

Нанотехнологии в доставке лекарств

А.С. Соболев

*Институт биологии гена РАН,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова*

Наночастицы для доставки лекарств

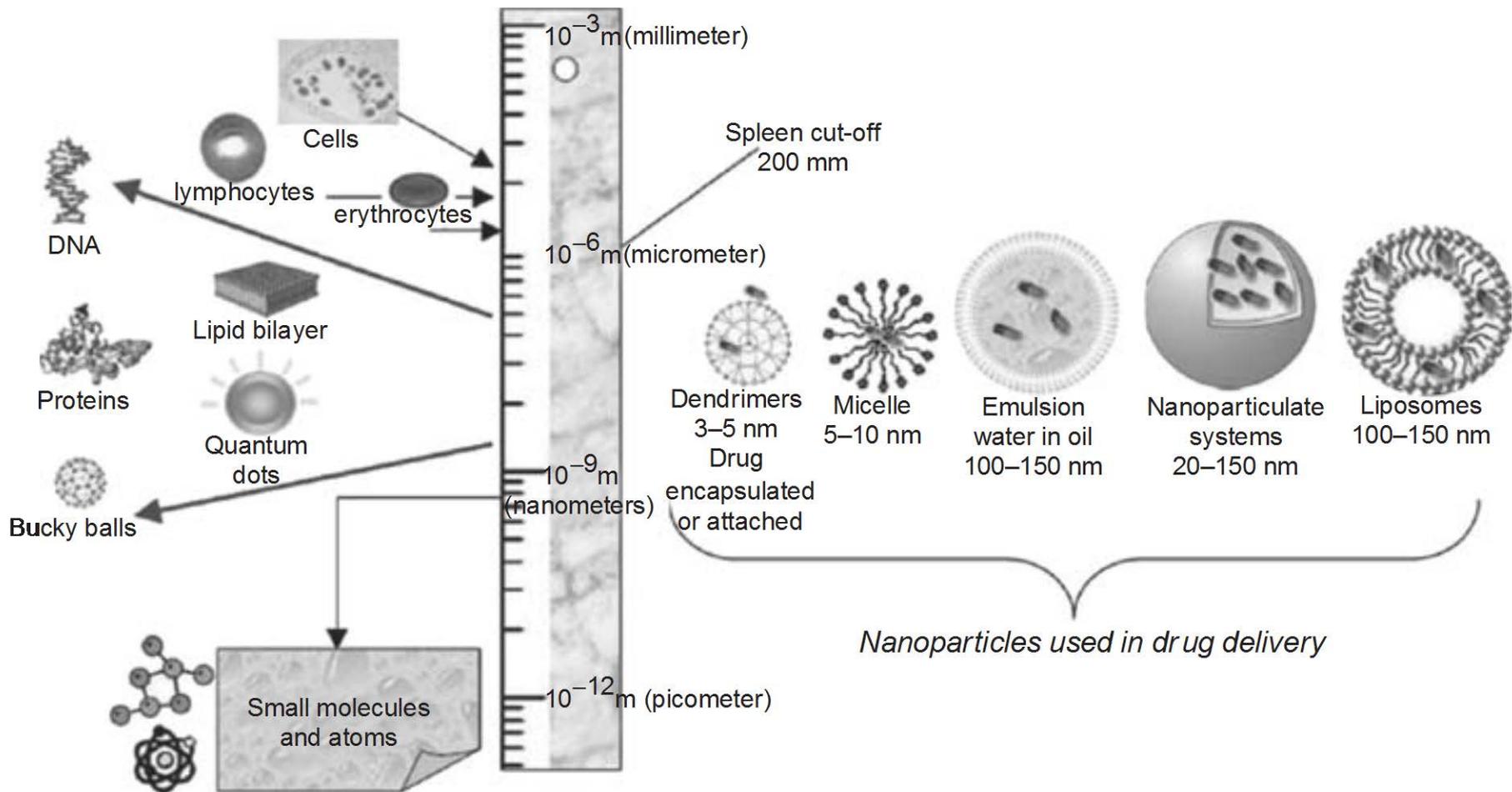


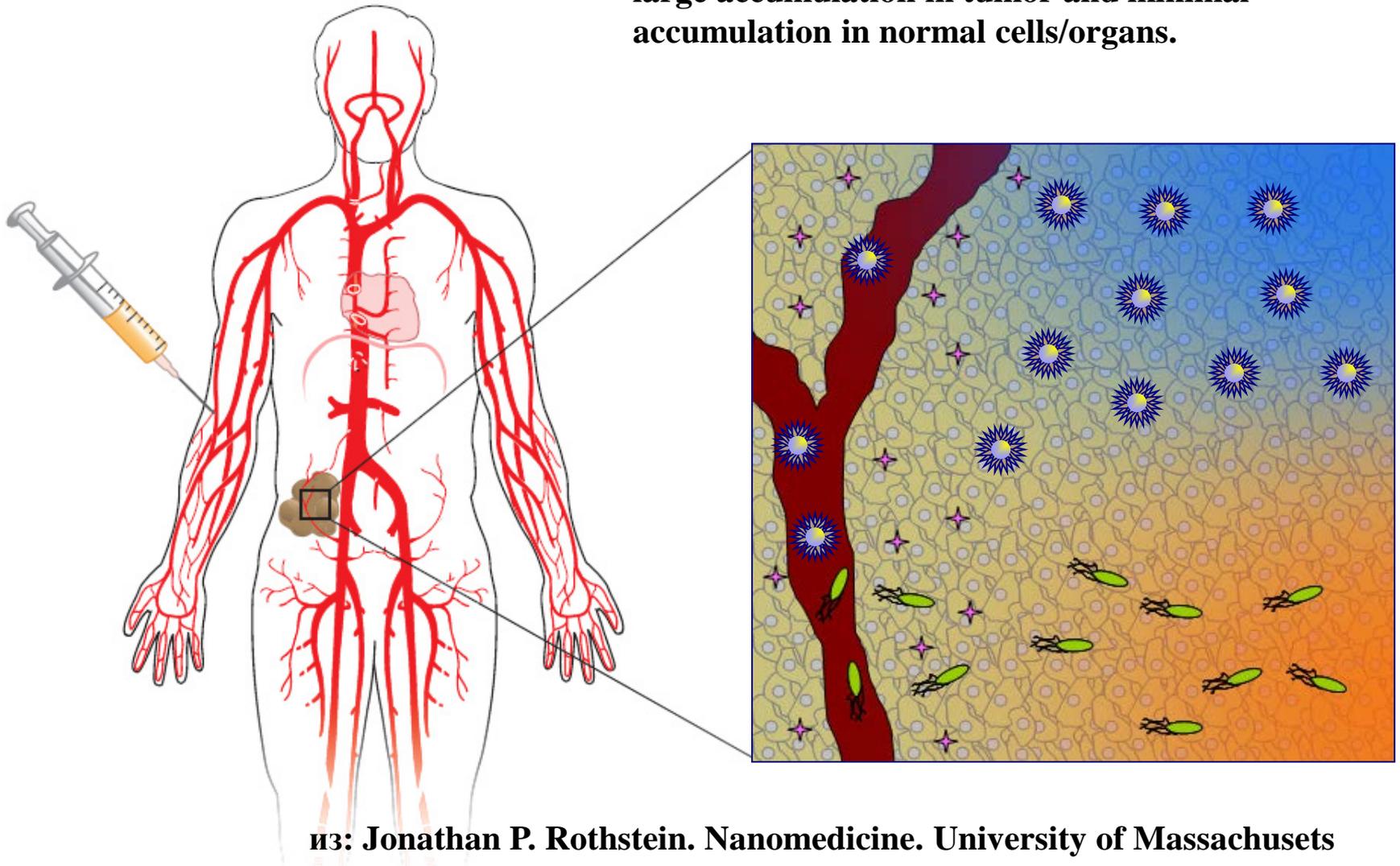
Figure 4.18 Nanoparticles for drug delivery applications. (Arruebo *et al.* 2007)

Особенности поведения наночастиц в организме



Направленная доставка в опухоли

- Goal is to inject treatment far from tumor and have large accumulation in tumor and minimal accumulation in normal cells/organs.



из: Jonathan P. Rothstein. Nanomedicine. University of Massachusetts

Беспорядочный рост сосудов опухоли

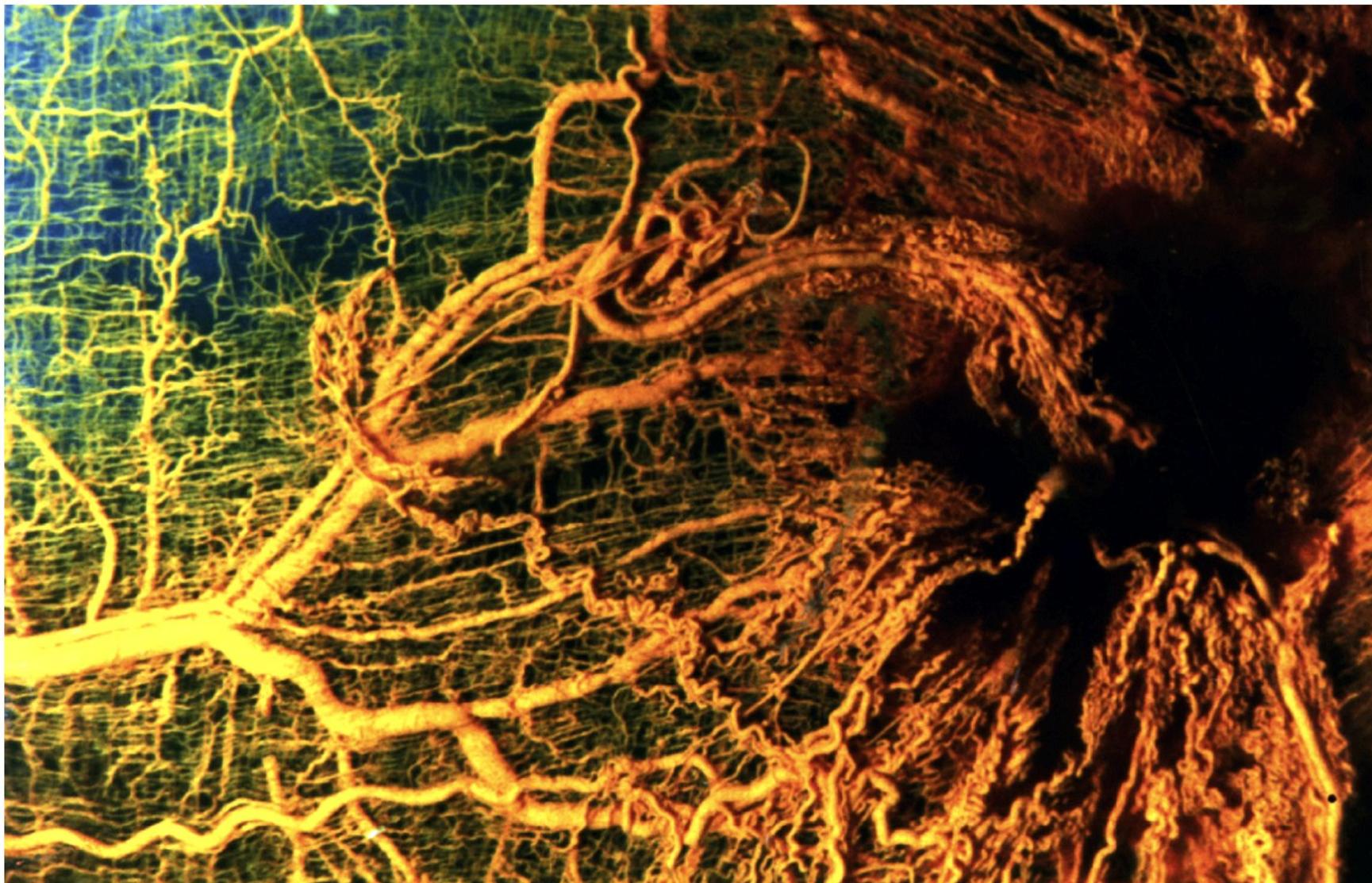
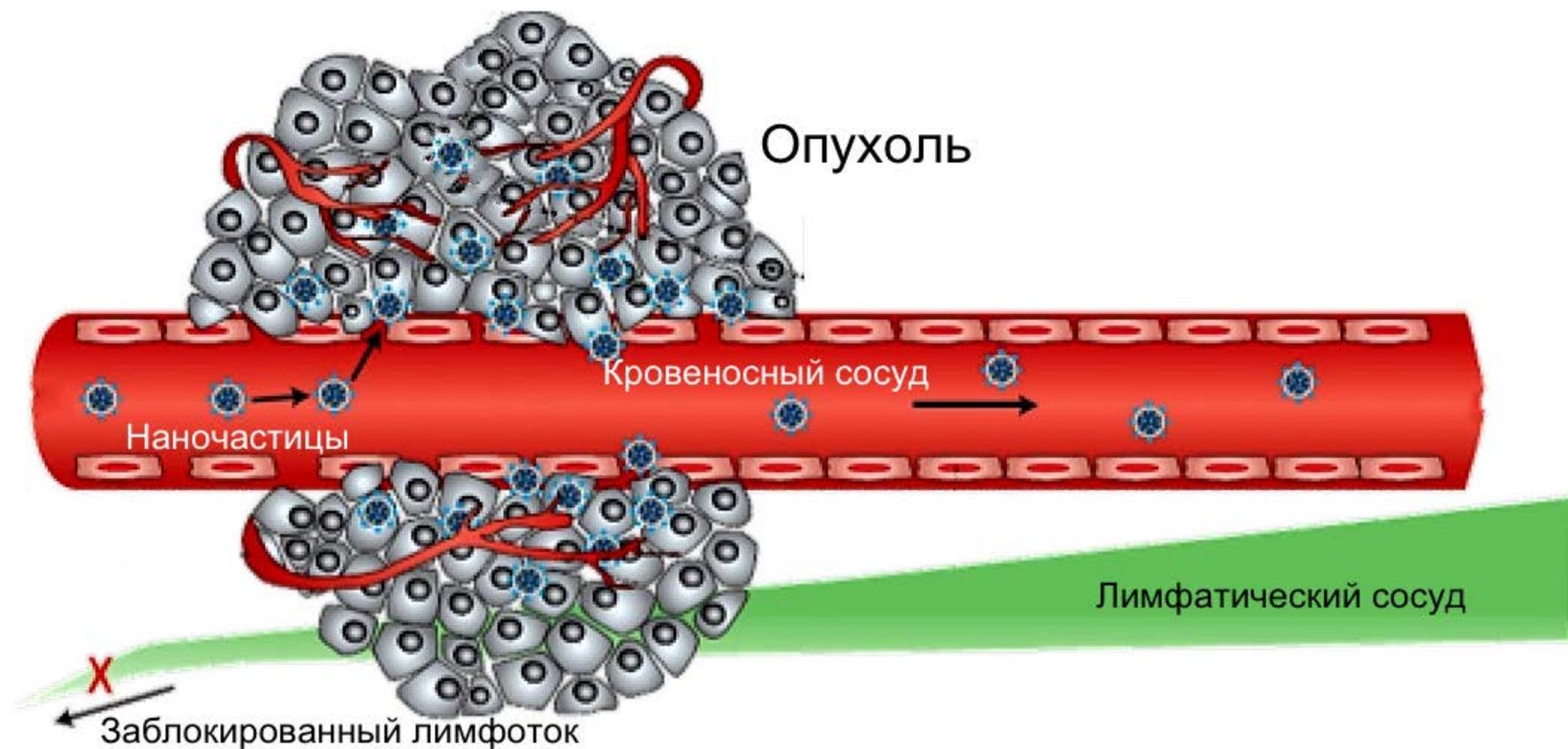


Figure 13.34a *The Biology of Cancer* (© Garland Science 2007)

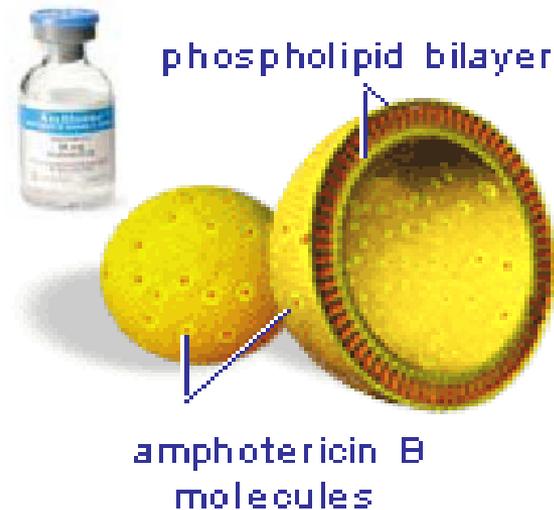
Поры (fenestrae) в эндотелии сосудов опухоли



Увеличенная проницаемость сосудов опухоли и большее удержание в опухоли наночастиц



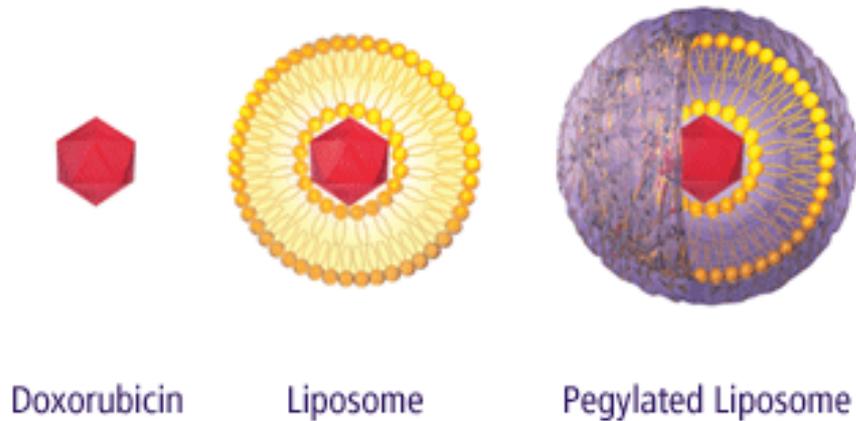
Пример 1: AmBisome



**Лекарство: амфотерицин В
против грибковых инфекций у раковых больных**

ЛИПОСОМЫ

Пример 2: Doxil



**Лекарство: доксорубицин
лечение рака яичников**

ЛИПОСОМЫ

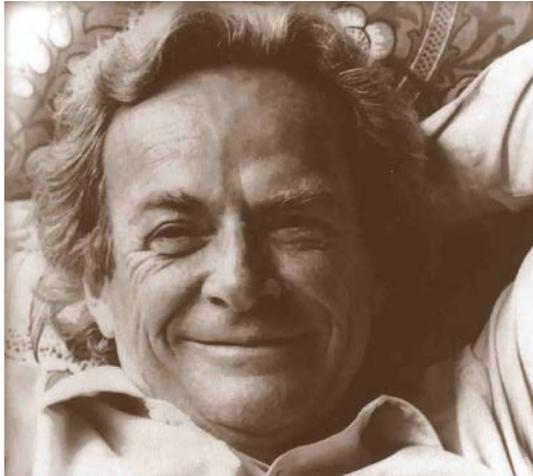
Пример 3: Abraxane



Лекарство: Паклитаксел

Лечение рака молочной железы

Белковые наночастицы



Ричард Ф. Фейнман
(1918 – 1988)

ВНИЗУ ПОЛНЫМ-ПОЛНО МЕСТА: ПРИГЛАШЕНИЕ В НОВЫЙ МИР ФИЗИКИ

«... Внизу (т. е. «внизу или внутри пространства», если угодно) располагается поразительно сложный мир малых форм, и когда-нибудь (например, в 2000 г.) люди будут удивляться тому, что до 1960 г. никто не относился серьезно к исследованиям этого мира.
<...>

Чудеса биологических систем

Биологический пример записи информации в малых масштабах вдохновил меня на то, чтобы думать о чем-то таком же, что стало бы возможным. Биология - это не просто запись информации; она *осуществляет* что-то на её основе. Биологическая система может быть чрезвычайно мала. Многие клетки очень малы, но они очень активны; они производят различные вещества, они перемещаются, они шевелятся, и они делают разные удивительные вещи - все в очень небольших масштабах. Кроме того, они хранят информацию. Рассмотрим же возможность того, что мы тоже сможем сделать вещь очень маленькой, и которая делает то, что мы хотим, - что мы можем изготовить объект, работающий на этом уровне!»

Из лекции, прочитанная в Калифорнийском технологическом институте на Рождественском обеде Американского физического общества в 1959 г.

Нанотехнология и ее изобретатель



«Молекулярные машины объединят в себе сенсоры, программы и молекулярные инструменты, с тем чтобы образовать системы, способные диагностировать и лечить компоненты отдельных клеток».

Эрик Дрекслер, «Машины создания. Грядущая эра нанотехнологий», 1986, стр. 100.

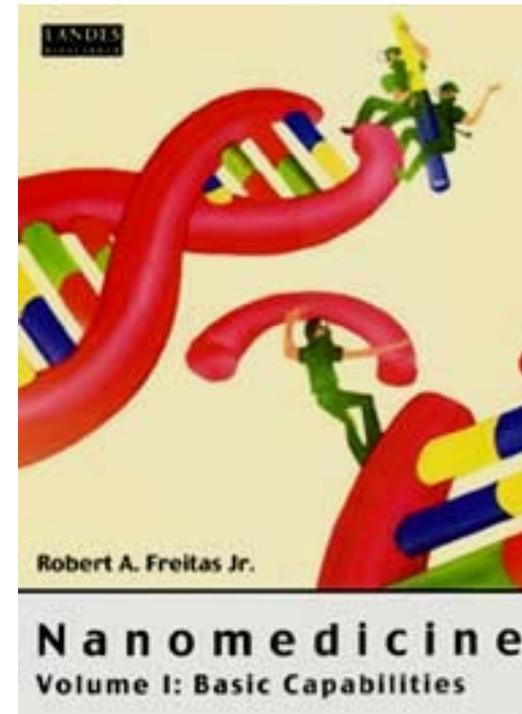


К. Эрик Дрекслер, род. 25.04.1955 г.

Наномедицина и ее автор



Роберт А. Фрайтас, мл.



Наномедицина и ее автор

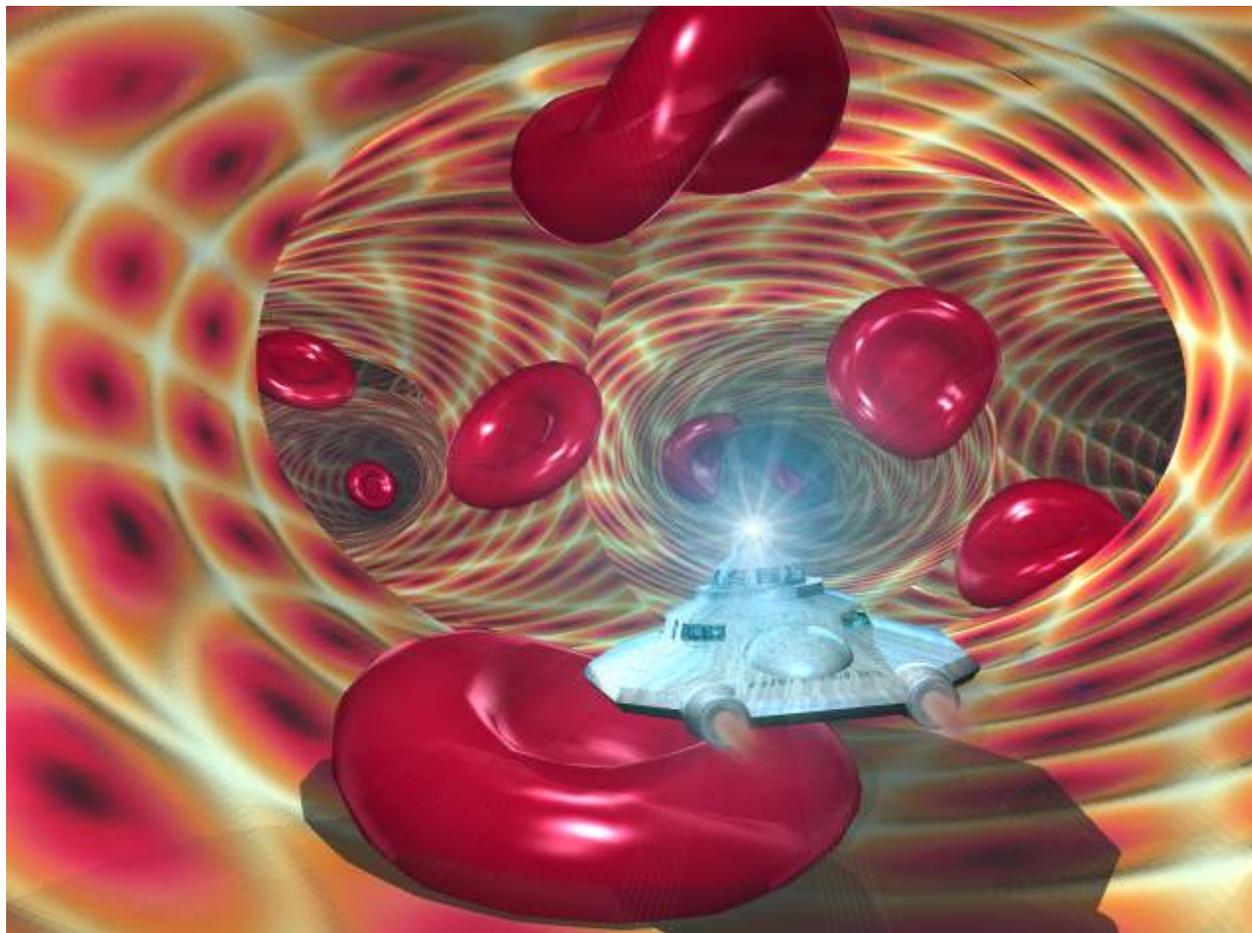


Роберт А. Фрайтас, мл.

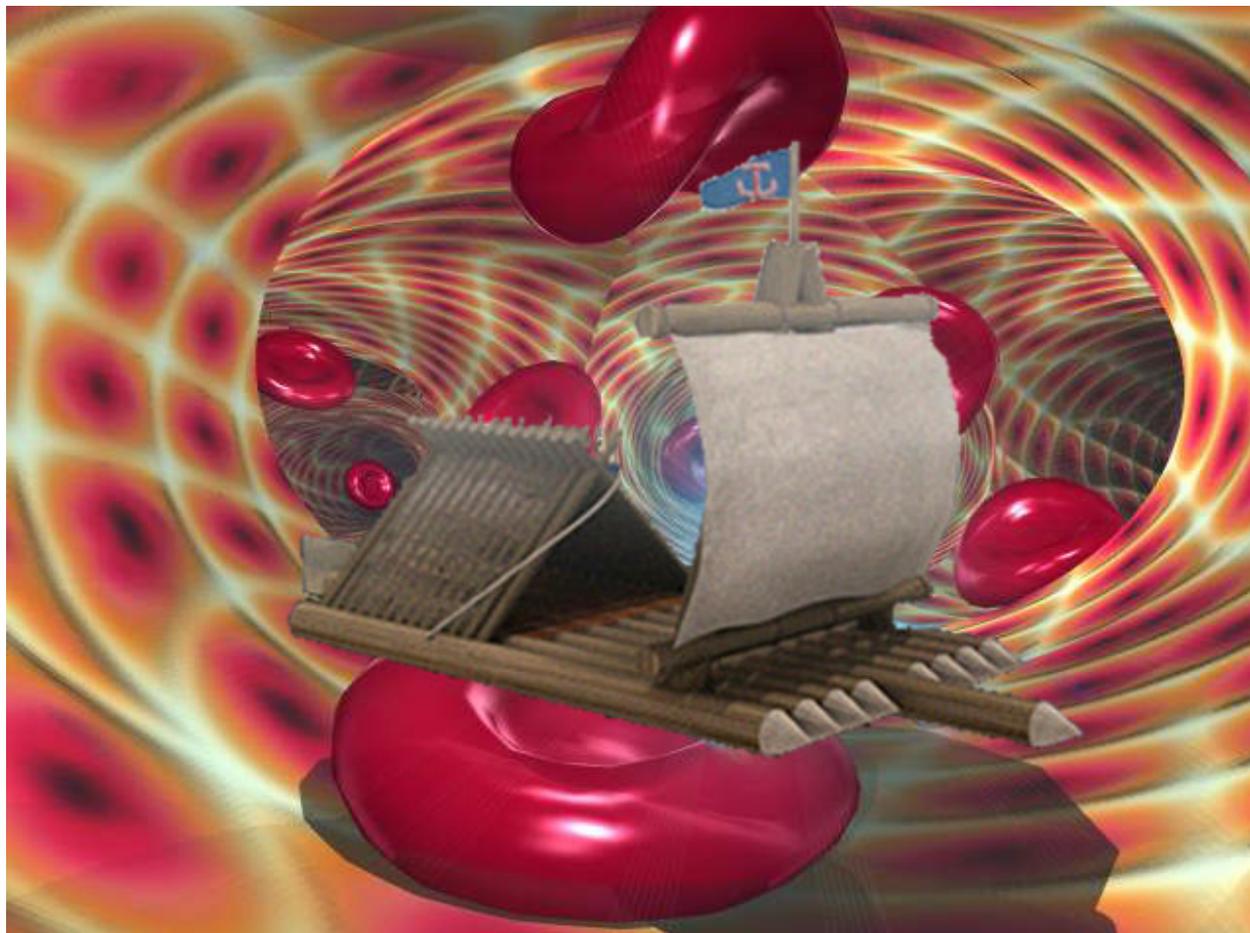
В грядущем столетии главный акцент сместится с медицинской науки на медицинскую инженерию. Наномедицина представит собою дизайн и производство большого числа молекулярных конструкций, которые, будучи введенными в организм пациента, станут поддерживать в определенном состоянии его здоровье.

*Robert A. Freitas, Jr. "Nanomedicine. Vol. I. Basic Capabilities".
Austin, Landes Bioscience, 1999, p. 17.*

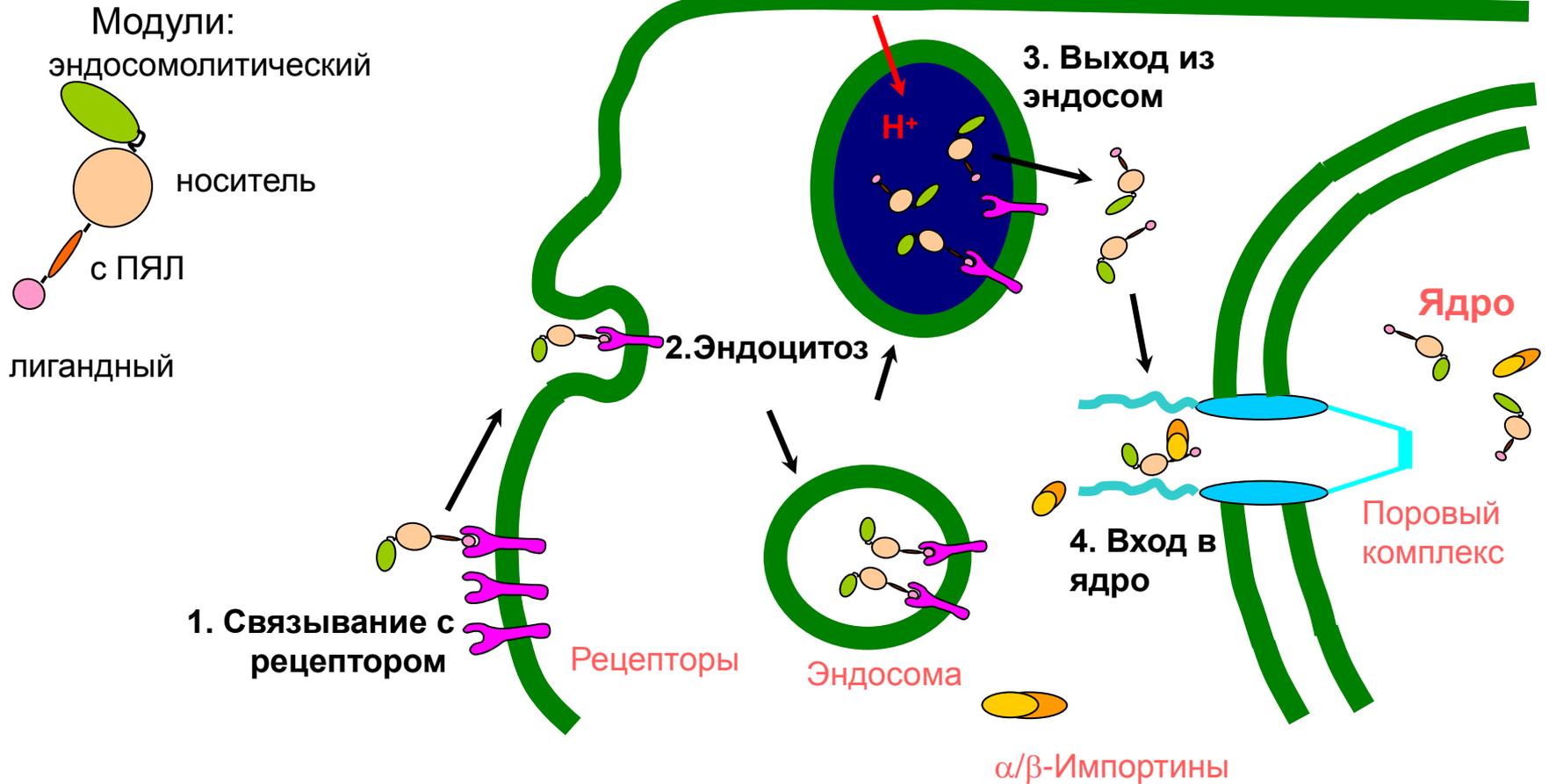
Цель наномедицины: *самодвижущиеся* конструкции, обнаруживающие дефектные клетки и излечивающие их после проникновения в них



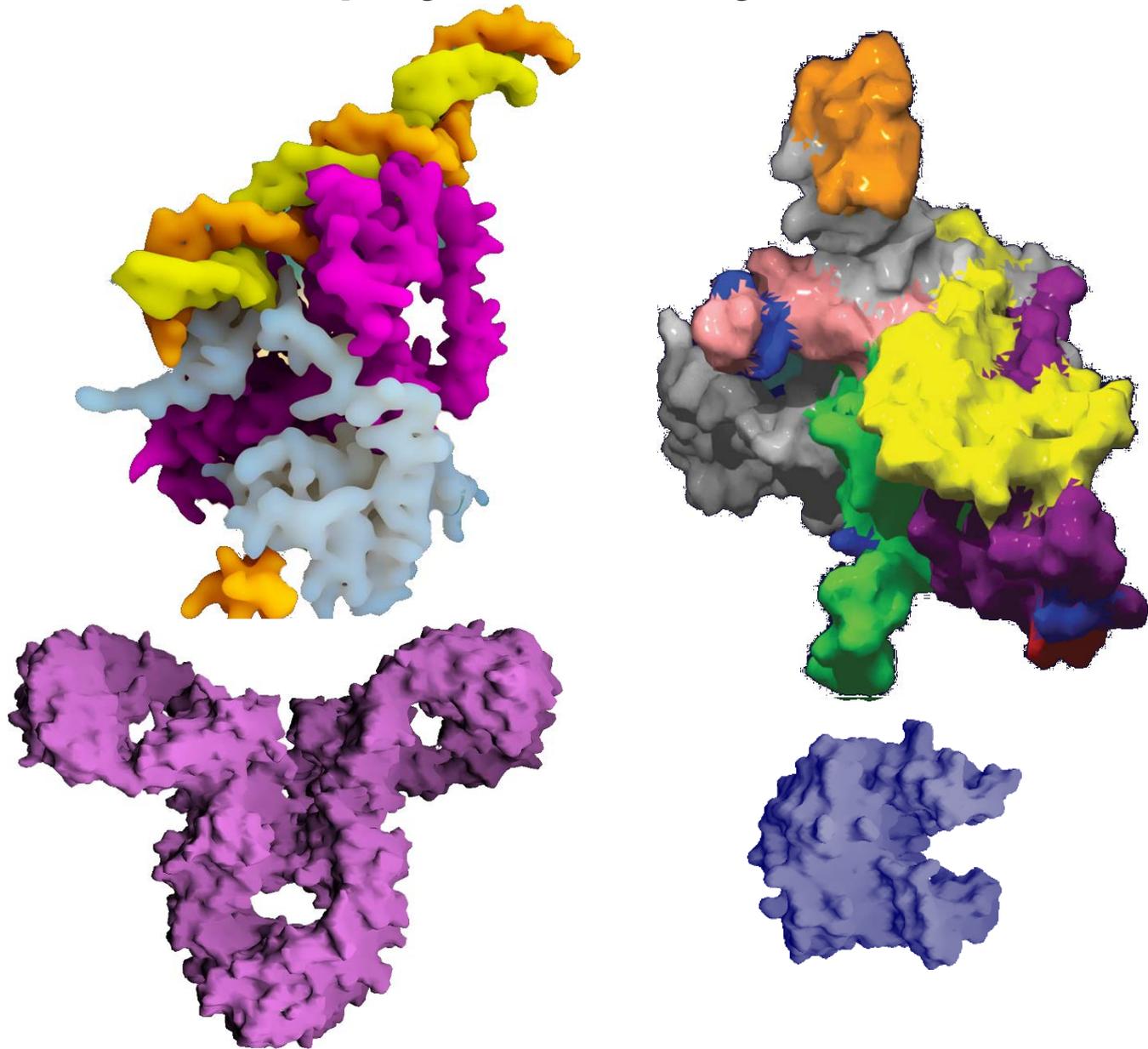
Сейчас: конструкции, использующие существующие в организме и его клетках транспортные процессы для поиска и лечения дефектных клеток



Модульные нанотранспортеры и их модули

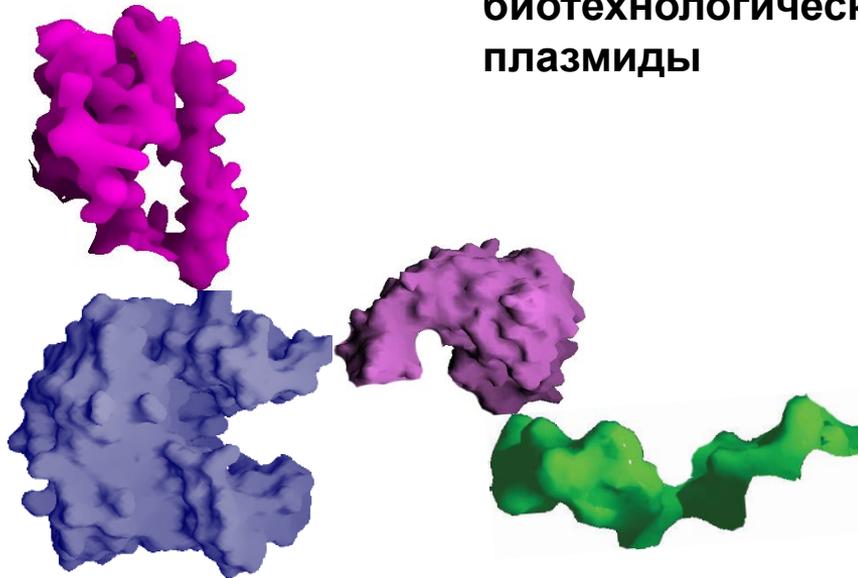


Выбор нужного модуля

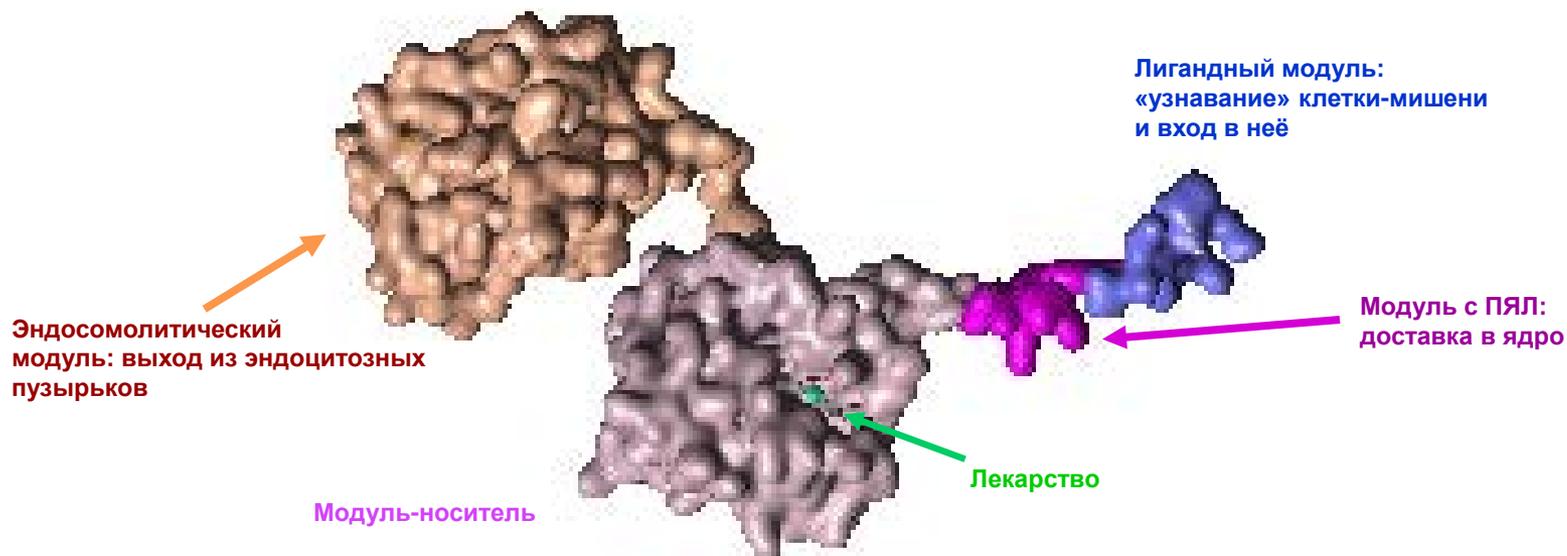


Выбор нужного модуля

Реально соединяются фрагменты генов, кодирующие соответствующие модули. Конечный нанотранспортер синтезируется биотехнологически на основе кодирующей плазмиды



Модульные нанотранспортеры и их модули



Лигандные модули : 1) α -меланцитстимулирующий гормон, или 2) эпидермальный фактор роста, или 3) интерлейкин-3, или 4) соматостатин,

обеспечивают «узнавание» следующих раковых клеток-мишеней:

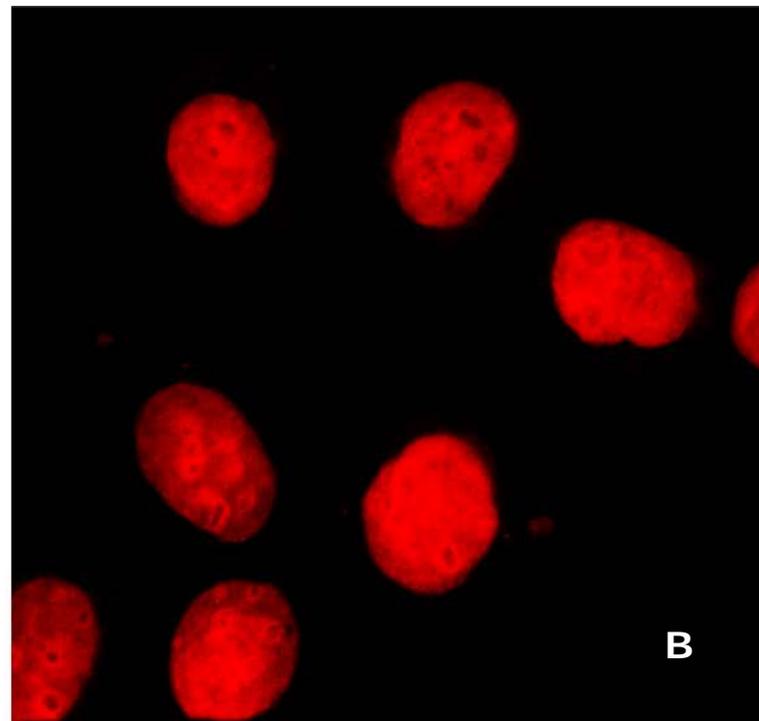
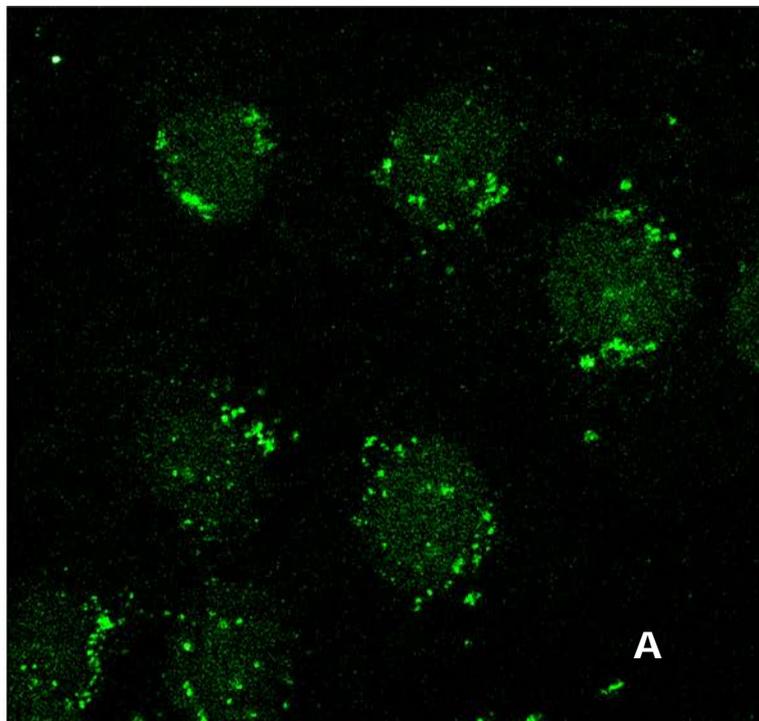
1) меланома, или 2) рак головы и шеи, глиобластома, рак пищевода, эпидермоидная карцинома, или 3) острый миелоидный лейкоз, или 4) нейробластома, соответственно.

Sobolev A.S. *BioEssays*. 2008; 30:278-287;

Соболев А.С. *Росс. нанотехнологии*. 2009, 4: 36-38;

Sobolev A.S. In: *The Biomedical Engineering Handbook*, 4th Edition. Ed. by J.D. Bronzino, D.R. Peterson. Vol. 4: *Molecular Engineering. Nanomedicine*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2012 (in press)

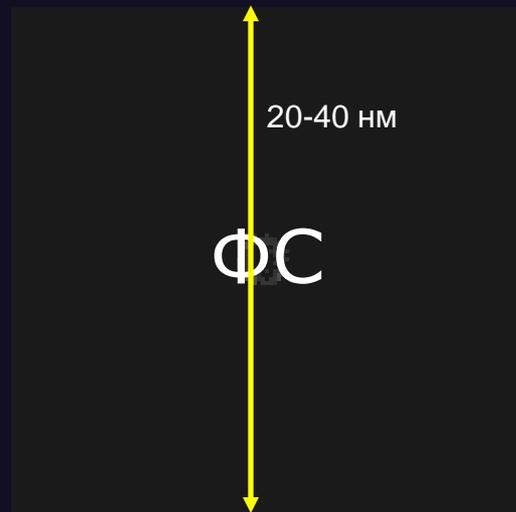
Внутриклеточная локализация МНТ



A, DTox-HMP-NLS-EGF в клетках A431; B, те же клетки A431 с ДНК, окрашенной ToPro-3

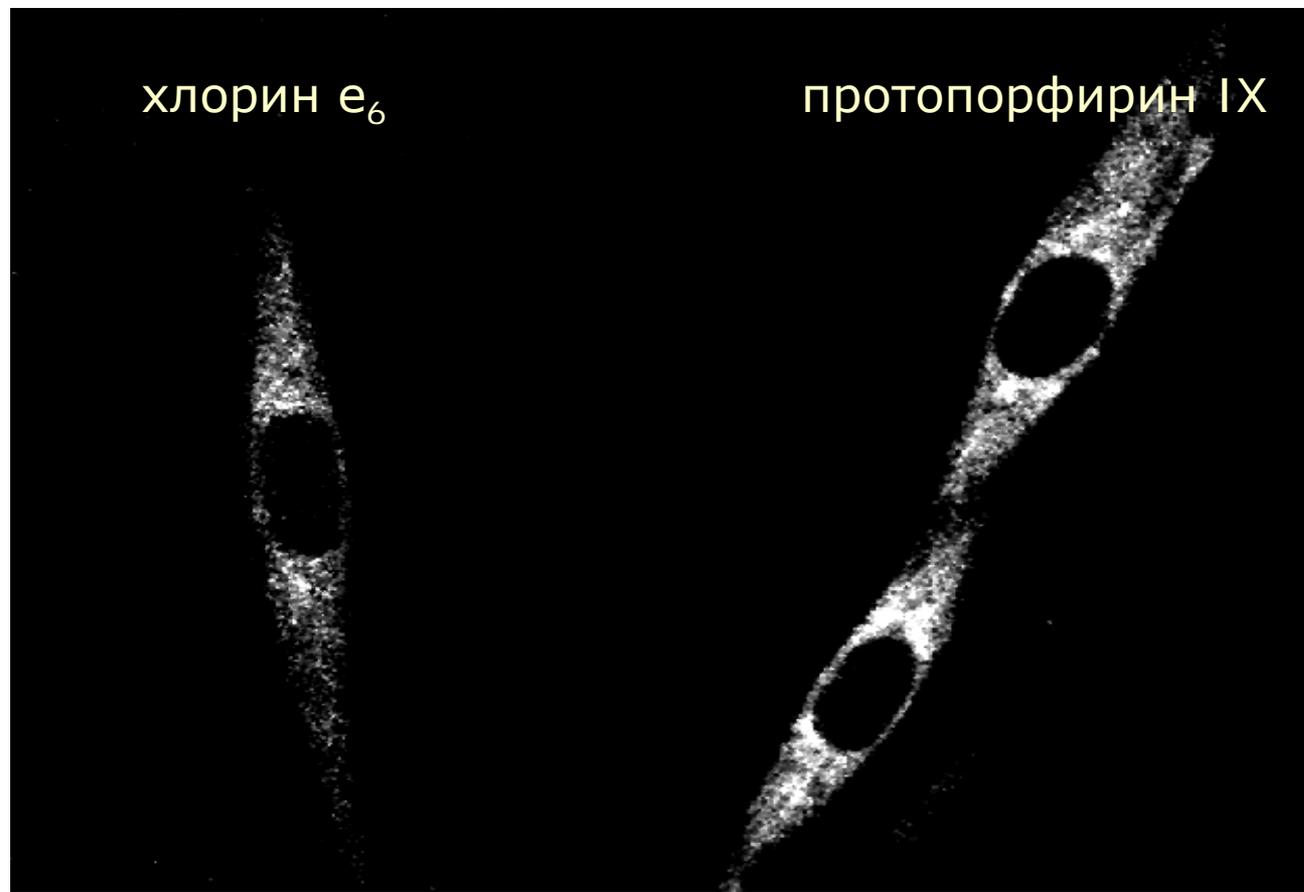
Фотоактивация фотосенсибилизаторов

$h\nu$



Активные формы кислорода

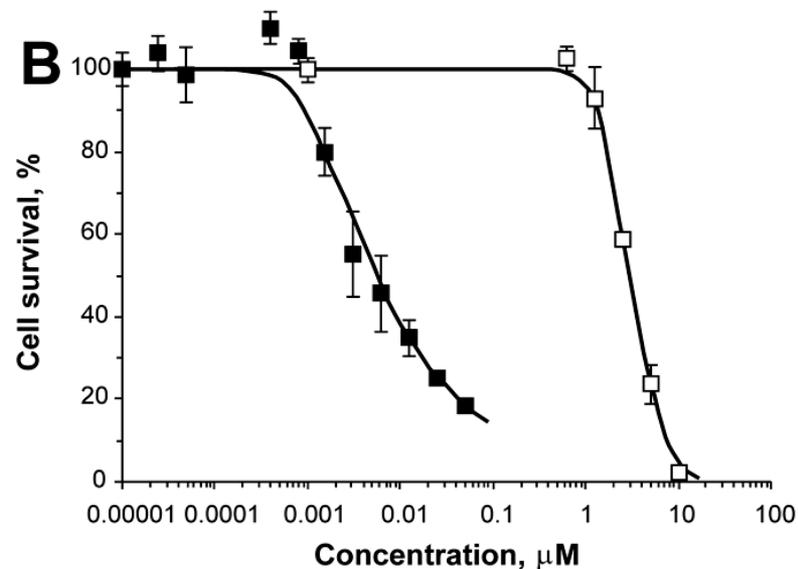
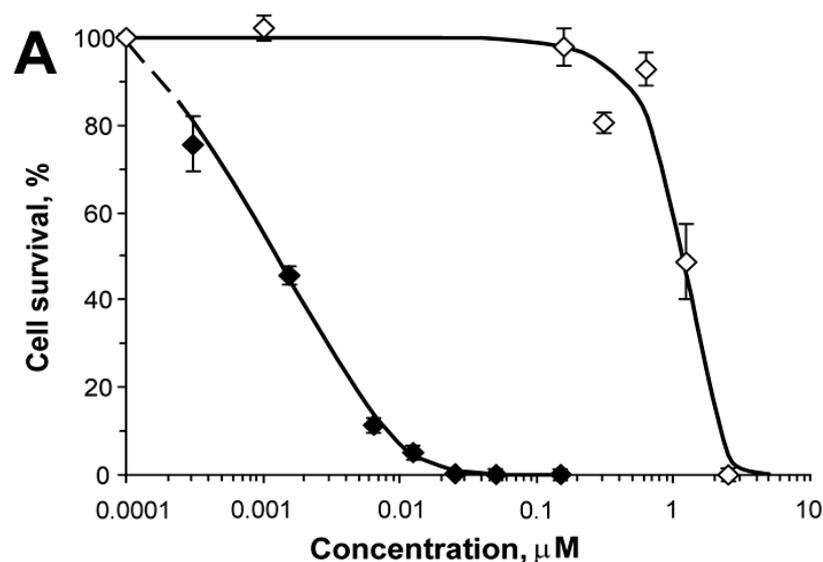
Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов



Фотосенсибилизаторы не локализуются в ядрах клеток – структурах, наиболее чувствительных к активным формам кислорода

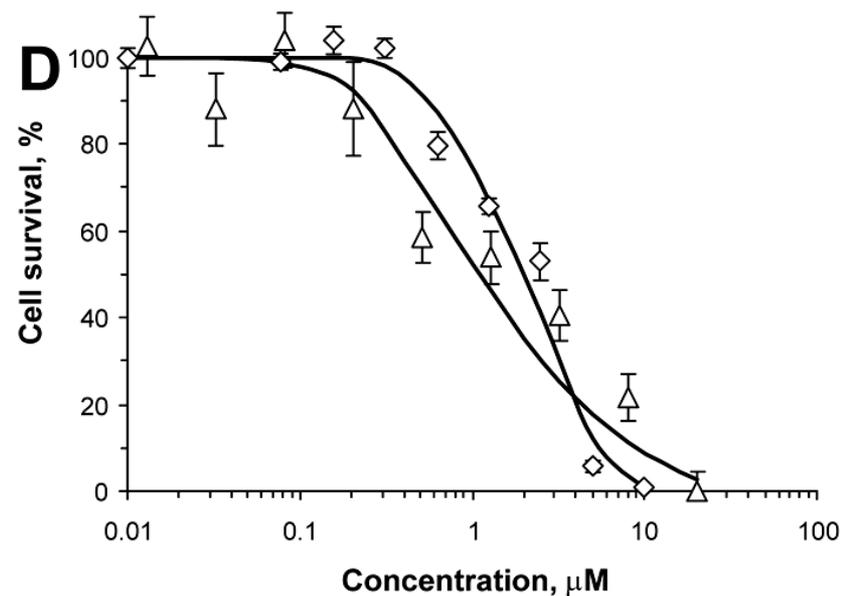
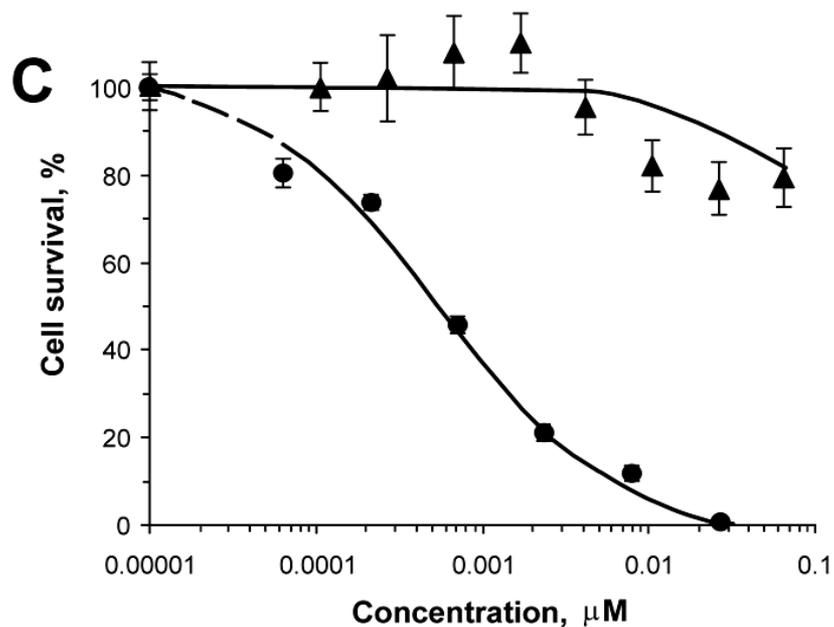
глиома C₆

Фотосенсибилизаторы, доставляемые МНТ в ядра клеток-мишеней, приобретают намного большую эффективность ...



A - (хлорин e_6)-HMP-NLS-DTox-EGF (\blacklozenge) и свободный хлорин e_6 (\diamond). B - (бактериохлорин p)-HMP-NLS-DTox-EGF (\blacksquare) и свободный бактериохлорин p (\square).

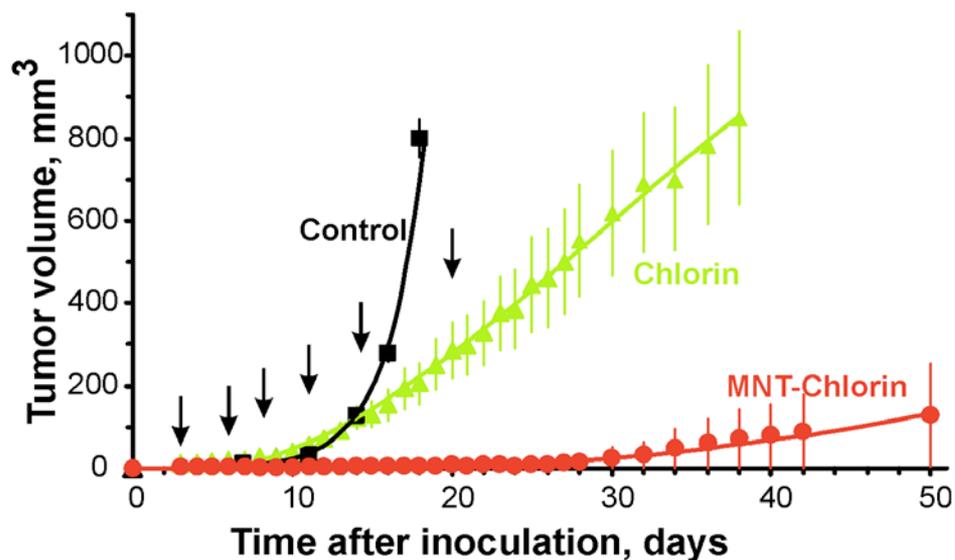
... и клеточную специфичность



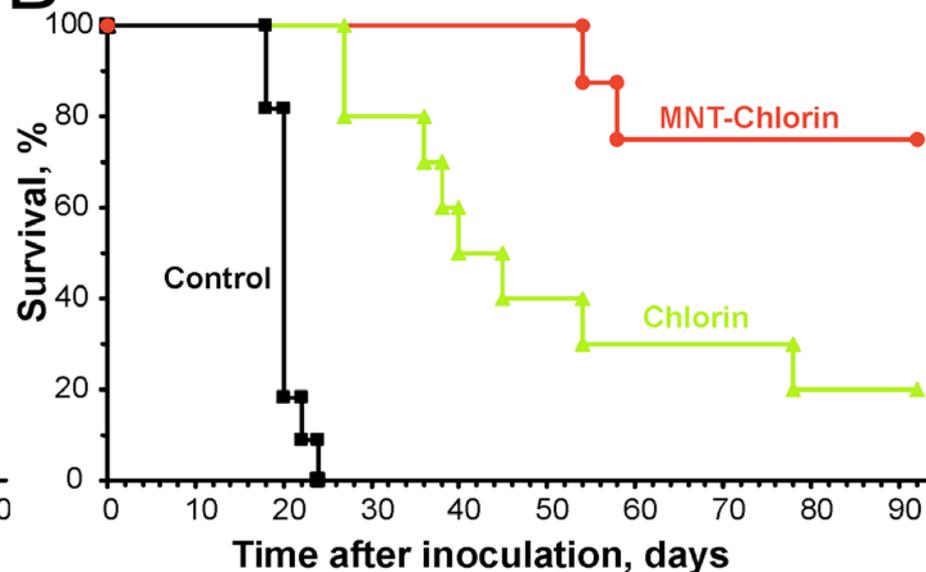
C - (хлорин e_6)-DTox-HMP-NLS-EGF на клетках-мишенях A431 (●) и «немишенных» клетках NIH 3T3 (▲). D - свободный хлорин e_6 на клетках-мишенях A431 (◇) и «немишенных» клетках NIH 3T3 (△).

Фотодинамическая терапия мышей с эпидермоидной карциномой человека

A



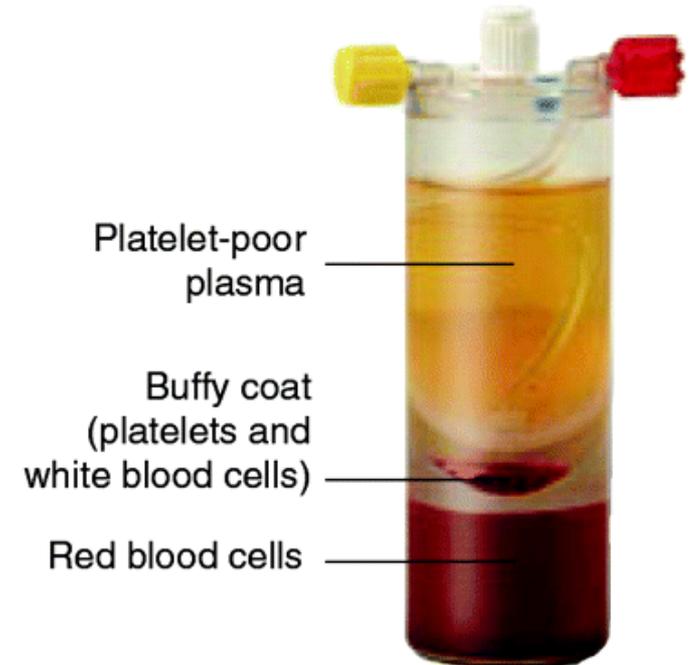
B



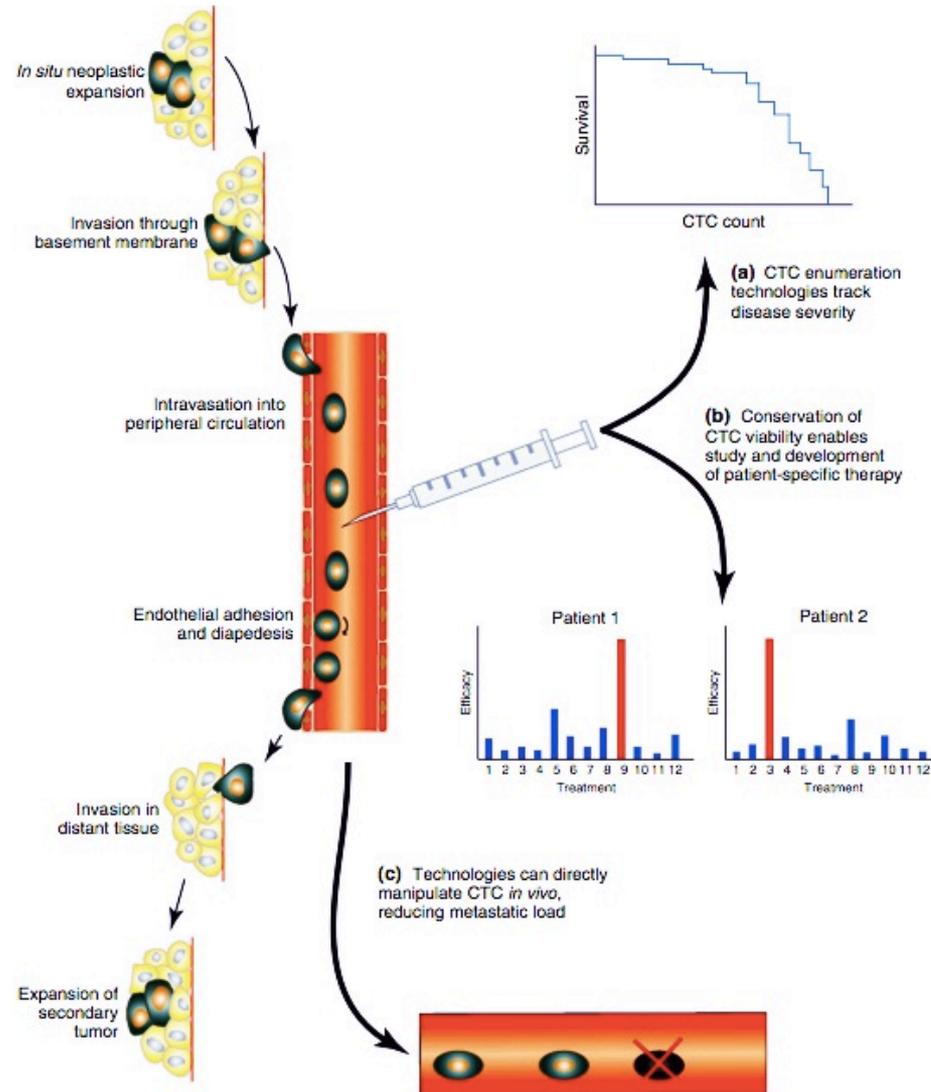
Нанобиотехнология для вылавливания циркулирующих раковых клеток

Device/ Technique	Molecular Target	Description	Sensitivity	Development Stage
CellSearch	EpCAM	CTC are immunoprecipitated from buffy coat samples using magnetic nanoparticles coated with anti-EpCAM antibody. Subsequent staining is employed to improve detection specificity. CellSearch is currently the only FDA-approved device for CTC detection.	1 CTC in 0.5 mL blood	FDA approved

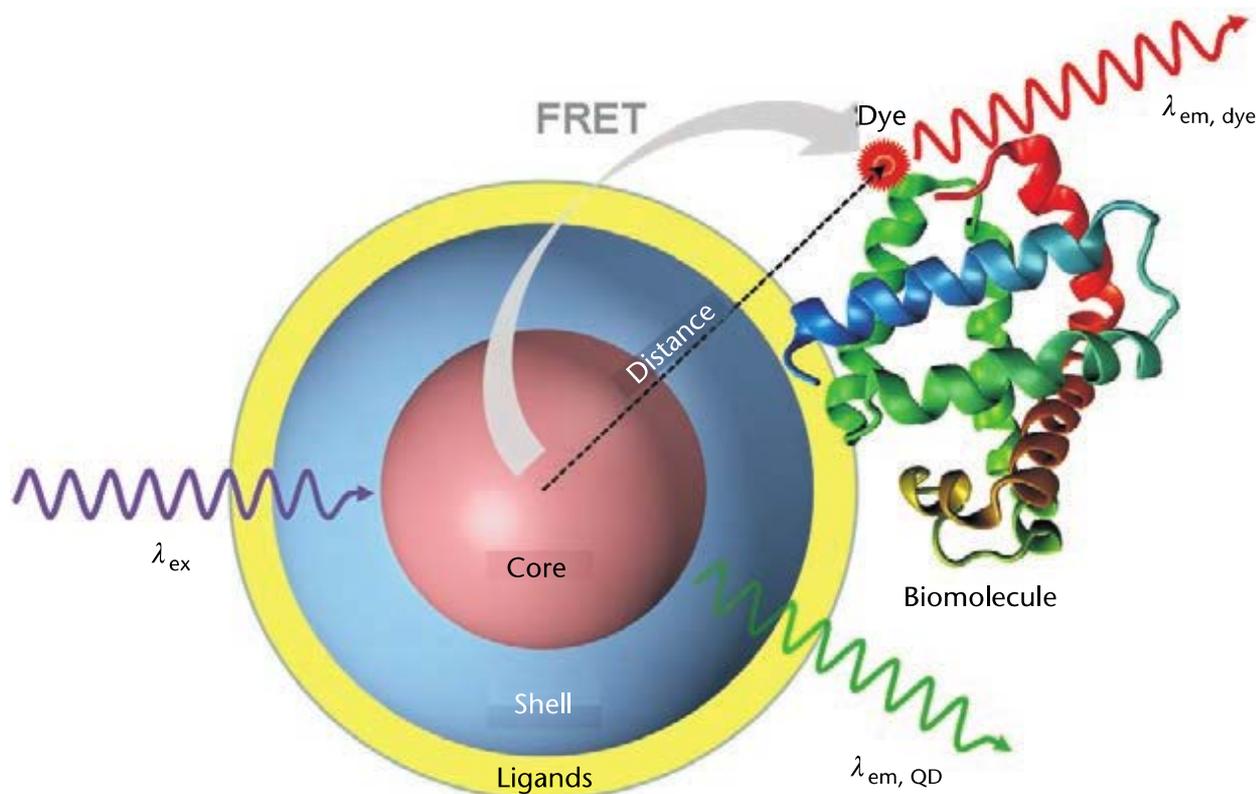
EpCAM, epithelial cell adhesion molecule;
CTC, circulating tumor cells



Нанобиотехнология для вылавливания циркулирующих раковых клеток



Контроль сборки комплекса белок-QD методом FRET (по Clapp et al., 2009)



re represented by $\lambda_{em, QD}$ and $\lambda_{ex, dye}$, respectively.

A map of human genome variation from population-scale sequencing

The 1000 Genomes Project Consortium*

The 1000 Genomes Project aims to provide a deep characterization of human genome sequence variation as a foundation for investigating the relationship between genotype and phenotype. Here we present results of the pilot phase of the project, designed to develop and compare different strategies for genome-wide sequencing with high-throughput platforms. We undertook three projects: low-coverage whole-genome sequencing of 179 individuals from four populations; high-coverage sequencing of two mother-father-child trios; and exon-targeted sequencing of 697 individuals from seven populations. We describe the location, allele frequency and local haplotype structure of approximately 15 million single nucleotide polymorphisms, 1 million short insertions and deletions, and 20,000 structural variants, most of which were previously undescribed. We show that, because we have catalogued the vast majority of common variation, over 95% of the currently accessible variants found in any individual are present in this data set. On average, each person is found to carry approximately 250 to 300 loss-of-function variants in annotated genes and 50 to 100 variants previously implicated in inherited disorders. We demonstrate how these results can be used to inform association and functional studies. From the two trios, we directly estimate the rate of *de novo* germline base substitution mutations to be approximately 10^{-8} per base pair per generation. We explore the data with regard to signatures of natural selection, and identify a marked reduction of genetic variation in the neighbourhood of genes, due to selection at linked sites. These methods and public data will support the next phase of human genetic research.



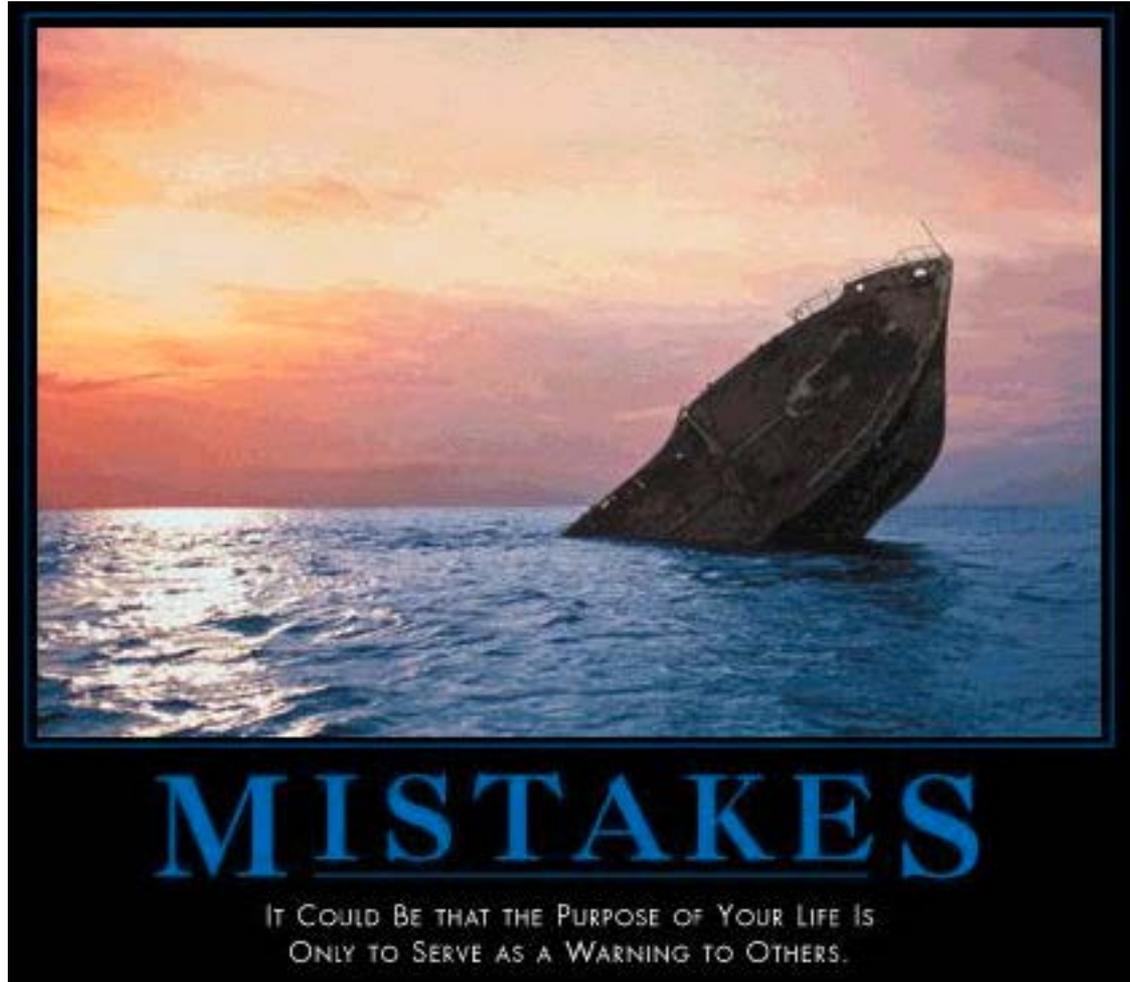
~115 новых мутаций на 1 человека за поколение

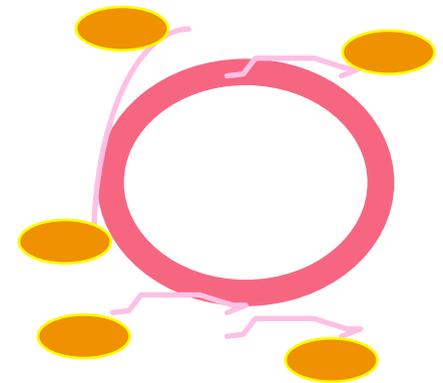
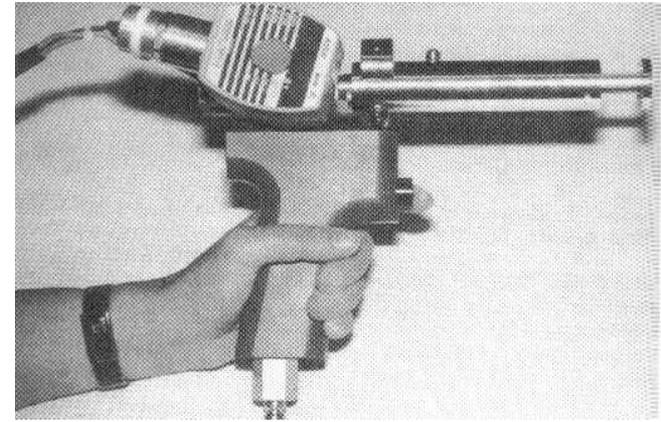
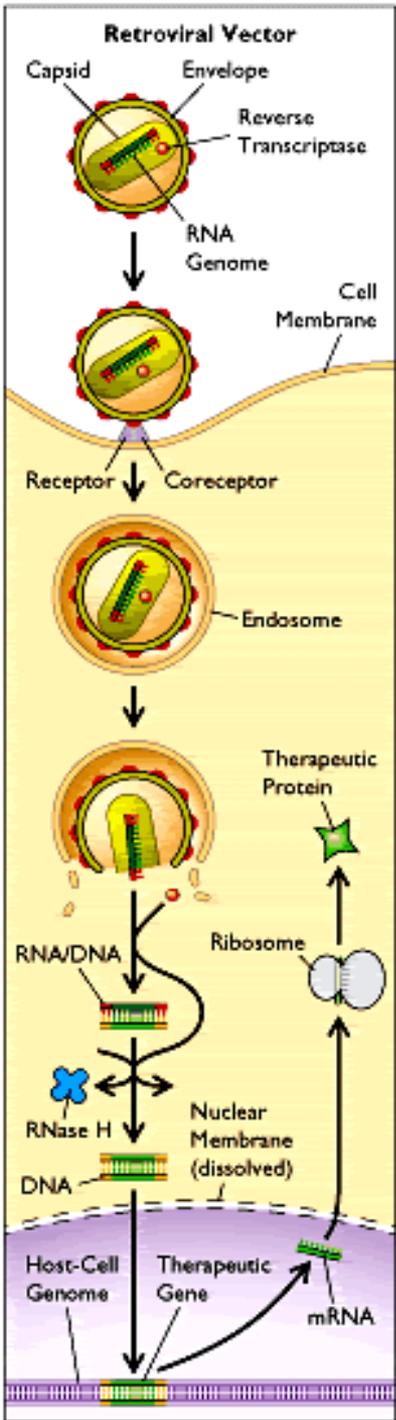
Мутагенная нагрузка на ДНК человека

• В течение суток у человека замещается около $7 \cdot 10^9$ клеток (из примерно 10^{14}). Это значит, что происходит $4 \cdot 10^{20}$ репликаций оснований ДНК.

• Точность работы ДНК-полимеразы: 1 ошибка на 10^7 оснований, так что за сутки осуществляется более 10^{13} ошибок (мутаций).

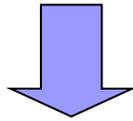
• Кроме того, происходят спонтанные химические повреждения ДНК (окисление, алкилирование, сшивки, гидролиз) с частотой 10^4 на 1 клетку в день (всего 10^{16} на организм)





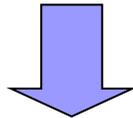
Ген орнитинтранскарбамоилазы (ОТК) в X-хромосоме

Дефект ОТК



Повышение уровня
аммиака в крови

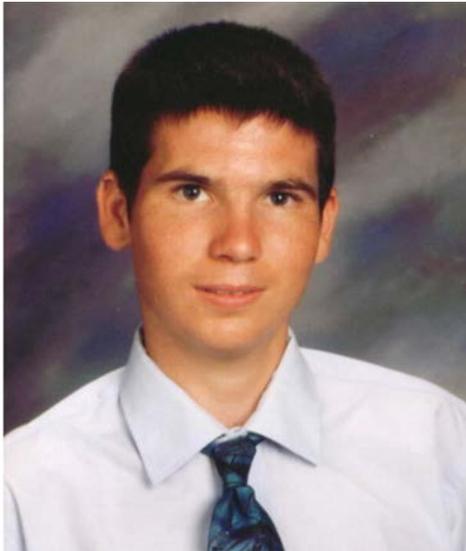
Аммиак нейротоксичен



Тошнота,
отказ от мясного,
прогрессирующая
летаргия, кома,
смерть в ~ 50% случаев

Частота дефекта – 1:30 000 (США)

Трагическая попытка лечения генетического дефекта с применением аденовирусного вектора



Джесси Гелсингер (Jesse Gelsinger),
18 лет, не первый пациент с недостатком
орнитинтранскарбомуилазы (6% акт-ти ОТС от
нормы), подвергшийся генотерапии.

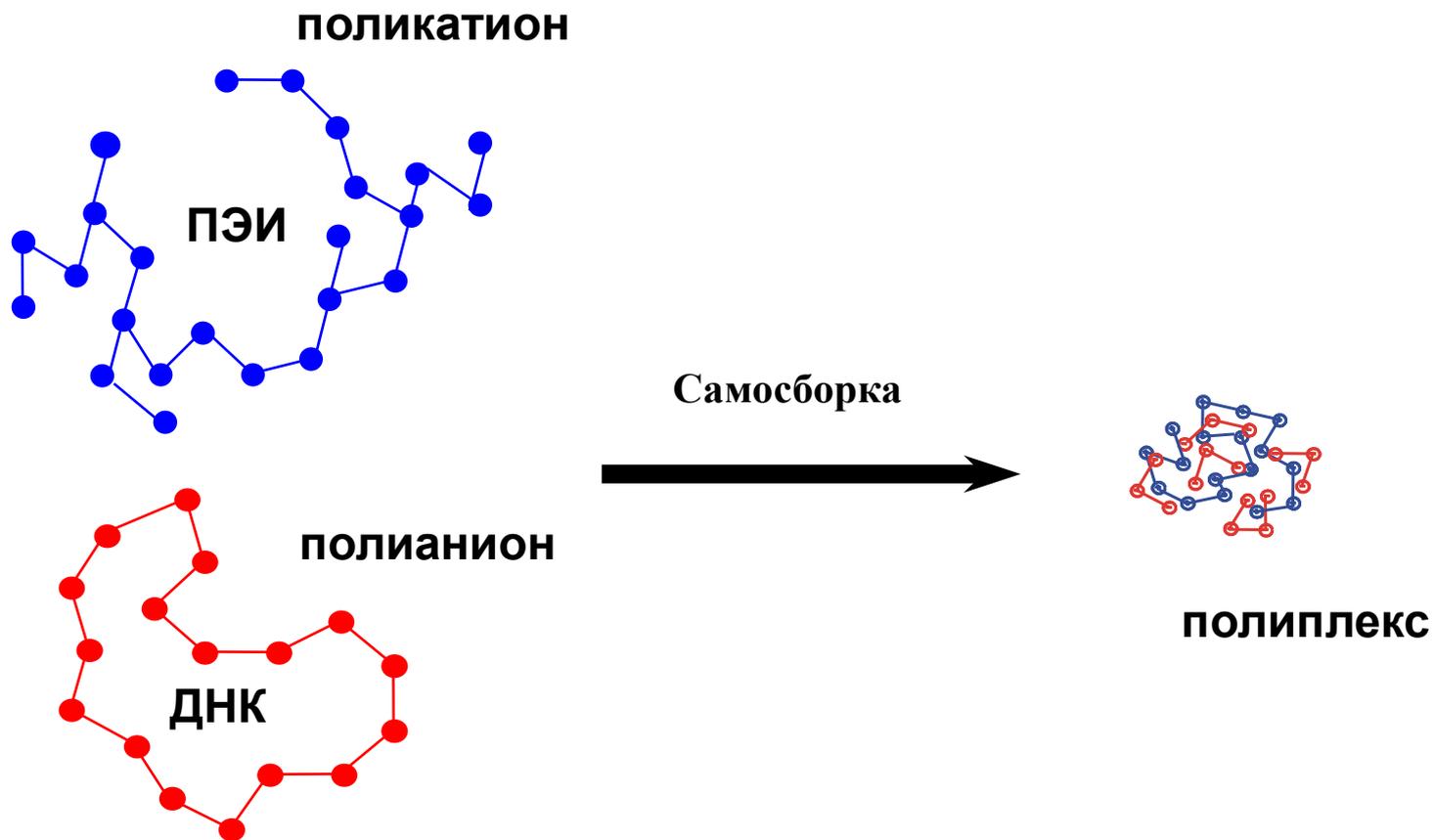
Третье поколение Ad-ОТС векторов с делециями
участков E-1 и E-4

6 возрастающих доз в печеночную
артерию; до 10^{13} в последней

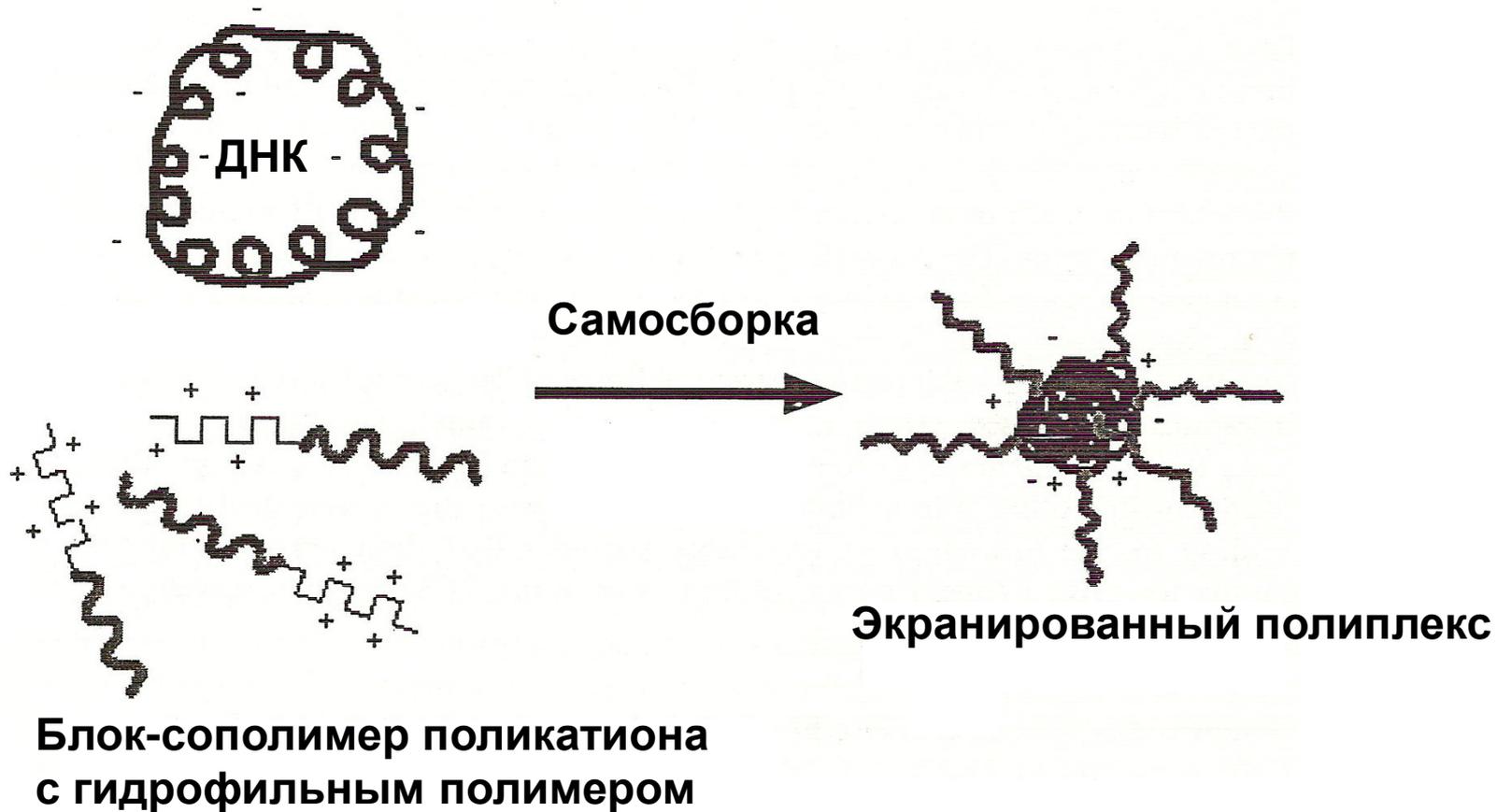
Официальные предположения о возможных причинах смерти J.G.

- 1) Высокая токсичность даже на уровне дозы №4
- 2) Высокий уровень аммиака у J.G.
- 3) Возможная парвовирусная инфекция у J.G.
- 4) Рекомбинация вектора с аденовирусом дикого типа

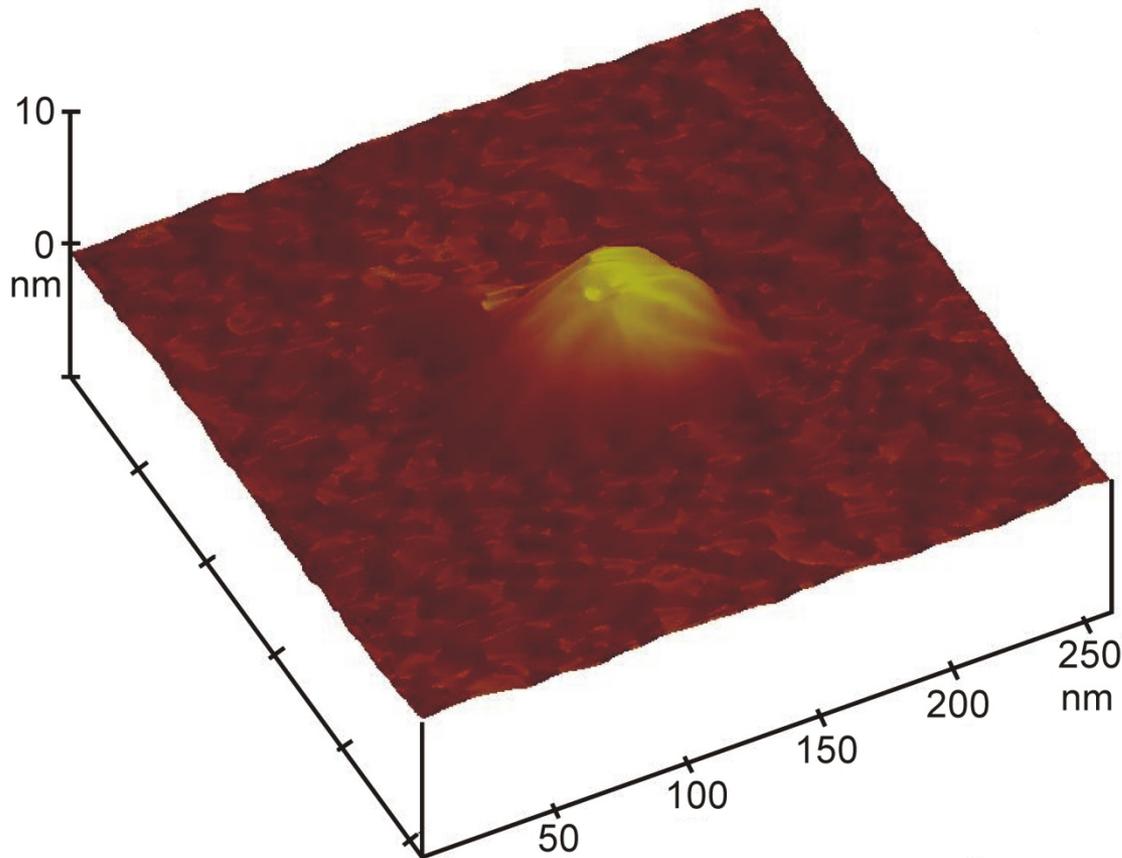
Полиплексы (1)



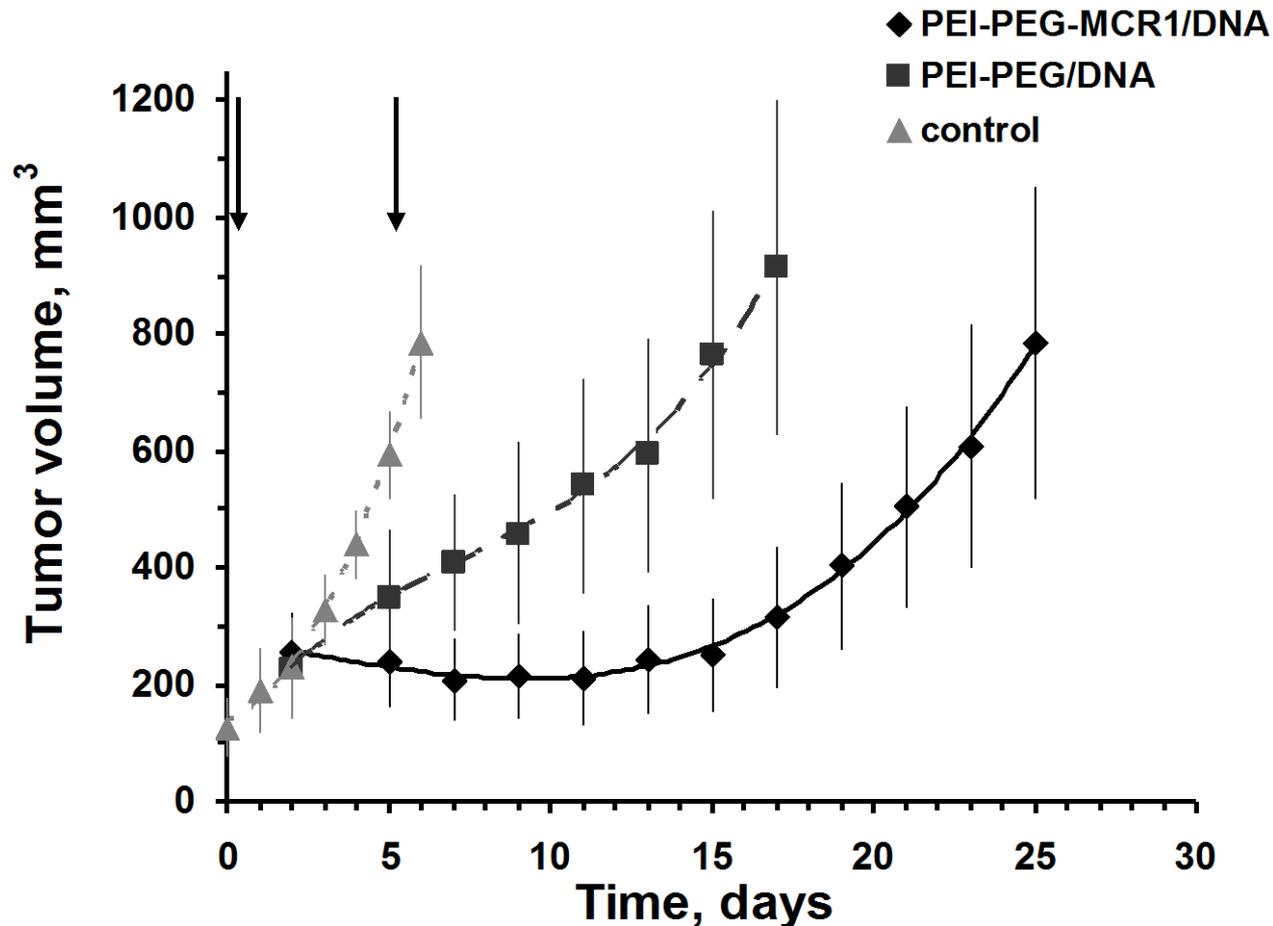
Полиплексы (2)



Атомно-силовая микроскопия наночастицы полиплекса



Подавление роста меланомы мышей полиплексами с геном «самоубийства»



Магнетофекция

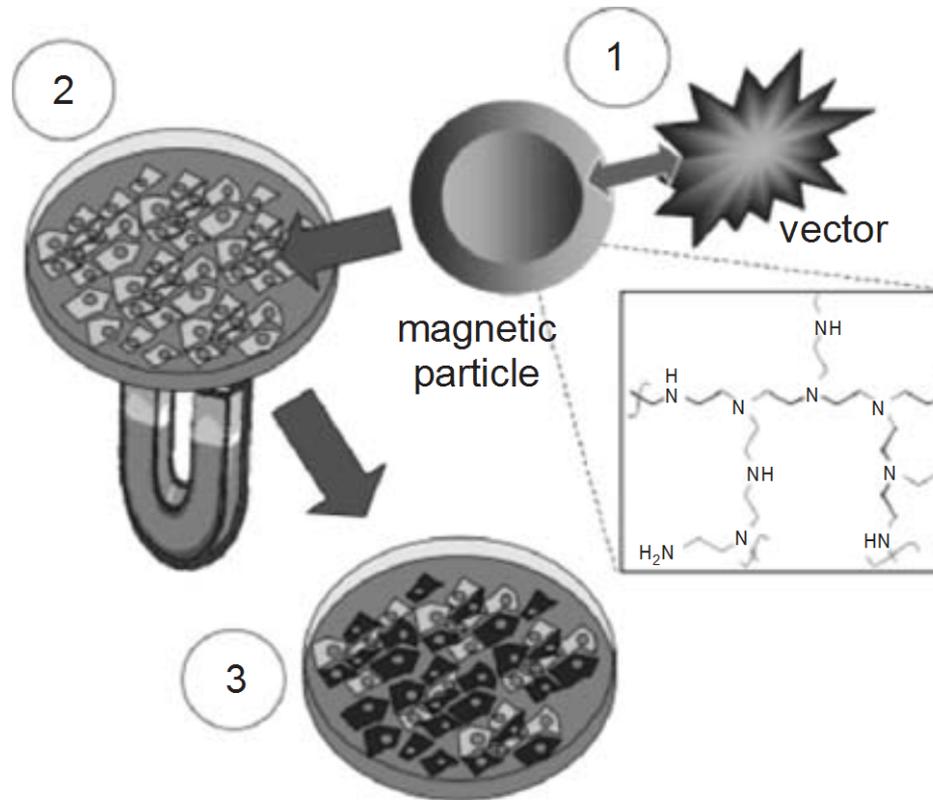
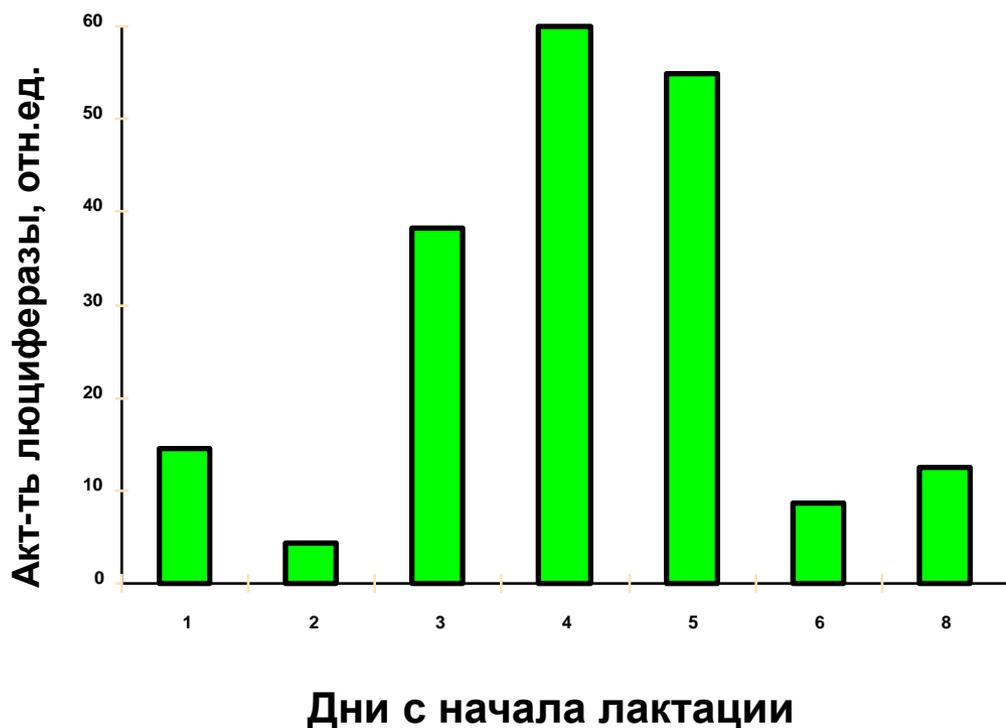


Figure 1.15 Procedure of magnetofection. Gene vectors are associated with magnetic particles coated with polyelectrolytes. Cells are cultured with the vector-magnetic particles under an external magnetic field. As the magnetic field attracts the vector-magnetic particles toward the cells, almost all the cells get in contact with vectors, and a high percentage of cells are rapidly transfected. (Plank 2003a)

Люциферазная активность в молоке овец



Luc HC-11 Молоко
Sigma

Western-blot с антителами против luc

Трансфекция плазмидой рCMV-BLA-Luc, кодирующей химерный белок β -лактальбумин человека - светлячковая люцифераза