



Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова»



СНК кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического
факультета

**АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ
НАНОПРЕПАРАТОВ
В ПРИМЕНЕНИИ К МОДЕЛЯМ РАКА НА
ДОКЛИНИЧЕСКОМ
ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Выполнила: студентка 4 курса педиатрического
факультета группы 2.4.01а Байрамукова Т.М.

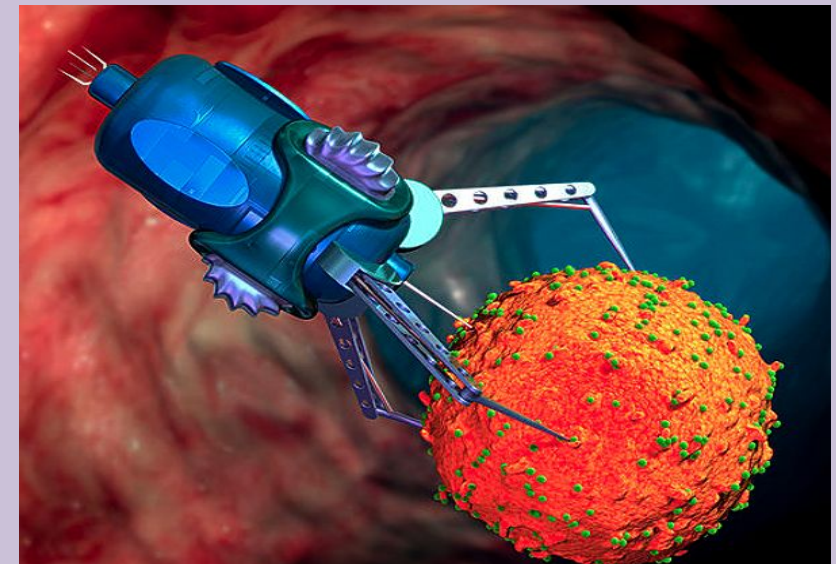
Руководитель кружка: д.м.н., Румянцева Ю.В.

Москва 2019

Нанотехнологии в медицине

Развитие нанотехнологий в медицине позволяет успешно реализовать качественно новый уровень диагностики и лечения заболеваний, в том числе и онкологических.

Проблема заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований — одна из наиболее актуальных в современной медицине. Она затрагивает интересы всего человечества. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно в мире умирает от рака более 4 млн. человек



Стратегии терапии рака разрабатываются по двум направлениям:

1. оптимизация диагностических протоколов для обнаружения опухолей на ранних стадиях;
2. разработка персонализированных средств терапии для увеличения эффективности и селективности лечения.

Проводимые в последнее время исследования были направлены на рациональное внедрение обоих подходов, а их результаты внесли вклад в разработку нанопрепаратов, которые можно адресно доставлять к пораженным тканям в целях тераностики опухолей на доклинических моделях.

Эти модульные наносистемы достаточно гибки и позволяют объединить визуализацию и таргетирование лекарств для применения в онкологии. Они могут служить базой для дальнейшего усовершенствования методов лечения рака.

Нанопрепарат

— это терапевтический, диагностический или комбинированный (тераностический = терапевтический + диагностический) агент, помещенный внутрь наночастицы (НЧ) или присоединенный к ней.



Задача наночастиц, несущих на своей поверхности лекарство, не «попасться в руки иммунной системы человека»

НЧ способствует:

- лучшему биораспределению агента
- повышает его эффективность
- понижает токсичность

В ходе работы были идентифицированы новые биомаркеры и изучено применение нанопрепаратов таргетированной доставки для визуализации рака (флуоресцентные НЧ) и его терапии (содержащие лекарства липосомы) на моделях для доклинических исследований. В настоящем обзоре кратко описываются основные результаты этой работы.

Прицельная молекулярная визуализация метастатического колоректального рака

- комплекс интегрина альфа-6 и E-кадгерина, который присутствует на поверхности раковых клеток толстой кишки и отсутствует у нормальных клеток толстой кишки
- специфический лиганд к этому рецепторному комплексу (ангиопоэтинподобный белок 6) - фактор, в больших количествах вырабатываемый здоровой печенью и физиологически вовлеченный в метаболизм липидов

Данный комплекс рецептора и лиганда участвует во вторичном распространении опухолей

Пептиды-аналоги ангиопоэтинподобного белка 6

- CGIYRLRS
- CGVYSLRS (однобуквенный код аминокислот)

эти пептиды связывают комплекс интегрин альфа-6/Е-кадгерин благодаря способности конкурировать с ангиопоэтинподобным белком 6 при связывании рецепторного комплекса (и таким образом ингибировать метастазирование в печень)

Они представляют собой потенциальное средство для идентификации клеток опухолей, которые вырабатывают как интегрин альфа-6, так и Е-кадгерин

Нанопрепараты для визуализации рака

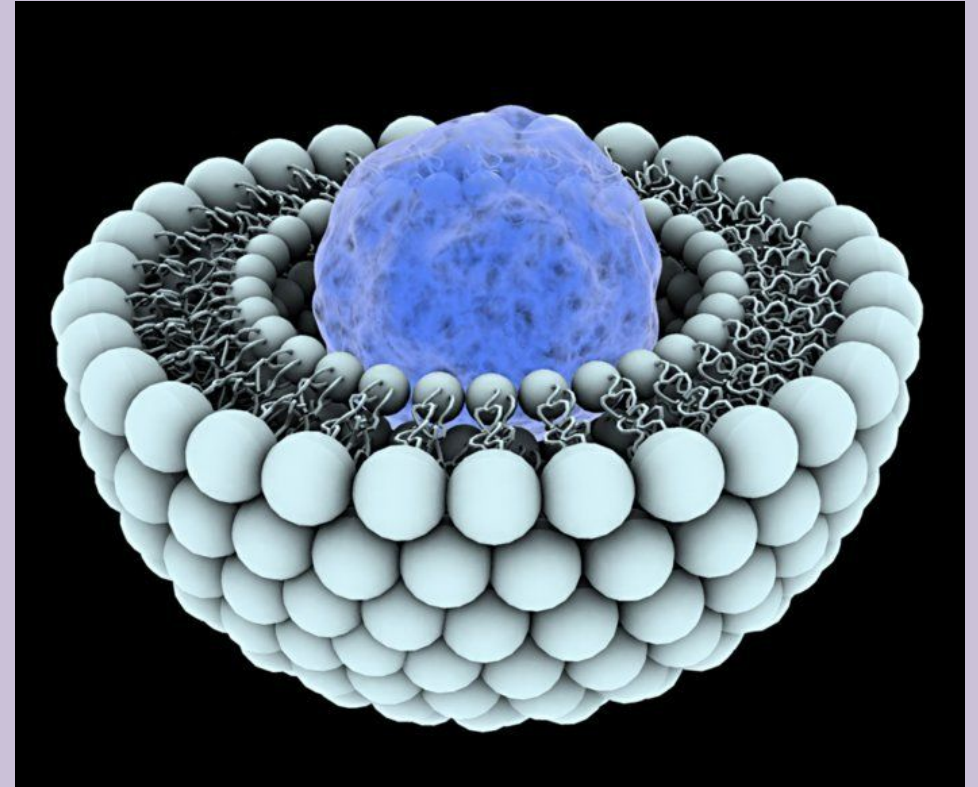
В данном исследовании были использованы кремниевые НЧ, которые имеют подходящий токсикологический профиль и хорошую биосовместимость *in vivo* в сочетании с легкостью выполнения манипуляций *in vitro*

Были созданы модульные наносистемы, чтобы получить визуализационную платформу, состоящую из флуоресцентных кремний-полиэтиденгликолевых (ПЭГ) НЧ, на поверхности которых присутствует пептид CGIYRLRS или CGVYSLRS.

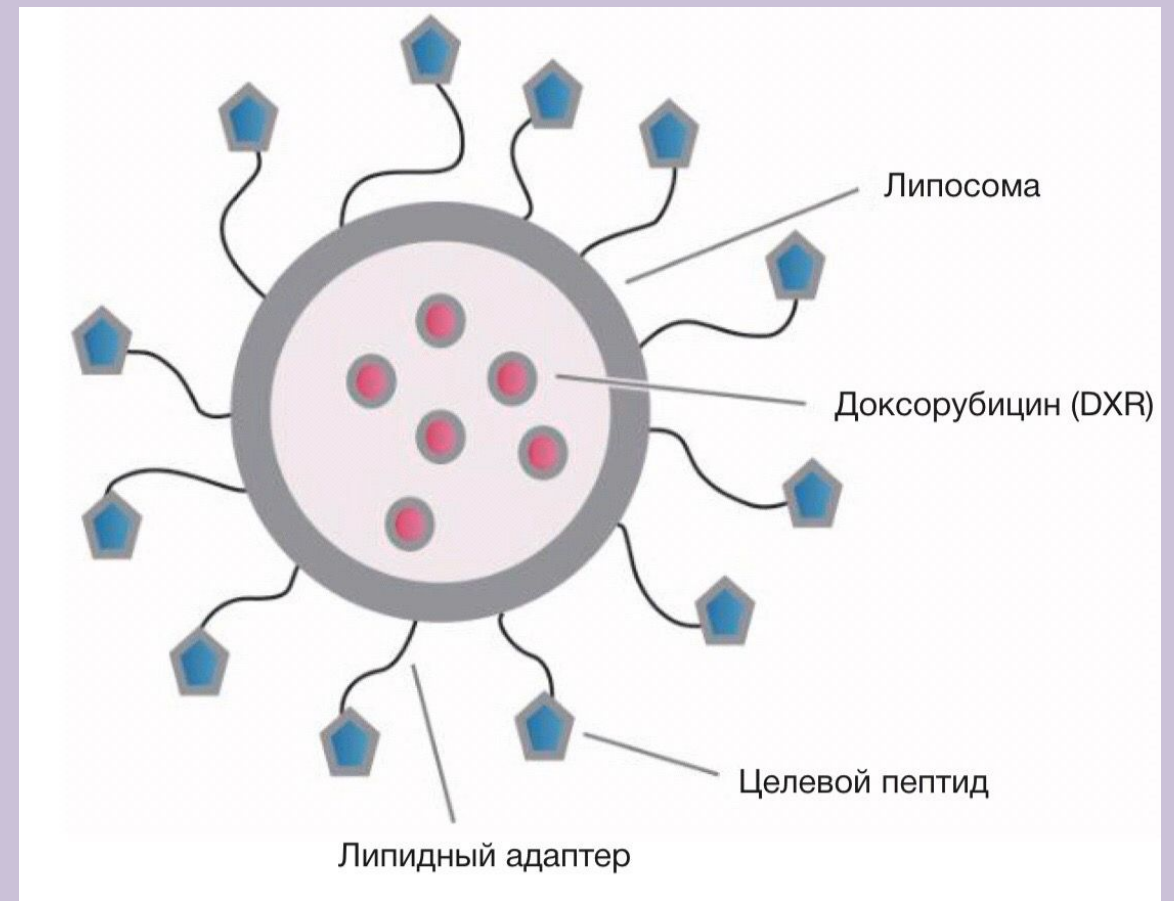
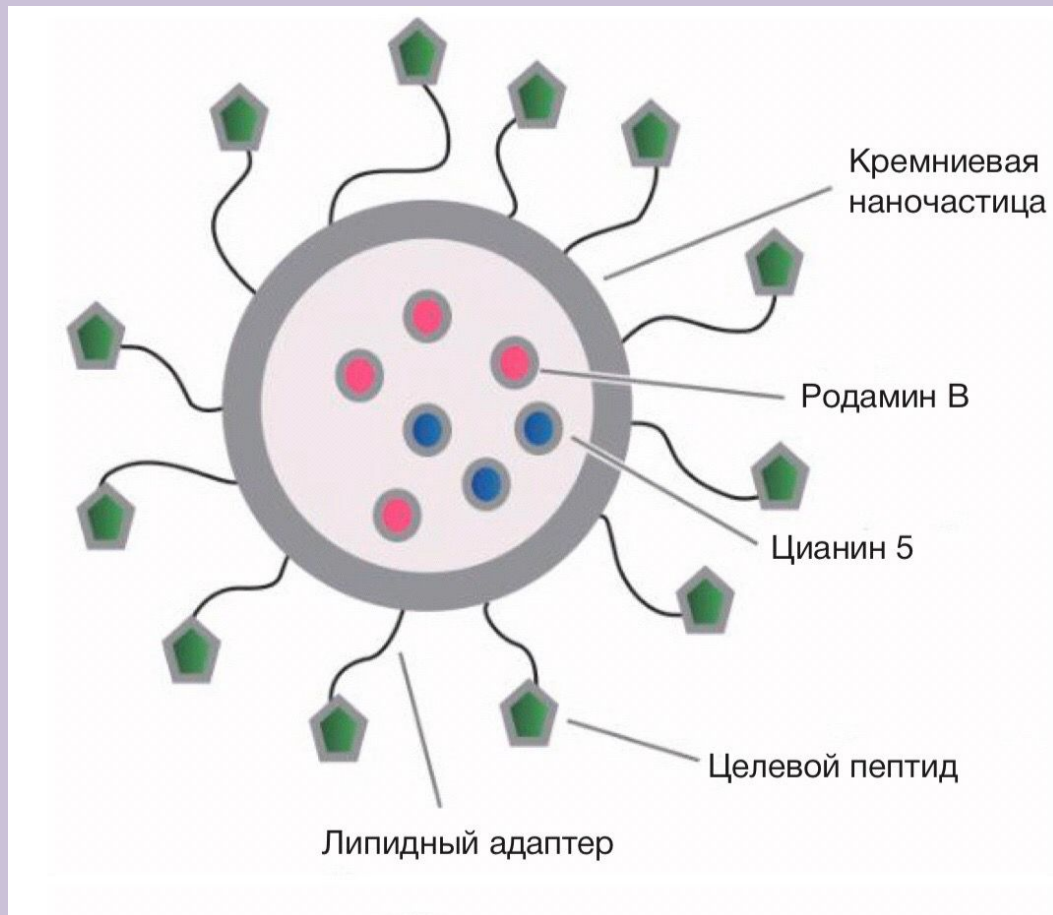
Такие НЧ имеют ядро из диоксида кремния, к которому добавлены один или несколько флуоресцентных красителей на основе алкоксисиланов; ядро заключено в мицеллу сополимера Pluronic®F127.

Иными словами, они состоят из полиэтиленгликолевой оболочки, внутри которой находится ядро из диоксида кремния с добавлением красителя.

Полиэтиленгликоль снаружи работает как стандартный полимер для обеспечения малозаметности, способствуя стабильной дисперсии в физиологических условиях и препятствуя поглощению клетками фагоцитарной системы.



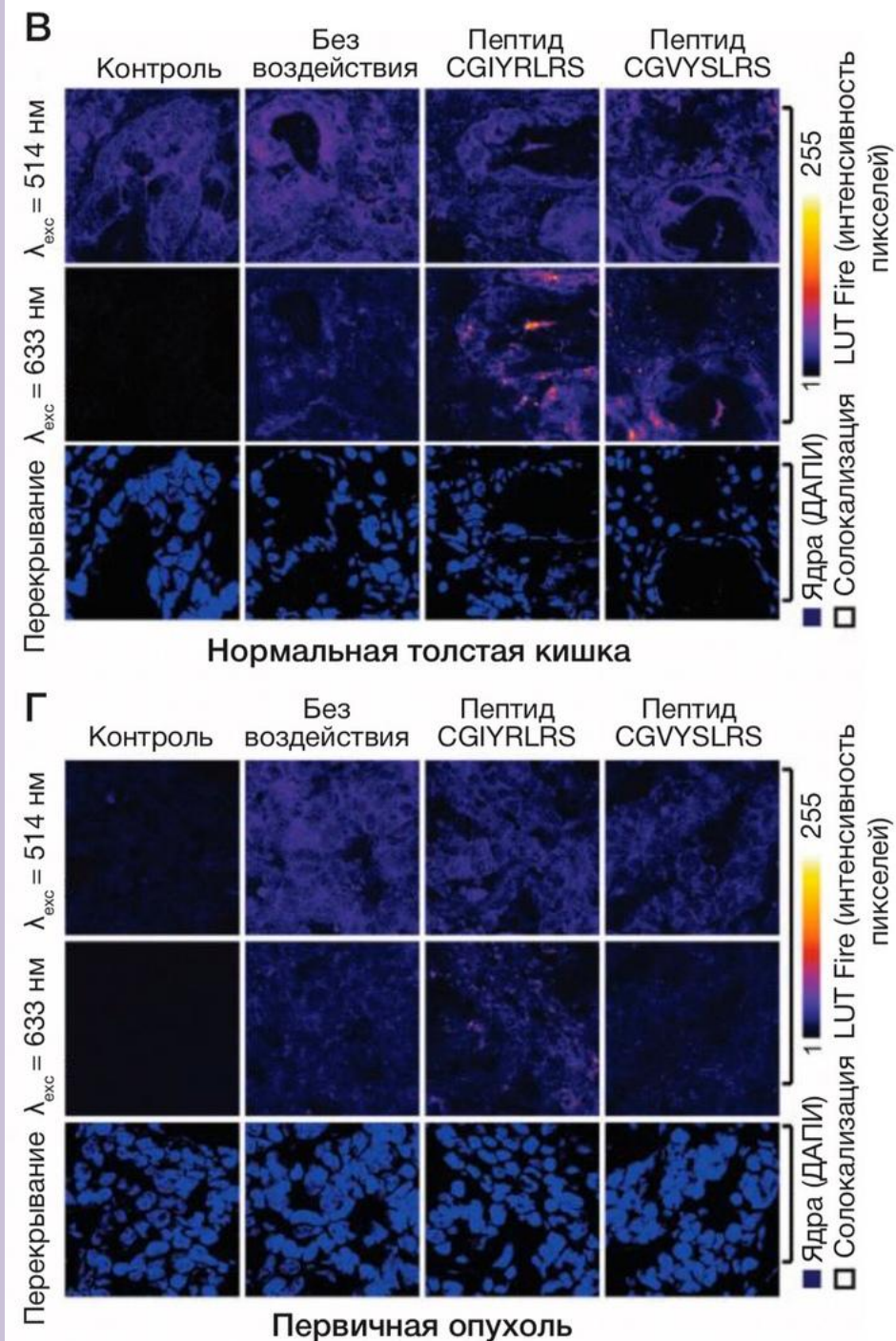
НЧ имеют диаметр ядра SPN 11 ± 3 нм и гидродинамический диаметр 23 нм, они содержат краситель родамин В (Rhod), цианин 5 (Cy5) (одноцветные) или оба (двухцветные)

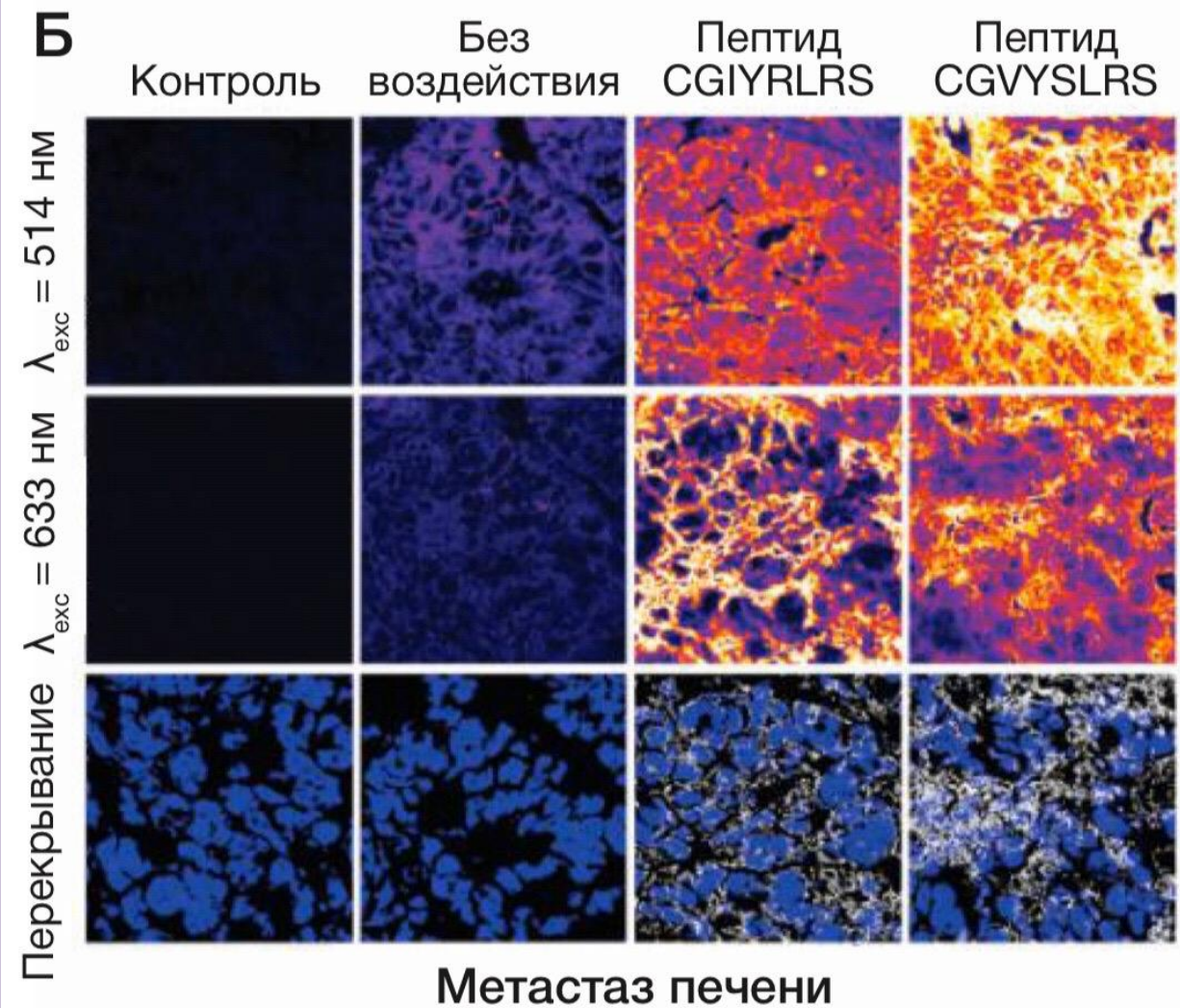
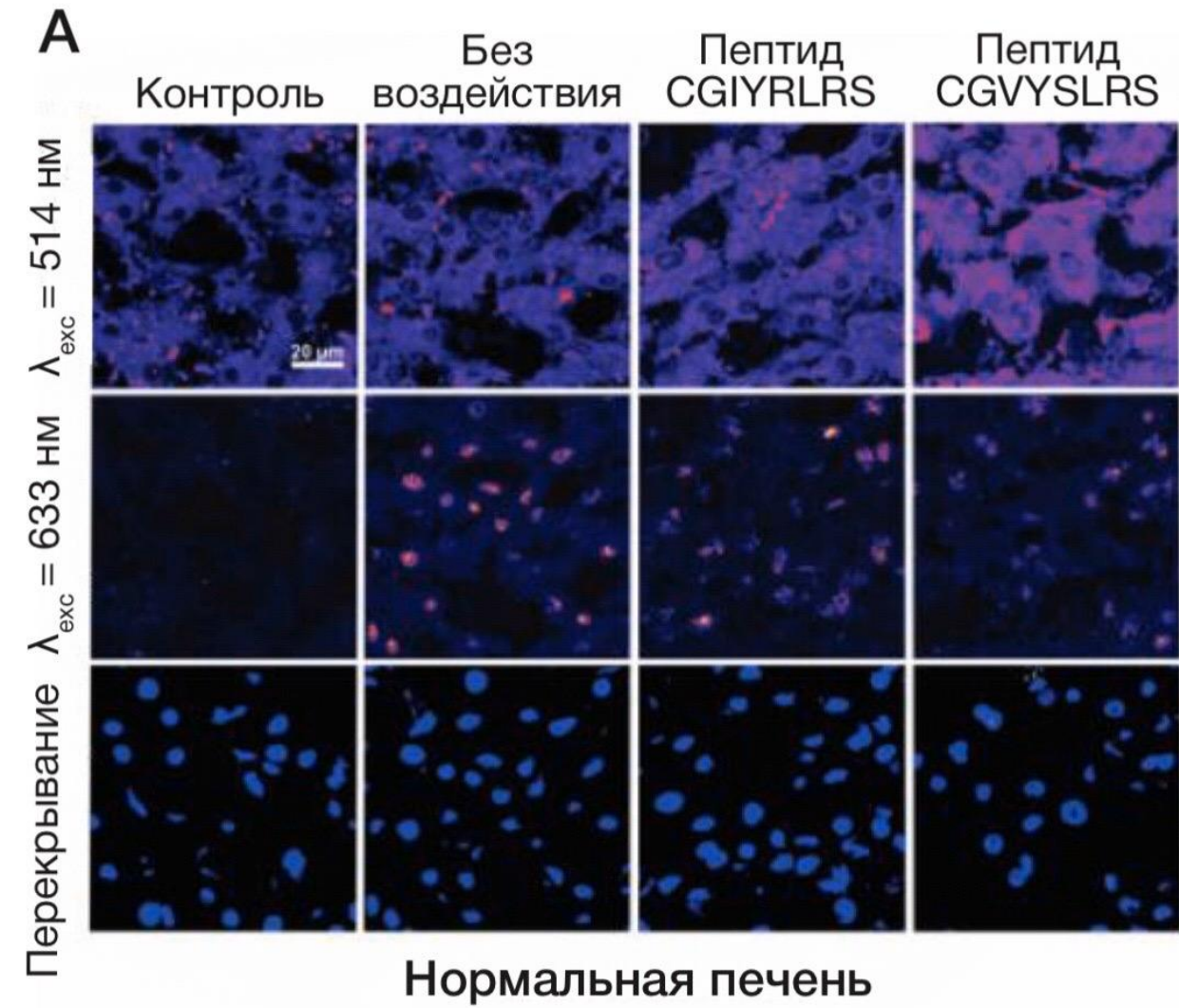


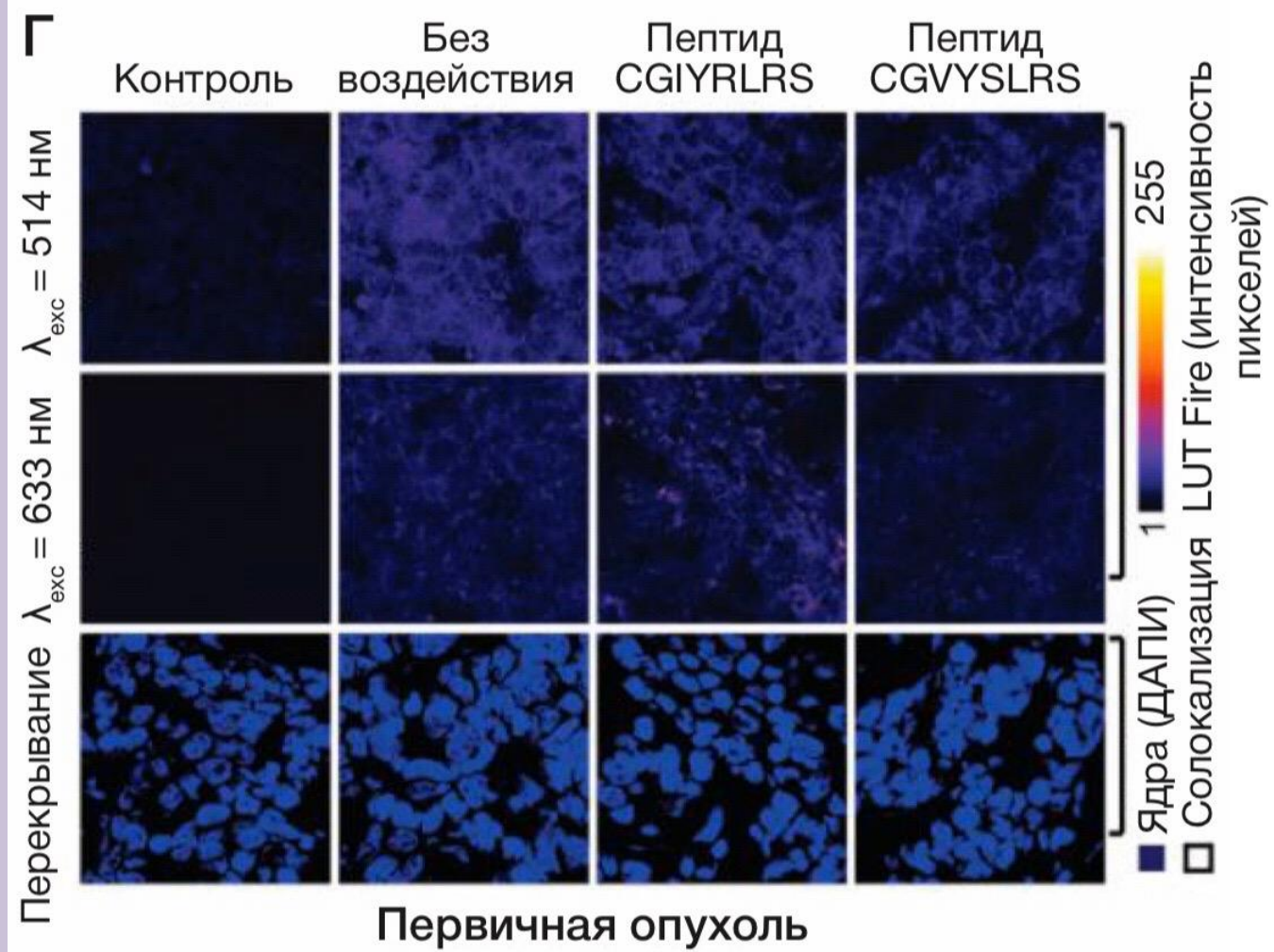
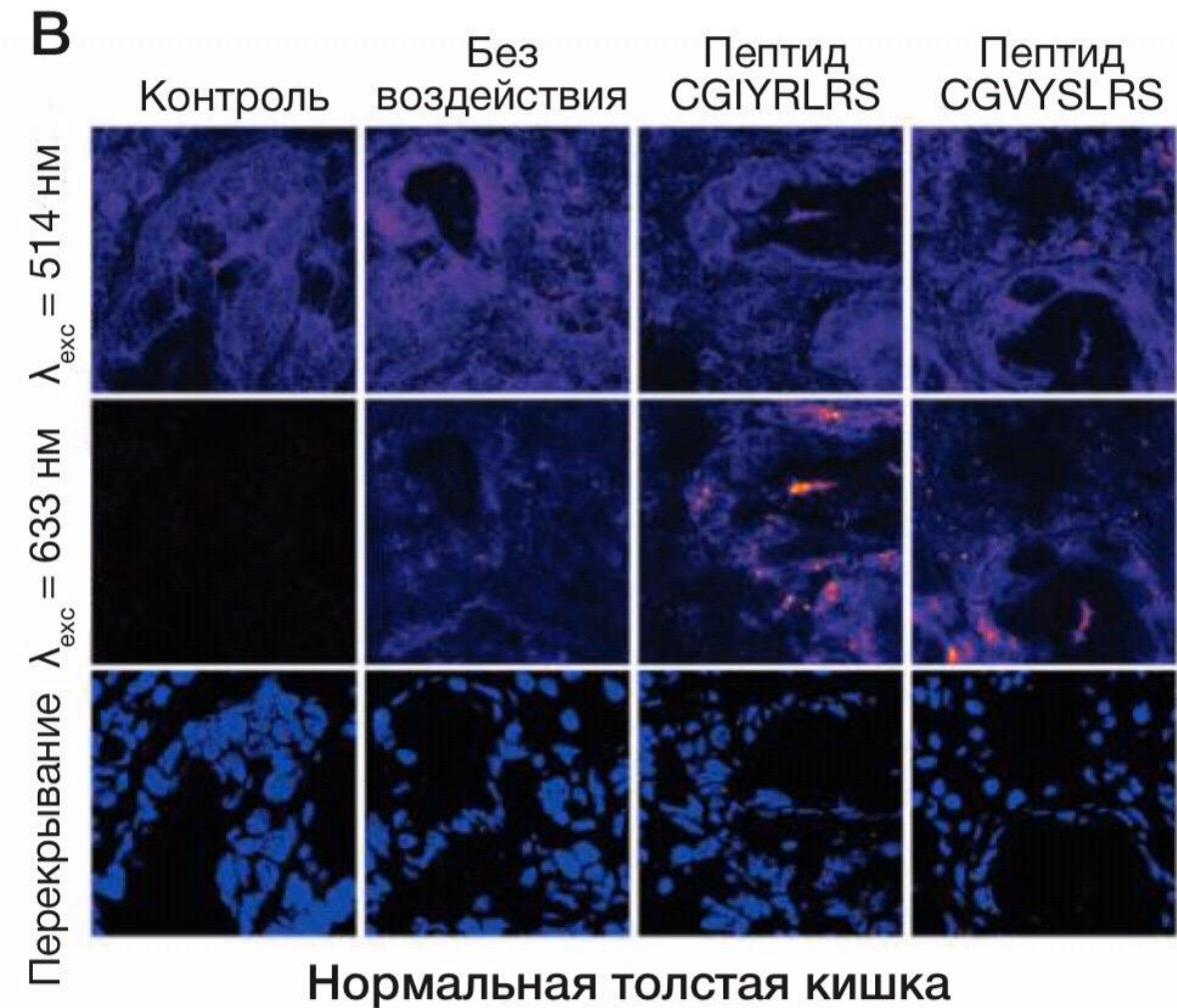
Их специфичность была сначала изучена *ex vivo* на образцах метастазов печени пациента в сравнении с образцами нормальной печени и первичного рака толстой и прямой кишки

Срезы образцов замороженных человеческих тканей инкубировали с контролем (без метки) и с двухцветными (Rhod + Cy5) кремниевыми НЧ с пептидной меткой.

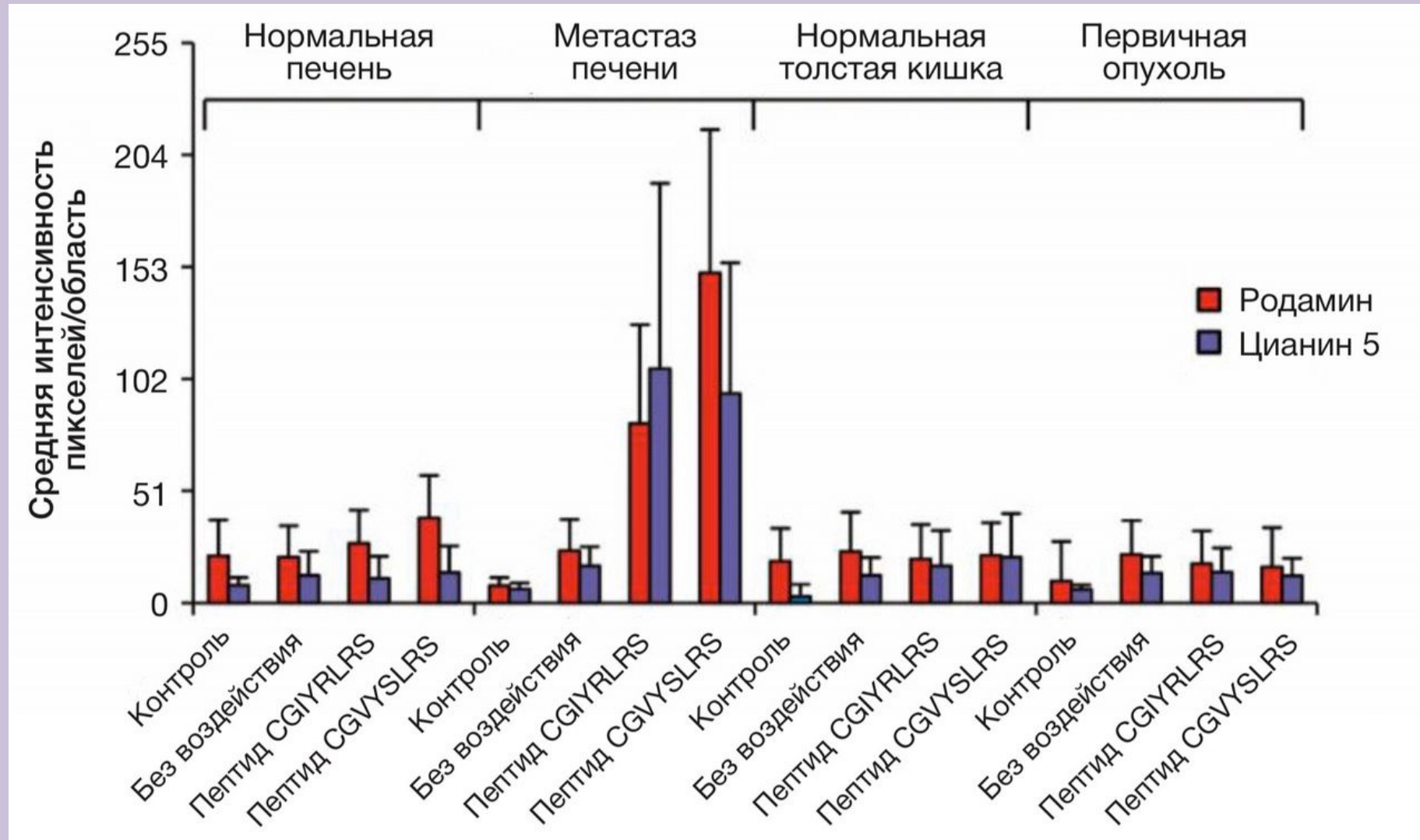
Селективность НЧ оценивали методом конфокальной микроскопии, выявляя специфическое связывание кремниевых НЧ CGIYRLRS- и CGVYSLRS-(Rhod + Cy5) с клетками метастазов печени (рис. 1Б) и проводя сравнение с образцами ткани нормальной печени и толстой кишки, а также первичной опухоли.







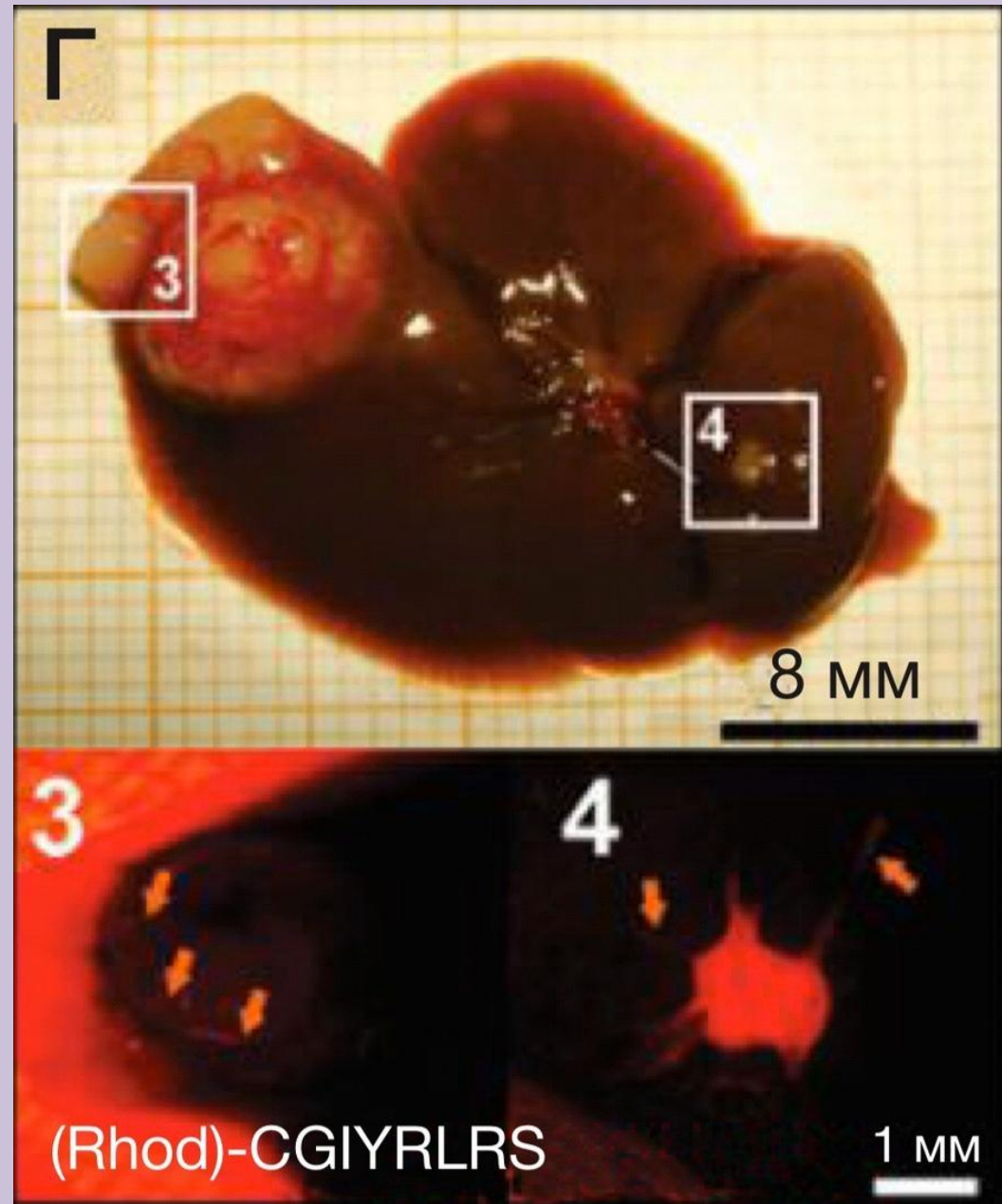
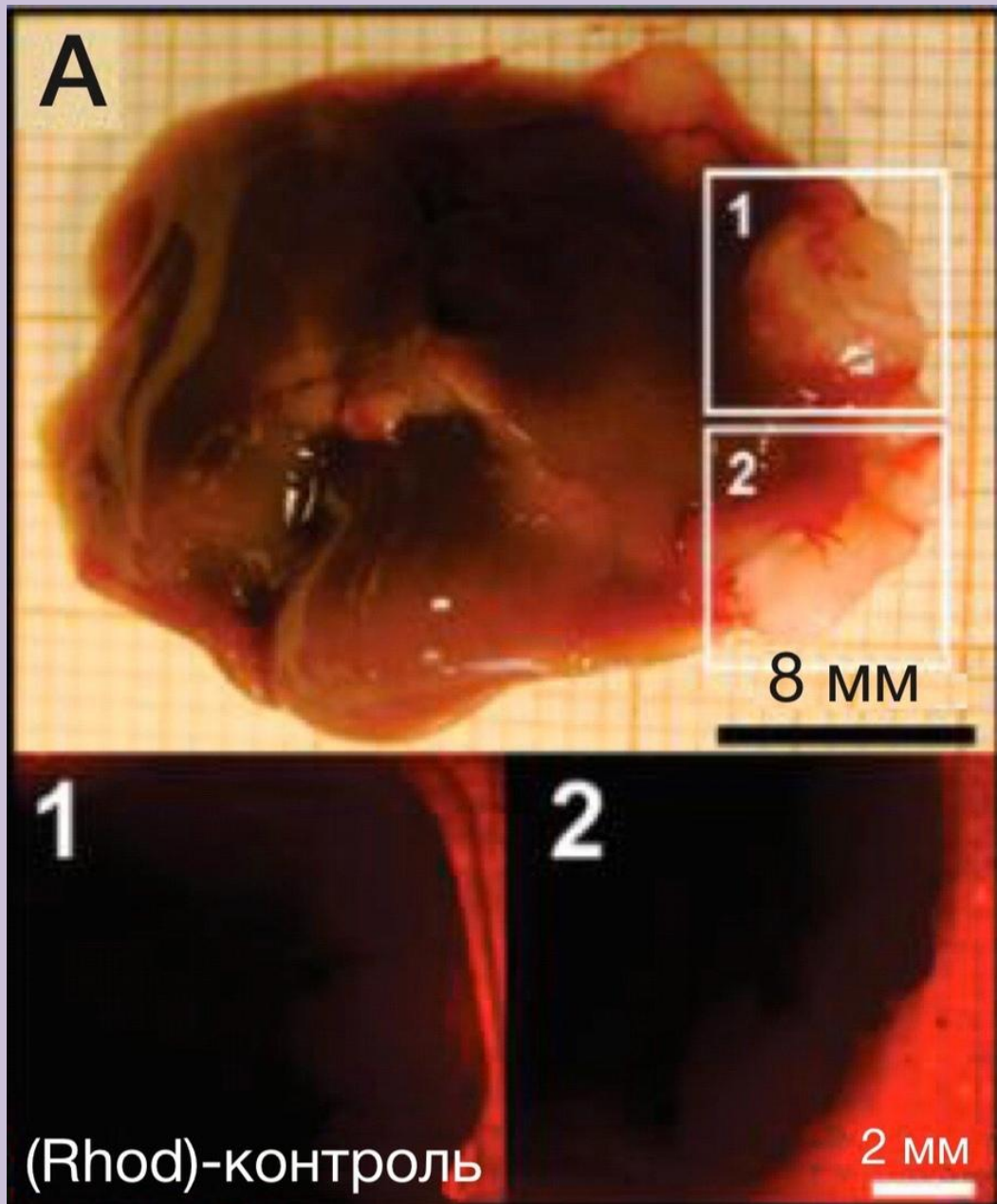
Количественно связывание кремниевых НЧ выражается как интенсивность испускаемых пикселей после облучения на 514 нм (Rhod) и 633 нм (Cy5) и представляет собой среднее значение для пяти изображений каждой ткани.



Кремниевые НЧ *in vivo* на модельных мышах с псевдо-метастатической опухолью

Мышам с диабетом без ожирения/тяжелым комбинированным иммунодефицитом, имеющим первичные опухоли и множественные метастазы в печени, ввели одноцветные кремниевые НЧ (контроль (А, Rhod; Б, Cy5) или НЧ CGIYRLRS (Г, Rhod; Д, Cy5)), двухцветные НЧ (контроль (В) или НЧ CGIYRLRS (Е))

Через 16 ч мышей усыпили, а извлеченные органы сфотографировали на цифровую камеру высокого разрешения, подключенную к флуоресцентному стереомикроскопу.



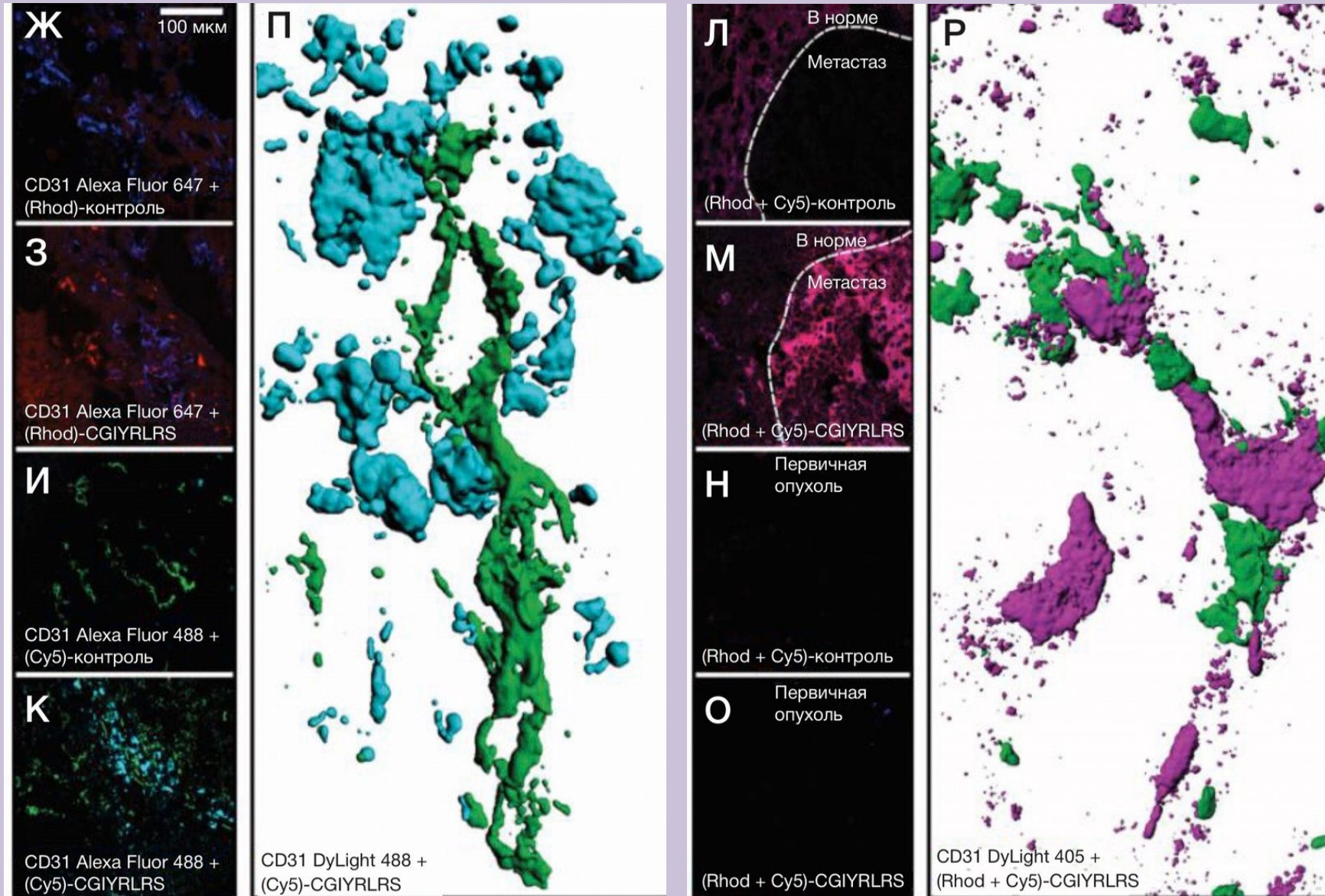


(Cy5)-контроль



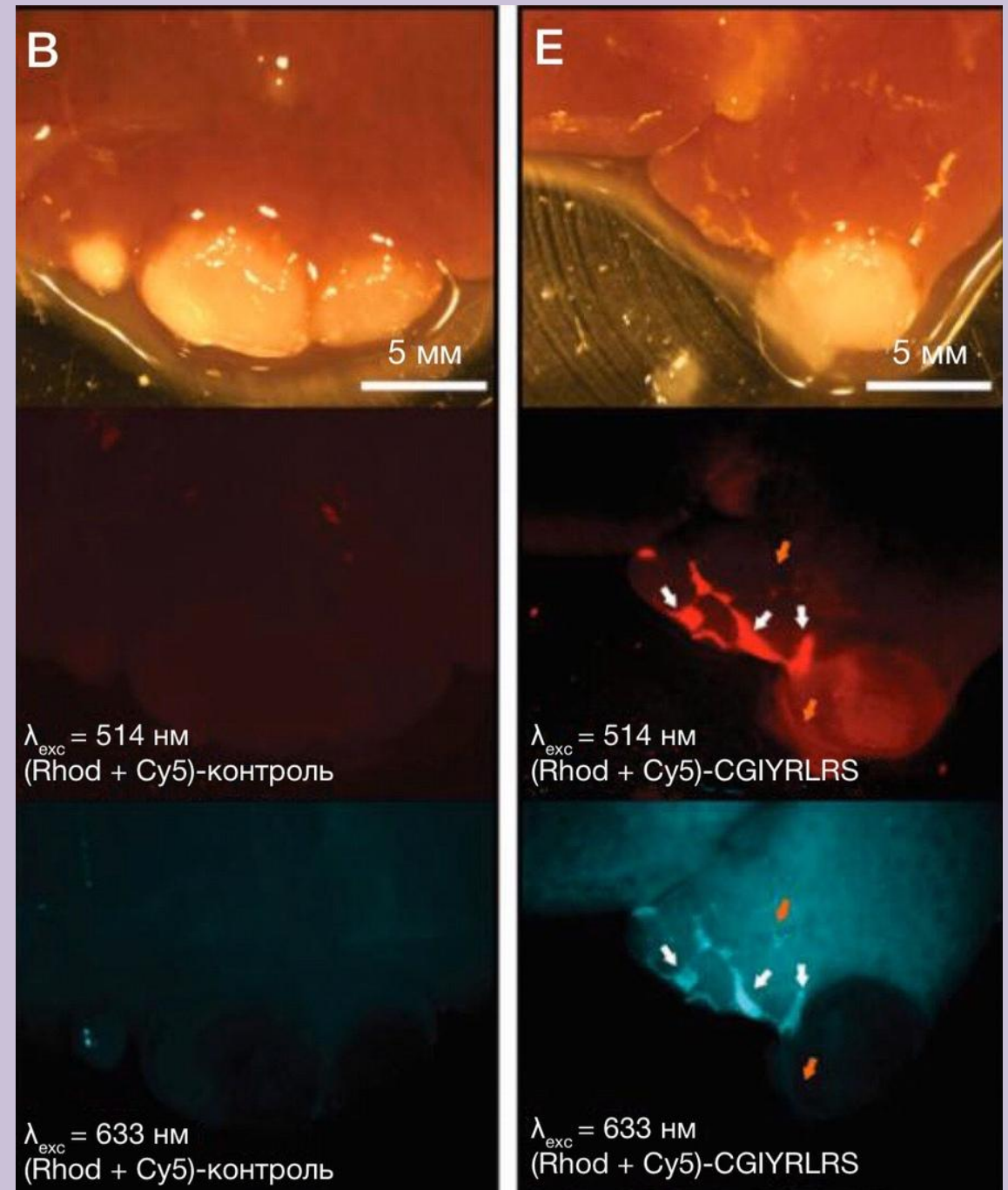
(Cy5)-CGIYRLRS

Трехмерная реконструкция нескольких конфокальных микрофотографий показала, что меченые кремниевые НЧ располагаются очень близко к кровеносным сосудам опухоли



Флуоресцентная визуализация методом стереомикроскопии и конфокальной микроскопии подтвердила специфичное накопление в метастазах кремниевых НЧ (Rhod-Cy5)-CGIYRLRS

Интраоперационно флуоресцентные индикаторы начинают применять при раке простаты, желудка, мочевого пузыря и яичников. Возможна флуоресцентная визуализация наружных злокачественных образований, а именно немеланомных опухолей кожи; уже разработаны эндоскопические системы флуоресцентной визуализации, предназначенные для применения при раке толстой и прямой кишки.



Целевая доставка препарата при метастатической нейробластоме

В последние годы были идентифицированы пептиды с уникальными функциями нацеливания для применения в лечении опухолей.

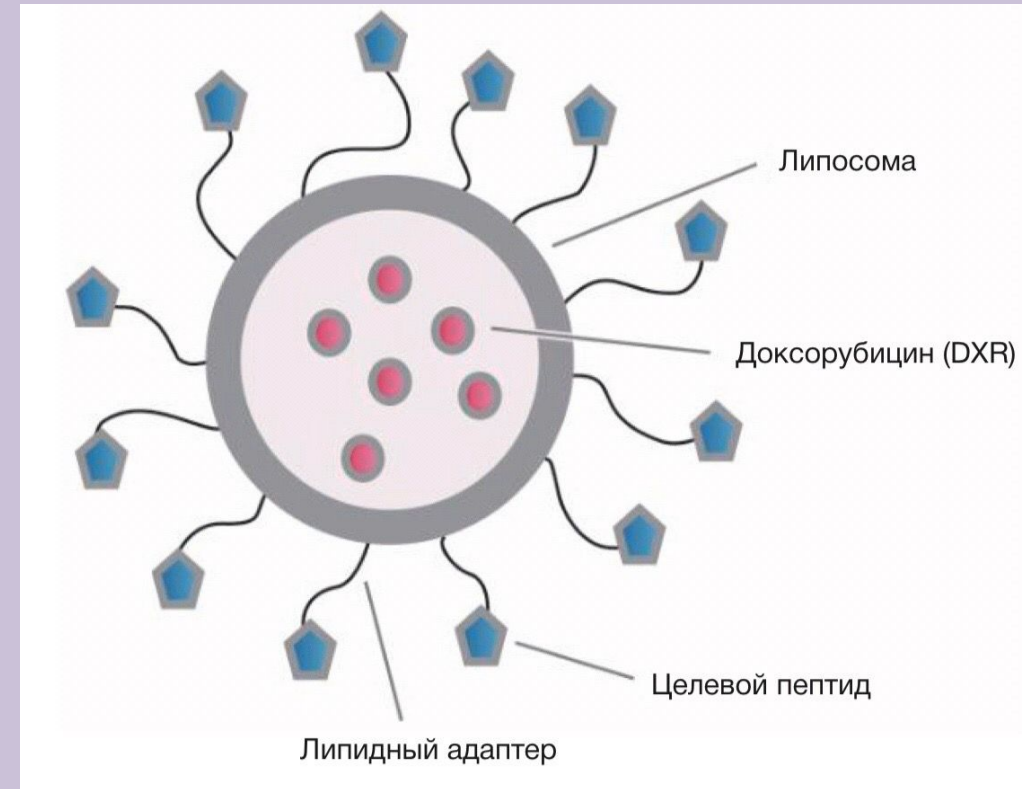
Из них CPRECES и CNGRC (однобуквенный аминокислотный код) с высокой селективностью связываются с маркерами эндотелиальных/периваскулярных опухолей аминокептидазами А (АРА) и N (APN) соответственно, поэтому они оптимальны для применения в доставке препаратов *in vivo* через кровяное русло.

Эти два пептида использовали в первом исследовании, целью которого была доклиническая оценка осуществимости доставки нанопрепаратов направленного действия для доксорубина на моделях нейробластомы первой стадии

Были получены синтетические версии обоих пептидов путем слияния человеческого фактора некроза опухолей с коротким линкером KY и последующего присоединения к полиэтиленгликолевым стелс-липосомам, в состав которых входят:

- Дистеароилфосфатидилэтаноламинполиэтиленгликоль
- гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин
- холестерин

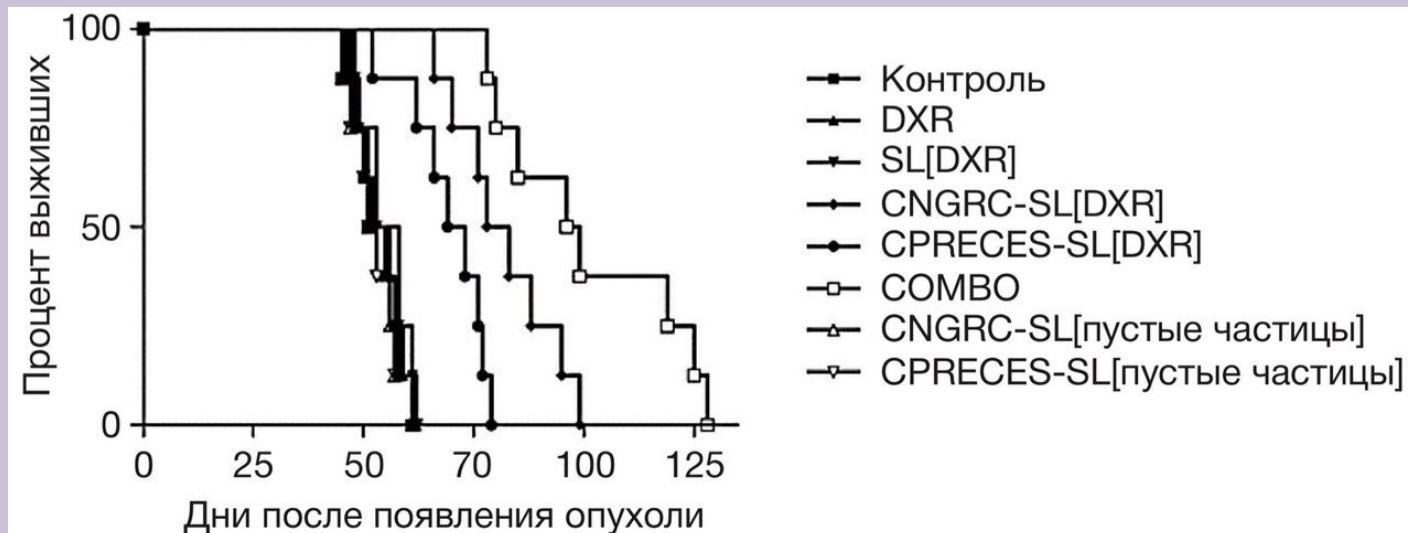
В такие стелс-липосомы (SL) был инкапсулирован доксорубицин (DXR) для получения наносистем направленного действия CPRECES-SL[DXR] и CNGRC-SL[DXR] соответственно, имеющих размеры 90–115 нм, инкапсуляцию препарата с выходом 95⁰% и показатель связывания пептидов 4 мкг/мкмоль для каждой липосомы.



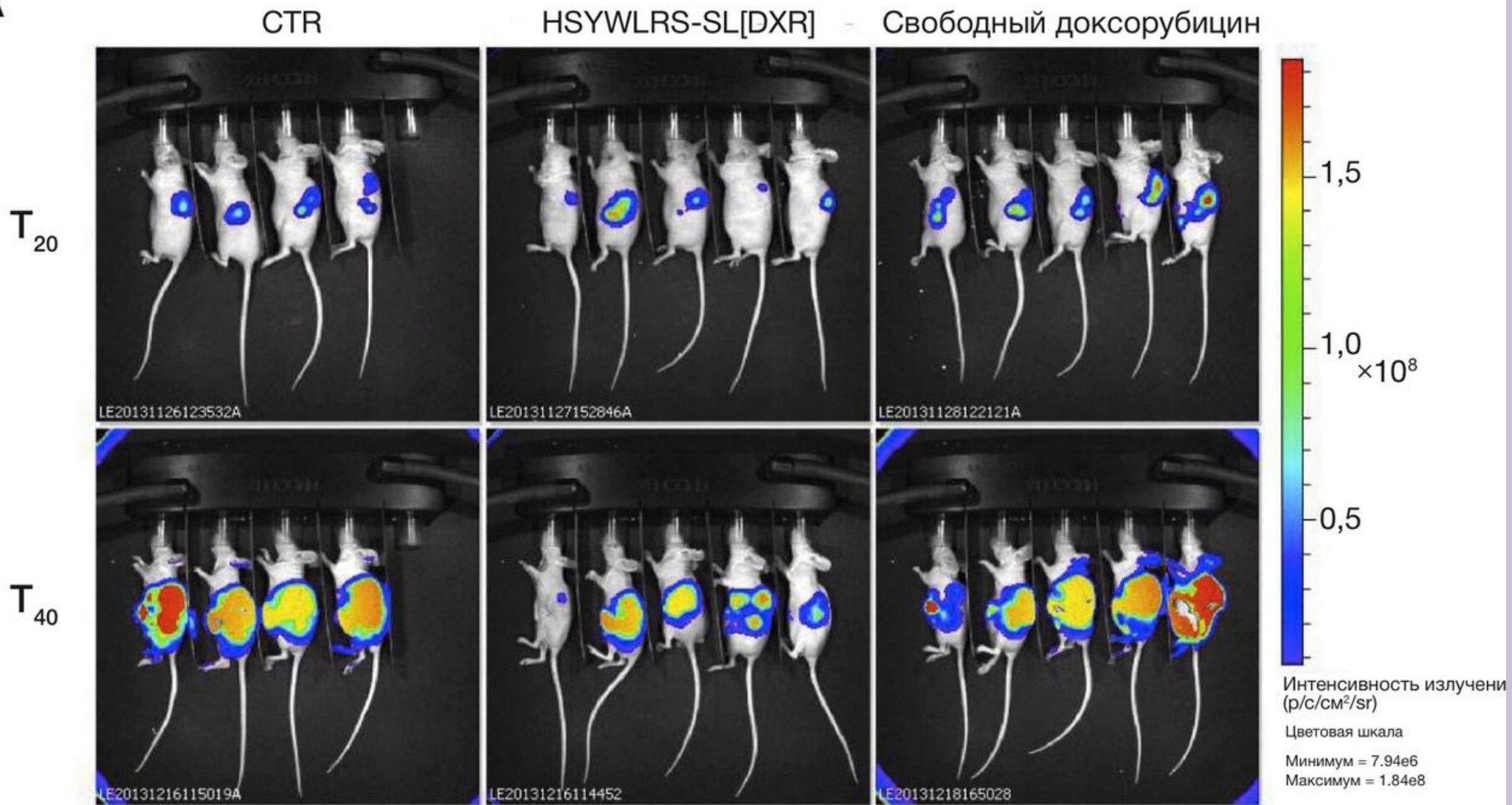
Терапевтическая эффективность нацеленных на аминопептидазу N (APN) и A (APA) липосомных препаратов на модельных мышах с нейробластомой

Для проведения фармакокинетических исследований такие стелс-липосомы были снабжены двойной меткой, что позволило продемонстрировать достаточную стабильность и продолжительное время циркуляции (до 24 ч). Оценку эффективности этих композиций, как в виде одиночных агентов, так и в составе комбинированных препаратов (COMBO), провели на ортотопических моделях, полученных в результате имплантации человеческих клеток нейробластомы в левый надпочечник мышей.

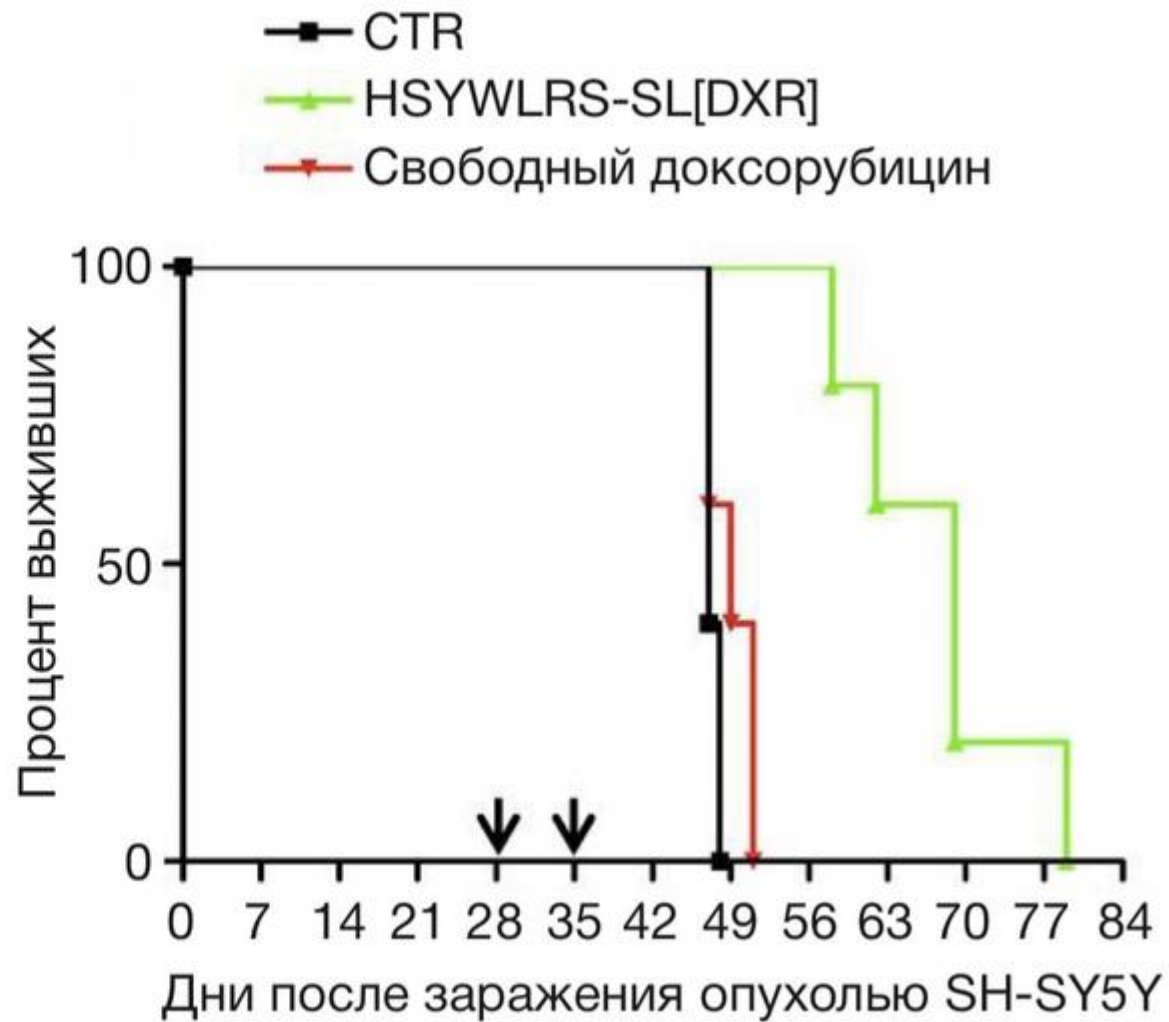
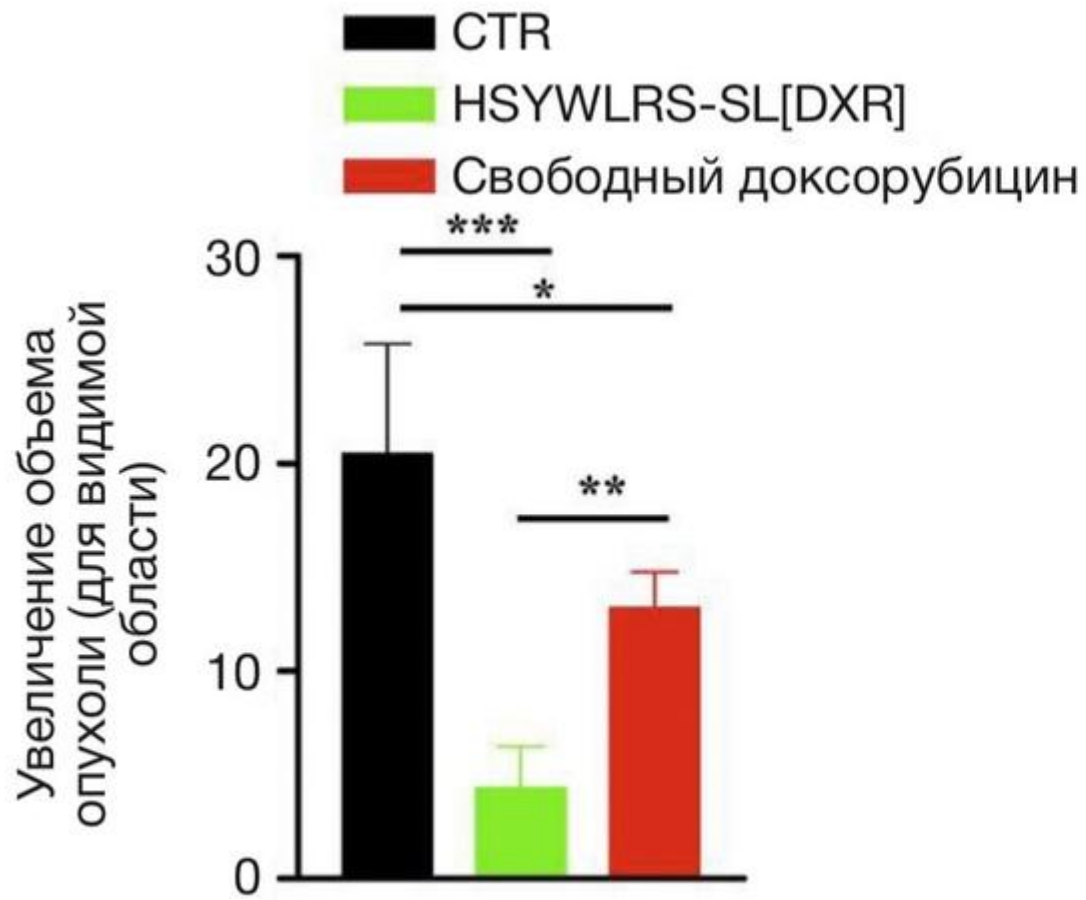
Введение CPRECES-SL[DXR], CNGRC-SL[DXR] или COMBO обеспечивало достоверное увеличение продолжительности жизни по сравнению с введением свободного препарата



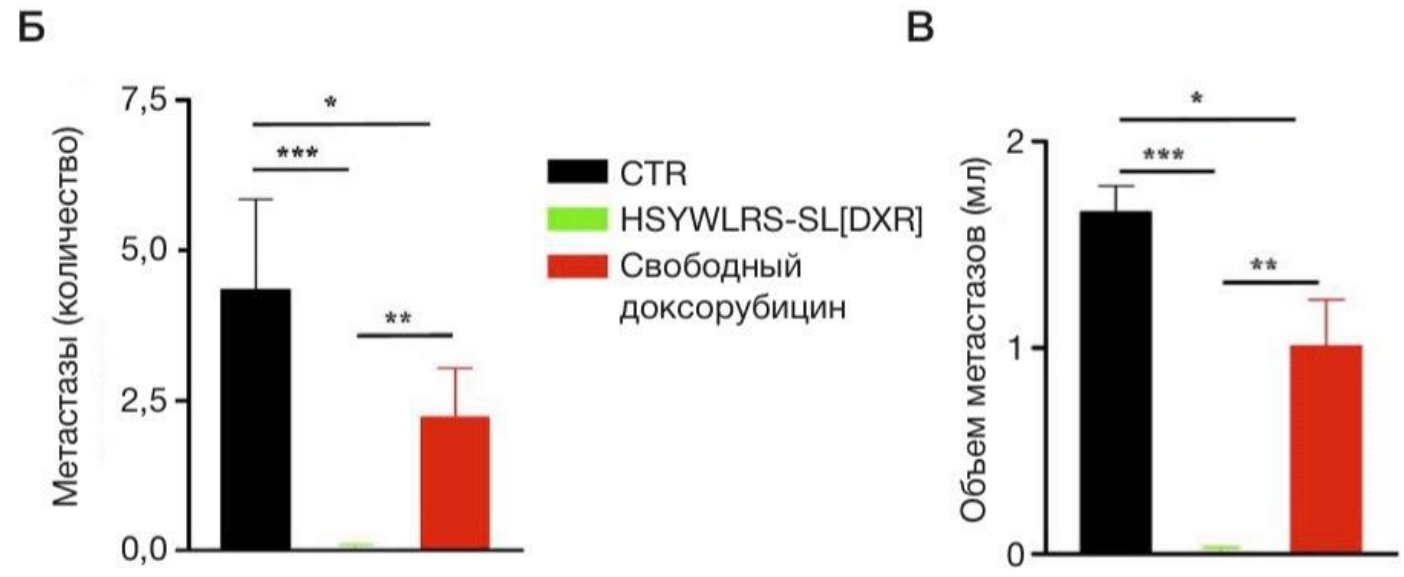
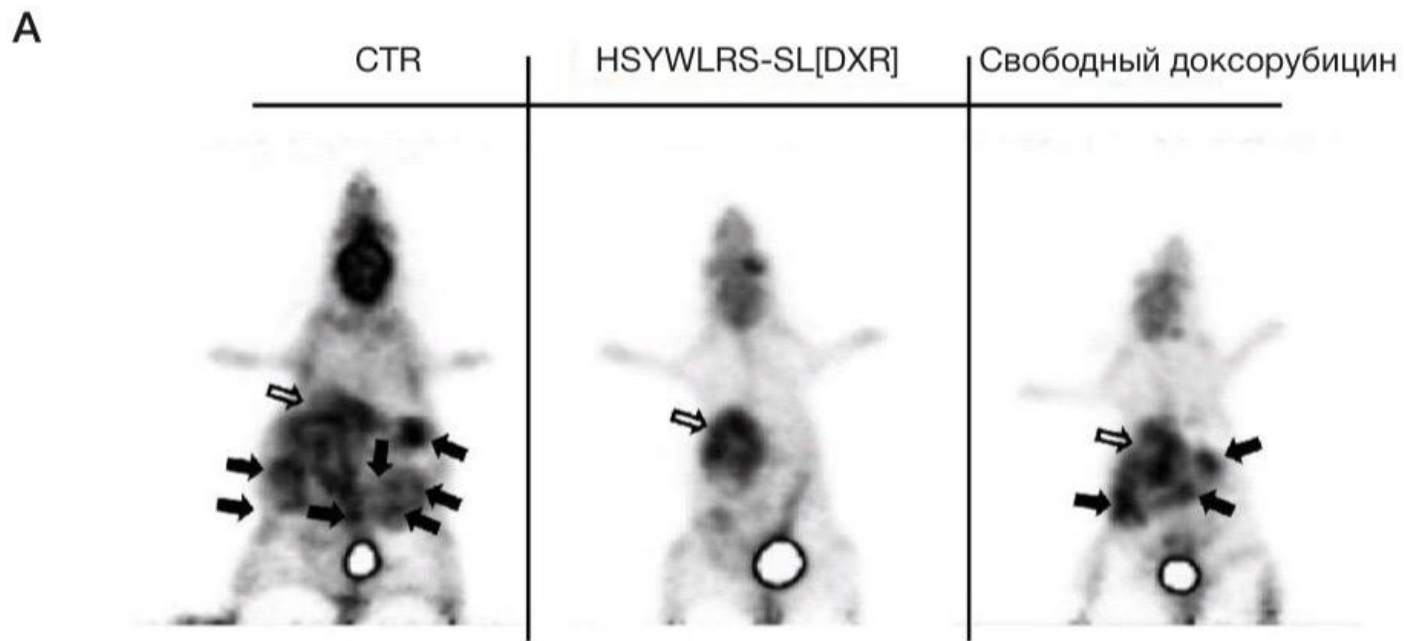
A



Оценка способности препаратов направленного действия увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолями



Оценка способности препаратов направленного действия увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолями



(А). Карты поглощения глюкозы (белые стрелки: первичная опухоль; черные стрелки: метастазы). Количество (Б) и объем метастазов (В) после лечения.

Выводы

Весьма актуальна проблема ранней диагностики опухолей и эффективного лечения, которое имело бы максимальный противоопухолевый эффект, но не затрагивало нормальные ткани.

Появление нанопрепаратов может радикально изменить подход к визуализации и лечению рака при условии, что мы идентифицируем обладающие подходящими свойствами биомаркеры.

В действительности, несмотря на то что разработка наноматериалов стремительно развивается, по-прежнему необходимы мишени с более высокой селективностью, чтобы сделать возможным применение ориентированных на пациента методов.

В этой работе обнаружен ряд мишеней и компонентов направленного действия лекарств, которые были проверены доклинически и могут быть использованы для дальнейшей разработки клинических методов.

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ НАНОФОРМУЛЯЦИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ



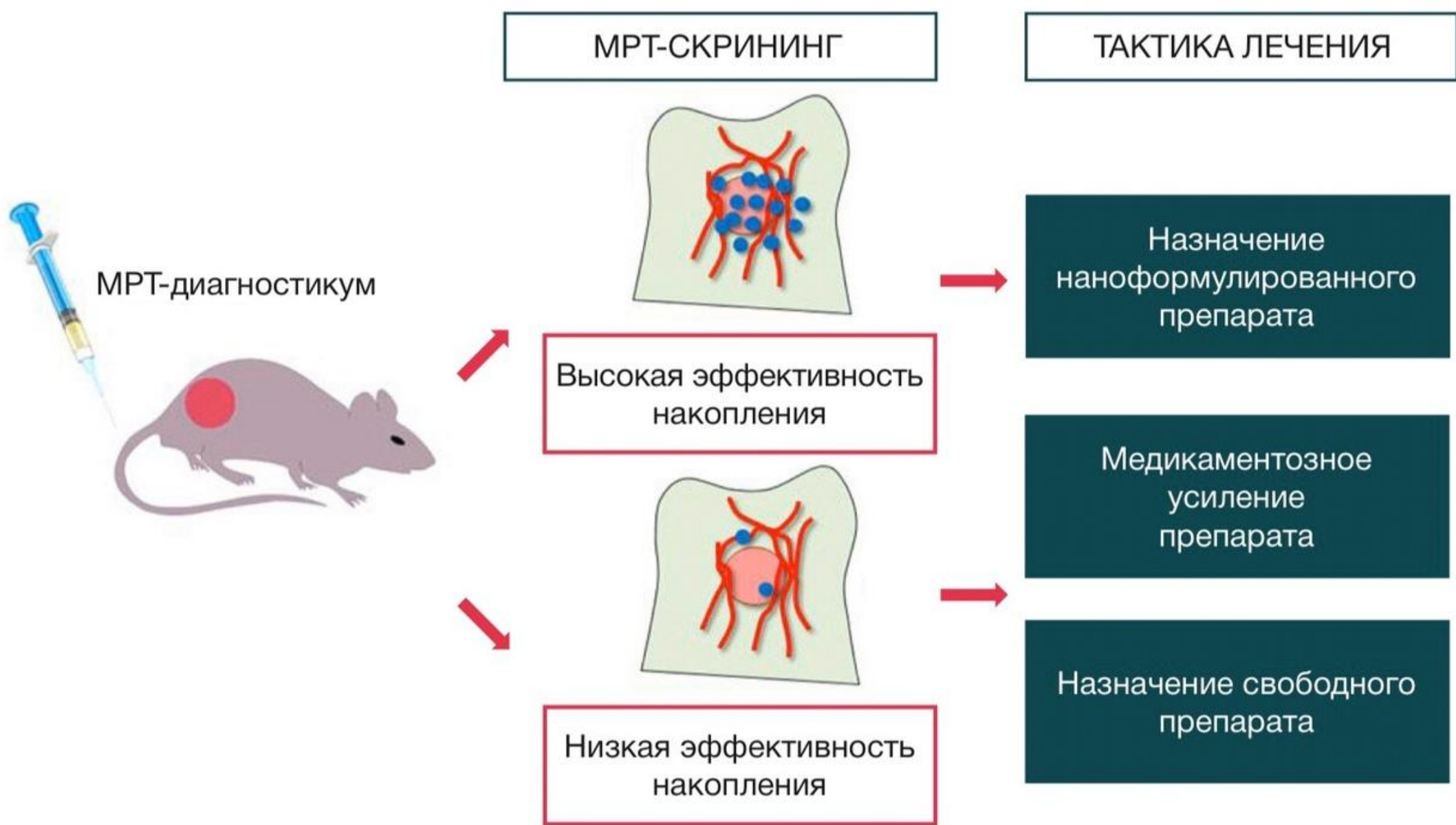
Магнитно-резонансная томография (МРТ) широко используется для диагностики онкологических заболеваний, а также для исследования доставки препаратов на магнитных наноносителях.

Накопление наночастиц в опухоли высоко вариабельно в популяции и зависит от биологических факторов, которые во многом остаются неизученными. В последние годы было высказано предположение о возможности использования МРТ для предсказания ответа на терапию наноформулированными препаратами на основе скрининговых данных о накоплении в опухоли магнитно-контрастных диагностикумов.

В статье обсуждаются преимущества и недостатки методов, позволяющих стратифицировать опухоли по степени накопления наночастиц.

Основными направлениями в области диагностики и лечения злокачественных новообразований являются:

- внедрение высокоинформативных методов диагностики онкопатологии;
- разработка новых препаратов и способов их доставки в опухоль;
- переход к персонализированной медицине.



Алгоритм персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП на животной модели

Необходимость индивидуального прогноза

С точки зрения эффективности лечения, НПП следует назначать тогда, когда EPR-эффект (повышенная проницаемость кровеносных сосудов и сниженный лимфатический дренаж) обеспечивает аккумуляцию необходимой концентрации действующего вещества в опухоли.

Доставка в опухоль может быть улучшена путем:

- повышения артериального давления при введении ангиотензина II или коллагеназа-опосредованного разрушения опухолевого матрикса
- использования НЧ с адресной доставкой

С фармаэкономической точки зрения, при одинаковой эффективности противоопухолевого препарата в наноформуляции и без нее предпочтение должно отдаваться последнему, так как его себестоимость на несколько порядков ниже (например, стоимость 20 мг доксорубина составляет 540 р., доксила — 42 300 р.).

Исследования прогностических факторов эффективности доставки противоопухолевых препаратов

На сегодняшний день в мировой практике отсутствуют клинические алгоритмы индивидуальной оценки EPR- эффекта и связанной с ним эффективности применения НПП. Однако в последние годы за рубежом запущены доклинические и клинические испытания, направленные на решение указанной проблемы. Далее будут разобраны некоторые из них.

Возможность использования магнитных частиц (ферумокситола) для определения эффективности лечения противоопухолевыми нанопрепаратами

В 2017 г. вышли первые результаты клинического исследования, в котором для оценки эффективности наноформулированного иринотекана у 13 пациентов с солидными опухолями использовали МРТ-данные о доставке в опухоль МНЧ (ферумокситола). Было показано, что высокие уровни накопления ферумокситола через 1–24 ч после введения коррелировали с уменьшением опухолевых очагов на фоне терапии.

Недостаток - значительная разница в физических свойствах диагностических и терапевтических НЧ (в частности, их размер составлял 23 нм и 110 нм соответственно).

Проведение интравитальной микроскопии (ИВМ) для оценки фармакокинетики ферумокситола и PGLA-ПЭГ показало различия в скорости и локусах накопления двух типов НЧ с различным размером.

Корреляция между накоплением в опухоли меченых ПЭГ-модифицированных липосом и эффективностью терапии

В исследовании оценивали корреляцию между накоплением в опухоли ^{64}Cu -меченых HER2-направленных ПЭГ-модифицированных липосом, содержащих доксорубин, и эффективностью терапии у 19 пациентов с HER2-позитивным метастатическим раком молочной железы.

Детекцию радиоактивно меченных НЧ проводили методом позитронно-эмиссионной и компьютерной томографии. Высокий уровень накопления меченых частиц коррелировал с положительным ответом на терапию.

Но изначально данное исследование было направлено на оценку эффективности лечения рака молочной железы липосомным доксорубином с трастузумабом в сочетании с циклофосфамидом.

В связи с этим представляется затруднительной интерпретация вклада сопутствующих факторов в результаты эксперимента. Кроме того, объективно оценить применимость подхода не позволяло испытание лишь одной опухолевой модели.

Эффективность использования наноформуляций доксорубицина, меченных радиоактивным технецием

На животной модели была показана корреляция интенсивности сигнала в опухоли по данным однофотонной эмиссионной КТ с накоплением препарата в экстрагированных опухолях.

Эффективность данного подхода нашла подтверждение в клиническом испытании, где $(99m)\text{Tc}$ -меченый липосомный доксорубин вводили 35 пациентам с мезотелиомой.

Накопление препарата в опухоли коррелировало с ответом на лечение. Однако технические сложности, связанные с использованием радиоактивных материалов, а также отсутствие необходимого оснащения в большинстве лечебно-профилактических учреждений ограничивают трансляционный потенциал данного подхода.

Проблемы и перспективы использования МРТ в прогностических алгоритмах противоопухолевой терапии

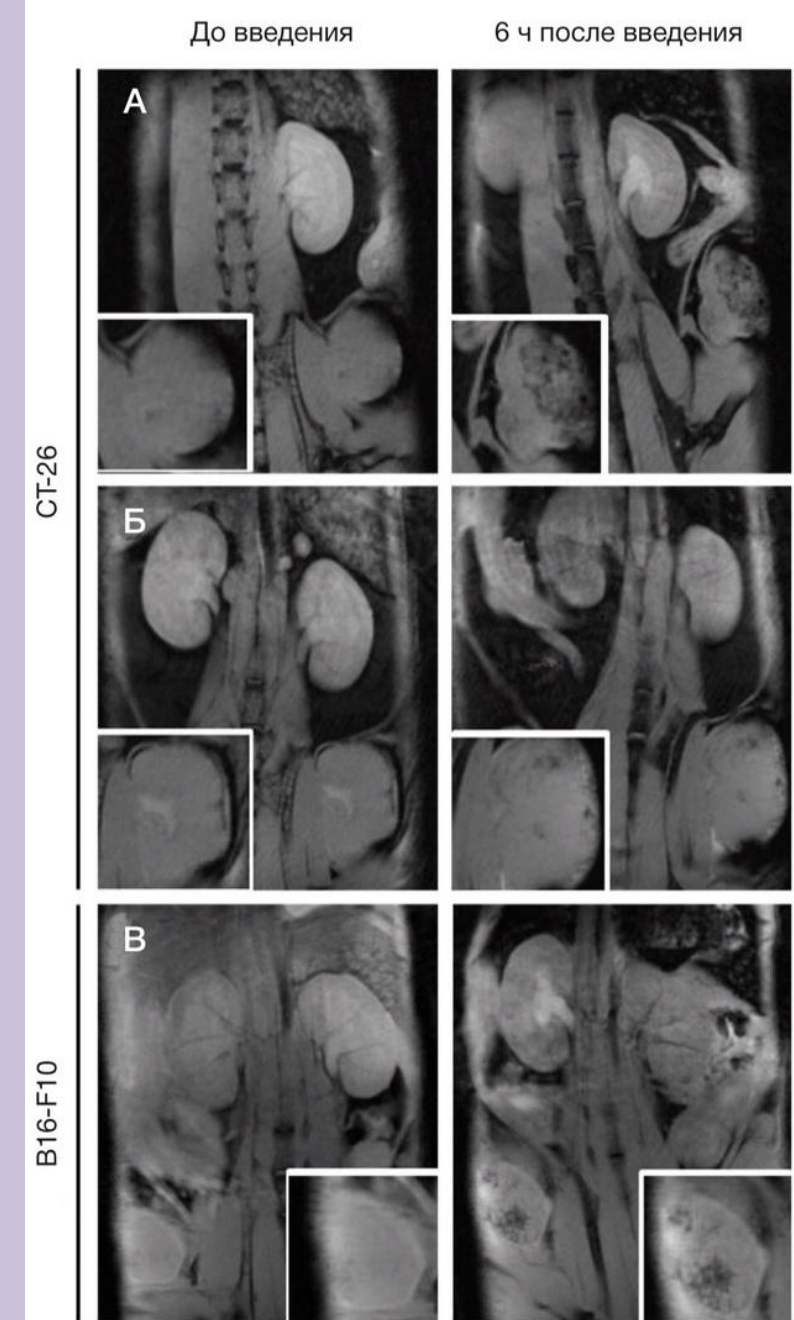
Концептуальные проблемы и технические ограничения, стоящие на пути создания технологии персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП:

1. в качестве диагностических и терапевтических препаратов используют НЧ различной природы;
2. не исследована возможность того, что введение первой (диагностической) дозы наноформуляции может оказывать влияние на введение второй (терапевтической) дозы;
3. не исследованы временные изменения EPR-эффекта в одной и той же опухоли, что может определять различия в накоплении первой и второй дозы НЧ;
4. в большинстве случаев исследования выполнены ретроспективно на небольшой выборке с использованием одного типа опухоли;
5. исследования не связаны с прямой оценкой EPR- эффекта, а потому не позволяют исключить влияние сопутствующих факторов (например, сопутствующей противоопухолевой терапии).

Исследования, выполненные в лаборатории с использованием магнитно-контрастных НЧ, показали, что МРТ может быть использована для оценки степени выраженности EPR- эффекта как для различных опухолевых моделей, так и для различных животных.

На основе полученных данных возможно ранжирование животных на прогностические группы с последующей оценкой терапевтической эффективности нанопрепаратов.

Неоднородность накопления НЧ также может быть связана с эволюцией опухолевых сосудов и изменением архитектоники тканей, что диктует необходимость оценки EPR-эффекта на разных этапах канцерогенеза.



Гетерогенность EPR-эффекта: внутригрупповая (А–Б); между разными моделями опухолей (А–В)

Выводы

Концепция использования неинвазивных методов и МНЧ для создания индивидуальных терапевтических алгоритмов в онкологии представляется перспективной и реалистичной.

Использование современных методов исследования механизмов, определяющих степень накопления НЧ в опухоли, а также валидация МРТ как скринингового метода на животных моделях послужат основой для последующего внедрения в клиническую практику технологии персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП.

Литература

1) Вестник РГМУ (Научный медицинский журнал РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Ноябрь-Декабрь 2018/06

- Адресная доставка лекарственных нанопрепаратов в применении к моделям рака на доклиническом этапе исследований
С. Марчио, Ф. Буссолино
- Магнитно-резонансная томография для персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки наноформуляций противоопухолевых препаратов
В.А. Науменко, А.С. Гаранина, С.С. Водопьянов, А.А. Никитин, А.О. Преловская, Е.И. Демихов, М.А. Абакумов, А.Г. Мажуга, В.П. Чехонин

2) Овчинников П.Е., Межелевская Т.А. Нанопрепараты в лечении злокачественных новообразований//
[https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8\(26\)](https://nauchforum.ru/archive/MNF_nature/8(26))