

Когда и чем нанолечение лучше традиционных?

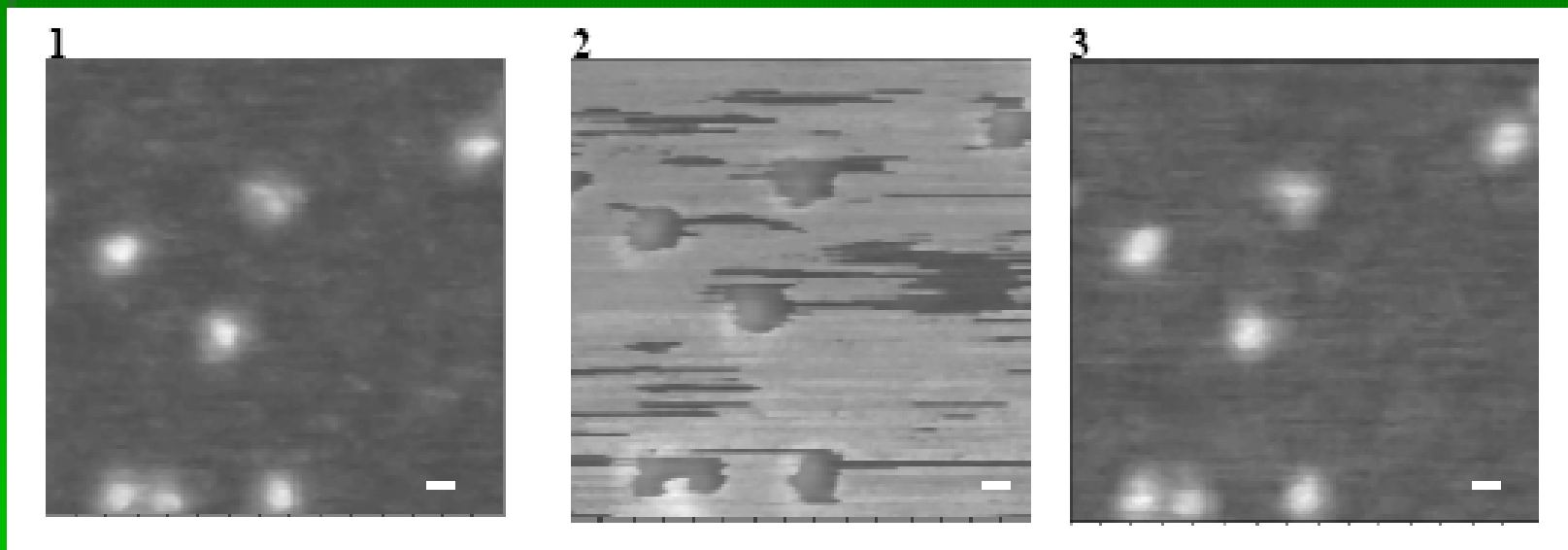
проф., д.х.н. Каплун А.П.

*Кафедра биотехнологии
МИТХТ им. М.В.Ломоносова*

Каковы границы нанотехнологий в медицине и биологии?

- Для физиков наночастицы – частицы, которые проявляют квантовые свойства **>10 нм.**
- Есть ли граница в этой области для биологических объектов?

Размеры IgG (Мм 150 кДа) около 10 нм (атомно-силовая микроскопия)



Мне не известны какие-либо особые свойства белков с Мм меньше 150 кДа.

Какие известны граничные размеры (cutoff) в биологии?

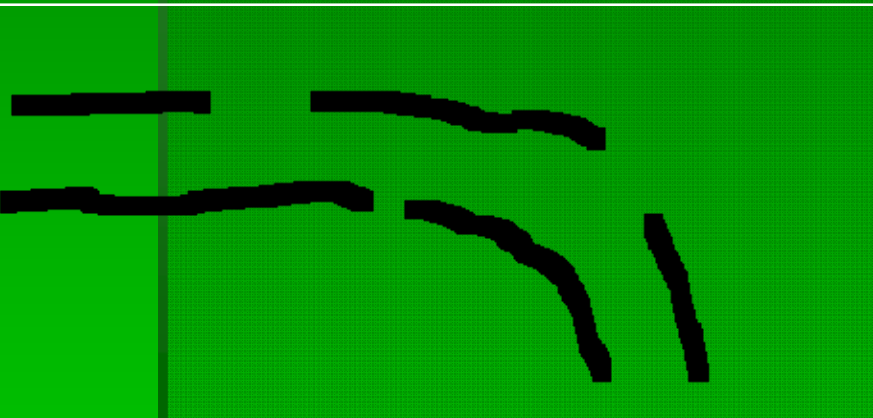
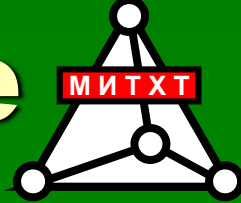
- Через почки выходят молекулы менее **25 кДа (~5 нм)**.
- В норме в капиллярах поры **<40 нм**.
- В капиллярах поры в зонах воспаления **до 200 нм**.

...

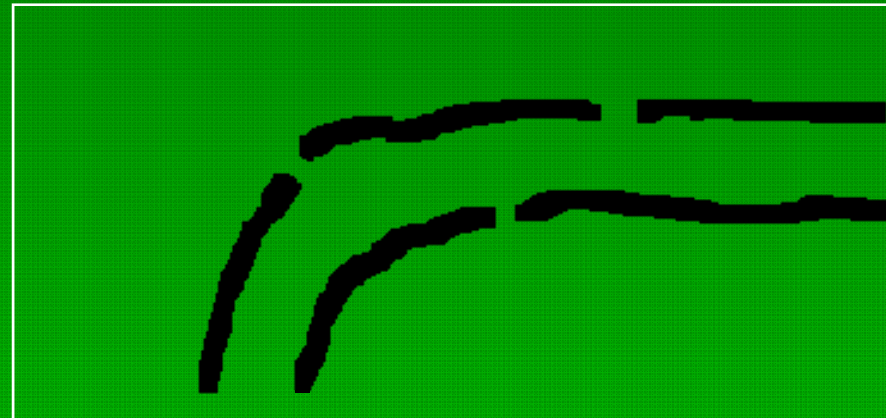
Что из этого следует?

- Молекулы (частицы) более 25 кДа долго циркулируют в крови, потому что не фильтруются через почки.
- Молекулы (частицы) более 40 нм еще дольше циркулируют в крови, потому что не выходят из капилляров.
- Молекулы (частицы) более 100 нм выходят из капилляров только в зонах воспаления (например, в раковые опухоли).

Пассивное нацеливание – важнейшее свойство наночастиц

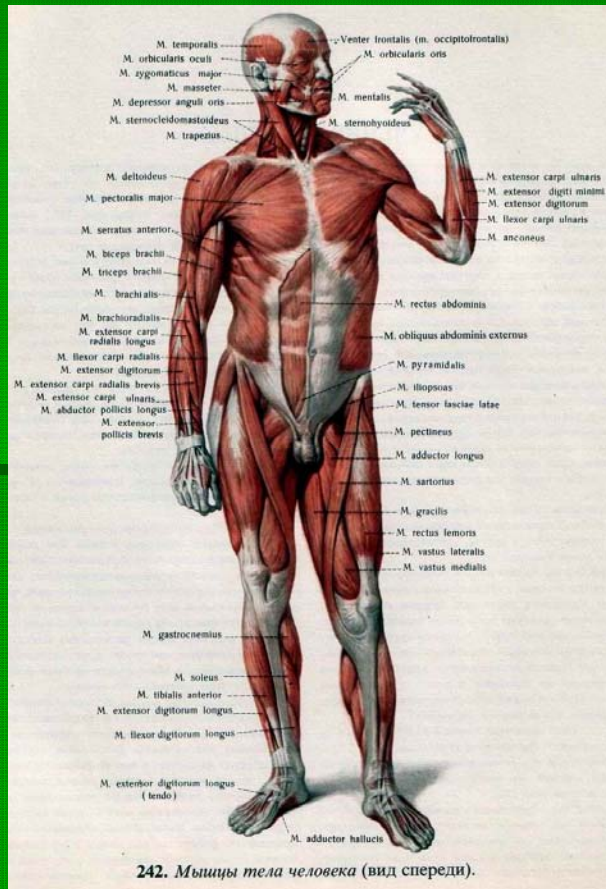
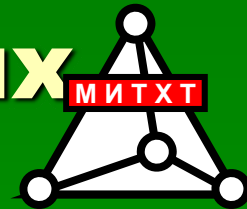


В области воспаления



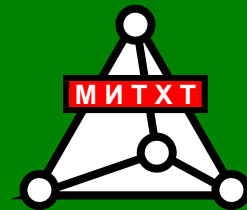
В нормальных тканях

Принципиальное ограничение эффективности современных лекарств – малая селективность



242. Мышцы тела человека (вид спереди).

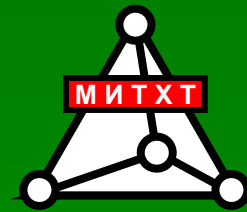
Только **1%** принятого лекарства попадает в цель. Остальное количество распределяется по всему организму, вызывая побочные эффекты



Почему нано-?

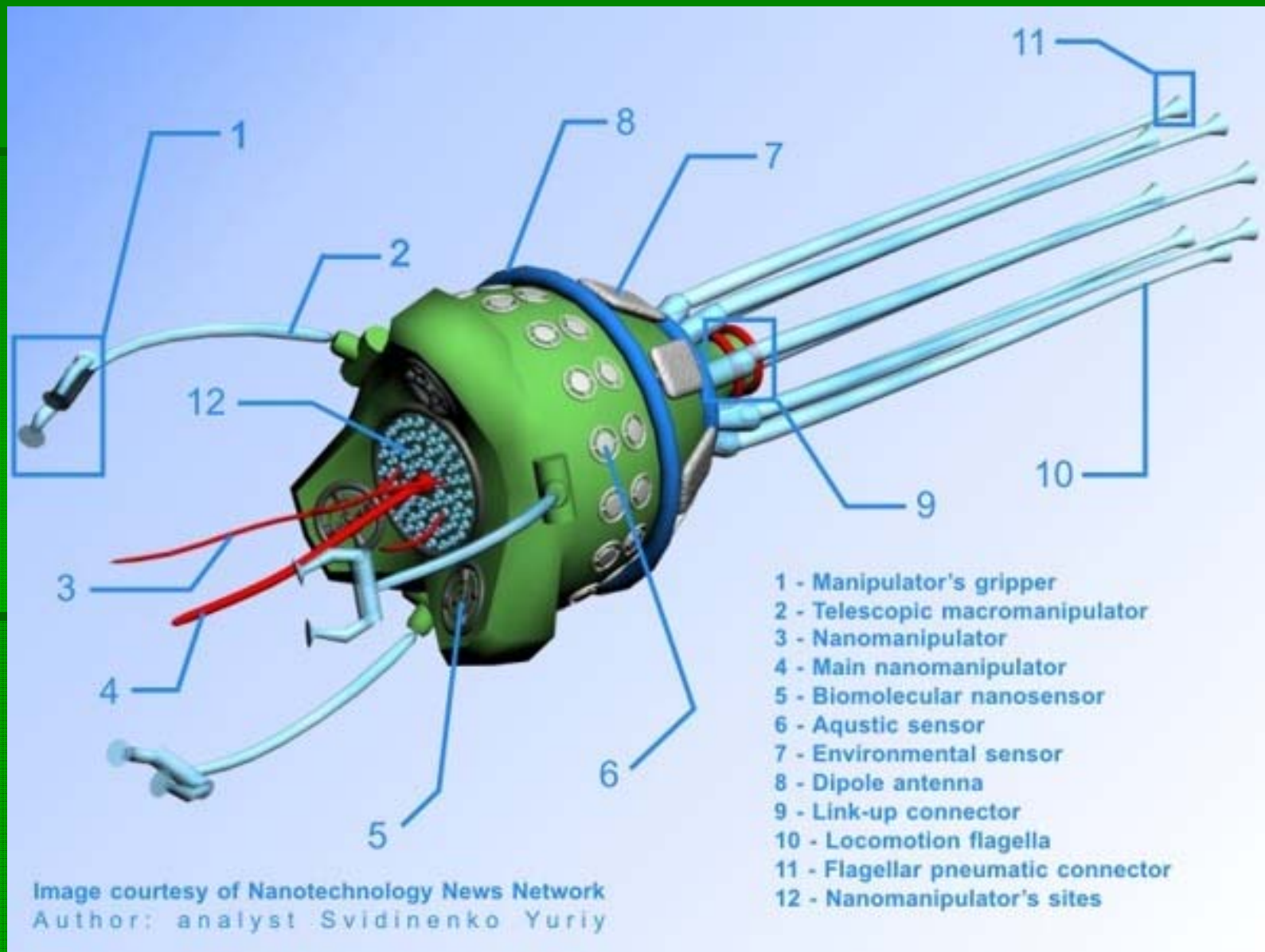
- Основным объектом воздействия современной медицины является клетка и во многих случаях макромолекулы (ДНК, белки)
- Размер клеток 7-20 мкм; диаметр двойной спирали ДНК 2.4 нм; понятно, что инструменты должны быть того же порядка, что и объект, т.е. **нанометрового** диапазона

Куда идем?

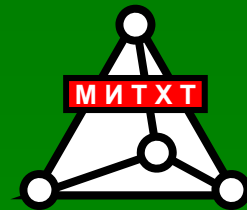


- Декларируемая "конечная цель" наномедицины - создание нанороботов-лекарей для адресной доставки:
 - лекарственной субстанции,
 - устройств для манипуляций над молекулами, над клетками

Безумство нанохудожников



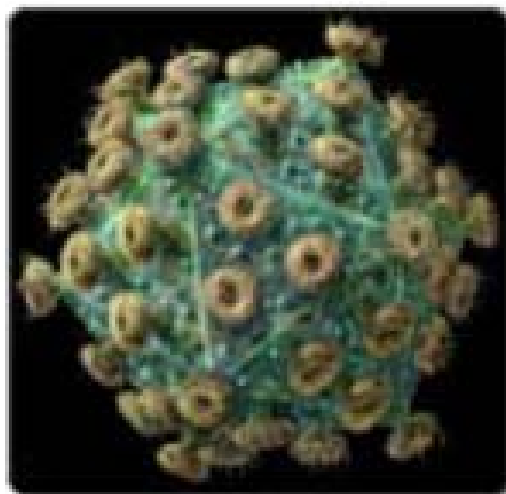
Что сейчас?



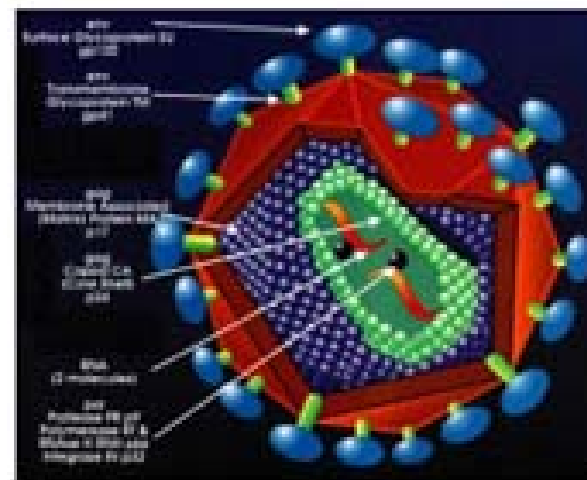
Доставка лекарственных и диагностических субстанций в нужное место лучше, чем в среднем

Вирусы – эффективные природные переносчики нуклеиновых кислот, векторы для **генной терапии**

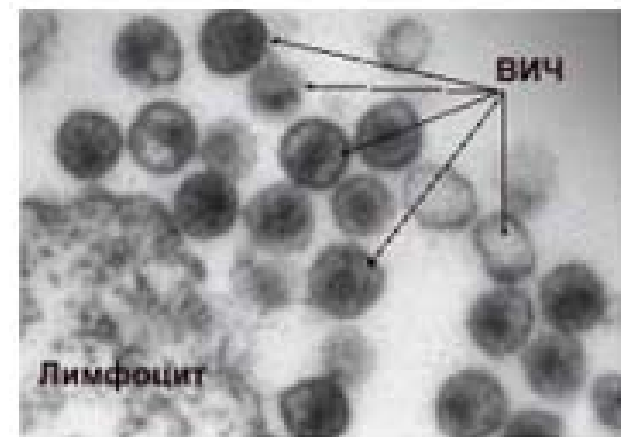
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), размер частиц 0.1-0.15 мкм

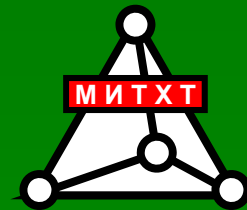


В каждой частице находятся 2 молекулы вирусной РНК, несущие 9 генов



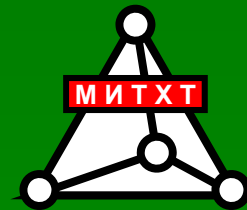
ВИЧ инфицирует лимфоциты - клетки иммунной системы (микротография)





Программа действий нанороботов-лекарей

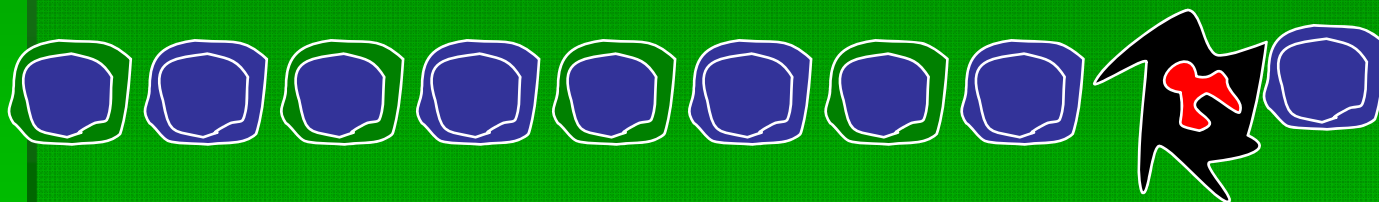
- Поиск клеток-мишеней
- Доставки к ним субстанции для лечения или обнаружения (диагностики)
- Проникновение в клетки-мишени
- Выгрузка содержимого
- Разборка на безвредные части



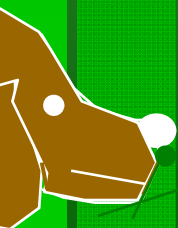
Итак, ключевые понятия

- направленный транспорт,
- прохождение барьеров,
- контролируемое высвобождение

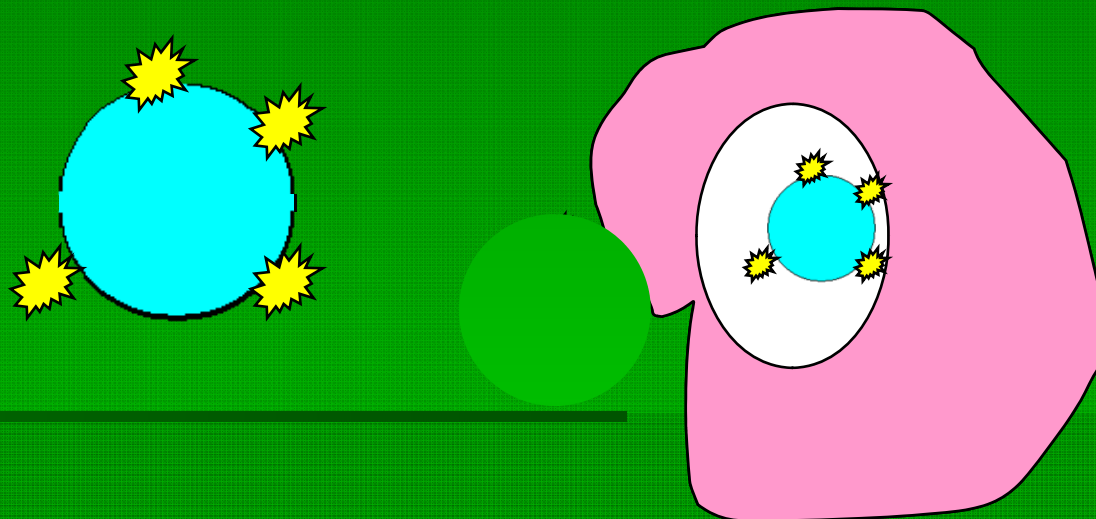
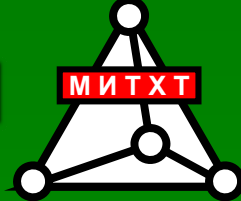
Поиск клеток-мишеней



- Раковые клетки
- Клетки, зараженные вирусом
- Атеросклеротические бляшки
- Сенильные бляшки
- Поврежденные органы
- ...

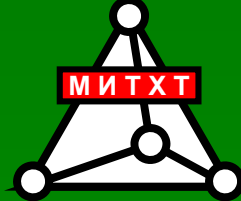


Естественные мишени для наночастиц - макрофаги

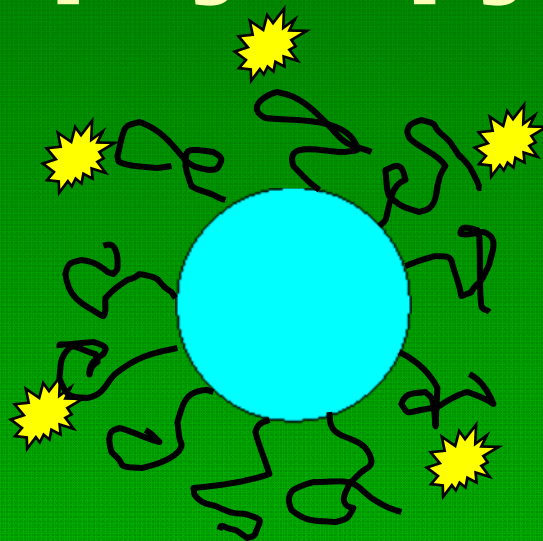


Наночастицы на себе сорбируют из крови белки, которые узнаются и поглощаются макрофагами.

Это уменьшает время циркуляции наночастиц в крови.



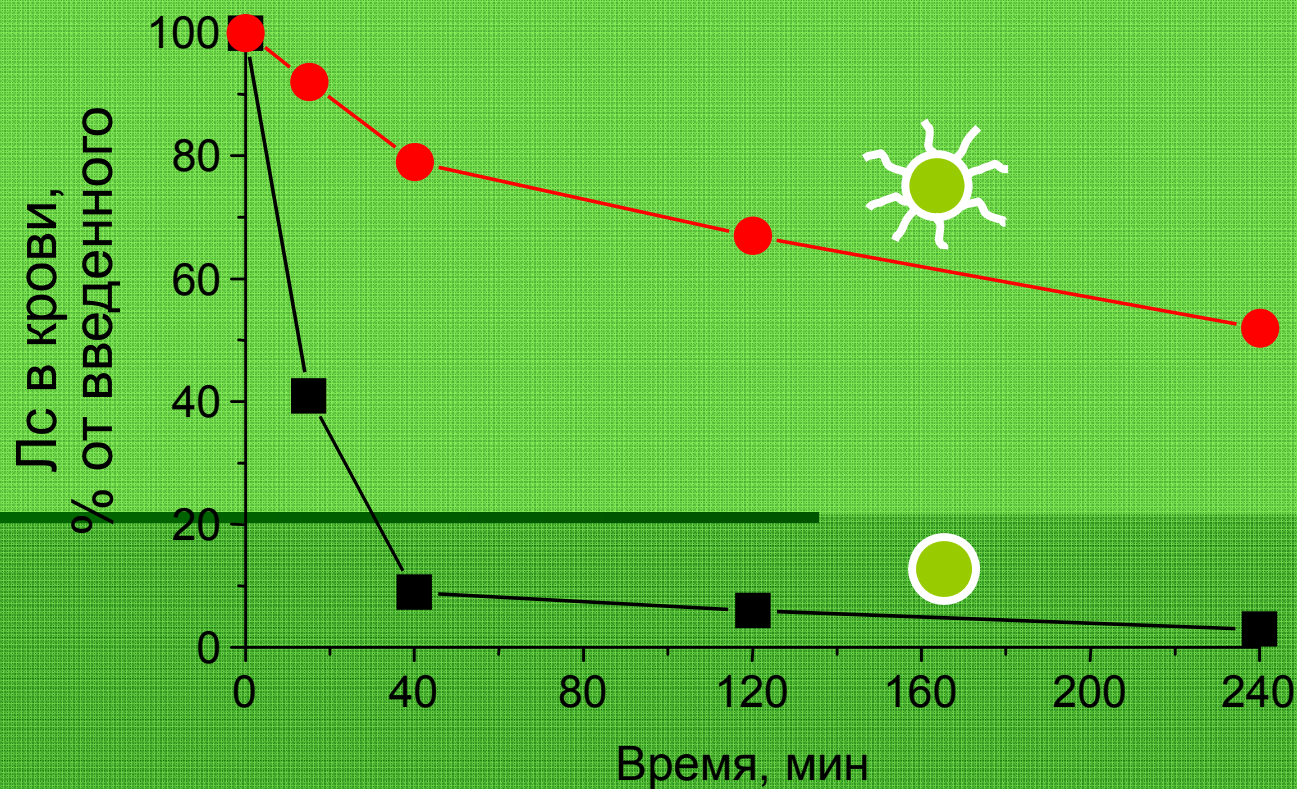
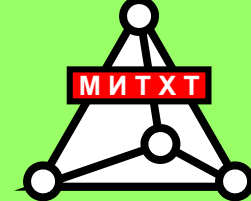
Стерически стабилизированные НЧ долго циркулируют



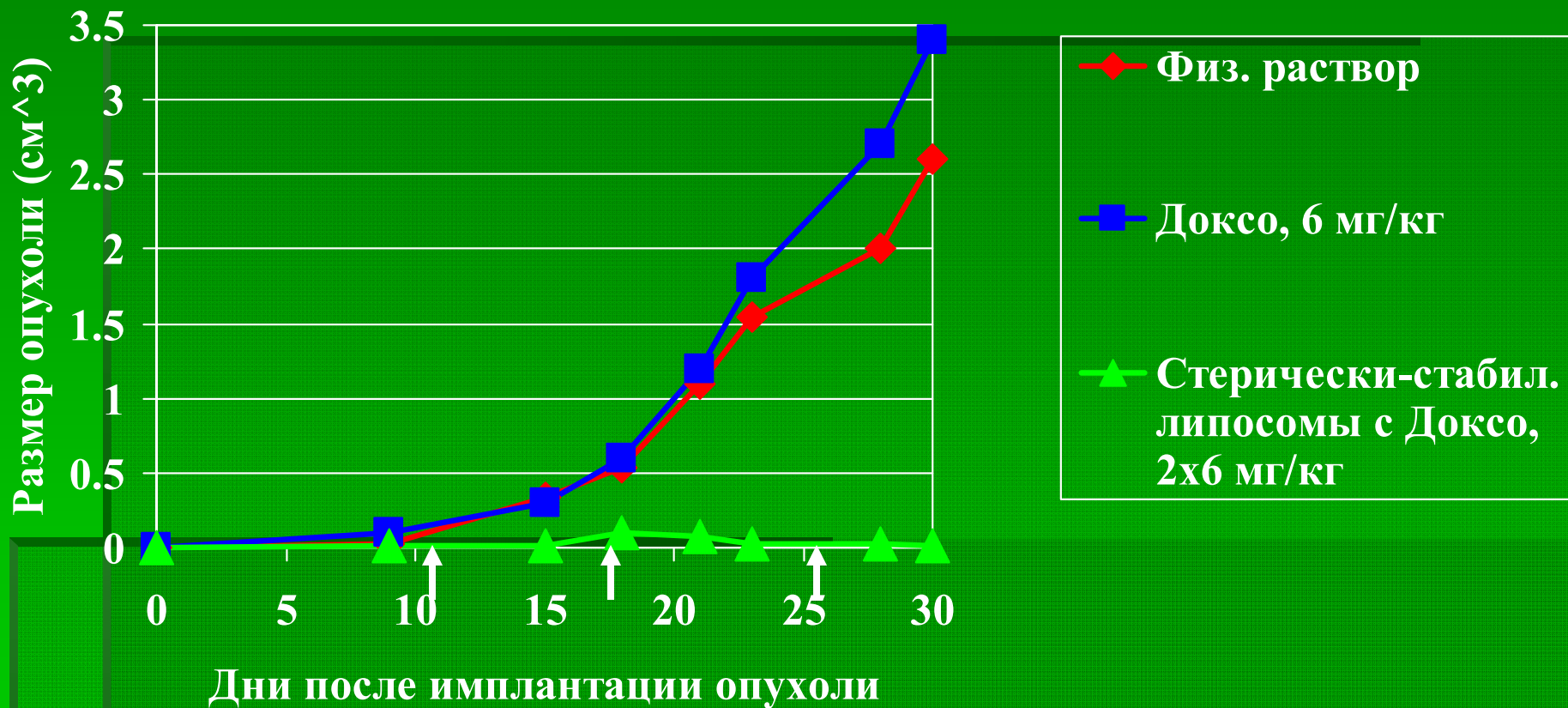
Прививка на поверхность полярных гибких полимеров препятствует сорбции белков, что увеличивает время циркуляции наночастиц в крови.

А это, в свою очередь, увеличивает шансы проявиться эффекту пассивного нацеливания

УВЕЛИЧЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЦИРКУЛЯЦИИ СТЕРИЧЕСКИ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЛИПОСОМ



Рост опухоли после подкожной имплантации мышам карциномы прямой кишки человека С-26



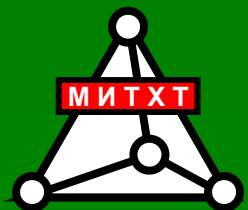
Концентрация Доксо в опухоли от введенной дозы:

Раствора 1%

Стерич.-стабил. липосомы 15%

Липосомные препараты

Субстанция (название)	Компания	Применение
Дауномицин (Daunoxome)	Nexstar Pharm. 1995	Саркома Капоши
Доксорубицин (Doxil/Caelyx)	Sequus Pharm. 1997	Саркома Капоши
Амфотерицин В (Ambiosome)	Nexstar Pharm. 1997	Грибковые инфекции
Доксорубицин (Липодокс)	Биолек/МИТХТ 1999	Саркомы мягких тканей
Белки гепатита А (Eраxal)	Berna Biotech 1994	Вакцина против гепатита А
Вирус гриппа (Inflexal)	Berna Biotech 1999	Противогриппозная вакцина



Наночастицы изменяют фармакокинетику (ADME-Tox)

➤ Объем распределения



➤ Концентрация в плазме



➤ Скорость биотрансформации



➤ Клиренс



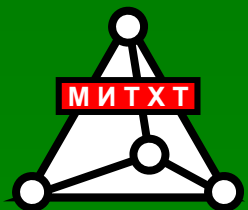
➤ Токсичность





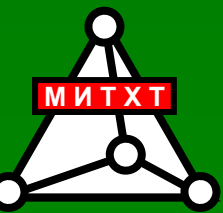
Преимущества липосомных препаратов

Эффект	Липосомный препарат/р-р
Накопление в сердце (доксорубицин)	1/2.3
LD ₅₀ (доксорубицин)	2.3
Накопление в опухоли (доксорубицин)	8.5
Концентрация в плазме (рифампицин - дауномицин)	3.3-185
Время выживания животных (доксорубицин)	2
Равноэффективная доза (дауномицин, ДОФА)	1/10
Увеличение растворимости (бетулиновая кислота)	200



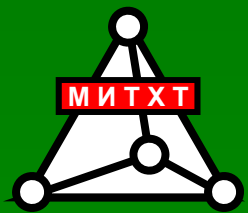
Нанопрепараты на основе полимеров





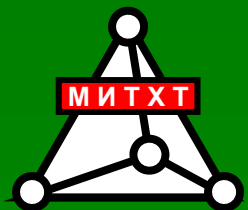
Neulasta[®] (pegfilgrastim) (Amgen, Inc.)

- **Лечение метастатического рака грудной железы**
- Конъюгат колониестимулирующего фактора (hG-CSF) и **MPEG** (20 кДа), Мм **39 кДа**
- hG-CSF - рекомбинантный белок
- Колониестимулирующий фактор стимулирует стволовые клетки к дифференцировке
- **Пегелирование** замедляет выведение белка, увеличивает время циркуляции
- Одобрен FDA 15 сент. 2005 г.



ONCASPAR[®] (Pegaspargase) (Rhône-Poulenc)

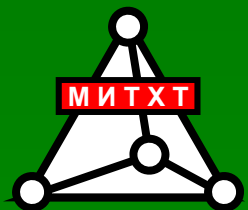
- Лечение аспарагин-зависимых лейкозий
- ПЭГелированная аспарагиназа
- $T_{1/2} = 14.9$ суток (0.9 у L-аспарагиназы)



Abraxane

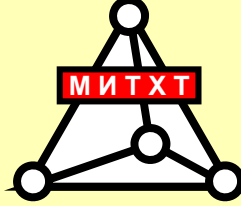
(American Pharmaceutical Partners, Inc., and American Bioscience, Inc.)

- Для лечения метастатического рака грудной железы
- Суспензия наночастиц конъюгата Таксола и альбумина для инъекций
- Уменьшенная токсичность, позволяет увеличить дозу и, следовательно ответ
- Проходит через эндотелиальные клетки рецептор-опосредованным (gp60) трансцитозом
- Одобрено FDA 7 января 2005 г.

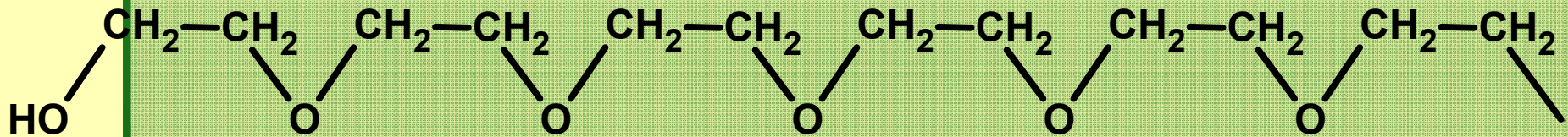


XYOTAX™ (paclitaxel poliglumex) **(Cell Therapeutics, Inc.)**

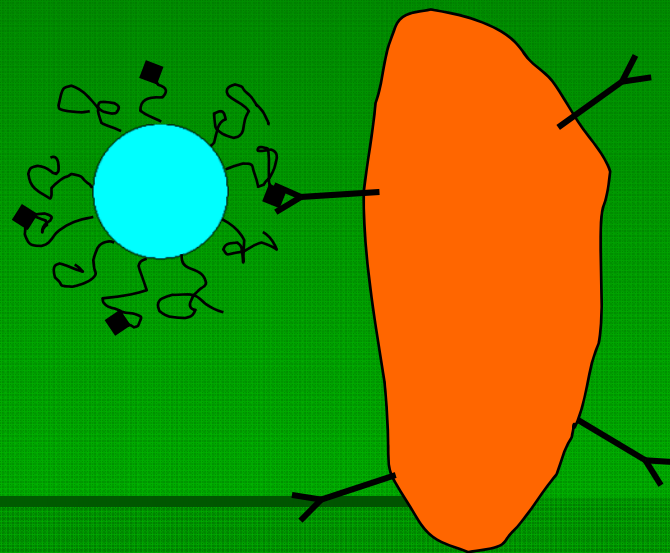
- **Лечение рака легких, грудной железы, простаты**
- Конъюгат Таксола и **полиGlu**
- ПолиGlu стабилизирует XYOTAX™ в кровотоке
- **Пассивное нацеливание**
- Таксол отщепляется от полимера только в раковых клетках благодаря присутствию в их лизосомах катепсина В
- Уменьшение токсичности, увеличение дозы с меньшими побочными эффектами



Полиэтиленгликоль



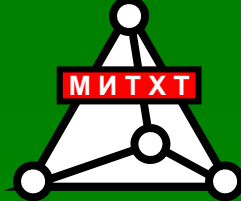
Активное нацеливание – важный элемент для увеличения эффективности химиотерапии



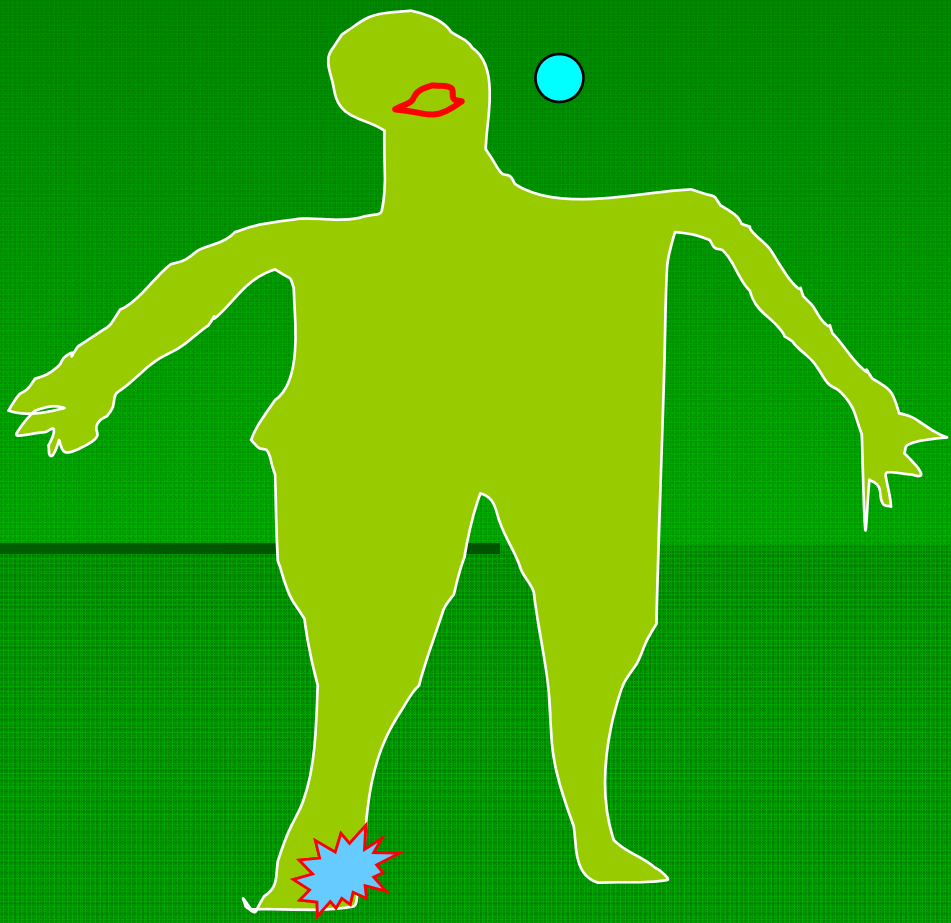
Иммобилизация на полимерных цепях «молекулярного адреса»
обеспечивает **активное нацеливание**

Модель волшебной пули Эрлиха





Волшебная пуля Пауля Эрлиха

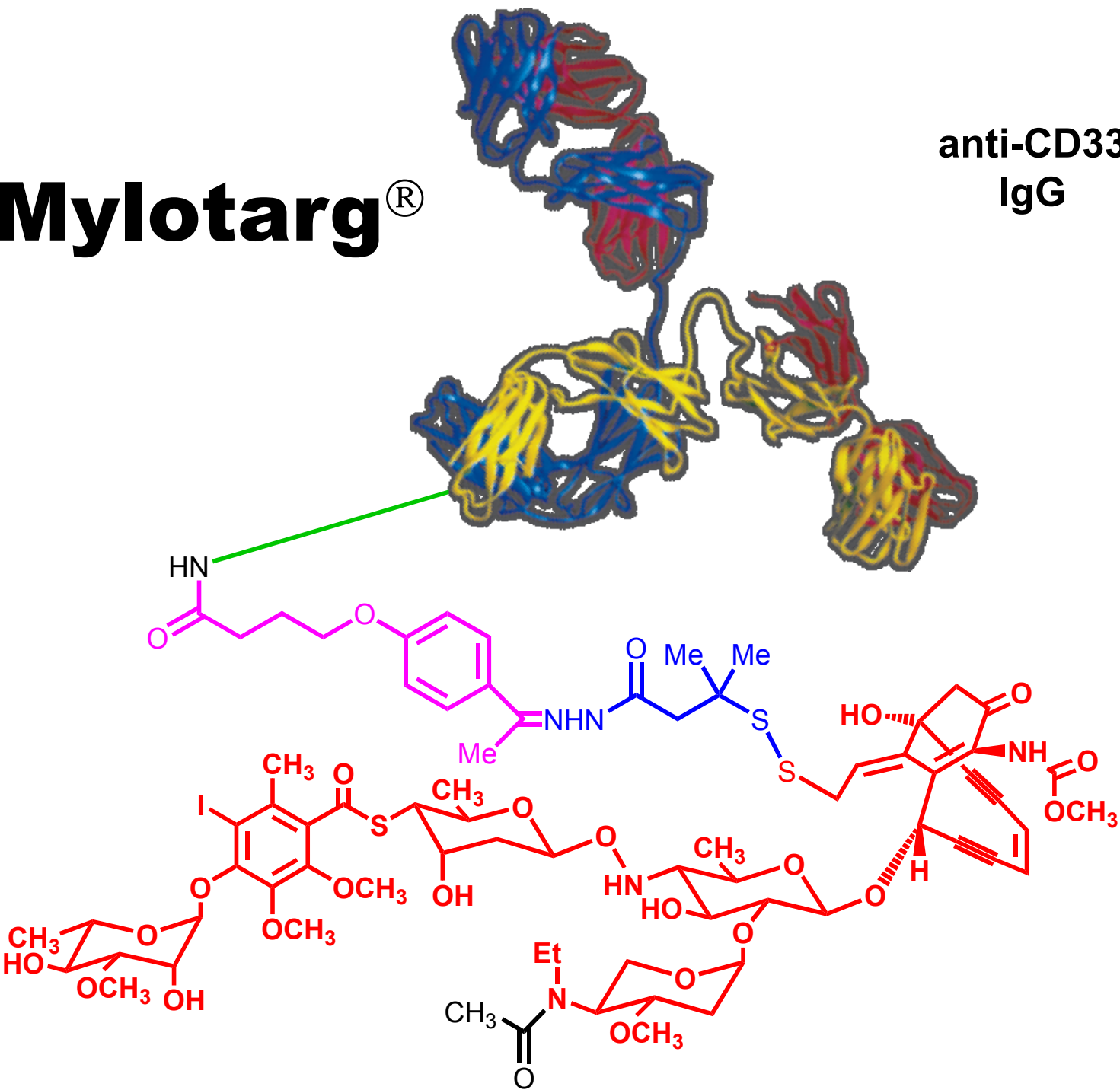


Mylotarg™ (Wyeth Pharmaceuticals) реальная «волшебная пуля» П.Эрлиха

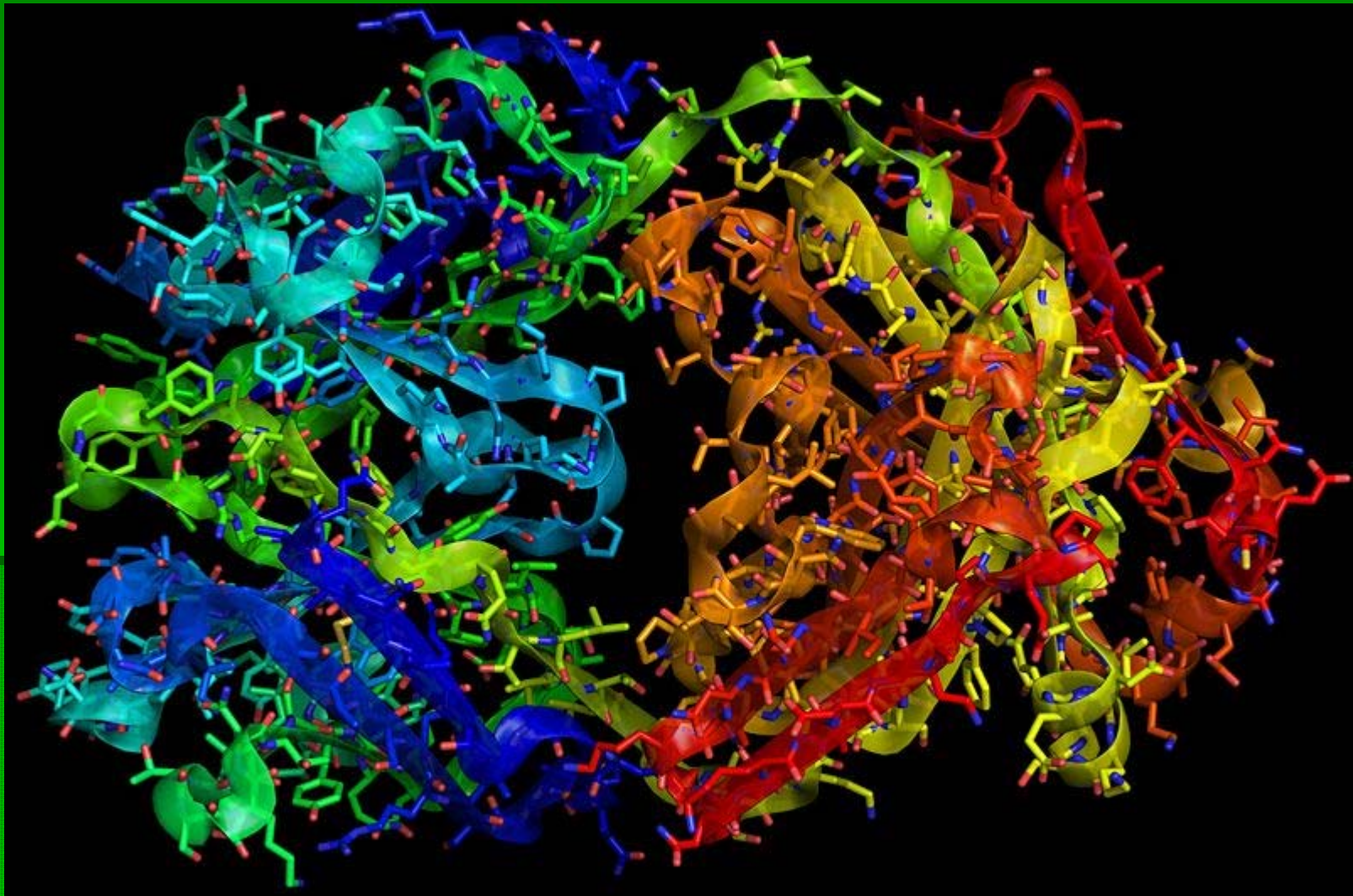
- **Лечение миелоидной лейкемии**
- Иммунотоксин – конъюгат гуманизированных МАТ (IgG4, κ) к CD33 антигену с противоопухолевым антибиотиком calicheamicin
- Цитотоксичность к клеткам лейкемии в **77000 раз** выше, чем к стволовым клеткам крови

Mylotarg[®]

anti-CD33
IgG



Гуманизированные моноклональные антитела



Герцептин (Herceptin®), Trastuzumab, Roche)

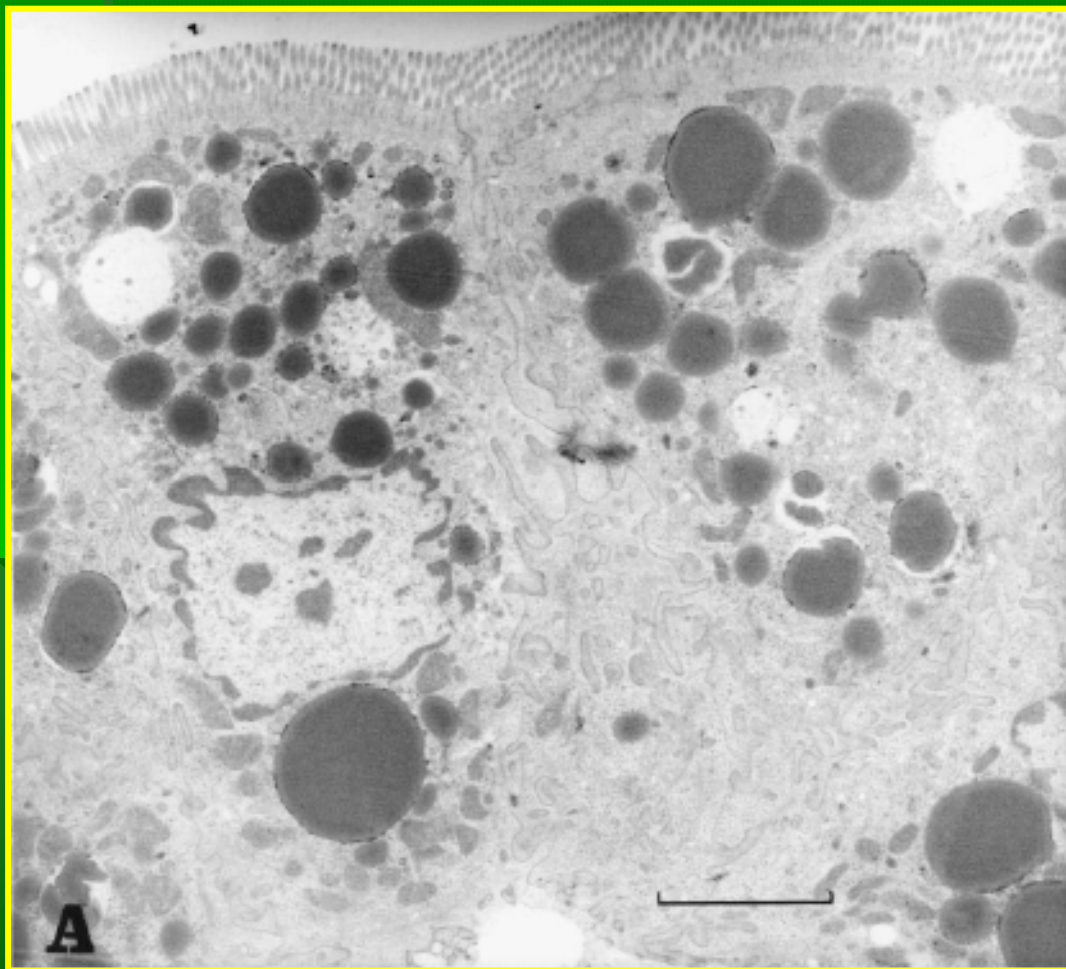
- Ранние стадии рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2
- Метастатический рак молочной железы с гиперэкспрессией HER2
- Гиперэкспрессия HER2 обнаруживается в ткани первичного рака молочной железы у 25-30% больных
- Моноклональные гуманизированные антитела против Her2-нео (рецепторов эпидермального фактора роста человека)
- По итогам 2006 г. объем продаж Герцептина составил 1.2 млрд долл. США
- **Herceptin costs about seventy thousand US dollars for a full course of treatment**

Парадоксальное свойство наночастиц - облегченное прохождение через барьеры



- Стенки ЖКТ
- Стенки капилляров
- Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ)
- Клеточная мембрана
- Мембраны органелл

Наночастицы абсорбируются из тонкого кишечника через М-клетки

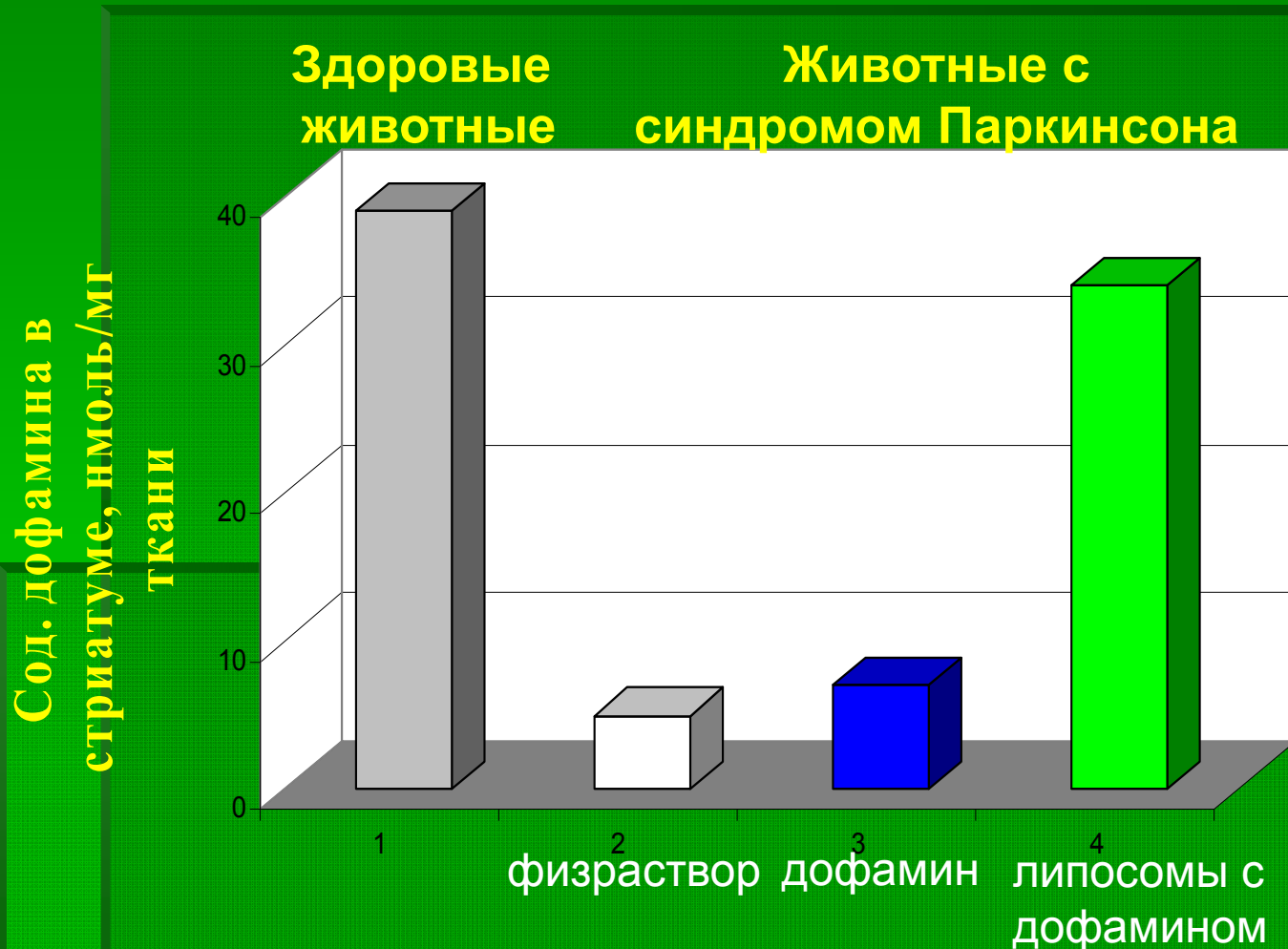
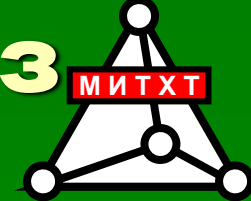


Наносферы
полимолочной
кислоты, меченные
ферритином в М-
клетках кишечника
крысы

S. McClean , E. Prosser, E.
Meehan, et al. Eur. J. Pharm.
Sci. 6 (1998) 153–163

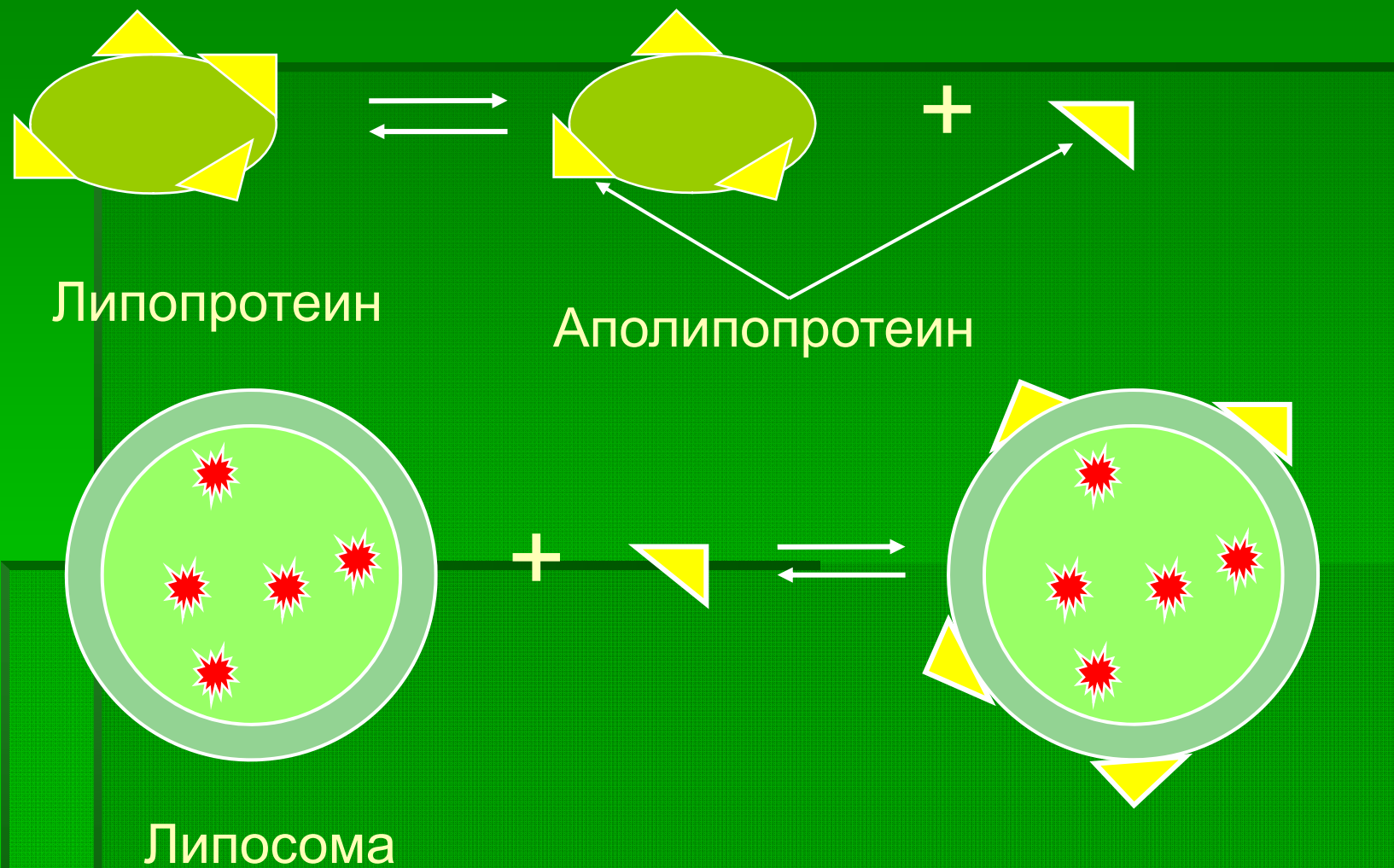
**Токсичность
неорганических
материалов !!!**

Наночастицы проходят через ГЭБ лучше, чем отдельные молекулы

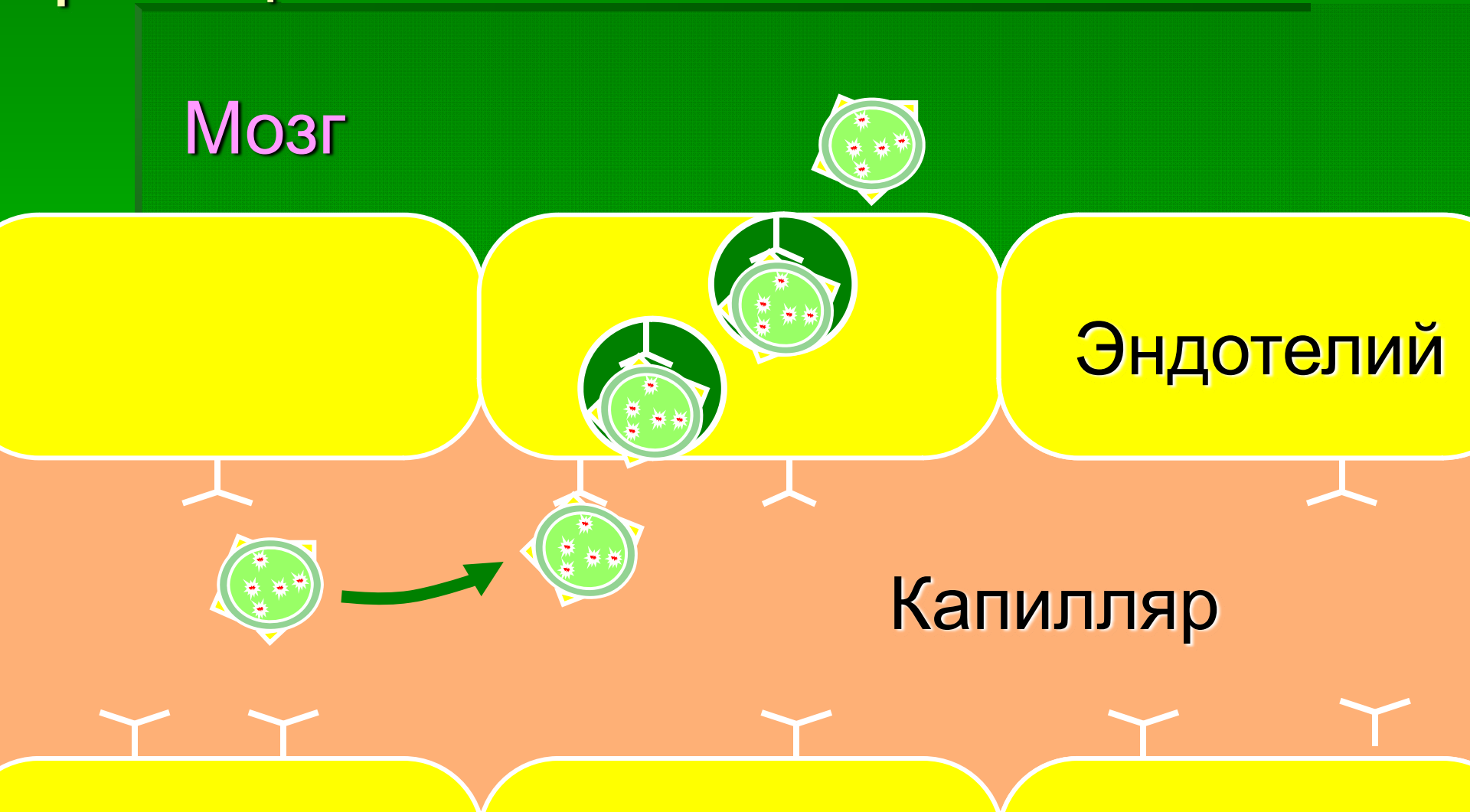


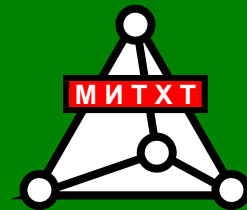
Zhigaltsev I.,
Kaplun A.,
Kucheryanu V.,
et al. (2001)
J. Liposome Res.
V.11. N 1. P. 55-71

Белки липопротеинов (переносчиков жиров и холестерина) могут в крови сорбироваться на наночастицах

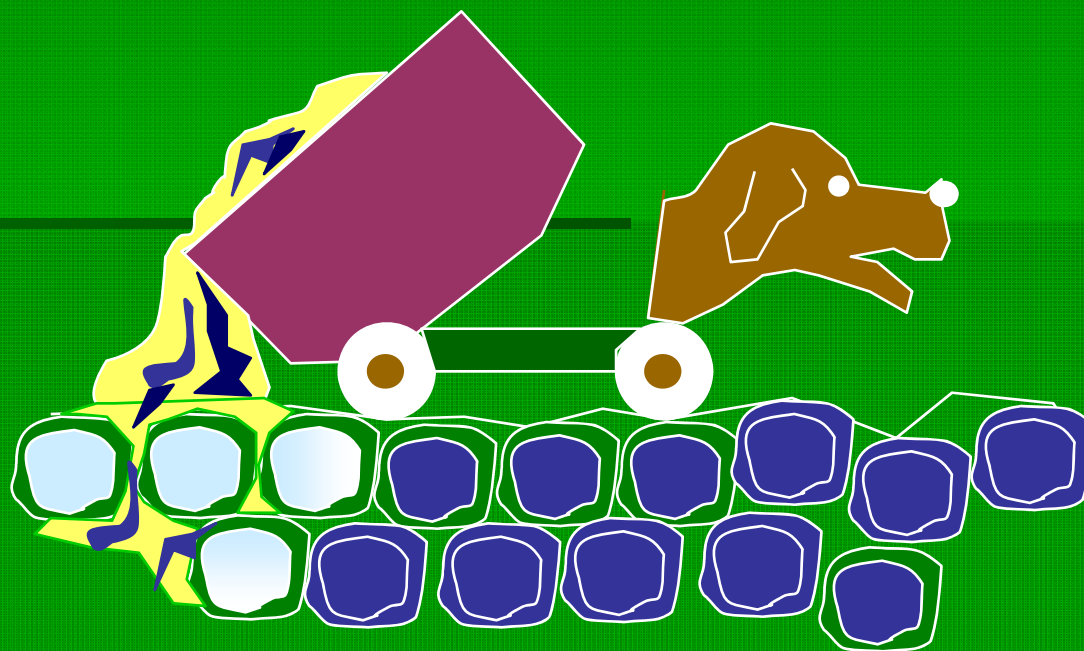


Наночастицы с аполипопротеинами на поверхности проникают через ГЭБ трансцитозом





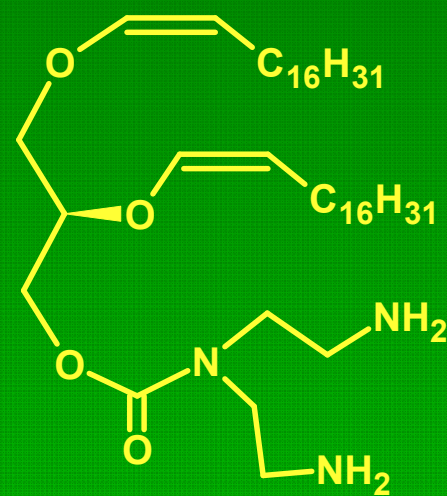
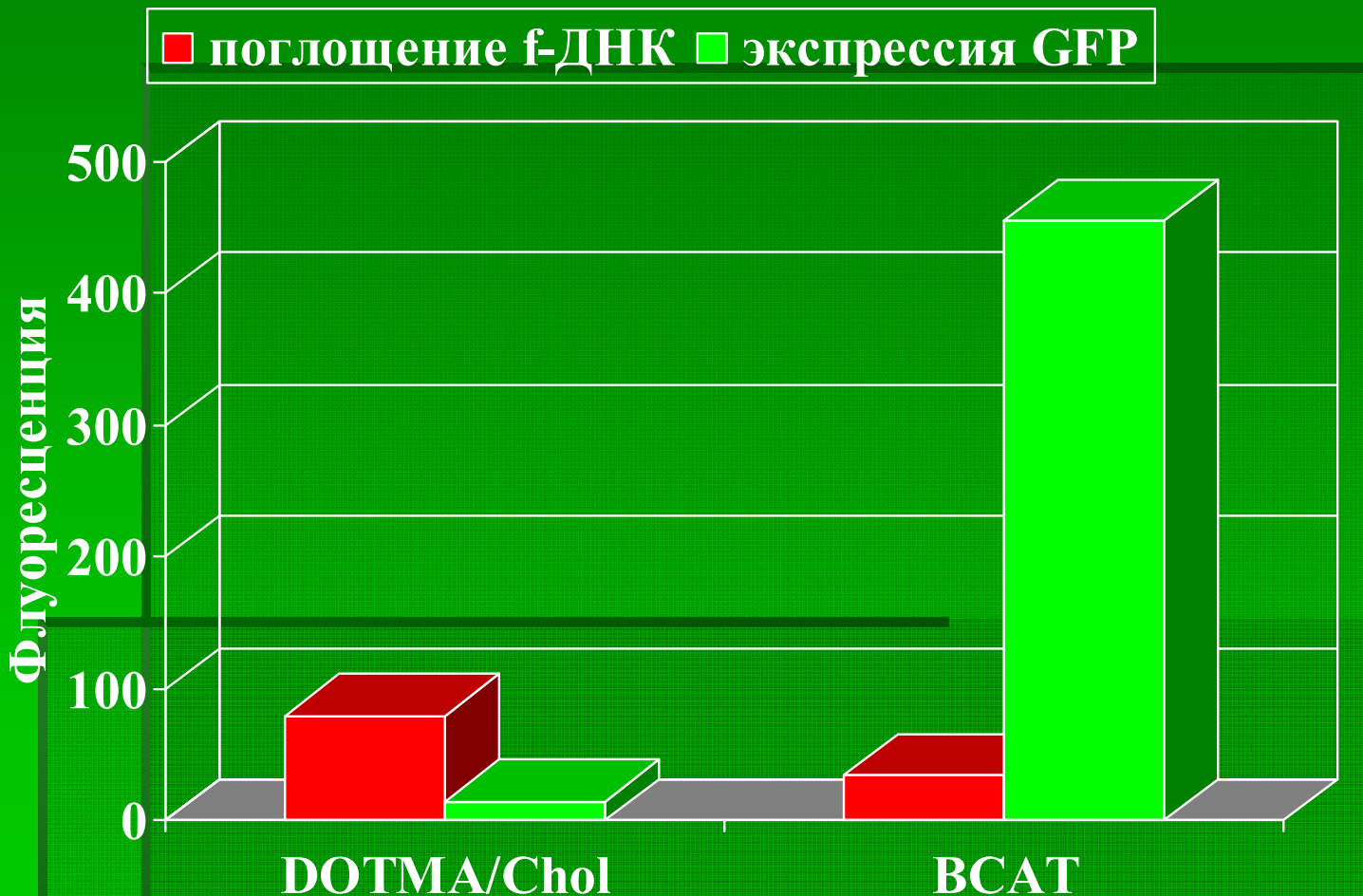
Выгрузка содержимого в избранном месте – контролируемое высвобождение



Контролируемое высвобождение – важный способ увеличения эффективности

- Контролируемое средой (рН, температура, специфические ферменты)
- Контролируемое по времени
- Двойное нацеливание

pH-Зависимое высвобождение из эндосом приводит к круциальному увеличению эффективности



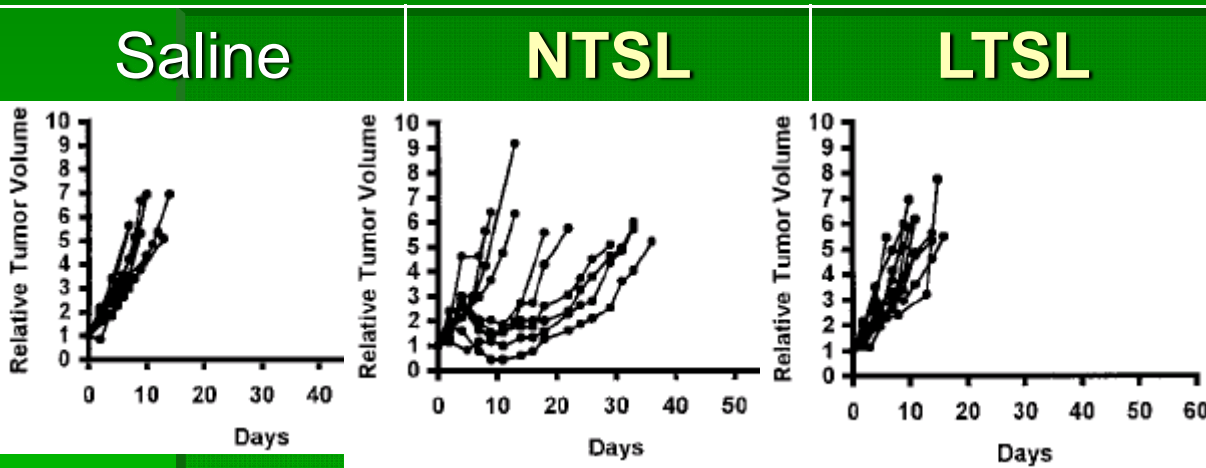
BCAT

f-ДНК – псорален меченная ДНК;

GFP – зеленый флуоресцирующий белок

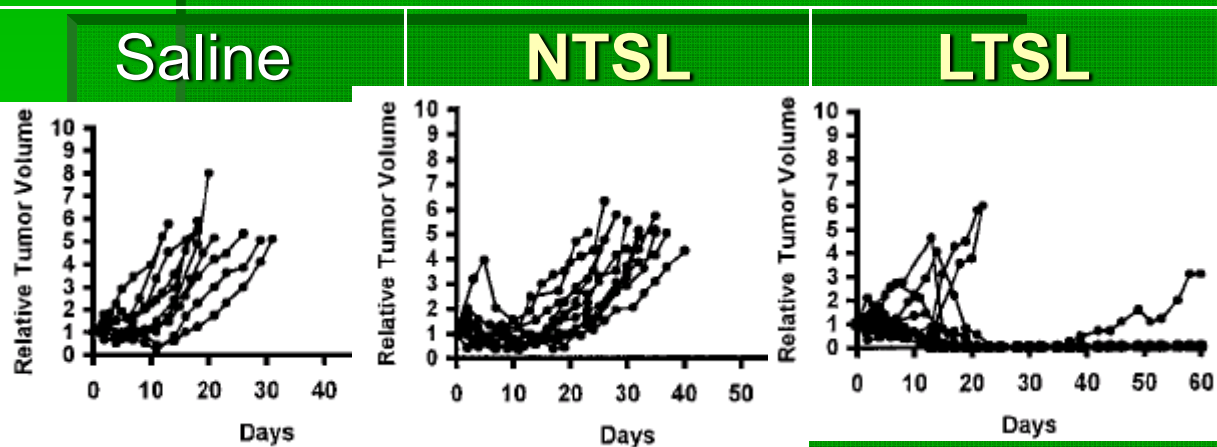
Кривые роста опухоли после лечения липосомным доксорубицином (термочувствительное высвобождение)

34°C



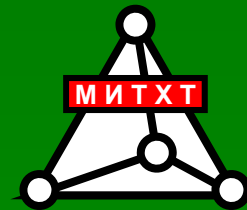
NTSL -
нетермочувств. Лс
HSPC:Chol: DSPE-
PEG-2000 (75:50:3)

42°C

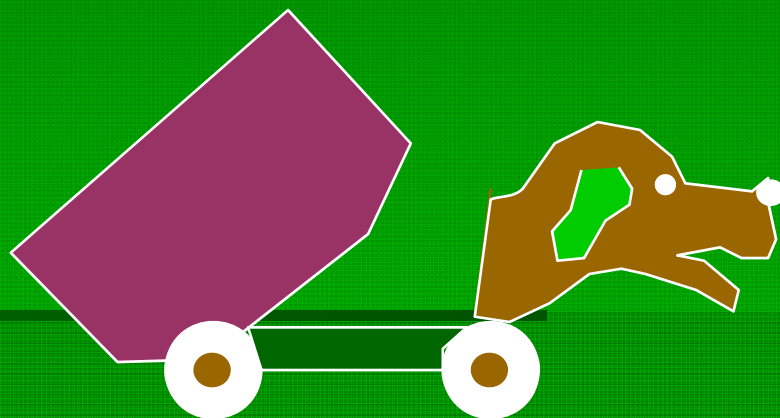


LTSL -
термочувств. Лс
DPPC:MPPC:DSPE
-PEG-2000 (90:10:4)

G. Kong, et al. (2000)
CANCER RESEARCH V.60,
P. 6950–6957



Диссипация и покидание организма



То, что не распалось – приводит к токсическим эффектам

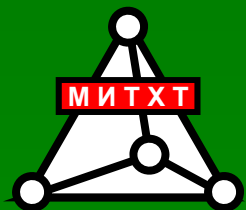
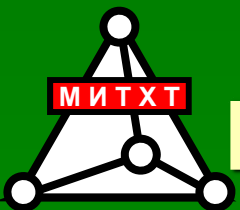
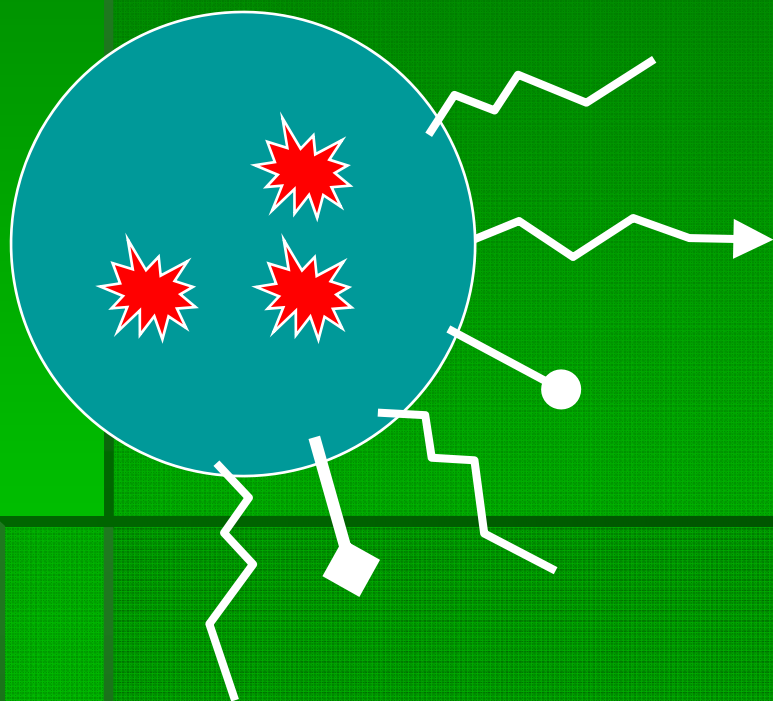


Схема нанолекарства недалекого будущего

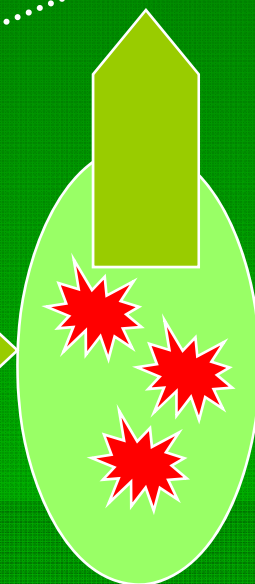




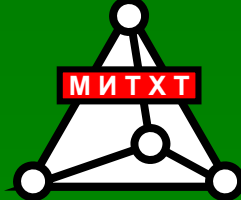
Наноллекарство, близкое к идеалу



ЭНДОЦИТОЗ



Липосомные лекарственные препараты, разрабатываемые кафедрой биотехнологии



Препарат, акт. в-во	Тип препарата	Стадия исследований.
Липодокс*, доксорубицин	Противоопухолевый	Препарат производится
Липин*, ФХ	Антигипоксический и др.	Препарат производится
Лиолив*, антраль	Гепатопротекторный	Препарат производится
Аминофосфатид*, ЦС	Гемолитическая болезнь новорожденных	Закончены биол. иссл.
ДОФАСОМ * ³ , Леводопа	Болезнь Паркинсона	Закончены биол. иссл.
Баларпан-Л* ² , баларпан	Ранозаживляющий	Начинаются клинические испытания
Нейропептиды * ⁴	Нейродегенер. процессы	Лабораторные иссл.
Бетусом, бетулиновая к-та	Меланома	Биологич. испытания
Липофлавон*	Противовоспалительный	Препарат производится
Фторурацил*	Противоопухолевый	Биологич. испытания
Рифаспорин, цефотексид, Биолек», ХарПротивотуберкулезный	Противотуберкулезный	Лабораторные иссл.

*¹В сотрудничестве с ИИХТ «Биолек», ХарПротивотуберкулезный

*²В сотрудничестве с ИИХТ Микрохирургия глаза

*³В сотрудничестве с Институтом патофизиологии РАМН

*⁴В сотрудничестве с ИИХТ РАН

Липосомный баларпан в два раза быстрее заживляет повреждения роговицы

Контроль

Баларпан
раствор

Баларпан
в липосомах

Первый
день



$S=24 \pm 2 \text{ mm}^2$

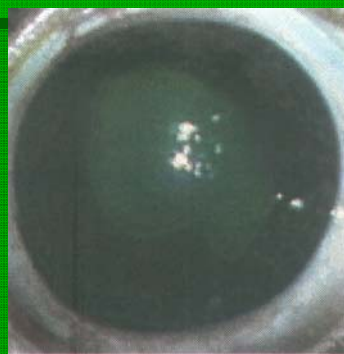


$15 \pm 1.5 \text{ mm}^2$



$7 \pm 0.5 \text{ mm}^2$

Второй
день



$S=21 \pm 1.5 \text{ mm}^2$

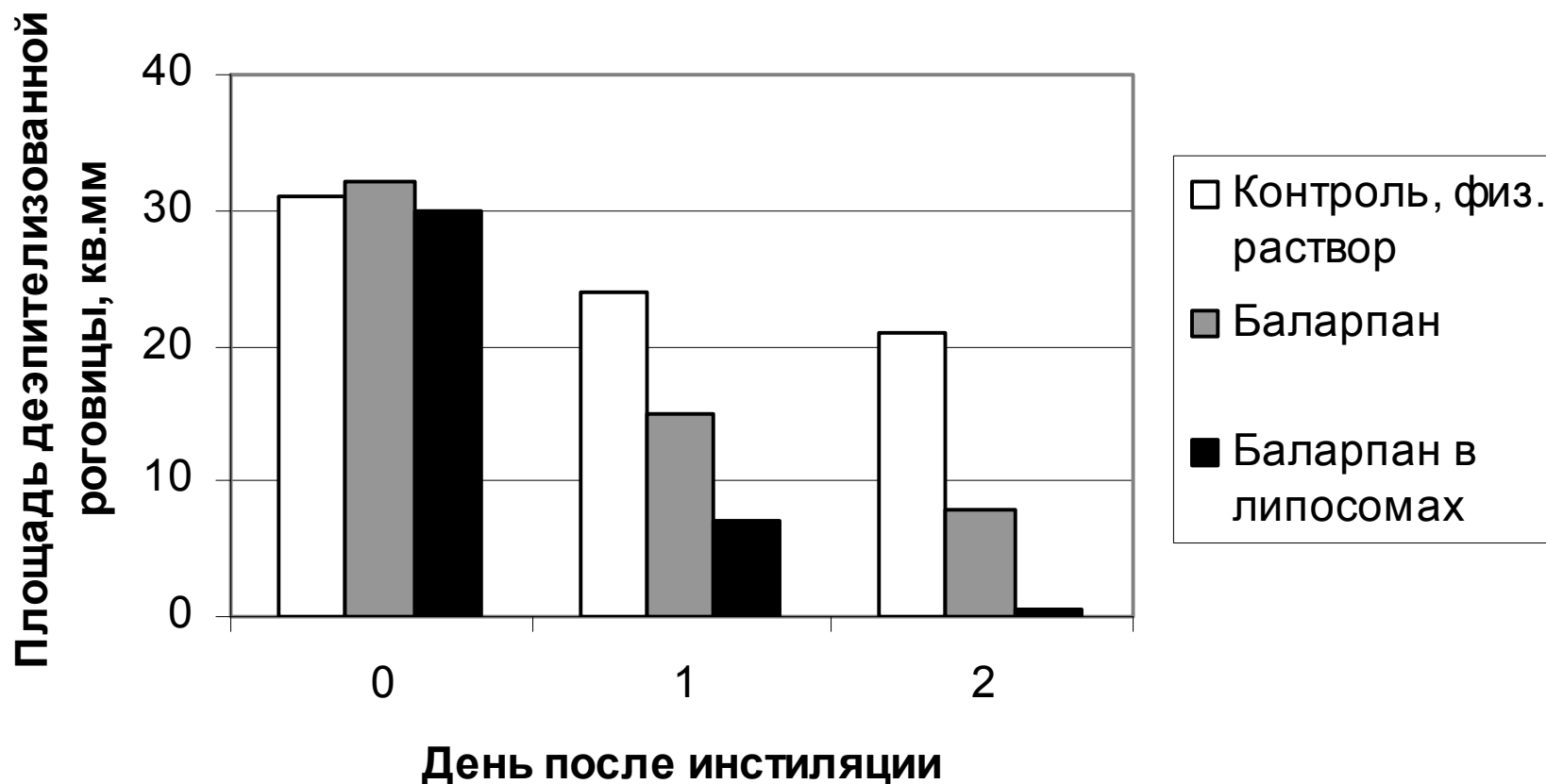


$8 \pm 1 \text{ mm}^2$

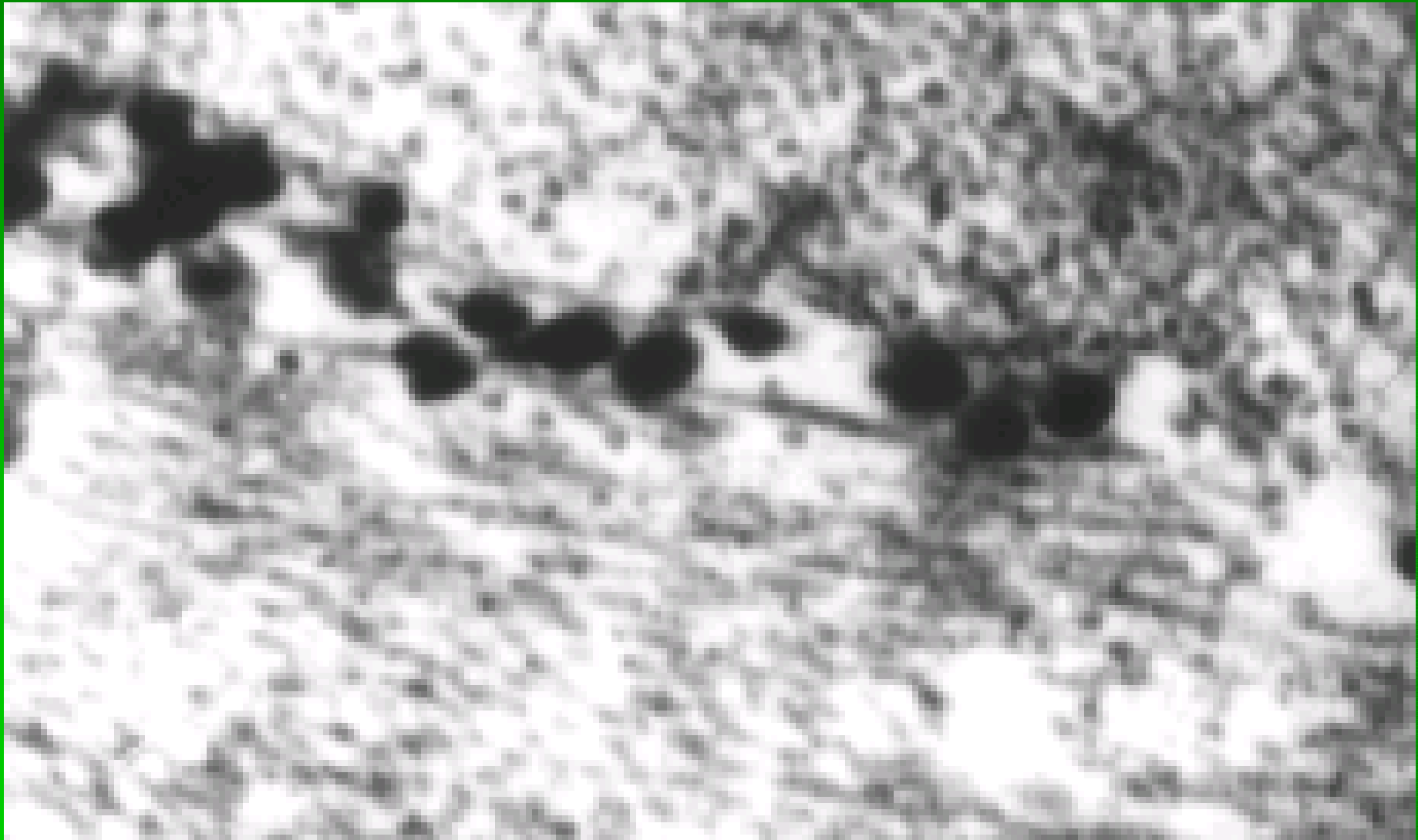


$0.1 \pm 0.05 \text{ mm}^2$

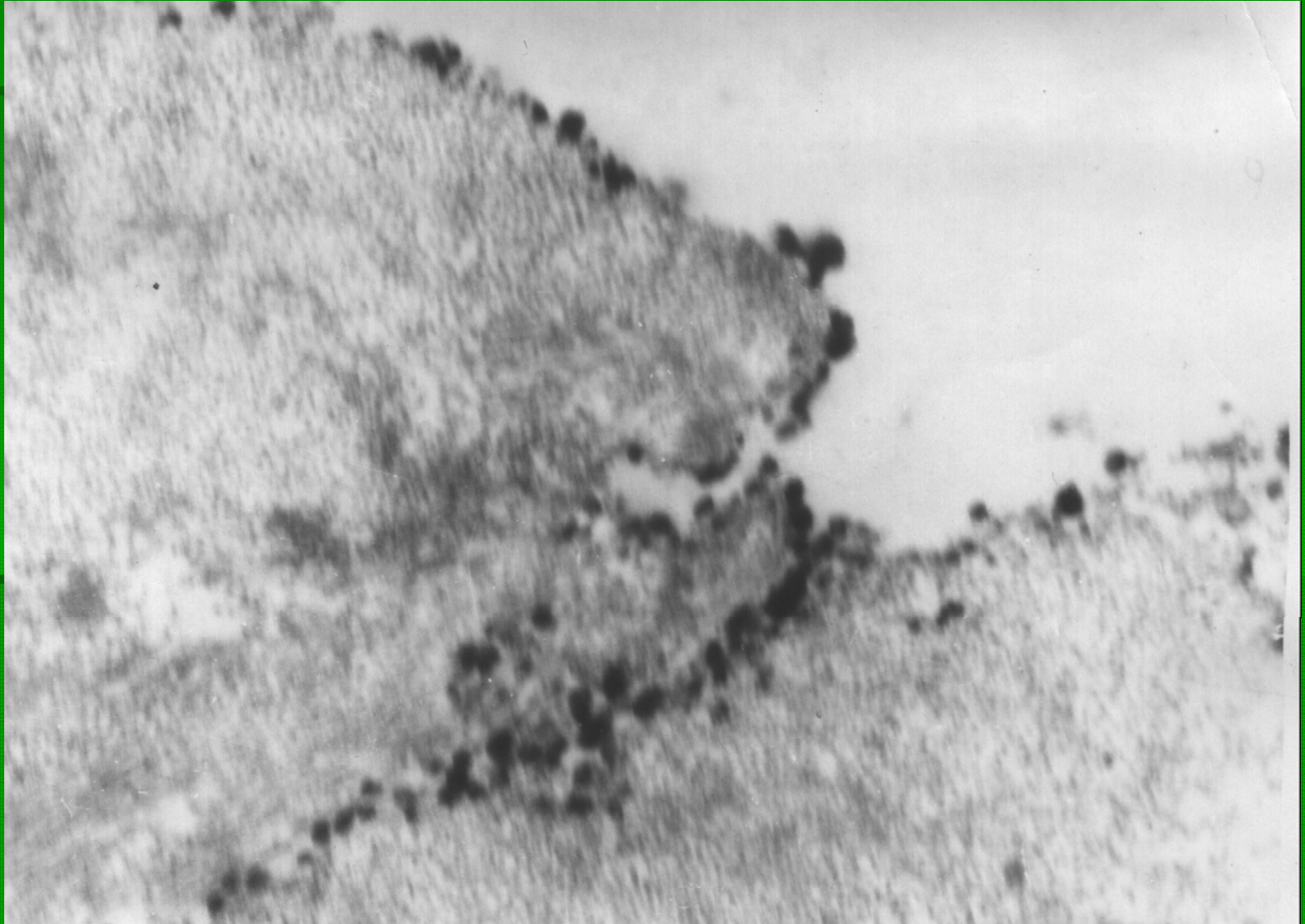
Уменьшение деэпителизированной роговицы после фоторефрактивной кератомии



Липосомы даже через 2 часа после инстиляции обнаруживаются между коллагеновыми слоями

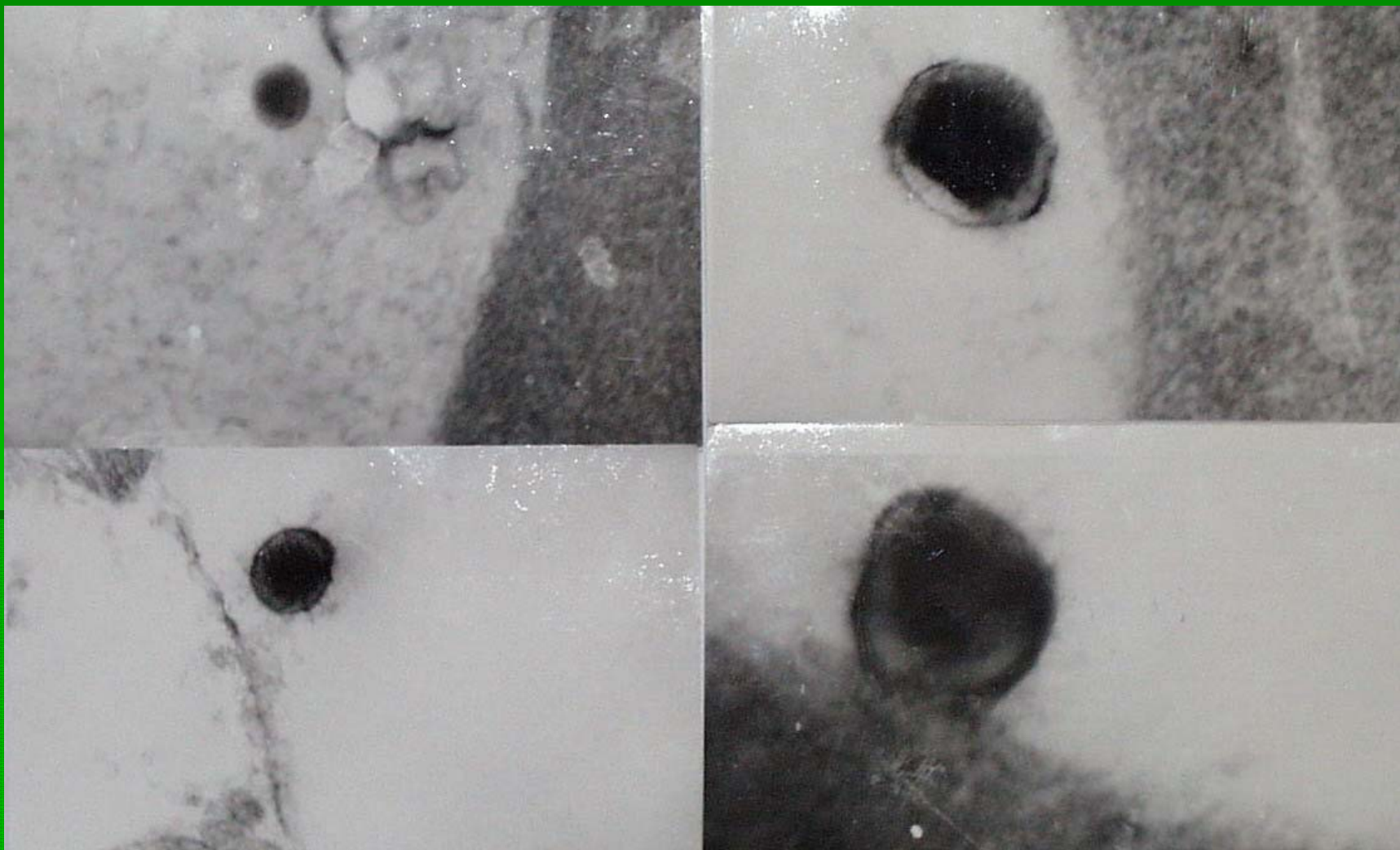


Липосомы сорбируются на поверхности роговицы и в ране

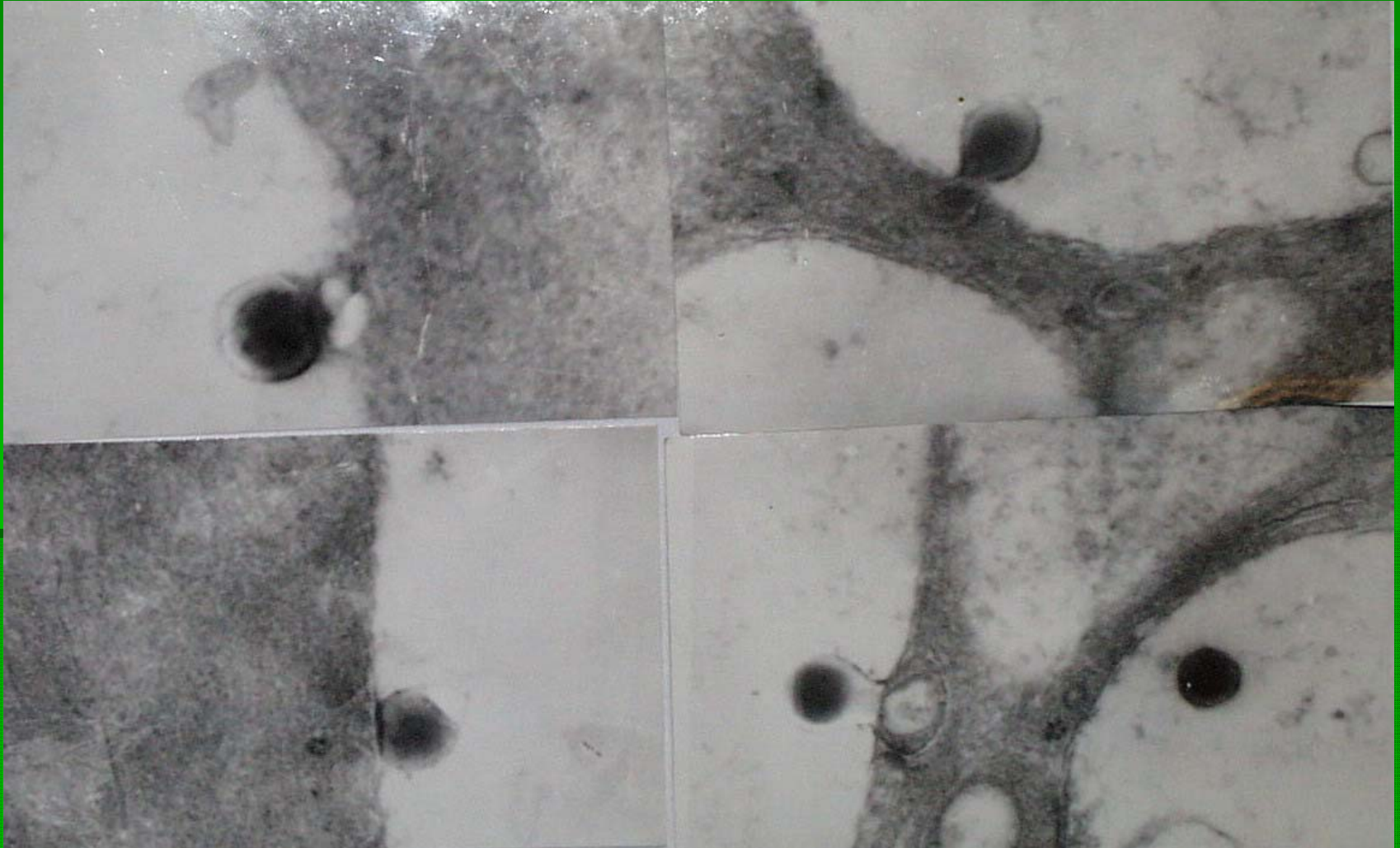


Электронные микрофотографии после
субтотальной витрэктомии и введения
липосомной дисперсии в полость стекловидного
тела

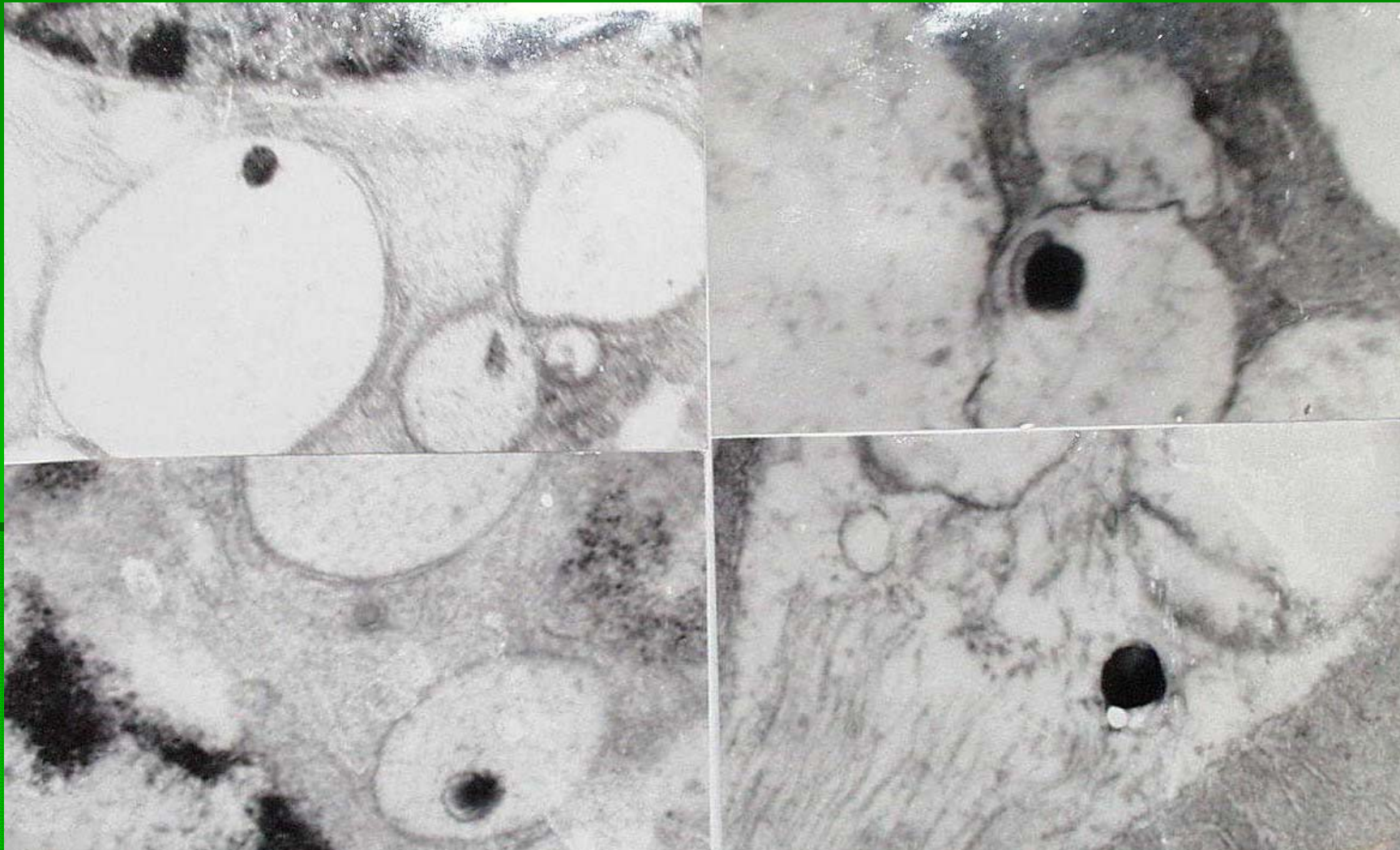
Липосомы в межклеточном пространстве (1 сутки после введения)



Пиноцитоз и деструкция липосомом (4 сутки после введения)



Конгломераты коллоидного серебра внутри клеток (7 сутки после введения)

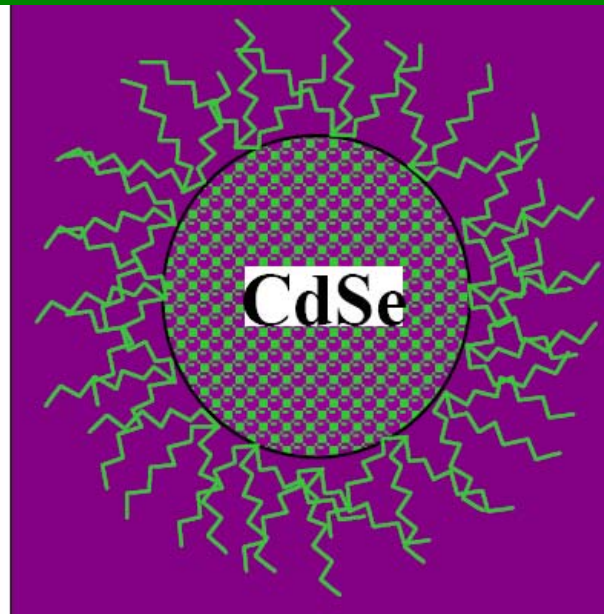
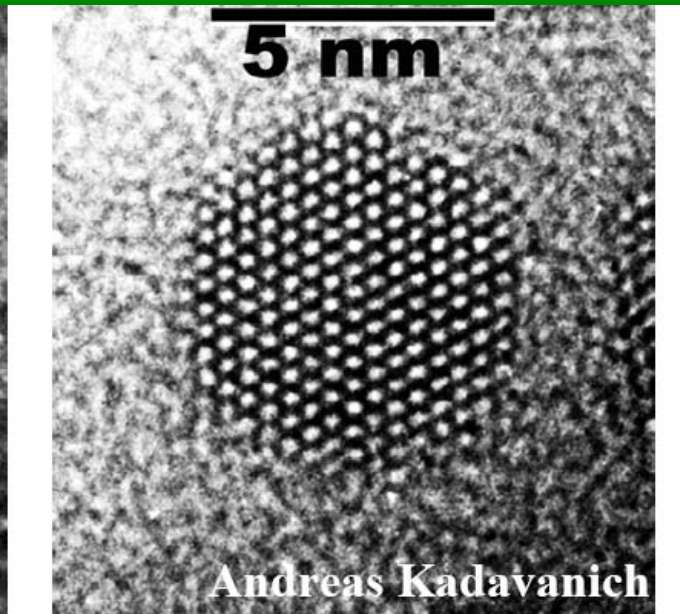
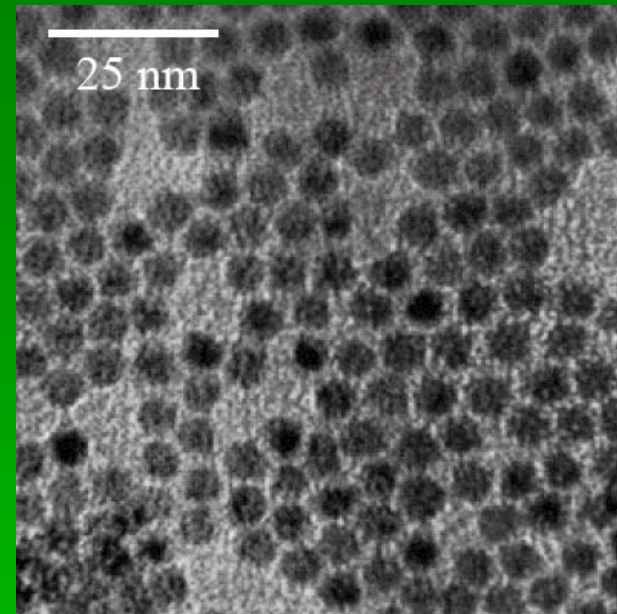




Наночастицы для диагностики – направленный транспорт диагностикумов

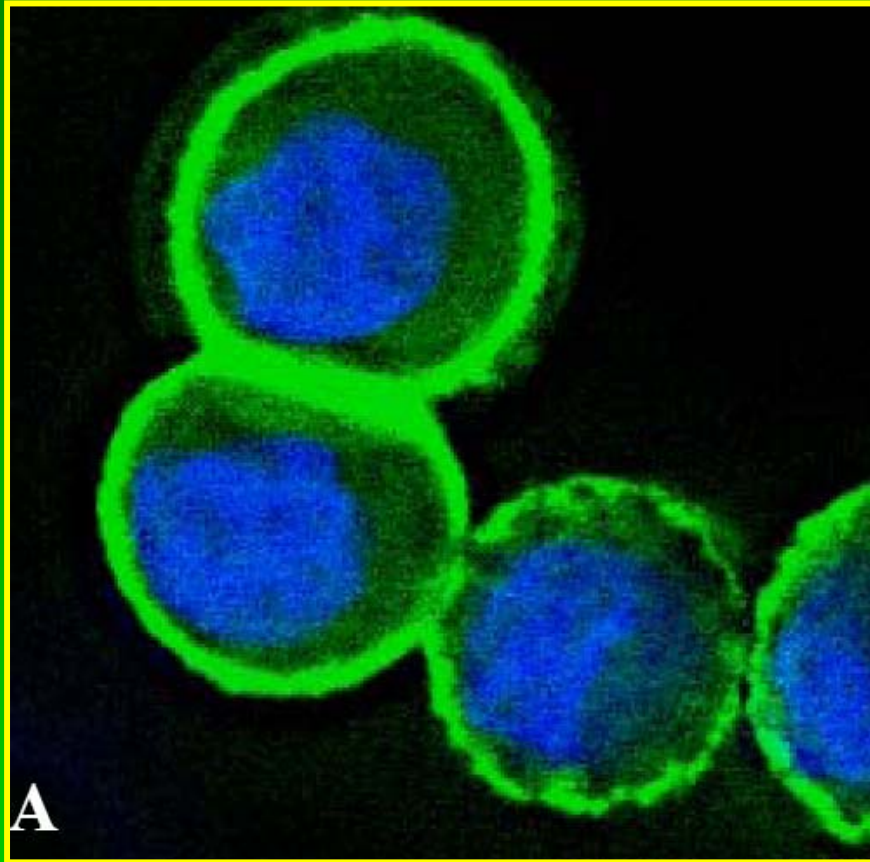


Квантовые точки, Qdots

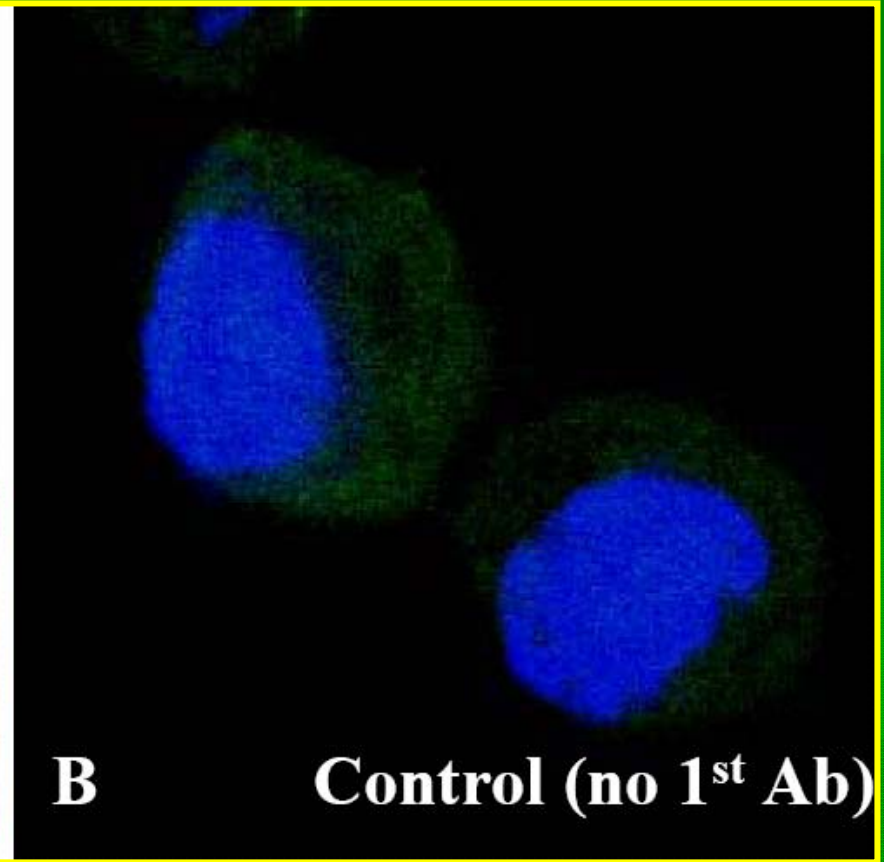


- Монодисперсны
- Размер 2-10 нм
- Материал: CdSe, покрытый ZnS
- Покрыты слоем полимера для присоединения молекулярного адреса

Выявление опухолевых маркеров на поверхности клеток



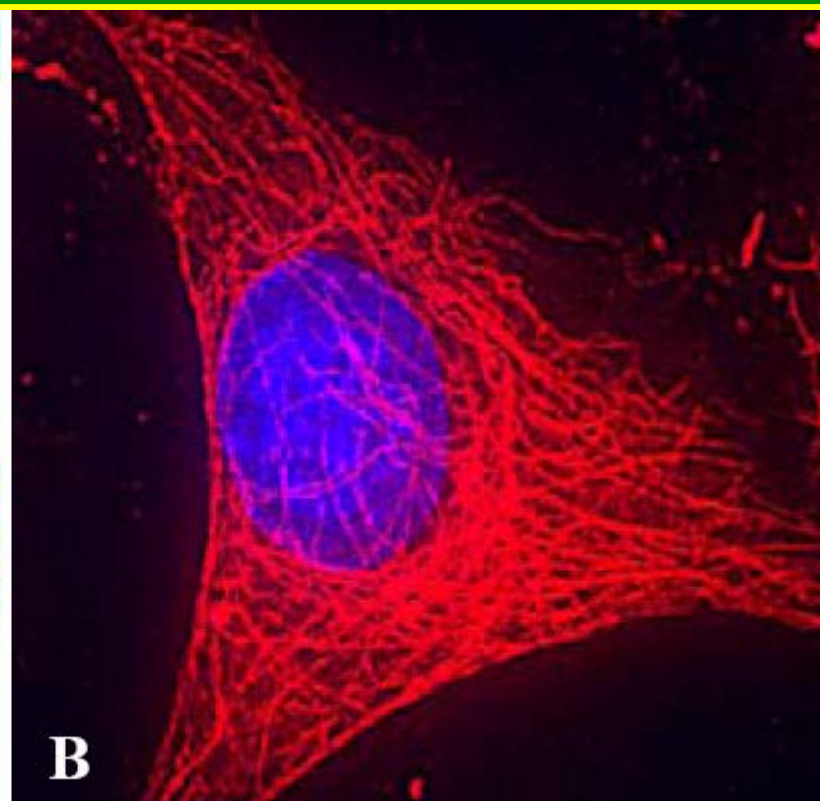
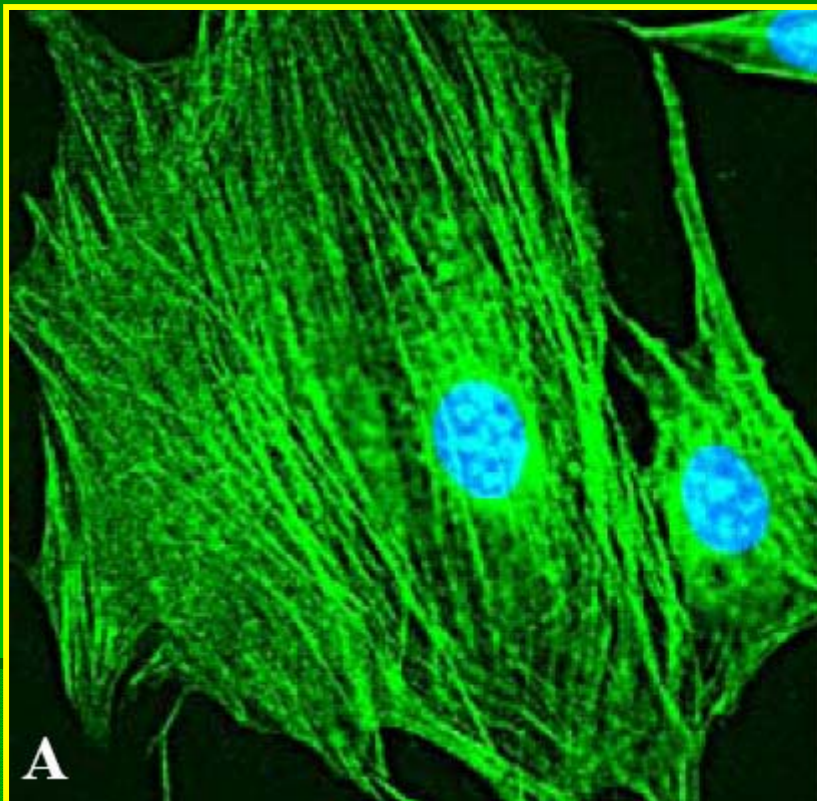
Раковые клетки



Нормальные клетки

Мышиные анти-Her2 и козы анти-мышинные IgG, конъюгированные с QD 535

Визуализация субклеточных структур



**Актиновые
микрофиламенты**
QD 535-streptavidin

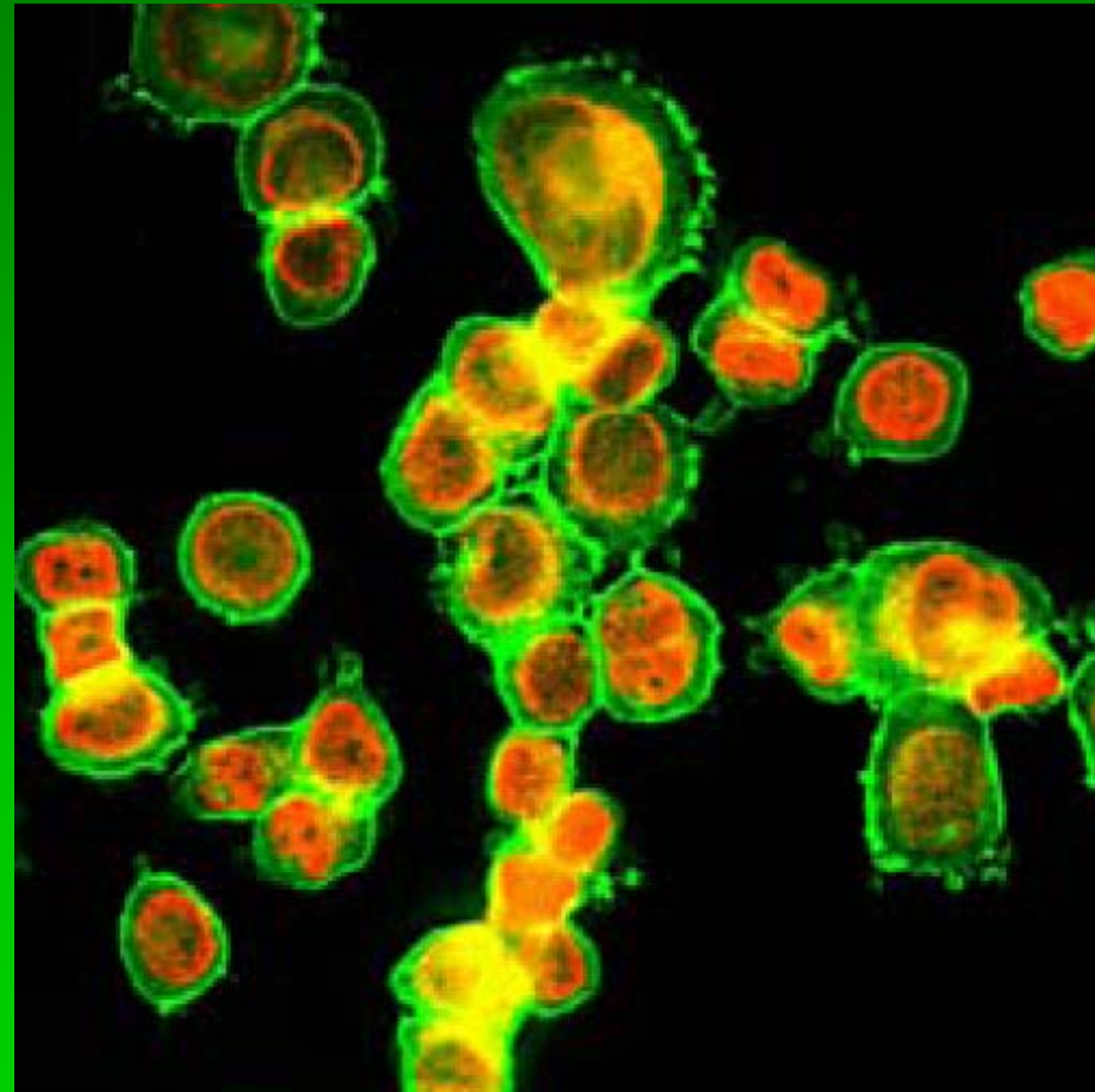
Микротрубочки
QD 630-streptavidin

Одновременное выявление двух мишеней на клетках

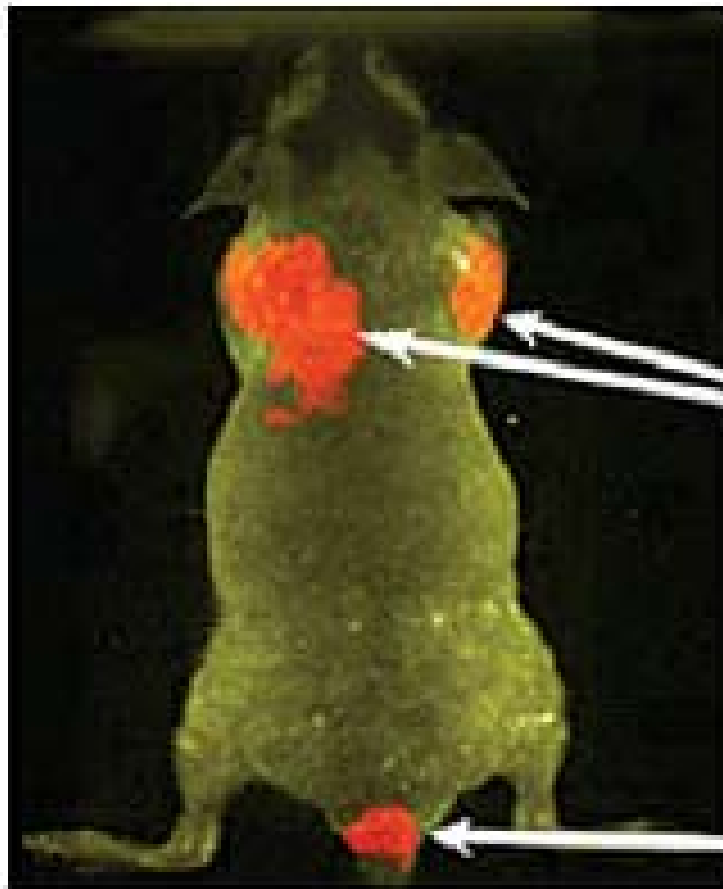
Опухолевые маркеры Her2 на поверхности клеток SK-BR3 помечены специфическими антителами, конъюгированными с QD 535.

Ядро помечено антителами, конъюгированными с QD 630, против гистонов.

При облучении выявляются одновременно оба элемента клеток.



Активное нацеливание с использованием опухоль-специфичных лигандов более эффективно, чем пассивное нацеливание



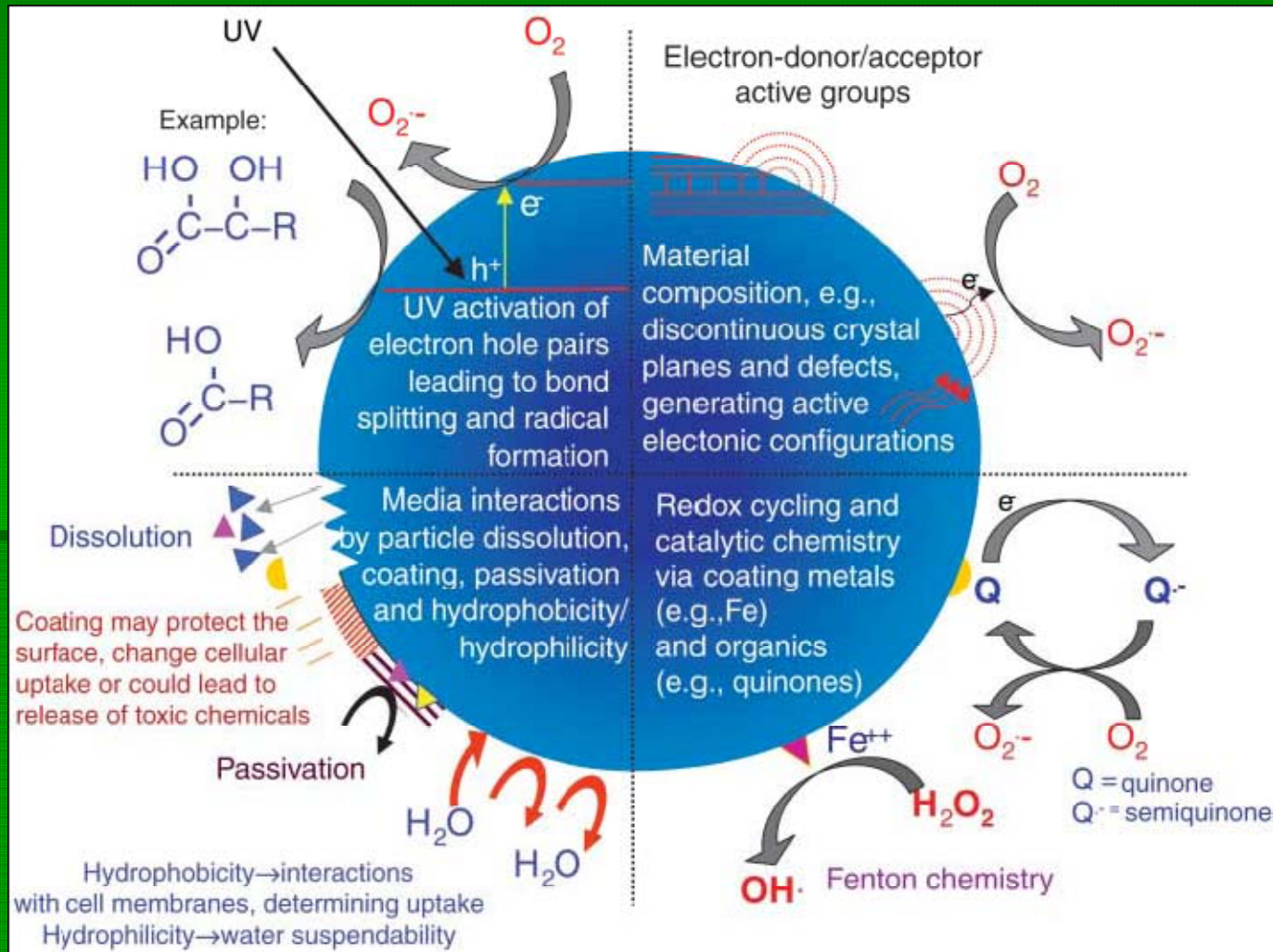
Tumors

Injection site



Многообразиe наночастиц

Possible mechanisms by which nanomaterials interact with biological tissue



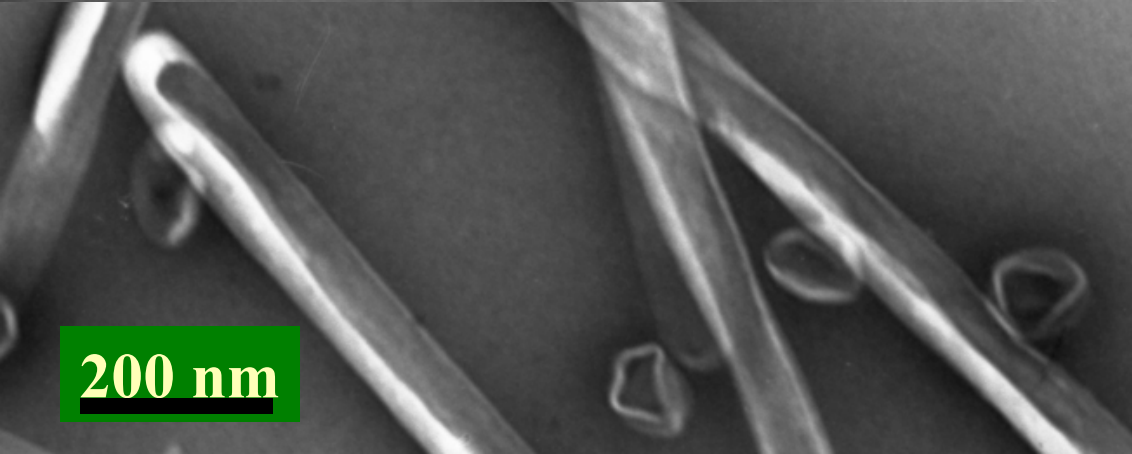
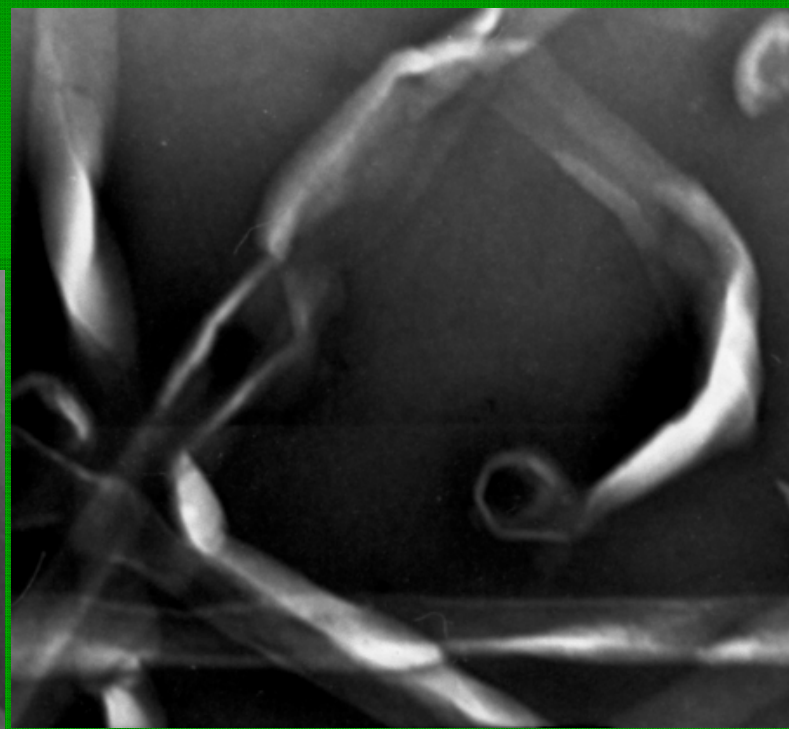
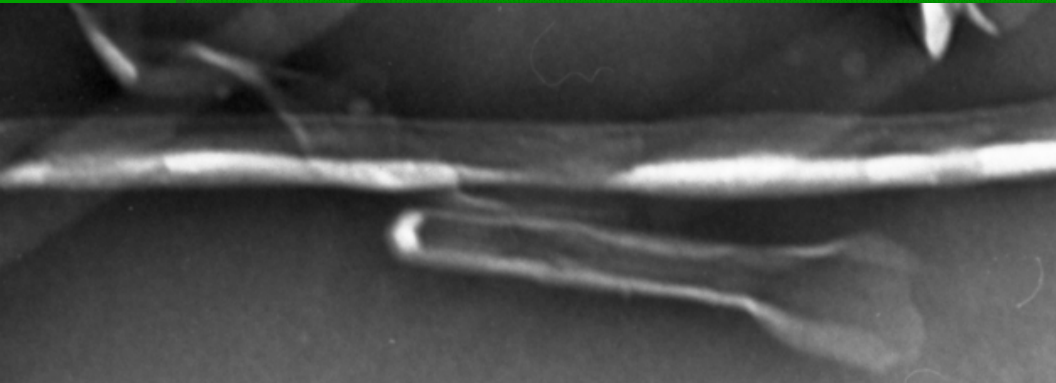
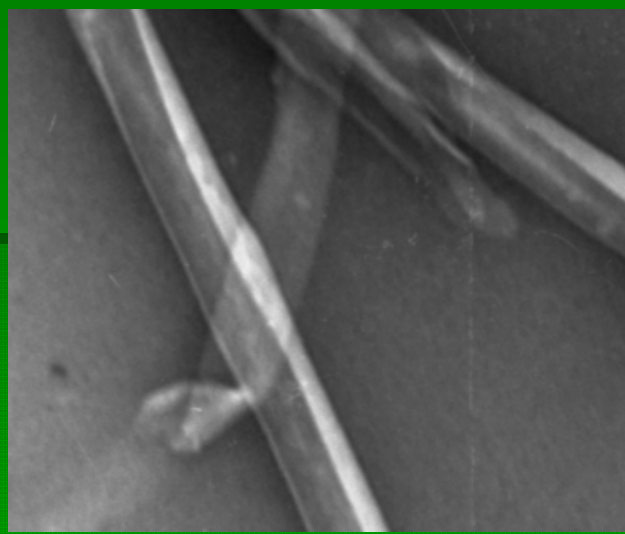
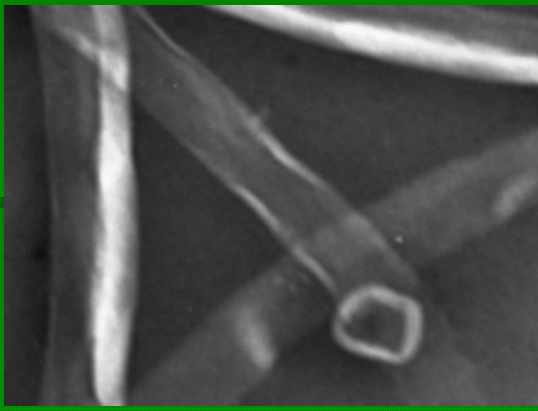
Hazard Assessment for Nanoparticles

Nanotoxicology Interdisciplinary Workshop. 6–7 April 2006. The Woodrow Wilson International Center for Scholars in Washington, DC.



Полунанотрубки - пролипосомы

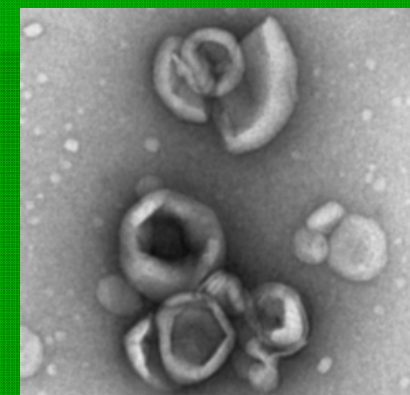
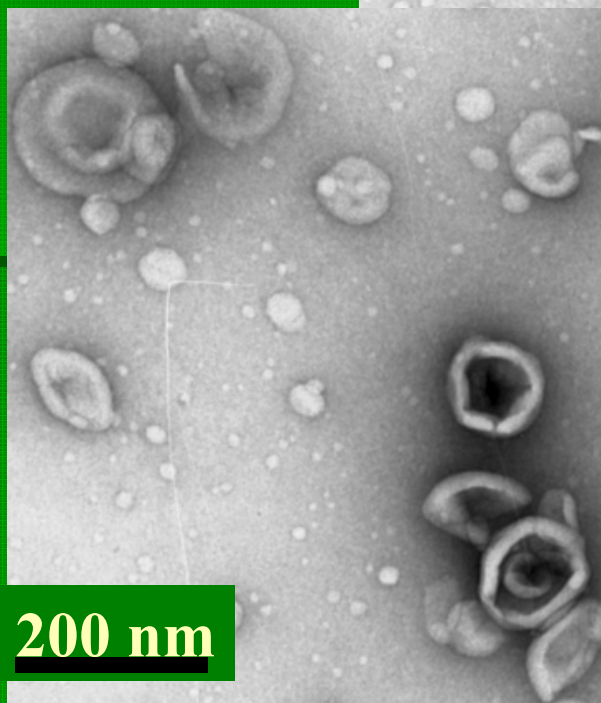
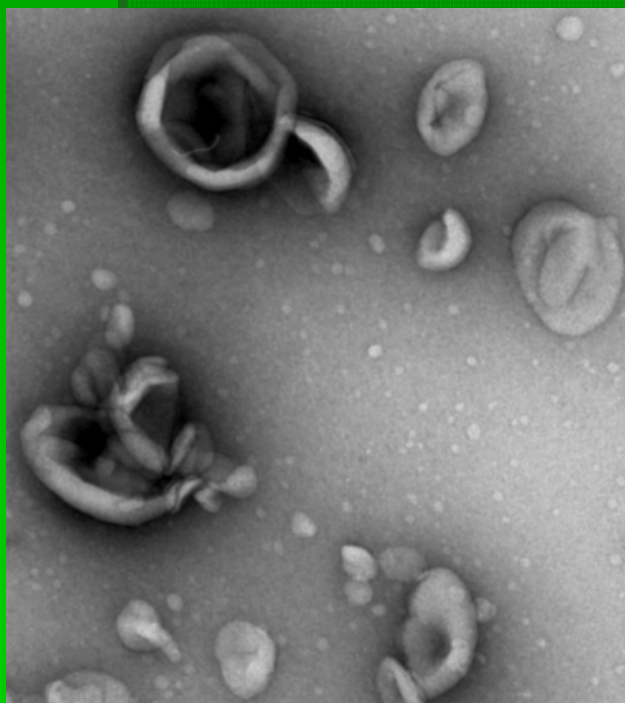
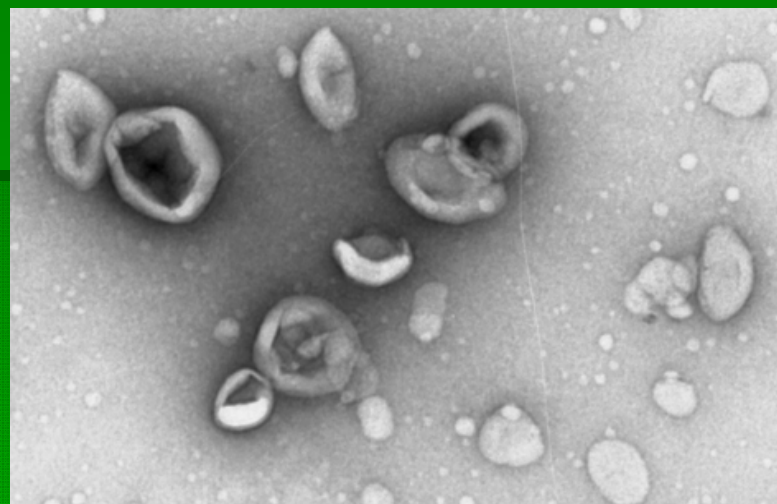
Спонтанное образование при комнатной температуре



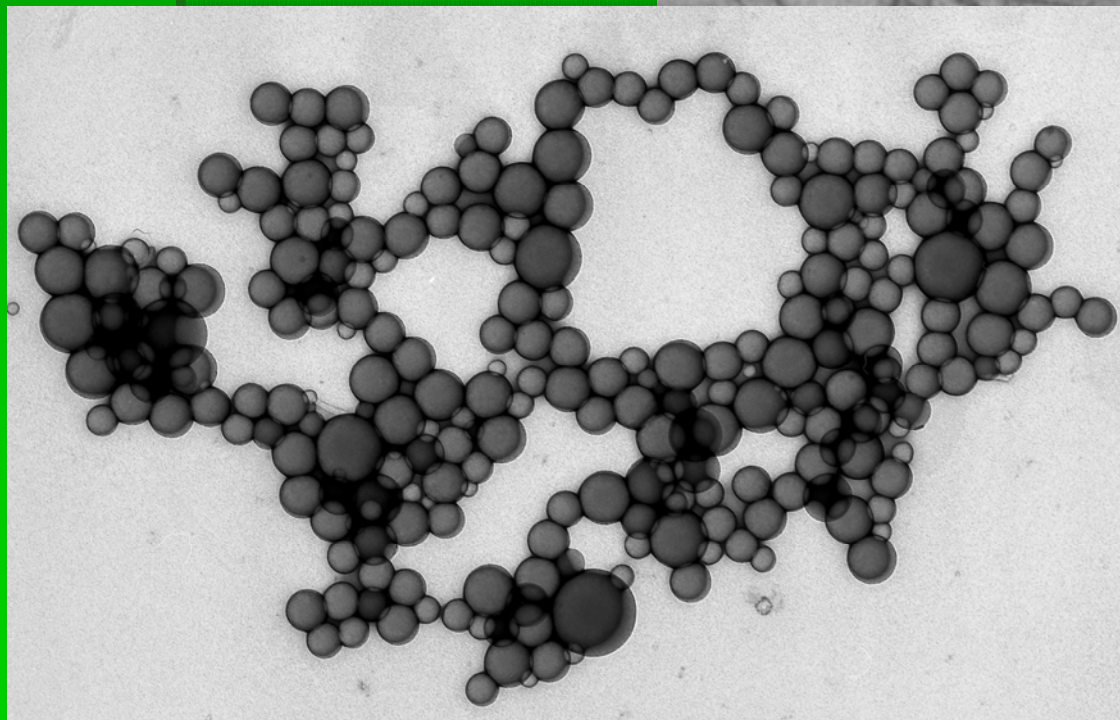
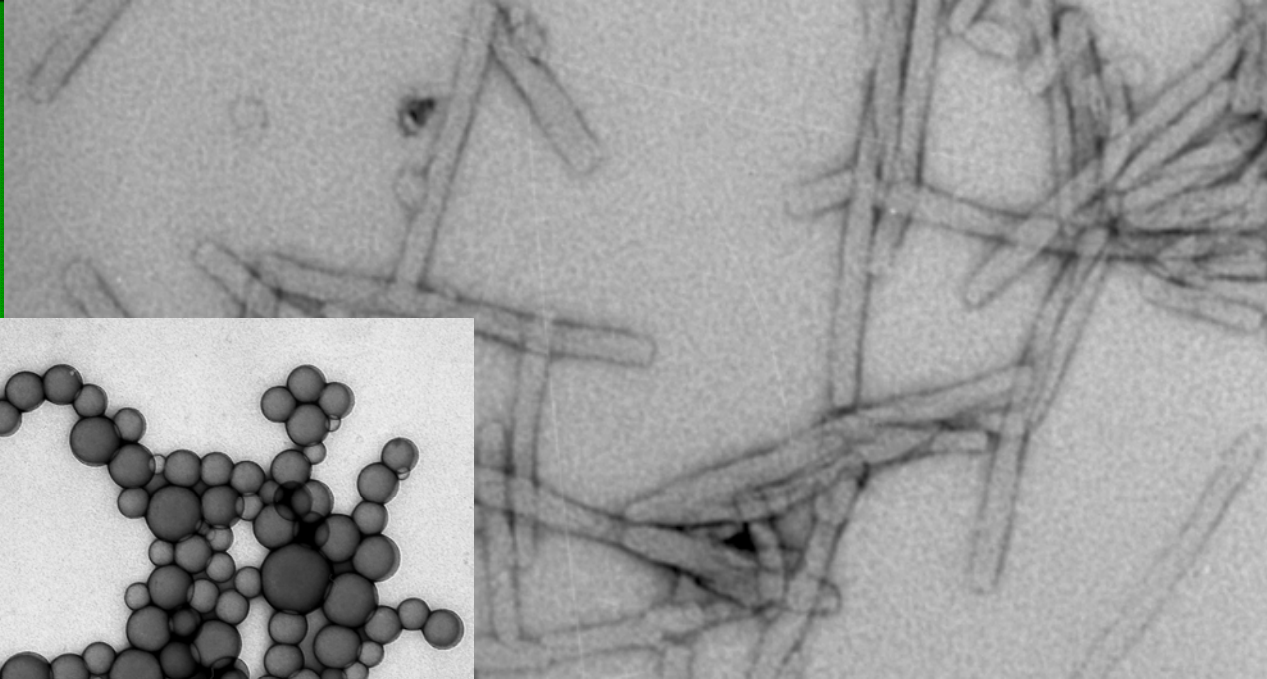
200 nm



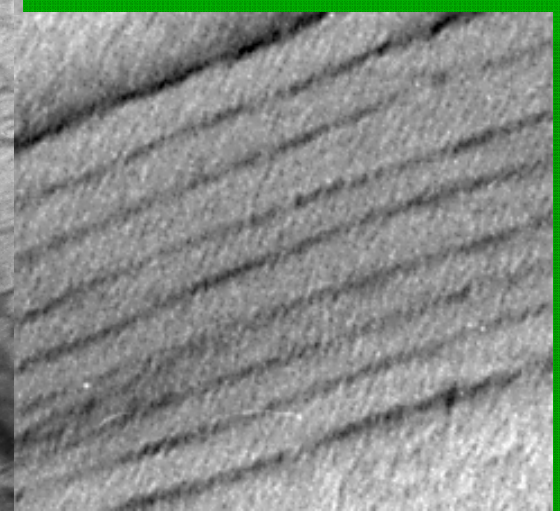
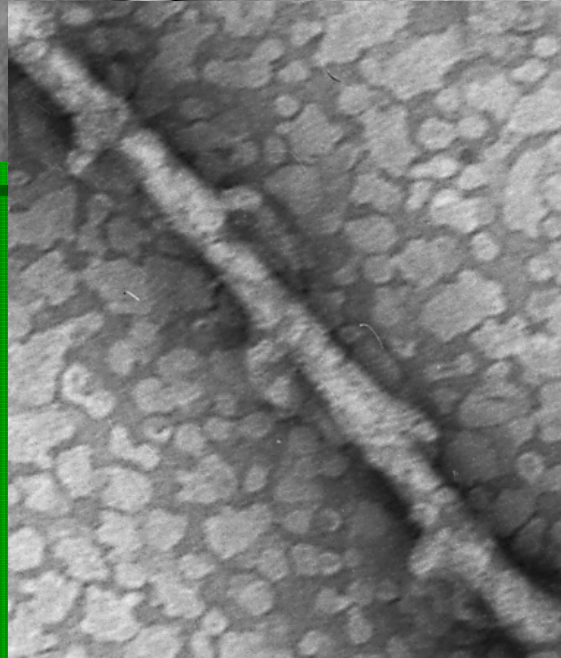
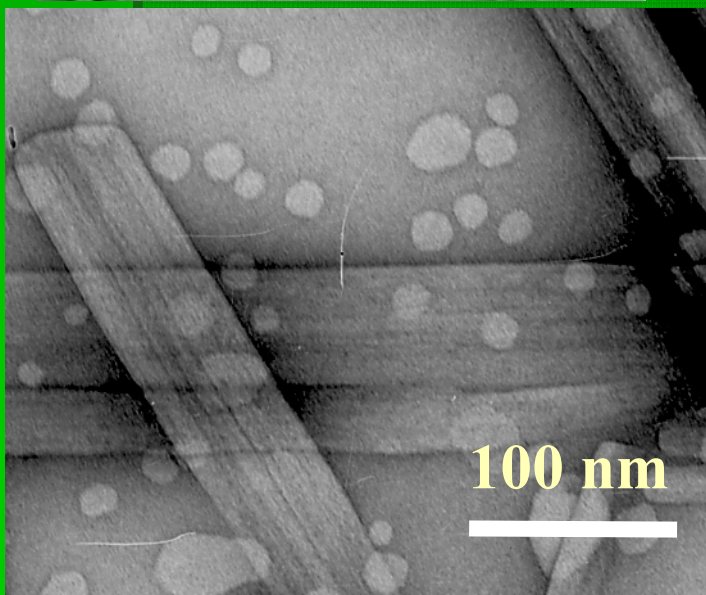
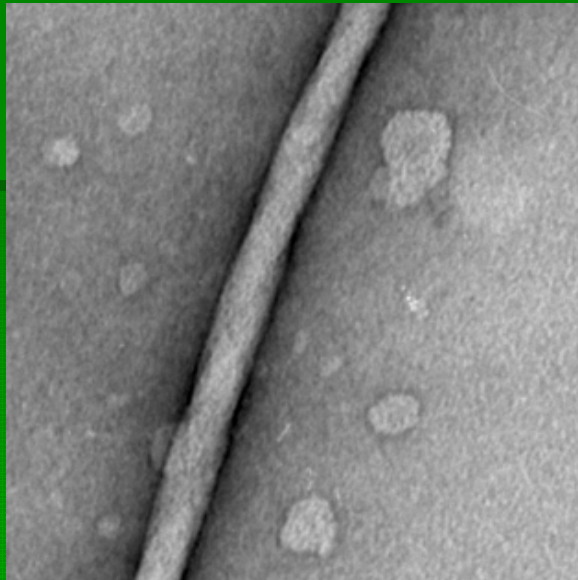
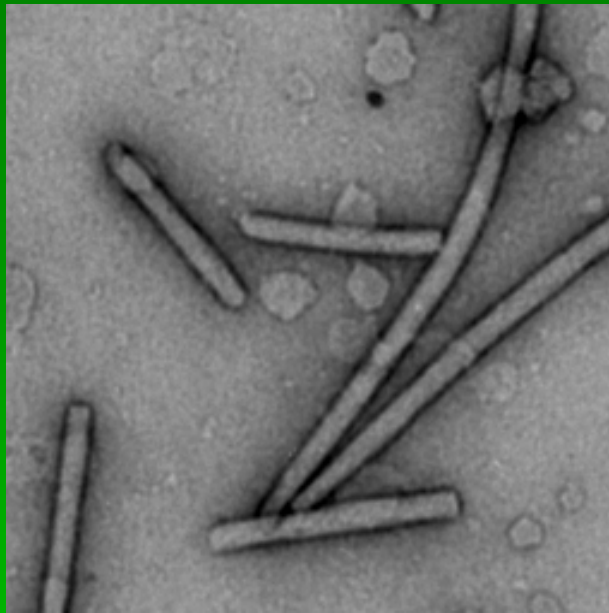
При нагревании превращаются в ЛИПОСОМЫ



Главный принцип образования наноструктур - самосборка



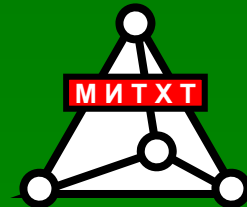
Наночастицы из различных тритерпеноидов





МИТХТ им. М.В. Ломоносова





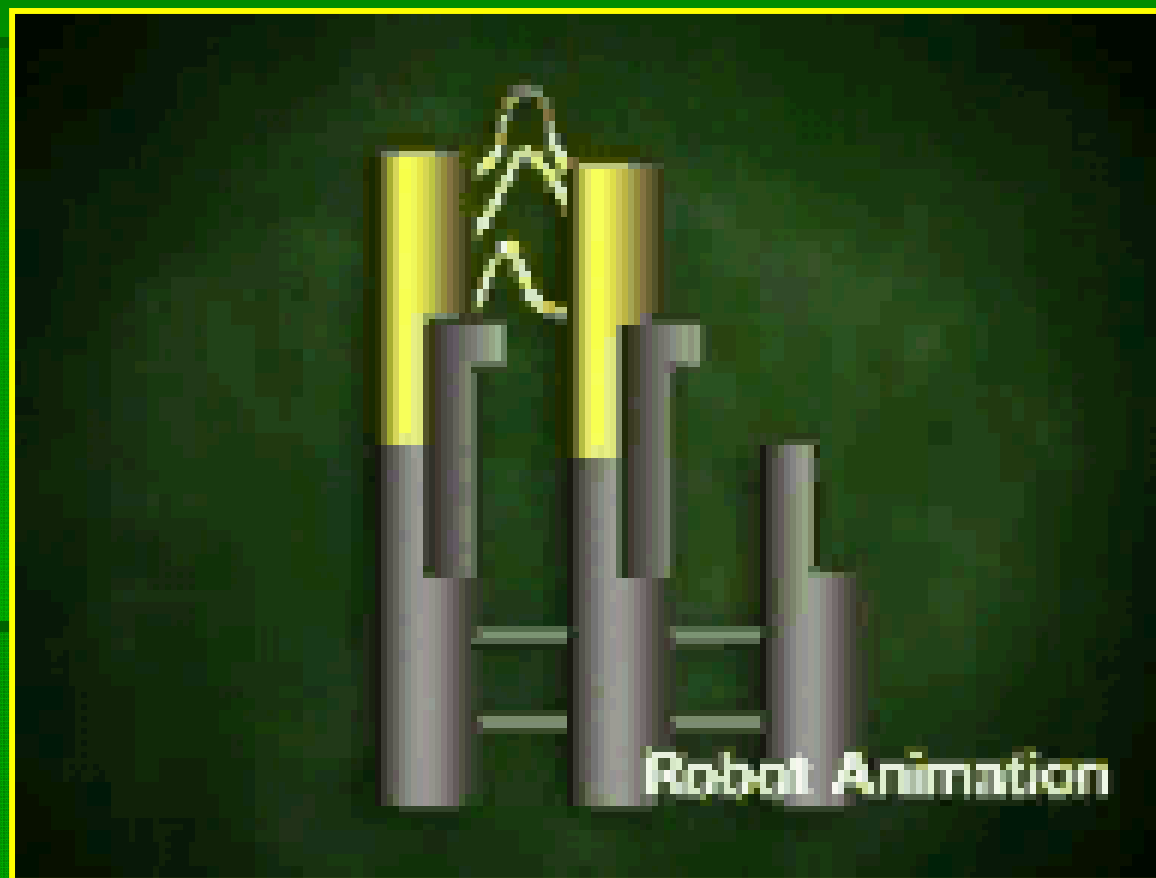
Благодарности

- Проф. В.И.Попенко, ИМБ РАН
- Денису Безрукову, МИТХТ
- Ане Цалман, МИТХТ

A stylized graphic at the bottom of the slide. It features a blue dome-like shape on the left, a light green horizontal bar below it, and an orange structure on the right that resembles a stylized chair or a piece of equipment. Two red octagonal shapes are positioned at the bottom, one under the blue dome and one under the orange structure.

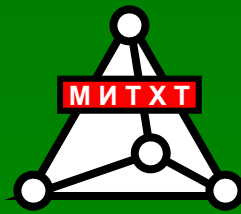
alex.kaplun@mail.ru

Шагающая ДНК



W.B. Sherman and N.C. Seeman. A precisely controlled DNA biped walking device. *Nano Lett.*, 4:1203–1207, 2004.

Наномотор



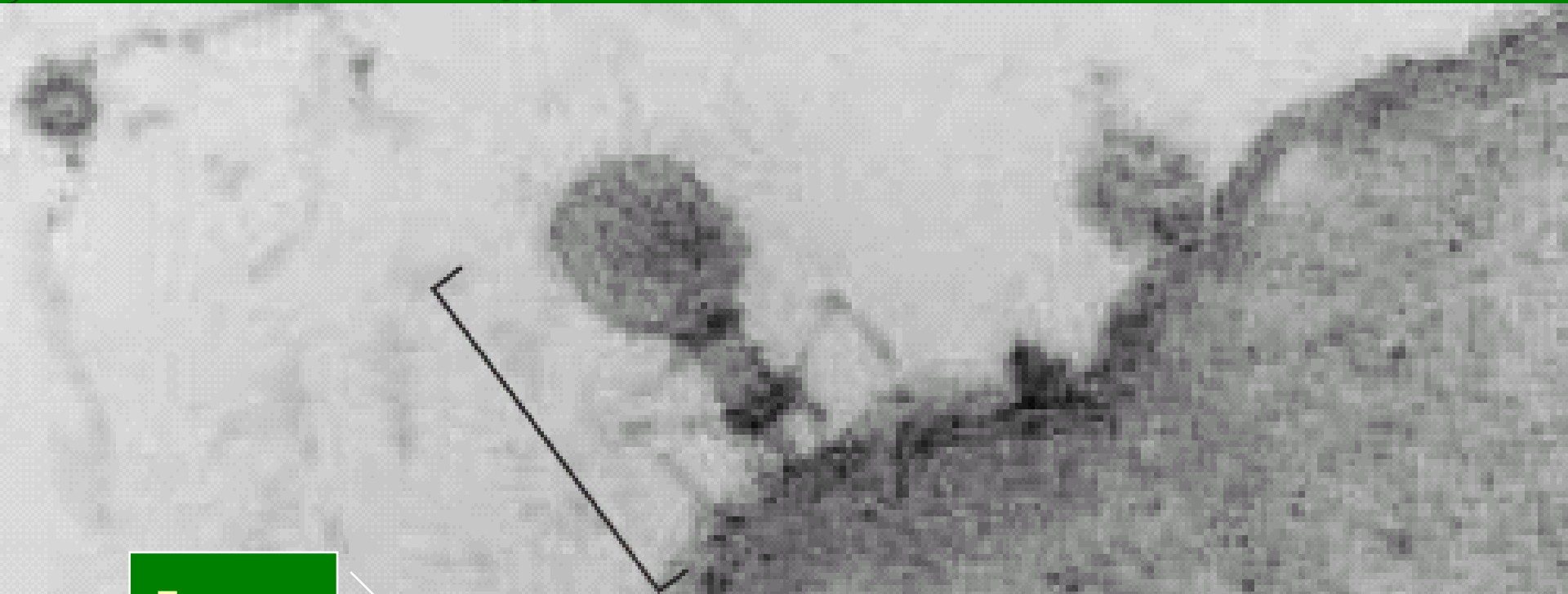
fully synthetic nanoscale electromechanical actuator incorporating a rotatable metal plate, with a multi-walled carbon nanotube serving as the key motion-enabling element



A.M. Fennimore, T.D. Yuzvinsky, Wei-Qiang Han, etc. Rotational actuators based on carbon nanotubes. *Nature* 424, 408-410 (2003)

Бактериофаг

λ

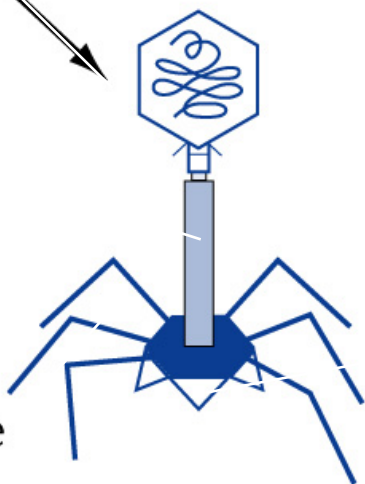


Головка

Воротничок

Чехол

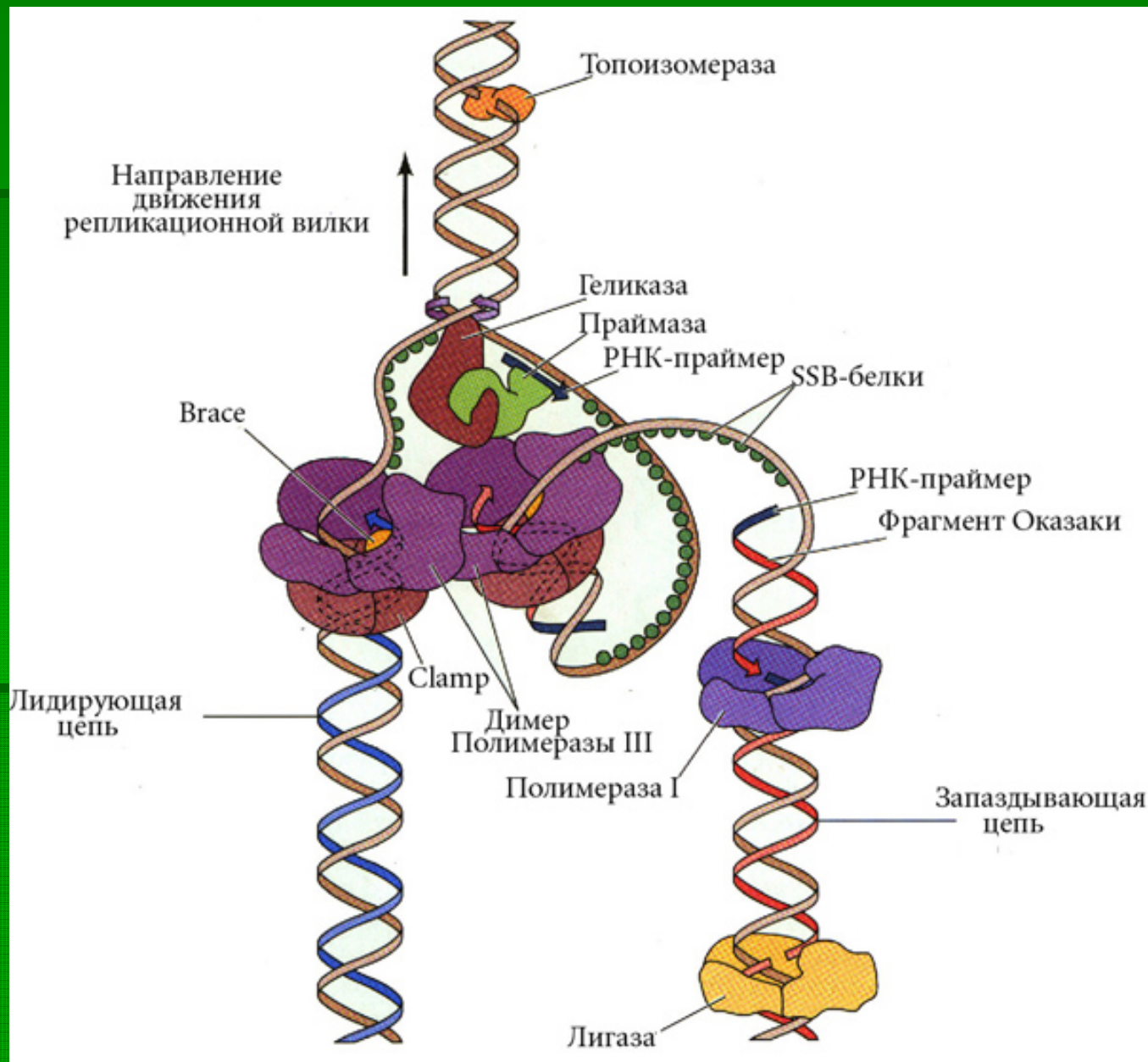
Хвостовые нити



Базальная
пластинка

100 nm

Репликация в бактериях



**Сегодня мы не знаем
того, что будем знать
завтра**