naudojant šį būdą iškyla keletas techninių sunkumų: sunku išskirti grynus baltymus ir gauti jų homogeniškus tirpalus; labai didelė optimalių sąlygų įvairovė skirtingų baltymų tirpalų stabilumui; skirtingų baltymų tirpalų tolerogeniškos ir imunogeniškos koncentracijos yra skirtingos, be to, tai priklauso nuo daugelio faktorių.

Vėžinių ląstelių vystymąsi galima stabdyti įvairiais metodais (Jackevičius A. Piktybinių navikų gydymas 1984, Vilnius). Plačiausiai yra paplitę metodai, kurie ardo arba inaktyvuoja nukleino rūgštis arba stabdo jų sintezę. Prie šio išradimo analogų reikia priskirti naudojamus antibiotikus (Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. 1987, Москва), kurie stabdo DNR, RNR, baltymų sintezę ne tik vėžinėse, bet ir kitose paciento ląstelėse.

Žinomi įvairūs imunogeninių medžiagų (tame tarpe vakcinų) gamybos būdai, naudojant nusilpnintus, negyvus patogenus, jų baltymus, dirbtinius antigenus (Cease K.B. & Berzofsky J.A. Toward a vaccine for AIDS: the emergence of immunobiology based vaccine development. *Annual Review of Immunology*. 1994, p923-989.; Heidrich H.G. Parasites and vaccination. *Parasitology in focus*. 1988, p719-731.; Wynn T.A., Jankovic D., Hieny S., Cheever A.W. & Sher A., IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. *The Journal of Immunology*. 1995, p4701-4709). Tačiau yra faktų, kad parazitai savo RNR naudoja išvengti šeimininko imuniteto (Tato P., Castro A.M., Rodriguez D., Soto R., Arechavaleta F. & Molinari J.L. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitology Research*. 1995, p181-187). Nors kai kuriais atvejais, gaminant priešvirusines vakcinas, virusai inaktyvuojami švitinant ultravioletiniais spinduliais, vėžinių ląstelių

imunogeniškumą galima padidinti ir rentgeno spinduliais arba spinduline radiacija; tačiau nėra žinoma, kad tikslingai pašalinant iš farmacinių kompozicijų RNR ir po to panaudojant pasirinktą iRNA, būtų siekiama padidinti šių medžiagų imunogeniškumą.

Kaip artimiausią analogą galima nurodyti Rabbani Elazar paskelbtą patentinę paraišką (15.06.94 EP 0 601 585 A2). Šiame išradime siūloma reguliuoti imunitetą, įleidžiant į ląstelę DNR, koduojančias baltymus, reguliuojančius ląstelės imuninį aktyvumą. Teoriškai tai ir pavojingas (įterpus DNR į genomą - procesas bus negrįžtamas), sudėtingas ir nepatikimas būdas (nedidelė tikimybė, kad pasiseks aktyvuoti įleistą DNR). Man nėra žinomas praktinis šio išradimo realizavimo rezultatas.

Išradimo esmė

Siūlymas pasirinktą informacinę RNR panaudoti vietoj baltymų vaistinių medžiagų gamyboje remiasi tuo, kad egzogeninė RNR sugeba pereiti ląstelės membraną ir funkcionuoti kaip baltymų matrica ląstelės viduje. Tokiu būdu į organizmo ląsteles tiesiogiai galima įleisti fermentus, hormonus, antibiotikus, ląstelės receptorių baltymus, struktūrinius baltymus. Kartu su informacine RNR galima įleisti ribosomines ir transportines RNR. Į recipiento organizmą įleidus RNR, koduojančią konkretų hormoną arba antibiotiką, ląstelės receptorių baltymus arba struktūrinius baltymus, šios medžiagos bus sintezuojamos tiesiog recipiento ląstelėse. RNR naudojimas vietoj baltymų junginių yra pranašesnis už kitus analogus jau vien tuo, kad RNR neturi imunogeniškų savybių, todėl nesukelia nepageidaujamų uždegiminių reakcijų. Lyginant su DNR panaudojimu vaistinėse medžiagose, iRNR panaudojimas yra pranašesnis tuo, kad iRNR kiekį organizme galima lengvai kontroliuoti, nes iRNR be DNR įprastom sąlygom organizme nesireplikuoja, be to ant iRNR, patekusios į ląstelę, gali būti tuoj pat sintezuojamas baltymas, kas neįmanoma su DNR, ši savybė padaro iRNR patikimesniu už DNR baltymo kiekio paciento organizme reguliatoriumi.

Įleidžiamos RNR koncentracija gali būti parenkama labai plačiame diapazone: nuo 0,00000001mg/ml iki 5mg/ml. RNR koncentracija priklauso nuo naudojamos RNR, sprendžiamų uždavinių, ląstelių membranų pralaidumo, ribonukleazų aktyvumo ir kitų faktorių. Pritaikius šį metodą, atsiveria naujos galimybės bioaktyvių medžiagų gamyboje,

naujų vaistų paieškai ir įsisavinime: nebereikia bioaktyvių baltymų išskirti ir išgryninti, užtenka naudoti jau žinomus ir išbandytus RNR išskyrimo metodus; galima derinti įvairiausias bioaktyvias medžiagas, kurios gali egzistuoti ir normaliai funkcionuoti tik ląstelės viduje. Daugeliu atvejų, norint šiuo metodu naudoti jau žinomas medžiagas, nereikia iš esmės keisti jų gamybos technologijos, užtenka pasinaudoti esama, tik vietoj baltymų junginių reikia išskirti RNR.

Tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad tuo atveju, kai išskirta RNR nėra adeniliuota, tai būtina atlikti, norint padidinti jos stabilumą ir padaryti tinkamą transliacijai eukariotinėse ląstelėse. Kai kuriais atvejais gali iškilti būtinybė įleisti kartu su norimą baltymą koduojančia iRNR ir iRNR baltymo, be kurio pagalbos nebūtų optimalios transliacijos arba baltymas būtų nepakankamai aktyvus.

Ne visuomet būtina naudoti žinomus baltymus koduojančią RNR. Galima naudoti RNR, išskirtą iš atitinkamai aktyvuotų tam tikrų ląstelių. Pavyzdžiui, išskirta bendra RNR iš kultūroje besidalijančių eukariotinių ląstelių galima stimuliuoti regeneracijos procesus paciento pažeistuose organuose: įleista RNR stimuliuos baltymų sintezę pažeisto organo ląstelėse, o tai skatins šių ląstelių spartesnę dauginimąsi ir mediatorių sintezę. Tačiau, norint užtikrinti pilnaverčių ląstelių dauginimąsi, reikia naudoti ir pažeistam organui arba audiniui būdingas RNR. Manau, kad RNR gali būti naudojamos net embriono vystymosi sutrikimų korekcijai, įleidžiant į pasirinktą embriono organą arba į jo užuomazgą RNR, koduojančias baltymus, skatinančius arba stabdančius ląstelių sąveiką, jų dauginimąsi ir specializaciją.

Gydant vėžinius, virusų, parazitų ar kitų patogenų sukeltus susirgimus, svarbu apriboti patogenų ar vėžinių ląstelių sintezuojamų RNR transliaciją imunokompetetingose paciento ląstelėse. Tai galima padaryti, įleidžiant į paciento organizmą arba tiesiai į pažeistą organą RNR, kuri nekoduotų patogeninių ląstelių ar parazitinių organizmų baltymų junginių. Geriausia naudoti RNR, išskirtą iš aktyvuotų imuninių ląstelių, arba iRNR, koduojančias imunines ląsteles aktyvuojančius baltymų junginius, jų receptorius. Galima naudoti ir bet kokias kitas iRNR, kurios, susijungusios su ribosomomis, konkuruotų su patogenų iRNR ir stabdytų jų transliaciją.

Dauguma priešvėžinių preparatų ir gydymo metodų mažina RNR sintezę ir bendrą jos kiekį visame organizme. Šiuos preparatus ir gydymo metodus tikslinga papildyti RNR

preparatų panaudojimu. Įleidžiant iRNR galima ne tik blokuoti vėžinių ląstelių iRNR sintezę imunokompetetingose ląstelėse, bet ir, atitinkamai parinkus iRNR, atstatyti baltymų junginių sintezę jose. Kita šio metodo pusė yra ta, kad vėžinėse ląstelėse bus sintezuojami ne vėžinių ląstelių poreikiams reikalingi baltymų junginiai, o tai sumažins šių ląstelių piktybiškumą.

Šiame išradime siūlomas imuninės tolerancijos indukcijos metodas remiasi principu, kad imunokompetetingos ląstelės nestimuliuoja imuninių reakcijų prieš tuos baltymo junginius, kuriuos jos pačios sintezuoja. Šis metodas numato, kad prieš įleidžiant į paciento organizmą baltymų junginius, persodinant audinius ir organus, recipiento imunokompetetingos ląstelės turi būti inkubuotos su RNR, kurių pagrindu yra sintetinami baltymų junginiai, turintys analogiškas imunogeniškas savybes, kaip ir įleidžiamos medžiagos ar persodinami audiniai ir organai. Imunokompetetingos ląstelės su RNR gali būti inkubuotos bent dviem būdais: 1) įleidžiant RNR tiesiai į paciento organizmą (galima suleisti į veną ar į numatomos operacijos vietą, arba įleisti bet koku kitu žinomu būdu); 2) išskirtas ląsteles (pavyzdžiui iš paciento kraujo) sumaišyti su RNR, o tada grąžinti atgal arba įleisti (jei ląstelės paimtos iš donoro) į paciento organizmą. Iš paciento organizmo galima išskirti ir vieną grupę imunokompetetingų ląstelių, pavyzdžiui, makrofagus (jie geriausiai absorbuoja ekzogenines medžiagas ir yra svarbiausi pirminėje imuninėje reakcijoje) arba bet kokią kitą grupę ląstelių, priklausomai nuo sprendžiamų uždavinių. Šiuo būdu RNR galima įvesti į recipiento organizmą ne tik slopinant imunines reakcijas, bet ir norint sukelti pageidaujamų baltymų arba jų junginių sintezę.

Persodinant audinius, organus, turi būti naudojamos RNR, koduojančios audinių suderinamumo komplekso baltymus, atitinkančius donoro baltymus ir besiskiriančius nuo recipiento. Galima pagaminti arba išskirti RNR, koduojančias atskirus audinių suderinamumo komplekso baltymus, kurių reikiamos kombinacijos būtų naudojamos slopinti recipiento imunogeninių ląstelių aktyvavimą prieš persodinamus donoro audinius. Dar paprasčiau tai būtų galima padaryti, naudojant RNR, išskirtas iš donoro organizmo audinių (pavyzdžiui, kraujo ar kraujo ląstelių). Ne visuomet reikia naudoti RNR, koduojančią audinių suderinamumo komplekso baltymus: in vitro nustačius prieš kokius baltymų junginius išsivysto imunogeninės reakcijos, yra parenkamos šiuos baltymus

atitinkančios RNR, skirtos slopinti recipiento imuniteto reakcijas prieš transplantantą arba transplantanto prieš recipientą.

Persodinant audinius, organus iš vieno organizmo į kitą, dažnai atsiranda komplikacijos dėl donoro imuniteto ląstelių aktyvumo prieš recipiento organizmą. Šių komplikacijų galima išvengti ar bent sumažinti jas, naudojant kompozicijas su RNR, koduojančias recipiento antigenus atitinkančius baltymus. Šios kompozicijos prieš transplantaciją inkubuojamos su transplantuojamais audiniais, organais, ląstelėmis. Taip pat galima į recipiento organizmą įleisti donoro ląsteles kartu su RNR, koduojančiomis baltymus, turinčiais recipiento antigenų savybes.

Ši tolerancijos indukcijos metodą galima naudoti ne tik transplantacijai arba antigeninių medžiagų įvedimui. Norint gydyti nevaisingumą ir nėštumo komplikacijas - kylančias dėl nepakankamo placentos imunosupresinio aktyvumo - farmacinėse kompozicijose imuninėms reakcijoms prieš vaisiaus antigenus slopinti galima naudoti RNR, koduojančias baltymus, turinčius analogiškas antigenines savybes vaisiaus baltymams, sukeliantiems komplikacijas. Kai nevaisingumo priežastis yra imunizacija prieš kiaušinėlio išorinio sluoksnio antigenus, gydyti galima farmacinėmis kompozicijomis, turinčiomis RNR, koduojančias kiaušinėlio išorinio sluoksnio antigenus. Pastaraisiais dviem atvejais numatoma, kad RNR bus transliuojama imuninėse ląstelėse, kas susilpnins arba padarys neįmanomas imunines reakcijas prieš vaisių.

Autoimuninių susirgimų procesą taip pat galima reguliuoti farmacinėmis kompozicijomis, kuriose naudojamos RNR. Nustačius, prieš kuriuos baltymų junginius gaminami imunoglobulinai, reikia gydyti šiuos imunogenus koduojančiomis RNR, kurių pagrindu imunokompetetingose ląstelėse sintezuojamos medžiagos, turinčios antigenines savybes, analogiškas paciento audiniams, prieš kuriuos nukreiptos autoimuninės reakcijos. Kadangi dažnai autoimuniniai susirgimai kyla dėl infekcinių mikroorganizmų, toks gydymas, neslopinant bendro organizmo imuniteto, leistų gydant pašalinti iš organizmo ligos sukėlėjus.

Ne visuomet būtina naudoti atskirtą nuo baltymo RNR. Žinant, kad ir baltymo tirpalas gali būti tolerogenu, kai kuriais atvejais geresnių rezultatų galima pasiekti naudojant kartu RNR ir jos koduojamo baltymo tirpalą.

Saugant ir prieš įleidžiant RNR reikėtų padidinti jos stabilumą. Tai gana lengvai galima pasiekti, naudojant augalų RNR iš viruso genomo. Išskirta iRNR tampa kelis kartus stabilesnė, kai sumaišoma su augalo viruso genomo RNR. Iš man žinomų tam tinkamiausias yra vignos mozaikos viruso genomas (Monk, M., Mamalian development a practical approach. 1987, Oxford). Dar patrauklesnis yra rekombinantinių RNR virusų su įterptomis į jų genomą reikalingomis RNR sekomis panaudojimas.

Pageidautina, kad prieš įleidžiant egzogeninę RNR, paciento ląstelėse būtų kaip galima mažiau recipiento RNR. Tai gan lengvai galima pasiekti vartojant vaistus (tikrų ir antibiotikų), laikinai inhibuojančius RNR sintezę. Tai turėtų būti taikoma visais atvejais, kai siekiama kaip galima didesnio įleistų RNR produktyvumo.

Įleidus RNR į paciento organizmą, yra didelė tikimybė, kad iki pasiekdama transliacijos vietą, RNR gali būti suardyta ribonukleazių. Todėl būtų logiška kartu su RNR įleisti ir ribonukleazių inhibitorių. Iš man žinomų tam geriausiai tikrų inhibitorius, išskirtas iš placentos. Tačiau šis inhibitorius gali būti imunogeniškas, todėl jį reikėtų vartoti kartu su jį koduojančia RNR, arba kai recipiento imunitetas yra susilpnintas (pavyzdžiui, po spindulinės terapijos).

Norint panaudoti RNR bioaktyviose kompozicijose, ne visuomet lengvai galima atskirti vieną baltymą koduojančią RNR nuo kitų, vienos rūšies RNR nuo kitos. Tiesa, toli gražu ne visais atvejais tai yra būtina. Pavyzdžiui, jei gaminamos farmacinės kompozicijos (transplantanto atmetimo reakcijoms slopinti) su atitinkamo audinių suderinamumo komplekso baltymus koduojančiomis iRNR, visai nėra būtina atsikratyti visų kitų RNR, jos gali būti naudingos ląstelių regeneracijos funkcijų atstatymui, ypač, jei naudojami antibiotikai, slopinantys RNR sintezę.

Siūlomas iRNA panaudojimas imunogeninių medžiagų (tame tarpe vakcinų) gamybai, remiasi prielaida, kad susilpnintuose ar nebegyvuose patogeniniuose organizmuose esanti RNR gali stimuliuoti recipiento toleranciją aukščiau aprašytu būdu, o didesnė imunogeniškų medžiagų įvairovė (ne atskiri baltymai ar jų junginiai) gali sukurti stabilesnį imunitetą prieš šį patogeną. Šis imunogeniškumo padidinimo metodas pirmiausia gali būti taikomas, kada inaktyvuoti patogenai naudojami kaip imunogeninės medžiagos. Patogeno RNR gali būti suardoma ultravioletiniais spinduliais, rentgeno spinduliais, spinduline radiacija arba kitomis cheminėmis medžiagomis, turinčiomis RNRazių savybių. Geriausi

rezultatai būtų gaunami, naudojant RNR inaktyvacijos metodų kombinacijas. Galutinį produktą reikia kontroliuoti koku nors žinomu ir konkrečiom sąlygom tinkamu metodu, nustatant RNR likutį. Po to vakciną galima papildyti ne patogeno iRNA. Tinkamiausia būtų vakciną papildyti iRNR, koduojančiomis baltymus dalyvaujančius imunines ląstelių sąveikoje. Pageidautina, kad iRNR koduotų imunoglobulinus, kurie susirįstų su vakcinos antigenais, bet ne su paciento.

Pirmas klausimas, kuris kyla, norint RNR tiesiogiai naudoti bioaktyvių kompozicijų, bioaktyvių medžiagų gamyboje - iš kur paimti reikiamą kiekį RNR. Priklausomai nuo sprendžiamo uždavinio, RNR galima išskirti iš donoro kraujo, kraujo ląstelių, atitinkamų organų, gyvūnų audinių arba bet kokių kitų gyvų organizmų, taip pat naudojamų biotechnologinėje pramonėje. Dabartinė biotechnologija leidžia kultivuoti mikroorganizmus, virusus su įterptais į jų genomą DNR (jie gali būti nukopijuoti nuo pasirinktos RNR) arba RNR fragmentais, kurie ir būtų RNR sintezės pagrindas augaluose, dumbliuose arba mikroorganizmų kultūrose.

Ne visuomet pageidaujamų rezultatų galima pasiekti, naudojant tik aukščiau aprašytus metodus. Dažnai yra būtinas įvairių žinomų metodų derinimas. Šiame aprašyme siūlomi metodai gali būti pagrindiniai, bet gali būti ir pagalbinių, prie kitų gydymo ir terapijos metodų. Visais atvejais turi būti atsižvelgiama į konkrečią situaciją ir metodų suderinamumą laike ir erdvėje.

Išradimo realizavimo aprašymas

Visuose eksperimentuose panaudota RNR išskirta iš kepenų, paimtų iš pelių, numarintų eteriu. RNR išskirta naudojant fenolinį metodą, aprašytą knygoje: Monk, M., Mamalian development a practical approach, 1987, Oxford.

Vėžinių ląstelių vystymosi stabdymas.

Buvo atlikti eksperimentai su CC57W linijos pelėmis ir Erhlichio vėžinėmis ląstelėmis. Pelėms po oda ties mentim suleista po 0,2 ml vėžinių ląstelių suspensijos, paimtos iš vienos pelės peritoninės ertmės. Po 5, 19 ir 24 dienų šalia vėžinio auglio suleista po 0,2 ml, 0,03gr/ml koncentracijos fiziologiniame tirpale, RNR, išskirtos iš CC57W arba DBA linijų

pelių kepenų. Kontrolinio bandymo metu suleista po 0,2 ml fiziologinio tirpalo. Trisdešimtą dieną, po vėžinių ląstelių suleidimo, pelės numarintos eteriu. Atlikus skrodimą išimti vėžiniai augliai pasverti. Palyginus svorį vėžinių auglių, paimtų iš pelių, kurioms buvo suleidžiamos skirtingų pelių RNR, nerasta skirtumų. Palyginus svorį auglių, paimtų iš pelių, gavusių RNR ir fiziologinį tirpalą, gauti patikimi skirtumai. Pelėse, kurioms buvo suleista RNR, patikimai buvo pristabdytas vėžinio auglio augimas (1 lentelė).

Transplantacijos eksperimentai.

Atlikti eksperimentai persodinant odos lopus nuo vienos linijos pelės ant kitos linijos pelės. Naudotos pelės DBA ir BALB linijų, jų RNR panaudota tolerancijos indukcijai kitos linijos pelėje. Kontrolei panaudota RNR, išskirta iš CBA linijos pelių. Likus vienai valandai iki persodinimo, pelėms į nugarą po oda suleista 0,3 ml, RNR 0,02 mg/ml koncentracijos fiziologiniame tirpale. Buvo persodinama vienos pelės 1 cm² oda, paimta nuo uodegos ant kitos pelės nugaros, prieš tai išpjovus atitinkamo dydžio odos lopą nugaroje. Visos transplantacijos operacijos atliktos su pelėmis, užmigdytomis eteriu. Palyginta atmetimo reakcijos dinamika: po kelių dienų prasidėjo transplantanto uždegimas; kada uždegimas apėmė visą transplantantą; kada visas transplantantas pasidarė nebegyvas (pajuodęs ir sukietėjęs). Rezultatai pateikti 2 ir 3 lentelėse. Kaip matome, su labai didele tikimybe galima teigti, kad RNR sulėtina transplantanto atmetimo reakcijas: DBA linijai, palyginus su kontrole, iki 4 dienų (transplantanto mirtis). BALB linijai transplantanto atmetimo reakcija prasidėjo 3 dienom vėliau negu kontrolinėje grupėje.

1 lentelė

Transplantuotų vėžinių ląstelių vystymosi stabdymas CC57W linijos pelėse

	RNR injekcijos	Fiziologinio tirpalo injekcijos
Bandymų skaičius	10	5
Piktybinio auglio svoris gramais	$4,02 \pm 0,80$	$5,24 \pm 1,12$
Reikšmingumo lygmuo Palyginimui naudotas Stjudento t-kriterijus	0,048	

2 lentelė

DBA linijos pelės transplantanto atmetimas BALB linijos pelėmis.

Transplantanto atmetimo stadija	Dienų skaičius po transplantacijos		Reikšmingumo lygmuo ***
	Suleista RNR		
	iš CBA *	iš DBA **	
Uždegimo pradžia	$7,8 \pm 0,5$	$10,8 \pm 0,8$	0,000025
Pilnas uždegimas	$11,0 \pm 0,0$	$13,2 \pm 0,4$	0,000001
Negyvas	$13,4 \pm 0,6$	$15,00 \pm 0$	0,000049

* Padaryti 5 persodinimai.

** Padaryti 6 persodinimai.

*** Palyginta naudojant Stjudento t-kriterijų.

3 lentelė

BALB linijos pelės transplantanto atmetimas DBA linijos pelėmis.

Transplantanto atmetimo stadija	Dienų skaičius po transplantacijos		Reikšmingumo lygmuo ***
	Suleista RNR		
	iš CBA *	iš BALB **	
Uždegimo pradžia	$9,7 \pm 0,8$	$13,4 \pm 0,9$	0,00049
Pilnas uždegimas	$11,0 \pm 1,6$	$14,6 \pm 1,7$	0,0049
Negyvas	$14,3 \pm 2,9$	$18,6 \pm 2,8$	0,034

* Padaryti 6 persodinimai.

** Padaryti 5 persodinimai.

*** Palyginta naudojant Stjudento t-kriterijų.

Išradimo apibrėžtis

1. Informacinės RNR (iRNR) panaudojimas vaistinėse medžiagose, skirtose padidinti šios RNR koduojamo baltymo kiekį paciento organizme.
2. iRNR panaudojimas pagal 1 punktą vaistinėse kompozicijose, kuriose vaistine medžiaga naudojama iRNR, koduojanti gydymui arba kosmetinei priežiūrai reikalingą baltymą.
3. iRNR panaudojimas pagal 1 punktą slopinti organizmo imuniteto reakcijas prieš baltymus arba jų junginius arba transplantuojamus audinius ir organus naudojama RNR, kuri stimuliuoja medžiagos, turinčios analogiškas naudojamoms medžiagoms antigenines savybes, sintezę.
4. iRNR panaudojimas pagal 1 punktą transplantanto imuninių ląstelių reakcijoms prieš recipiento organizmą sumažinti naudojama RNR, koduojanti antigeną, savo savybėmis atitinkantį recipiento antigeną.
5. iRNR panaudojimas pagal bet kurį iš 2 - 4 punktų, naudojama RNR kartu arba pakaitom su jos pagrindu sintezuotu baltymu arba jo junginiu.
6. iRNR panaudojimas pagal 1 punktą, naudojama RNR, konkuruodama su patogeno arba vėžinių ląstelių RNR, sumažina patogeno arba vėžinių ląstelių RNR koduojamų baltymų junginių sintezę imunokompetetingose ir kitose ląstelėse.
7. iRNR panaudojimas pagal 1 arba 6 punktą, RNR naudojama atstatyti arba pakeisti baltymų junginių sintezę po spindulinės arba cheminės terapijos.
8. iRNR panaudojimas pagal bet kurį iš 2 - 7 punktų siekiant padidinti RNR stabilumą, RNR naudojama kartu arba pakaitom su ribonukleazės inhibitoriumi, arba inkubuojama su virusu arba su RNR iš viruso genomo.
9. iRNR panaudojimas pagal bet kurį iš 2 - 8 punktų, RNR naudojama kartu arba pakaitom su medžiaga, slopinančia RNR sintezę.
10. iRNR panaudojimas pagal 1 punktą, RNR naudojama papildyti vakciną arba kitą medžiagą, skirtą suaktyvinti paciento imunitetą prieš šioje medžiagoje esančius antigenus, prieš tai iš šių medžiagų pašalinus arba inaktyvavus dalį arba visą RNR, dalyvaujančią sintezėje imunogeninių medžiagų, prieš kurias norima suaktyvinti paciento imunitetą.