



# **Нанофармакология: биохимические ОСНОВЫ, достижения и перспективы.**

# СТРУКТУРА УЧЕБНОГО СОДЕРЖАНИЯ

1. Определение
2. Общие принципы направленной доставки лекарственных препаратов
3. Направленная доставка в миокард
4. Наночастицы кремнезема
  - 4.1. Влияние наночастиц кремнезема на гемодинамические и биохимические параметры
  - 4.2. Биораспределение наночастиц кремнезема
  - 4.3. Вопросы безопасности наночастиц кремнезема
5. Направленная доставка в миокард с помощью наночастиц кремнезема
6. Направленная доставка с помощью магнитных наночастиц
8. Дилемма направленной доставки препаратов



# ОПРЕДЕЛЕНИЕ



# Определение

***Нанофармакология*** - раздел фармакологии, изучающий механизмы действия, биологические эффекты и фармакокинетику нанолекарств

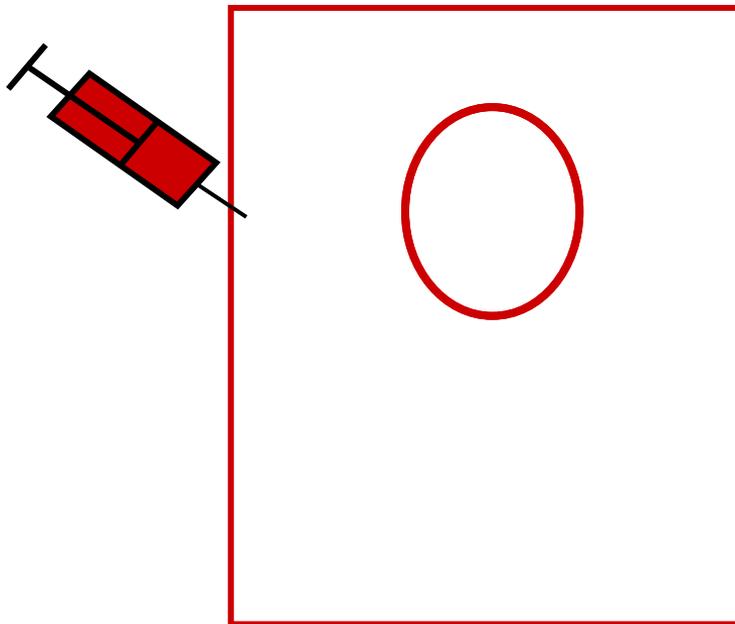


# ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ



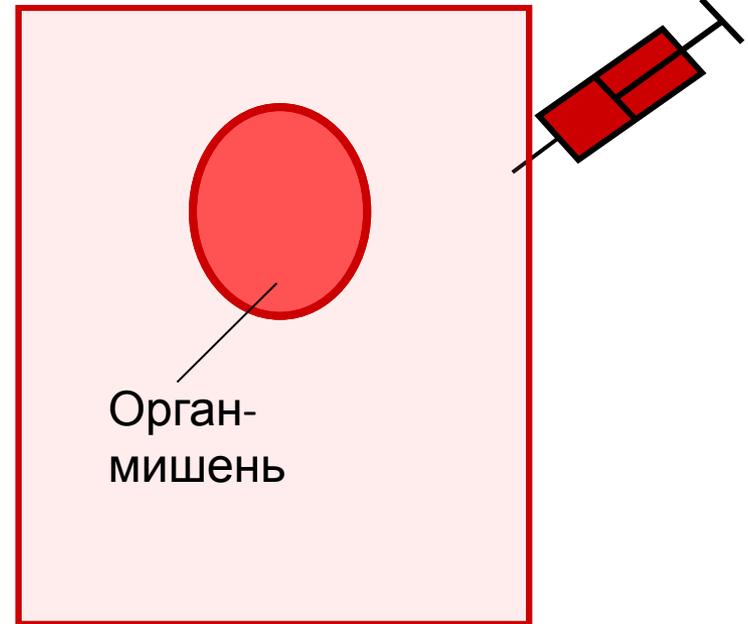
# Эффект направленной доставки

**Системное введение  
лекарственного препарата**



Большой объем  
распределения лекарства  
↓  
воздействие на системные  
механизмы заболевания

**Направленная доставка  
лекарственного препарата**



Уменьшение объема  
распределения лекарства  
↓  
направленная доставка

# Преимущества направленной доставки

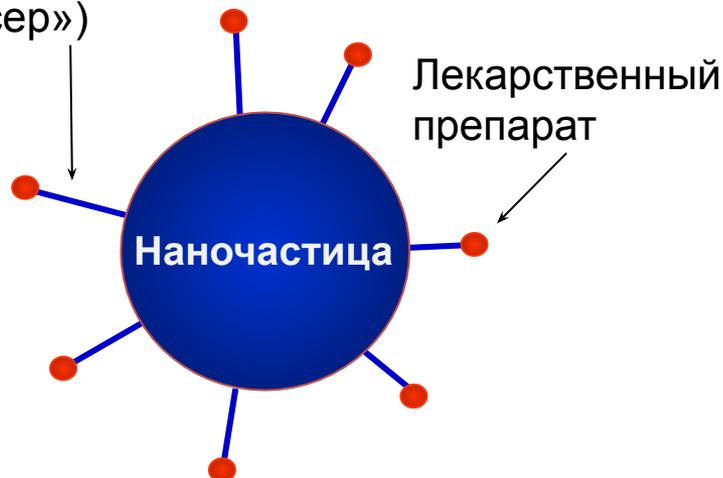
Направленная доставка лекарственных препаратов с помощью наночастиц имеет целый ряд существенных преимуществ:

- ✓ Уменьшение объема распределения препаратов;
- ✓ Снижение системной токсичности препаратов;
- ✓ Повышение растворимости гидрофобных препаратов;
- ✓ Повышение стабильности препаратов (белки, пептиды, олигонуклеотиды);
- ✓ Улучшение биосовместимости.

# Пассивный и активный механизмы направленной доставки

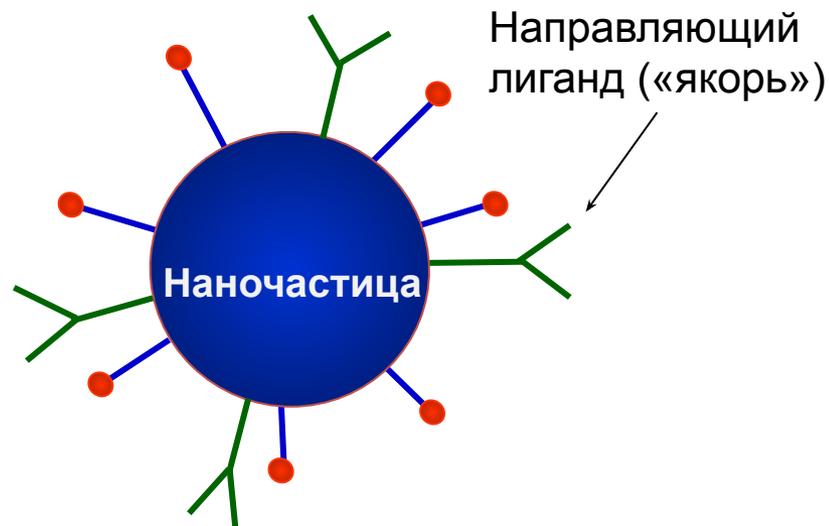
## Пассивный механизм

Молекула-вставка  
(«спейсер»)



Наночастицы с лекарством выходят за пределы сосудистого русла преимущественно в зонах повышенной проницаемости сосудов

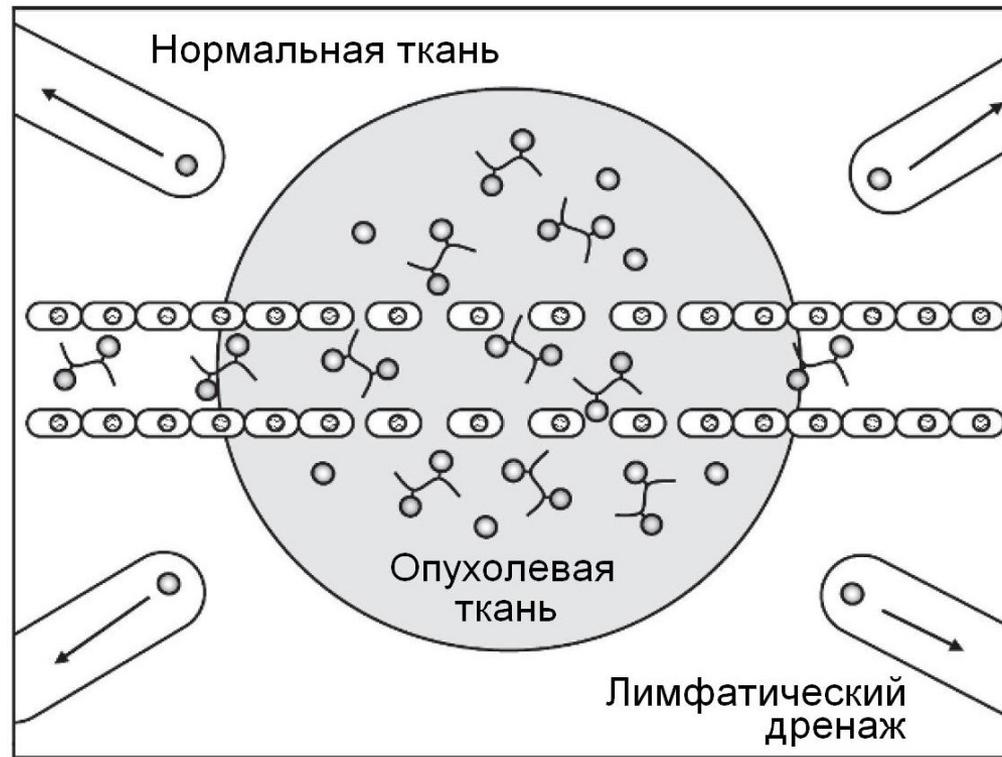
## Активный (таргетный) механизм



Накопление наночастиц с лекарством в зоне интереса за счет специфического связывания лиганда и маркера повреждения

# Пассивная направленная доставка

Ключевую роль в пассивной направленной доставке лекарственных препаратов играет повышенная проницаемость микрососудов (Matsumura Y., Maeda H., 1986), например, опухолевых.



# Основные типы направляющих лигандов для таргетной доставки лекарств

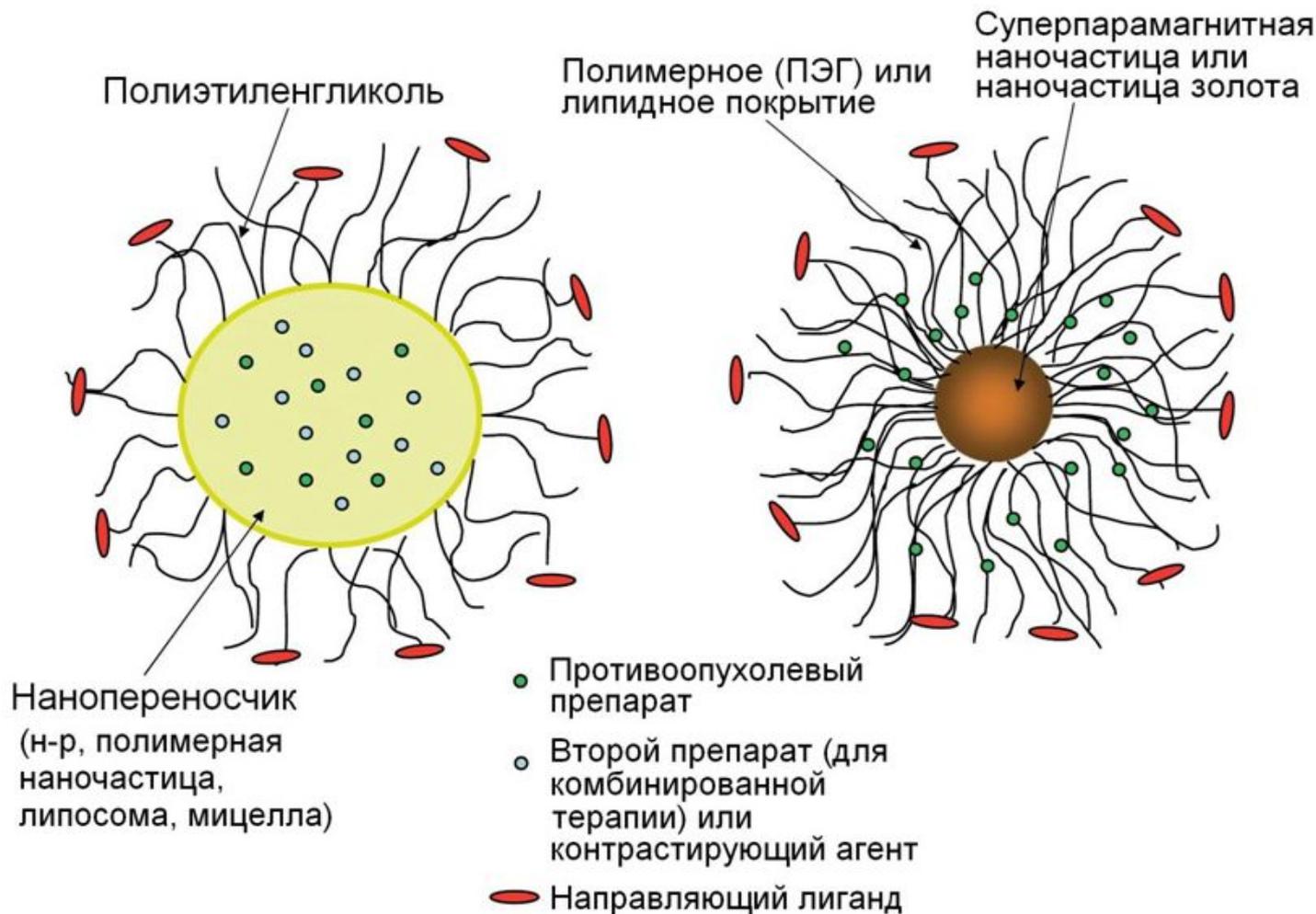
- Моноклональные антитела
- Антиген-распознающие фрагменты антител (Fab-фрагменты, одноцепочечные переменные фрагменты, наносомы)
- Аптамеры (олигонуклеотиды)
- Пептиды
- Низкомолекулярные соединения (фолиевая кислота)



# Примеры активной направленной доставки

- Доставка упакованного в липосомы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) за счет присоединения к поверхности липосом моноклональных антител против Р-селектина
- Доставка в миокард АТФ с помощью липосом, имеющих на своей поверхности моноклональные антитела против миозина

# Примеры бифункциональных наночастиц для диагностики и терапии опухолей



# Направленная доставка в онкологии: текущие клинические исследования

Соединение	Название	Показания	Статус
Липосомальный цисплатин	SPI-77	Рак легкого	Фаза II
Термочувствительный липосомальный доксорубицин	ThermoDox	Рак молочной железы, рак печени	Фаза I
Цисплатин-содержащие полимерные мицеллы	Nanoplatin	Различные злокачественные опухоли	Фаза I
Доксорубицин-содержащие полимерные мицеллы	NK911	Различные злокачественные опухоли	Фаза I
Конъюгаты полиглутамата и паклитаксела	Xyotax	Рак легкого, рак яичника	Фаза III
Альбумин-метотрексат	MTX-HSA	Рак почки	Фаза II

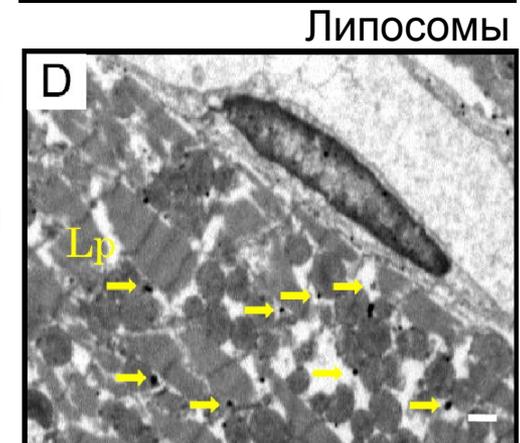
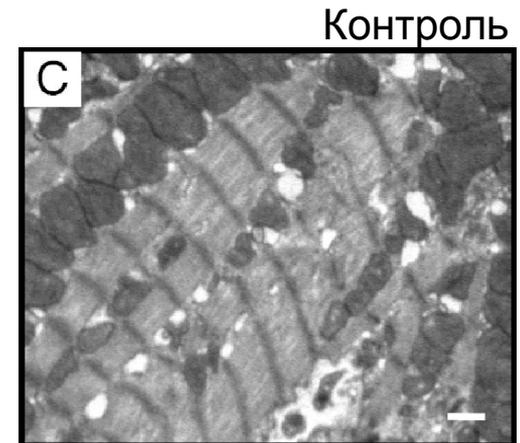
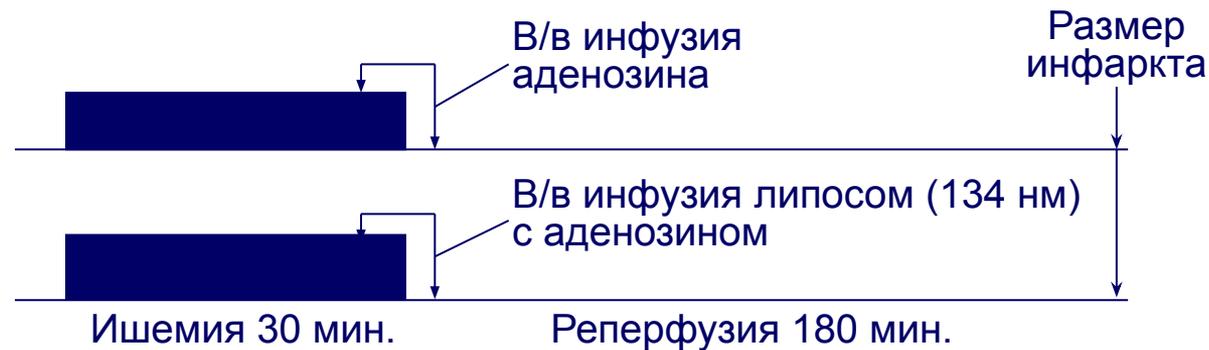


# НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА В МИОКАРД



# Пассивная направленная доставка в поврежденный миокард

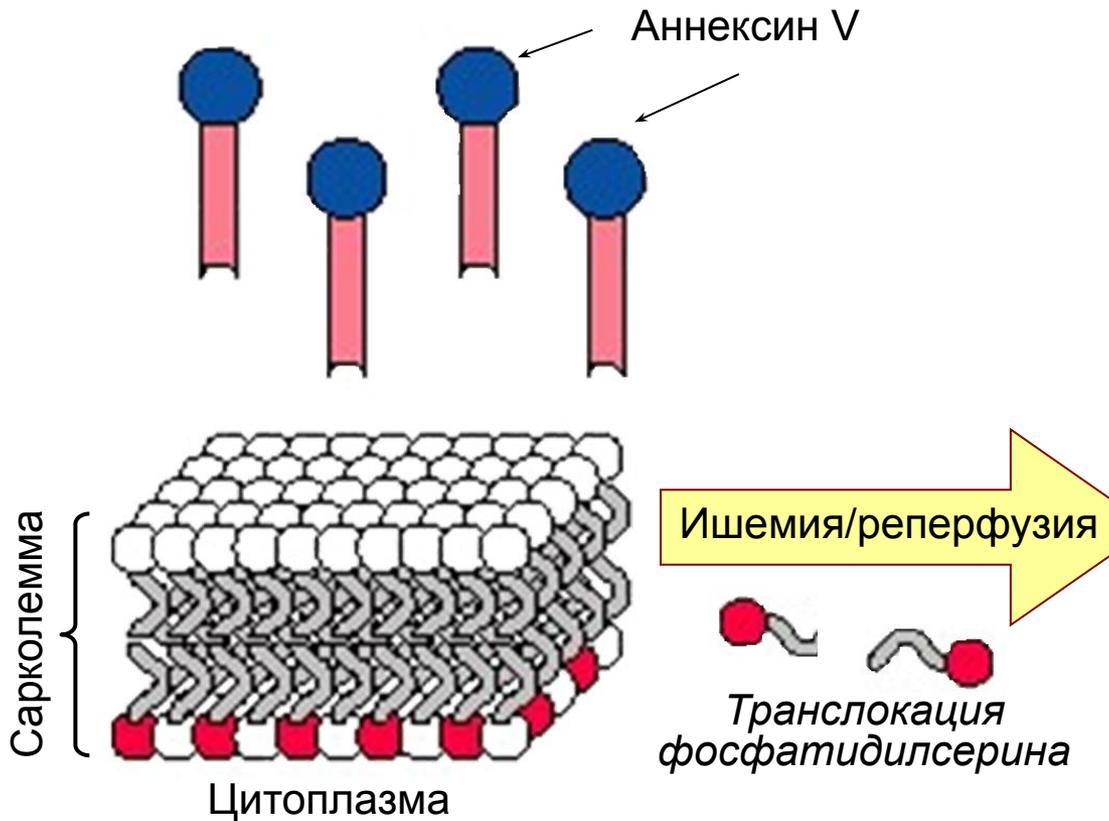
Протокол и результаты первого опубликованного исследования пассивной направленной доставки в миокард после ишемии (*Takahama H. et al., 2009*)



- Введение липосомального аденозина сопровождалось:
- ✓ Накоплением липосом в зоне риска (область некроза и пограничная зона);
  - ✓ Менее выраженными побочными гемодинамическими эффектами;
  - ✓ Более выраженным инфаркт-лимитирующим эффектом

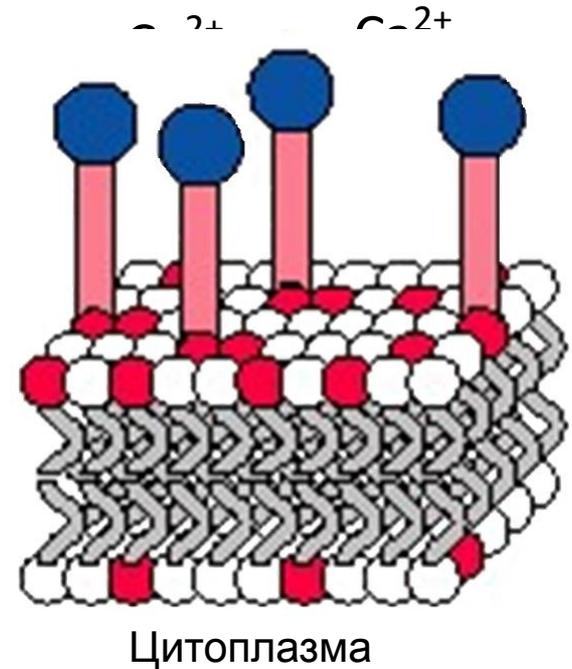
# Патологические изменения в ишемизированном миокарде

Норма



Обратимое повреждение

Специфическое связывание аннексина V с сарколеммой

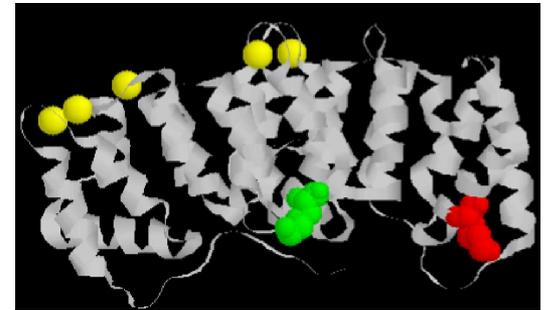


# Предпосылки к активной направленной доставки в ишемизированный миокард

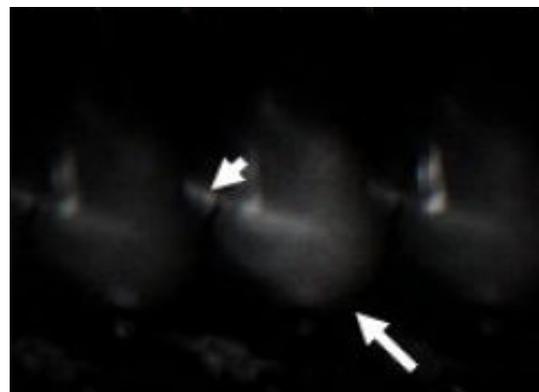
В исследовании *Ohnishi S. et al., 2006*:

- ✓ Был синтезирован конъюгат аннексина V с молекулой-флуорофором
- ✓ Была разработана модель регионарной ишемии/реперфузии миокарда у собак
- ✓ Флуоресценция конъюгата аннексина V была оценена спустя 30 минут после его внутривенного введения животным

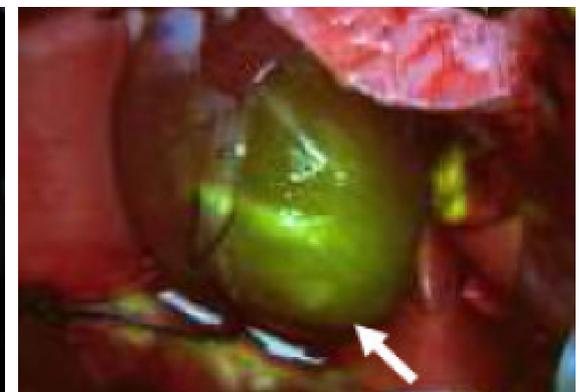
Конъюгат аннексина V с флуорофором



Видимый свет

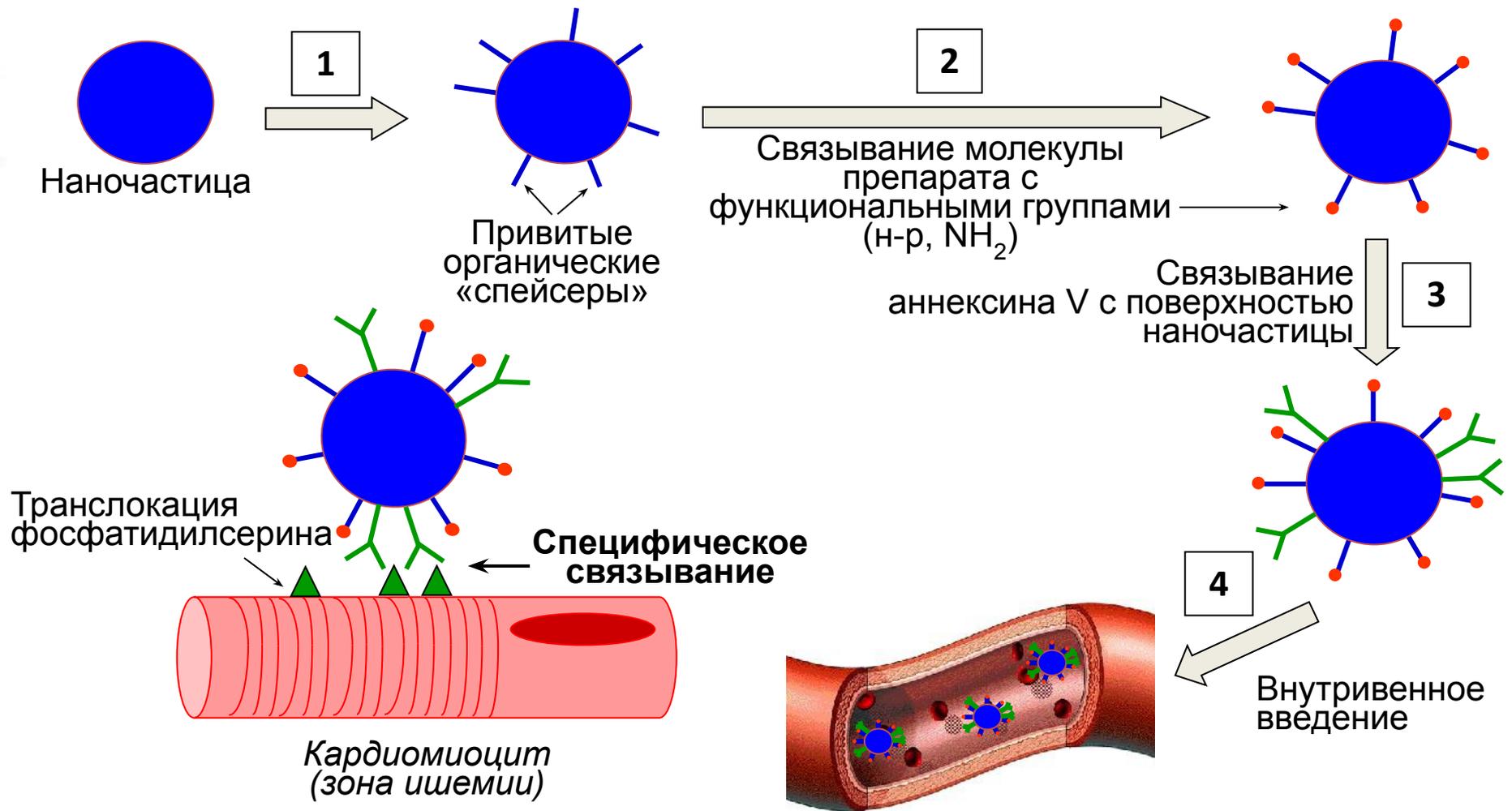


ИК излучение (800 нм)



Совмещение

# Алгоритм активной направленной доставки препаратов в миокард

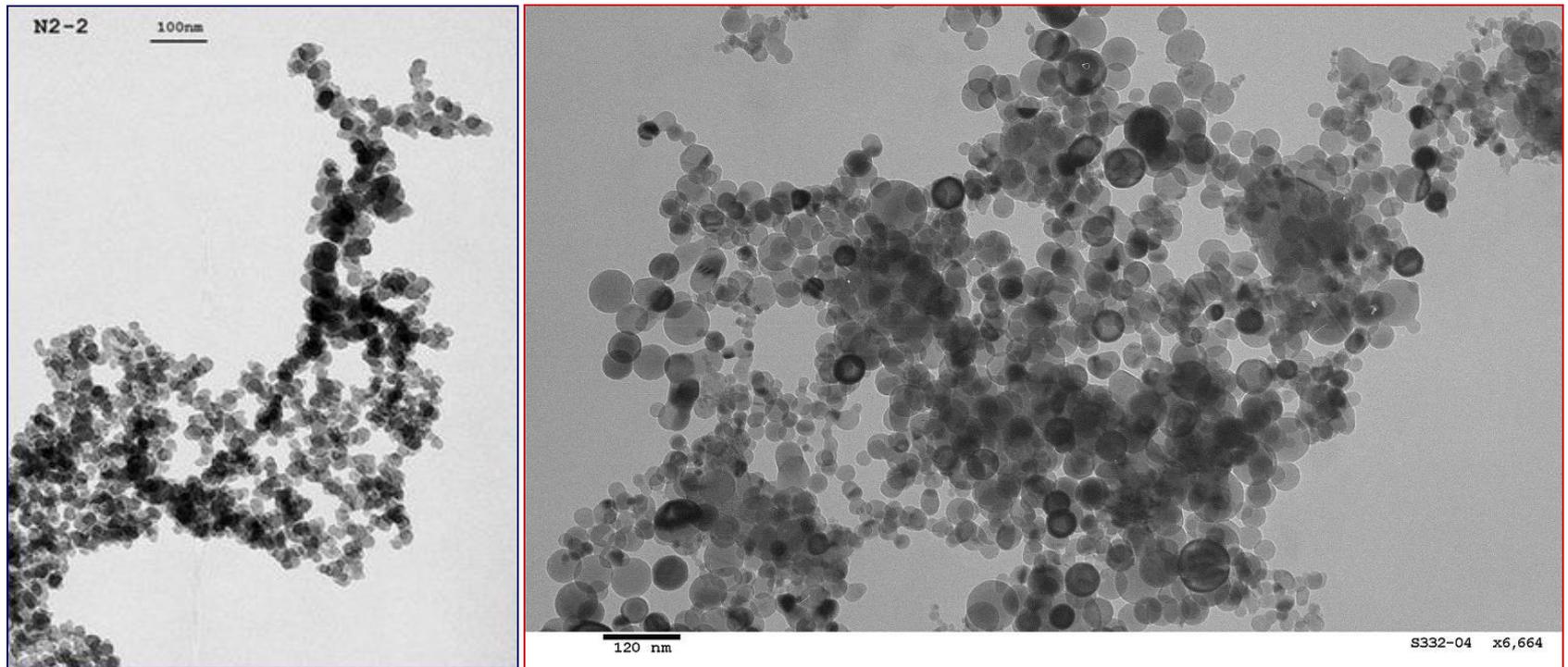


# НАНОЧАСТИЦЫ КРЕМНЕЗЕМА



# Наночастицы кремнезема

Морфологию наночастиц кремнезема (НЧК) можно исследовать с помощью просвечивающей электронной микроскопии:



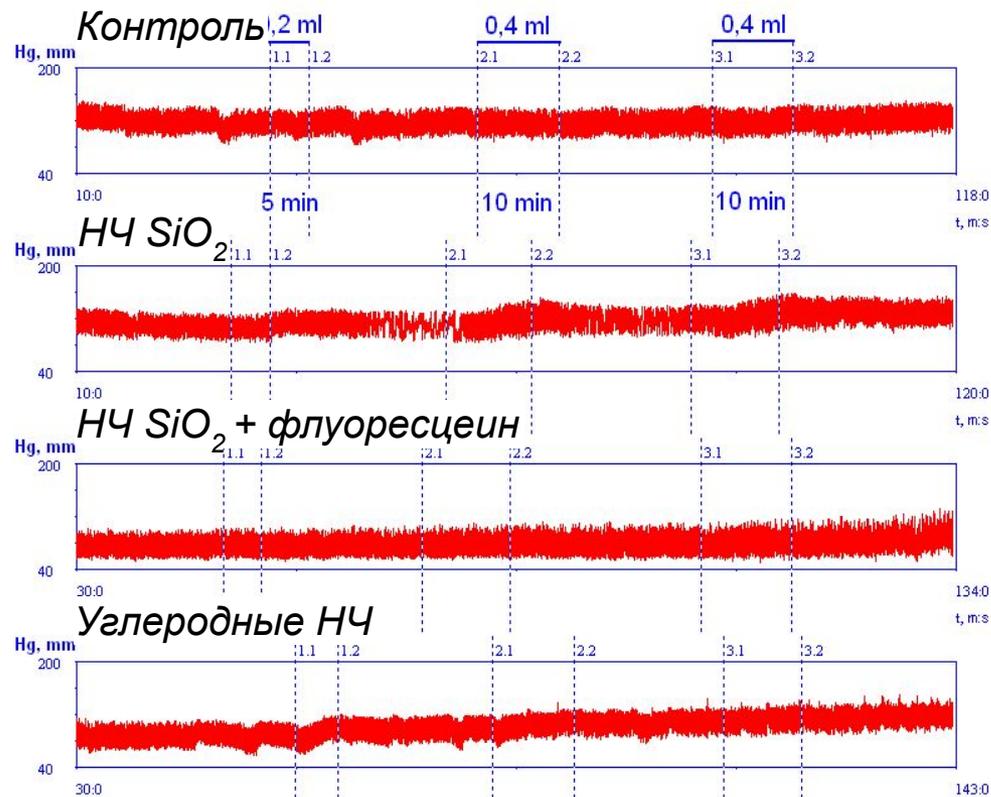
- ✓ удельная поверхность наночастиц кремнезема -  $600-700 \text{ м}^2/\text{г}$
- ✓ диаметр наночастиц кремнезема -  $7-20 \text{ нм}$

# 1. Влияние наночастиц кремнезема на гемодинамические и биохимические параметры



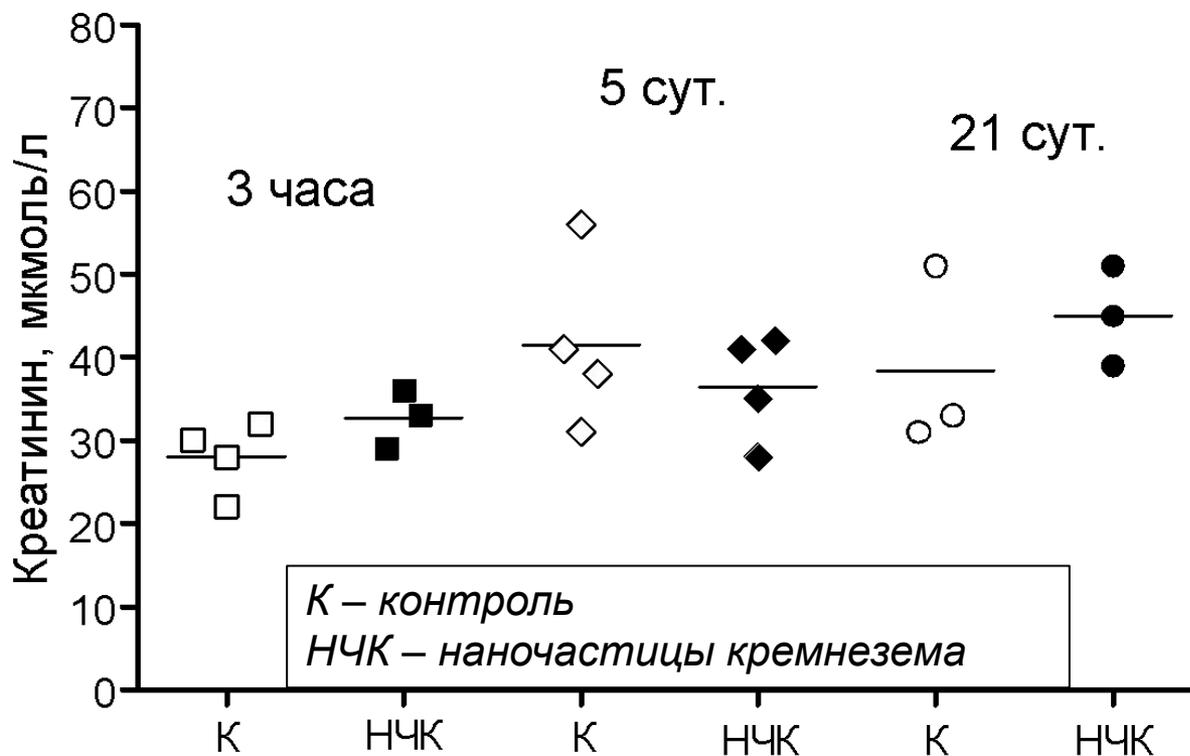
# Влияние наночастиц кремнезема на артериальное давление

В исследовании *Galagudza M. et al., 2010* установлено, что внутривенное введение суспензий углеродных и кремнеземных наночастиц животным не оказывает существенного влияния на гемодинамические показатели, что косвенно свидетельствует о хорошей биосовместимости использованных носителей.



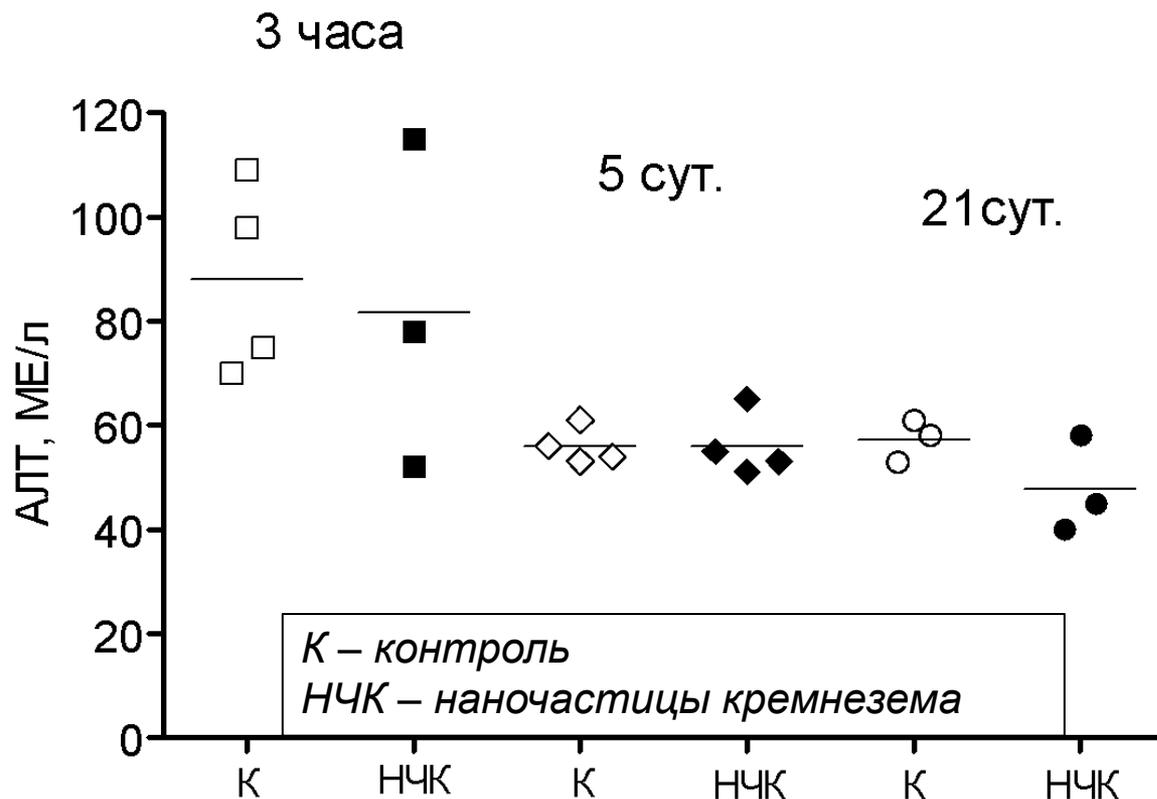
# Влияние наночастиц кремнезема на уровень креатинина

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень креатинина в плазме крови животных:



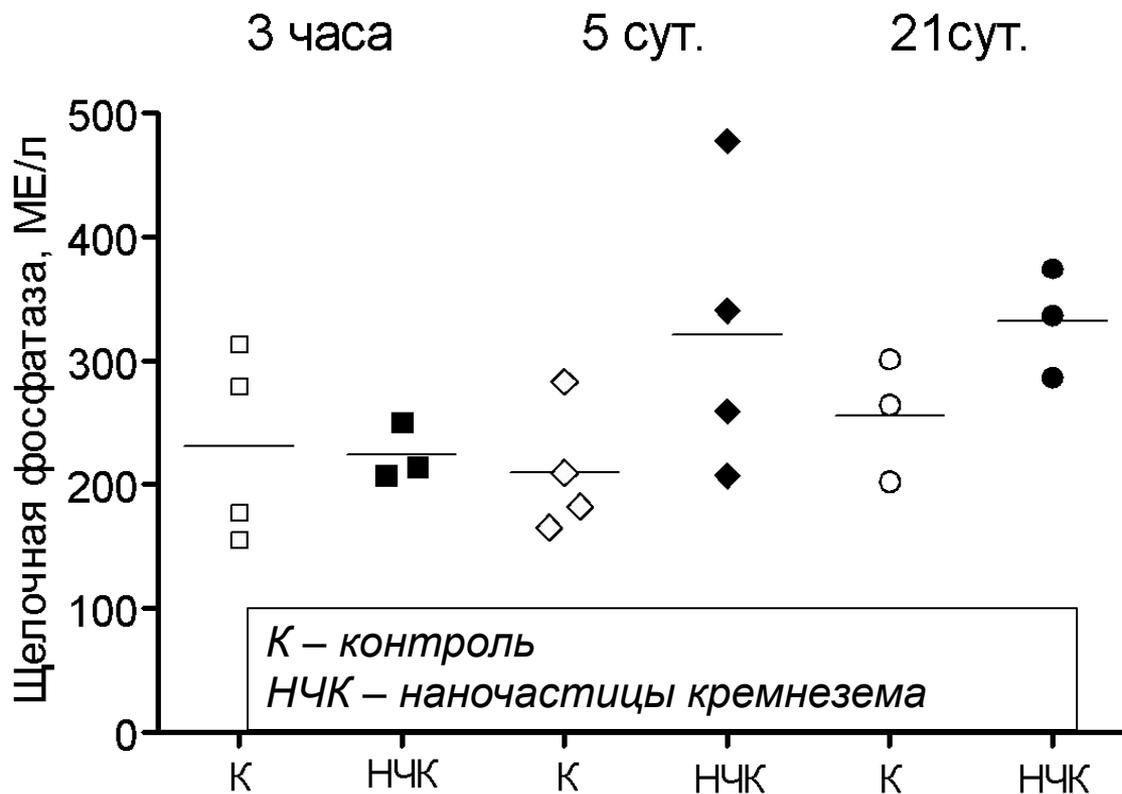
# Влияние наночастиц кремнезема на уровень аланинаминотрансферазы

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень аланинаминотрансферазы в плазме крови животных:



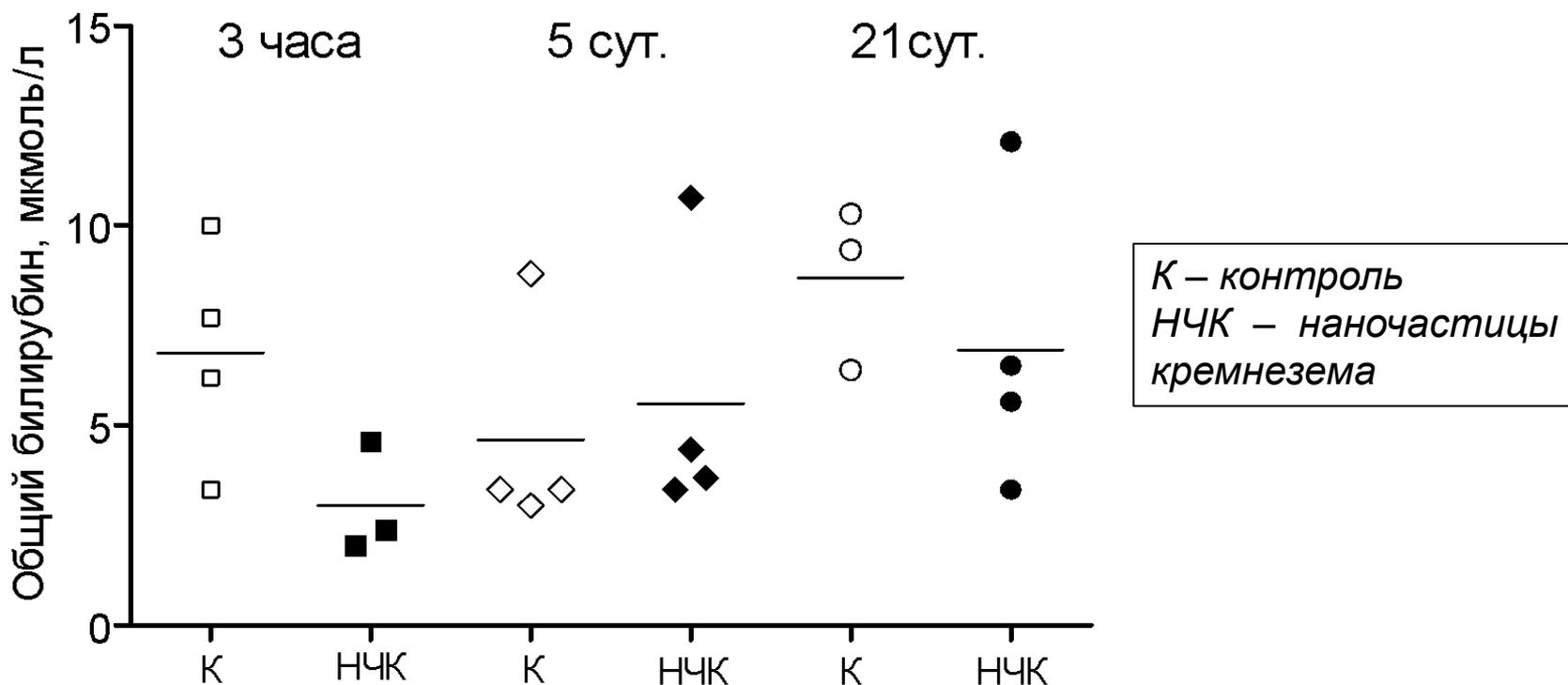
# Влияние наночастиц кремнезема на уровень щелочной фосфатазы

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень щелочной фосфатазы в плазме крови животных:



# Влияние наночастиц кремнезема на уровень общего билирубина

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень общего билирубина в плазме крови животных:

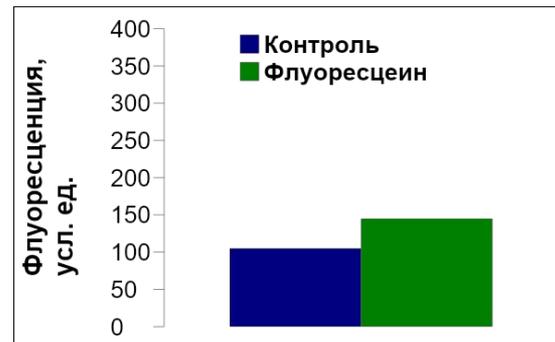
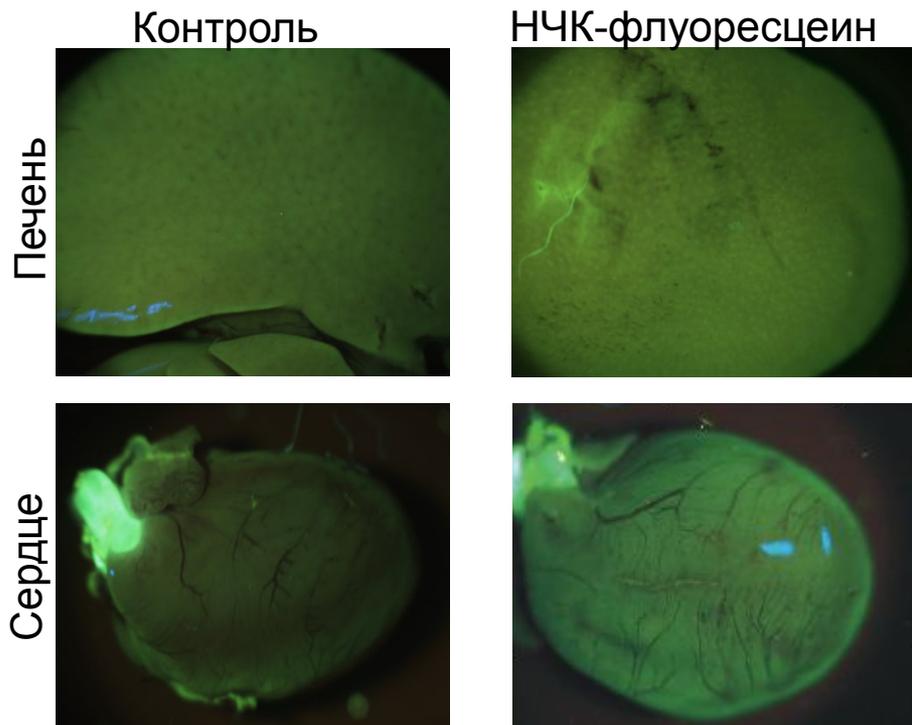
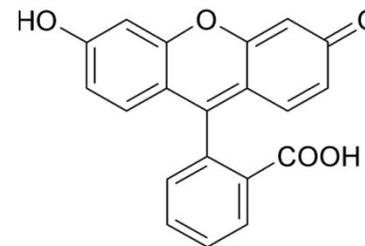


## 2. Биораспределение наночастиц кремнезема



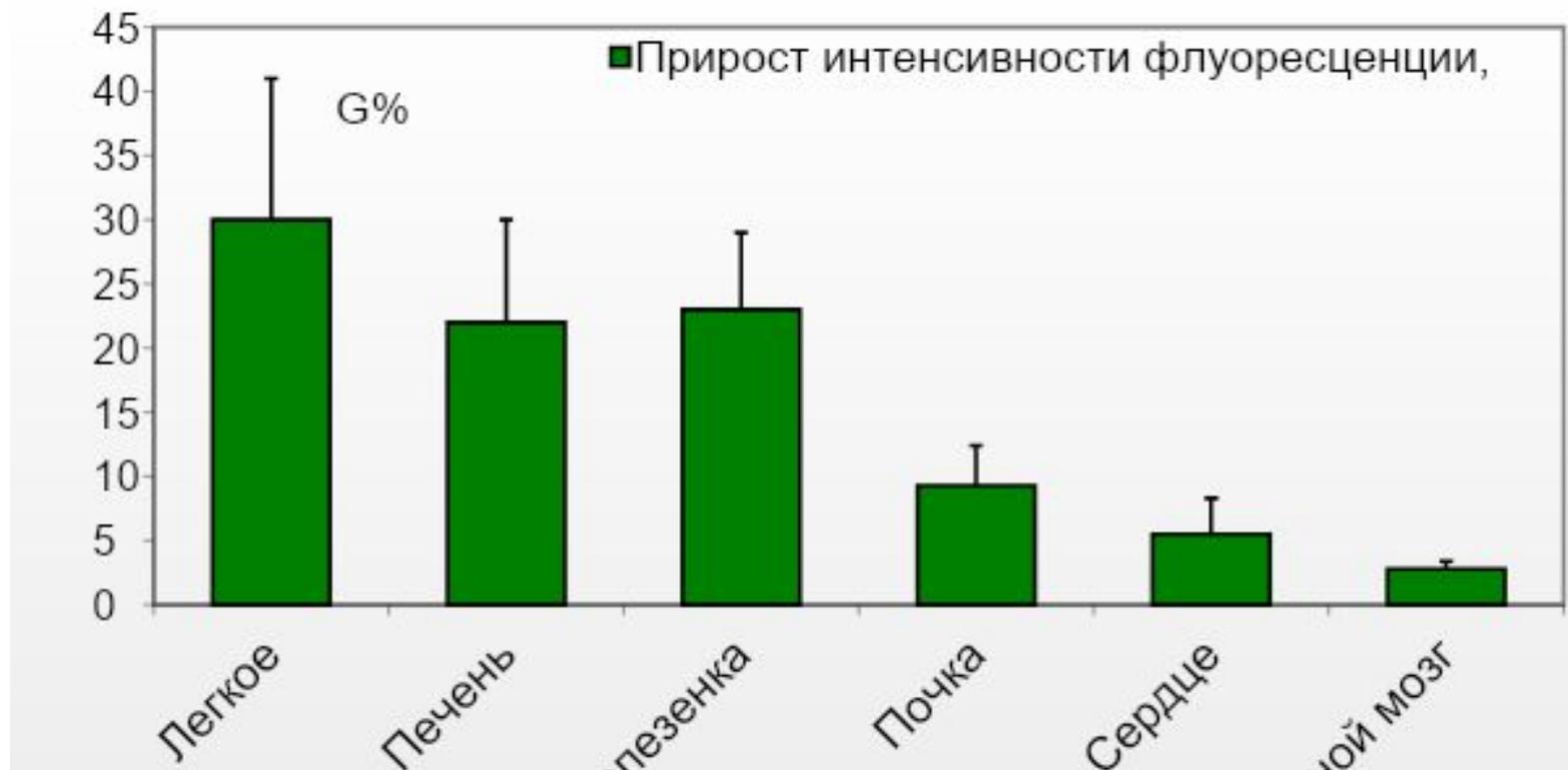
# Биораспределение наночастиц кремнезема

Для оценки биораспределения наночастицы кремнезема конъюгировались с флуоресцентным красителем флуоресцеином ( $\lambda_{\text{max адсорбции}} = 494 \text{ нм}$ )



# Биораспределение наночастиц кремнезема с флуоресцеином

Естественное биораспределение наночастиц кремнезема, модифицированных кремнеземом через 30 минут после внутривенного введения оценивалось методом оптической флуоресценции:





# 3. Вопросы безопасности наночастиц кремнезема



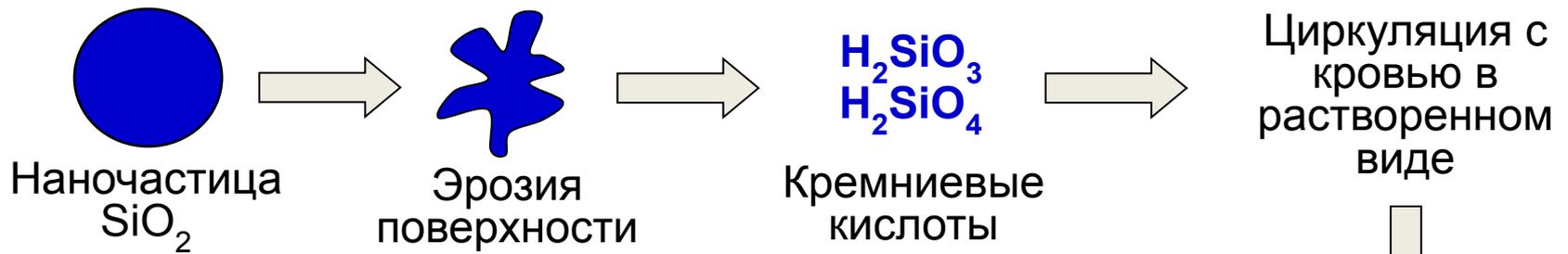
# Вопросы безопасности наночастиц кремнезема

□ Так как экспериментальные исследования показали, что наночастицы кремнезема способны неселективно накапливаться в различных органах, необходимо было выяснить:

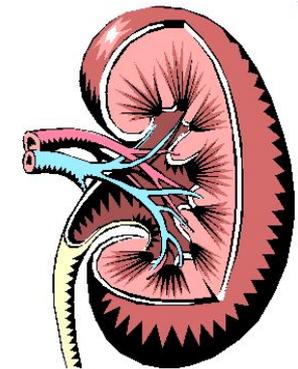
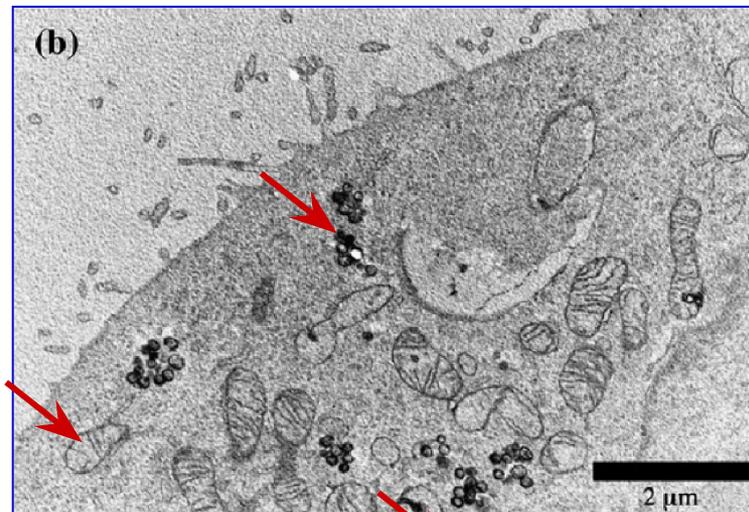
- ✓ не может ли накопление наночастиц кремнезема вызывать какие-либо побочные эффекты
- ✓ способны ли наночастицы кремнезема деградировать в организме и выводиться из него

□ Иными словами был поставлен вопрос о биосовместимости и биodeградируемости наночастиц кремнезема.

# Схема распада наночастиц кремнезема в организме



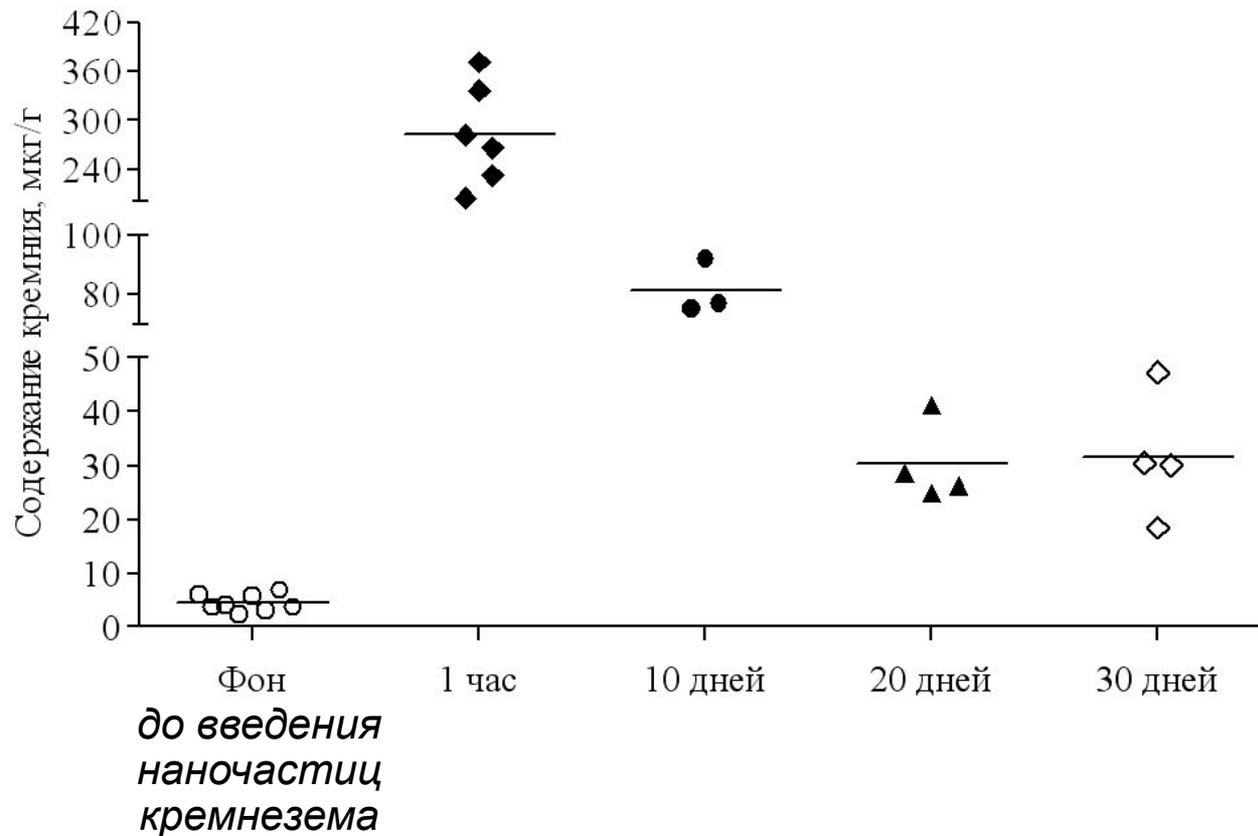
Эндоцитоз наночастиц кремнезема  $\text{SiO}_2$  клетками линии HeLa



Экскреция с мочой

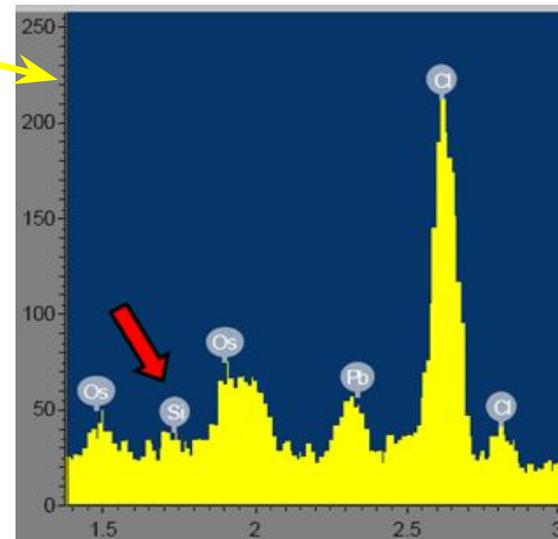
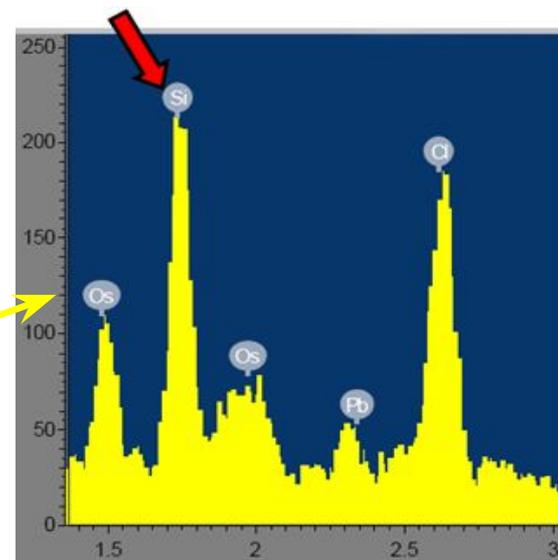
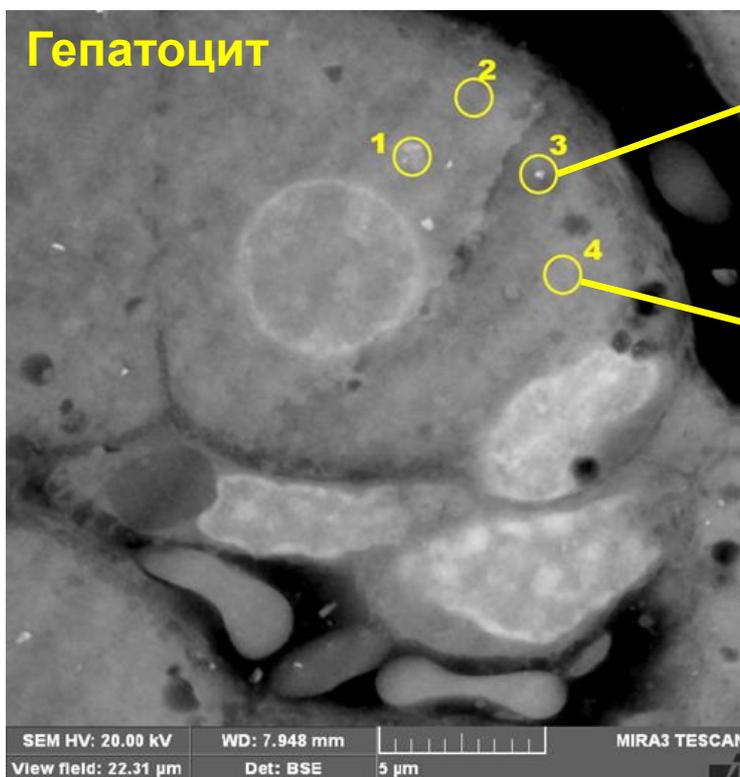
# Биодеградация наночастиц кремнезема

Было определено содержание кремния в печени животных в разные сроки после внутривенного введения наночастиц кремнезема

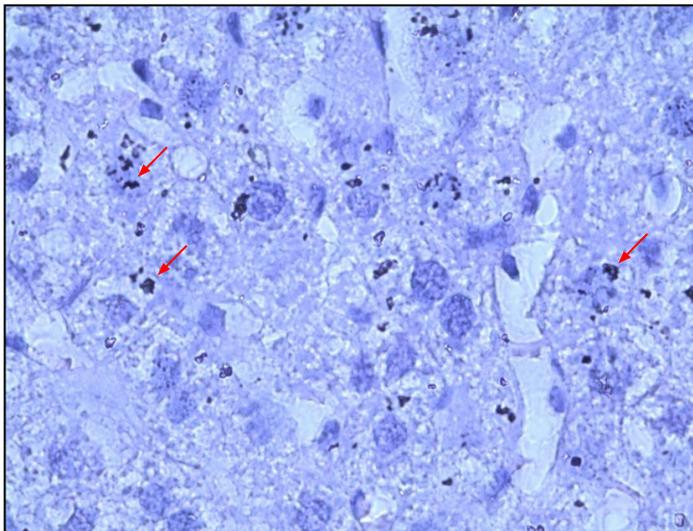


# Биораспределение наночастиц кремнезема

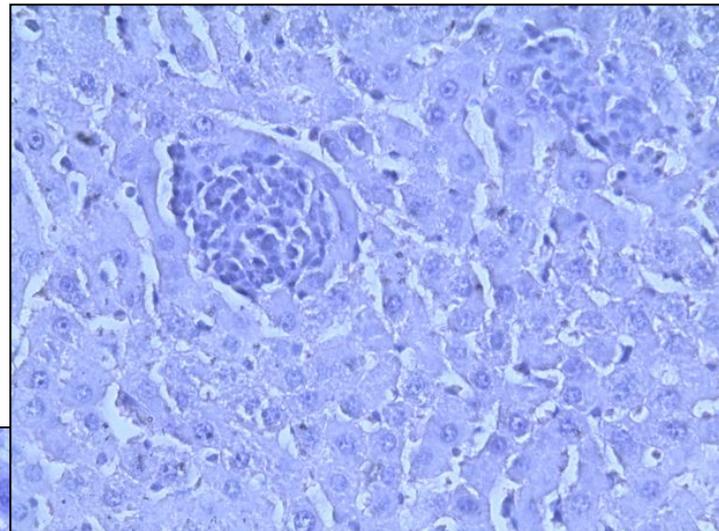
Анализ биораспределения наночастиц кремнезема был проведен с помощью сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии



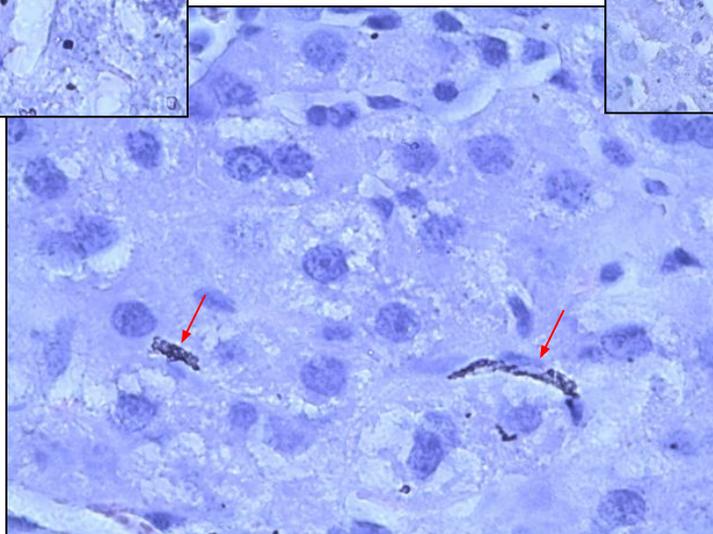
# Влияние наночастиц кремнезема на печень



3 ч после введения НЧК. Вне- и внутриклеточная локализация агрегатов НЧК (стрелки).



21 день после введения НЧК. Формирование единичных гранулем инородных тел.



21 день после введения НЧК.

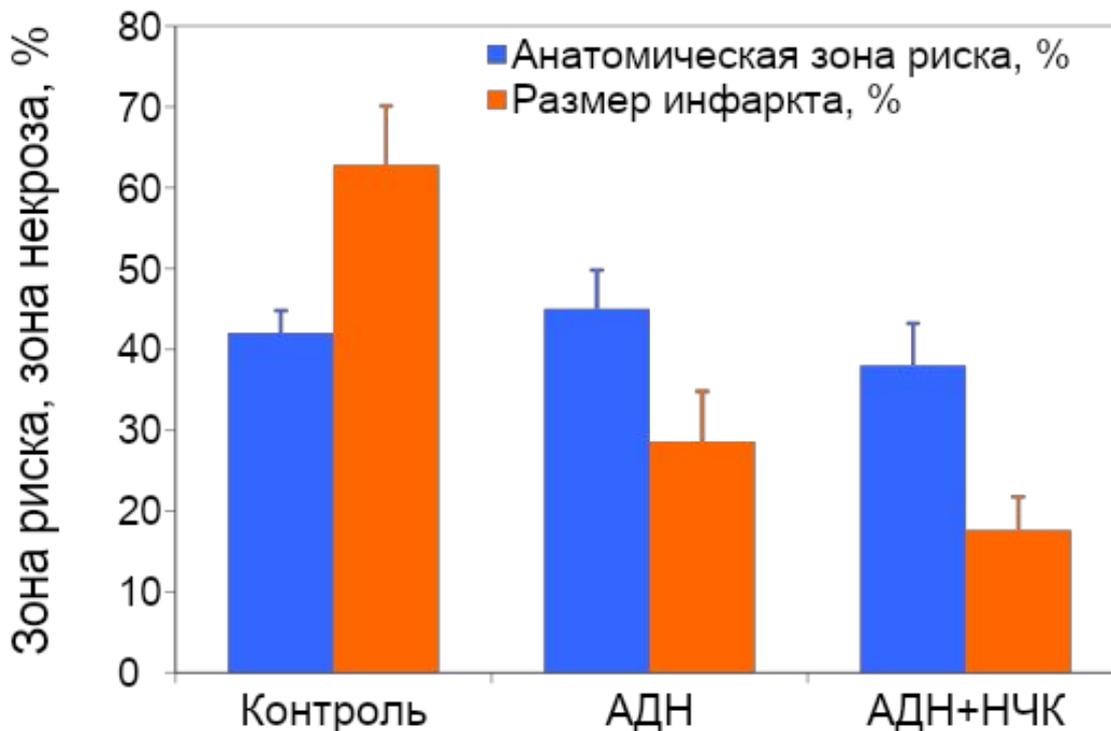
Формирование «слепков» из агрегатов НЧК, предположительно, в желчных ходах (стрелки).

# НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА В МИОКАРД С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНЕЗЕМА



# Эффект иммобилизации аденозина на поверхности наночастиц кремнезема

Было показано, что адсорбционная иммобилизация на поверхности наночастиц кремнезема сопровождается достоверным усилением инфаркт-лимитирующего эффекта аденозина.

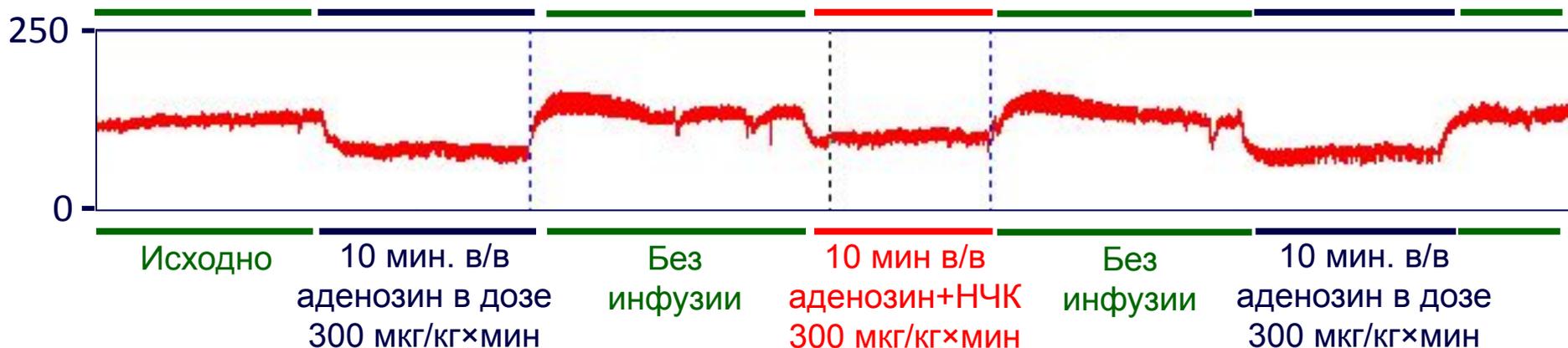


# Уменьшение гипотензивного эффекта аденозина при его иммобилизации на НЧК

АД, мм рт. ст.	Исходно	5 мин. инфузии	10 мин. инфузии	5 мин. после	10 мин. после
Аденозин	125±12	82±7	85±9	128±5	119±13
Аденозин+НЧК	131±8	108±14*	113±11*	134±12	130±10

\* -  $p < 0.05$  в сравнении со свободным аденозином

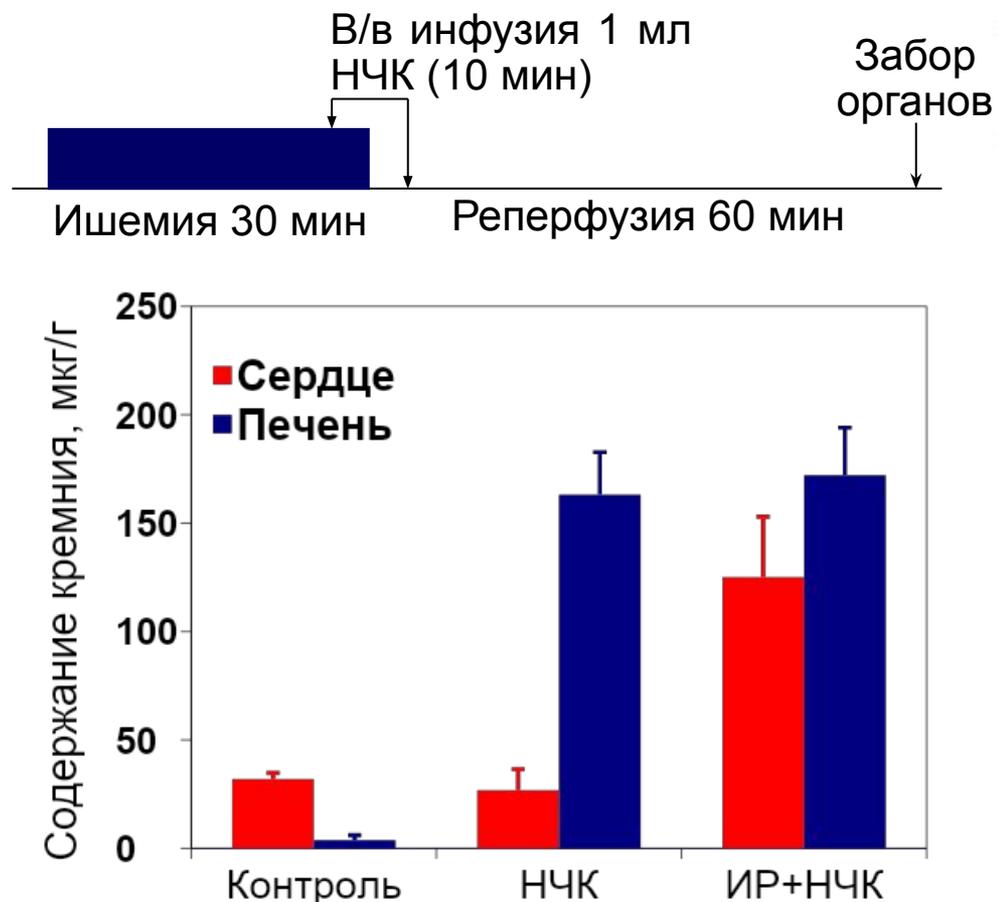
Репрезентативная запись АД, демонстрирующая различный уровень снижения АД под действием свободного и связанного аденозина:



# Направленная доставка препаратов в миокард с помощью наночастиц кремнезема

□ Для проверки гипотезы направленной доставки с помощью НЧК оценивалось биораспределение наночастиц у интактных животных и животных с ишемией-реперфузией миокарда.

□ Было показано, что содержание кремния в зоне повреждения миокарда существенно выше, чем в неповрежденном миокарде. Это позволяет говорить о том, что эффект пассивной направленной доставки с помощью наночастиц может быть реализован при ишемии-реперфузии миокарда.



# Препараты для доставки в обратимо поврежденный миокард

Для направленной доставки в миокард могут использоваться различные кардиопротективные и ангиогенные препараты: «миметики» прекондиционирования, активаторы тирозинкиназных рецепторов (факторы роста), влияние на сигнальный путь оксида азота.

Точка приложения	Примеры активаторов
G-белок-сопряженные рецепторы	Брадикинин, опиоиды, аденозин или синтетические агонисты соответствующих рецепторов
Тирозинкиназные рецепторы	Инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1, трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1, эритропоэтин, сосудистый эндотелиальный фактор роста, ...
Сигнальный путь оксида азота (NO/цГМФ/ПКГ)	Аторвастатин, предсердный натрийуретический пептид, ...
Стимуляция прочих внутриклеточных мишеней	Изофлюран, эстрогены, ...

# НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

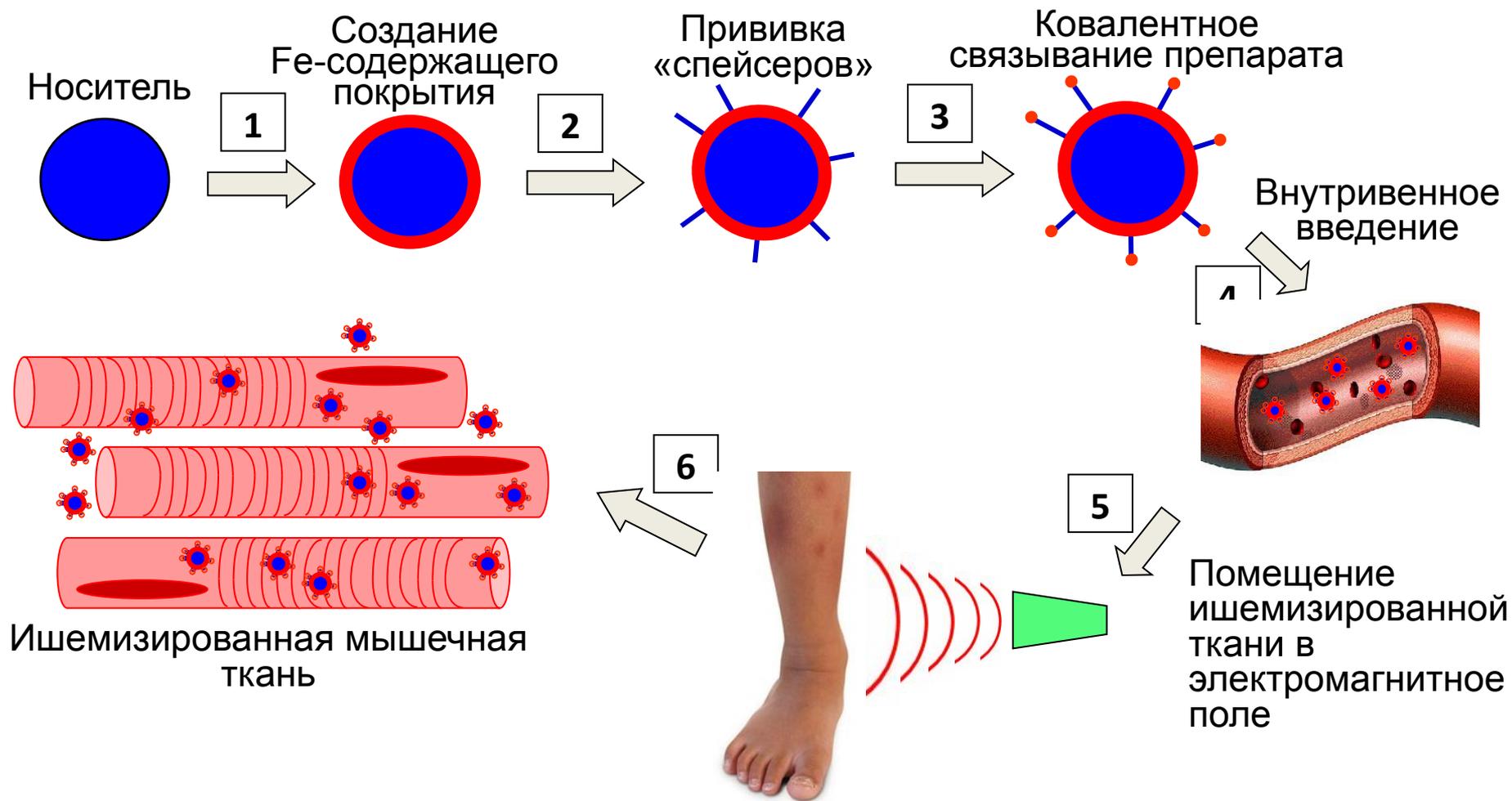


# Направленная доставка препаратов с помощью магнитных наночастиц

- Проблема адресной доставки лекарственных препаратов с противоишемическим и ангиогенным эффектами при хронической ишемии нижних конечностей может быть решена путем аккумуляции в ишемизированной мышце нанодисперсных железосодержащих матриц под действием внешнего магнитного поля.
- В результате применения такого подхода происходит:
  - ✓ накопление нагруженных препаратом наночастиц в зоне ишемии
  - ✓ высвобождение препарата в ходе биodeградации покрытия частицы

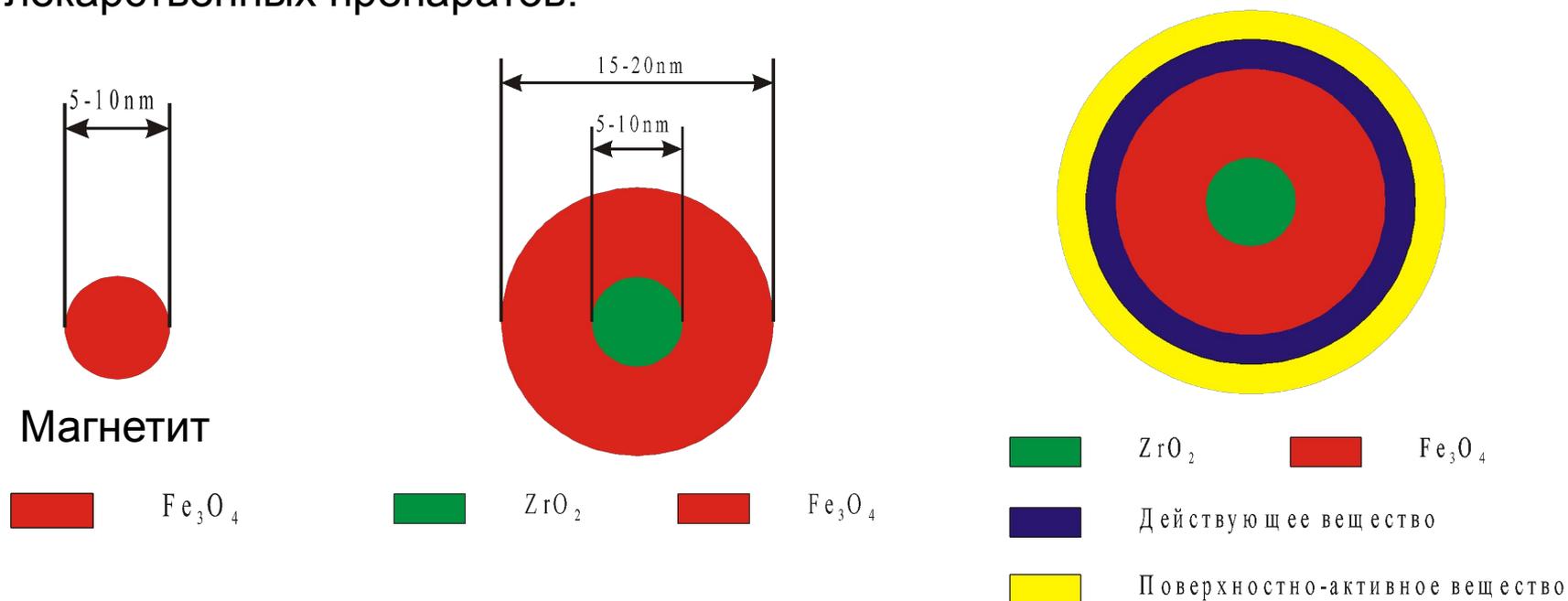


# Алгоритм направленной доставки препаратов с помощью магнитных наночастиц



# Примеры структур магнитных наночастиц

Наночастицы магнетита (оксида железа) – простейший пример из класса МНЧ. Возможно синтезировать биоксидные наночастицы, состоящие из ядра, представленного оксидом циркония, и оболочки из магнетита. Дальнейшая адсорбция лекарственного препарата на поверхности такой частицы, и добавление поверхностно-активного вещества позволяют обеспечить направленную доставку лекарственных препаратов.



# ДИЛЕММА НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ



# Дилемма направленной доставки препаратов

Одной из главных дилемм при разработке систем направленной доставки лекарственных препаратов внутрь клетки является выбор химической природы наночастиц: гидрофильной или гидрофобной.

