



ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤ' ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων
Τ.Ε.Ι. Αθήνας



Μάθημα 15^ο
Νανοσωματίδια για γονιδιακή μεταφορά

Διδάσκων

Δρ. Ιωάννης Δρίκος

Απόφοιτος Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων (ΠΙ)

Απόφοιτος Βιολογίας, ΑΠΘ

Διδάκτωρ Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

Ειδ. Παιδιατρικής

email: johndrikos@yahoo.com, idrikos@teiath.gr

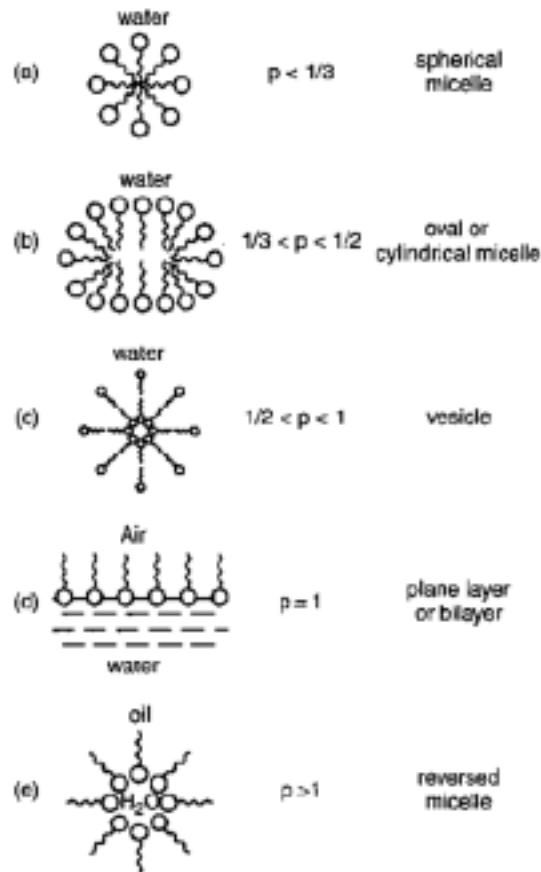


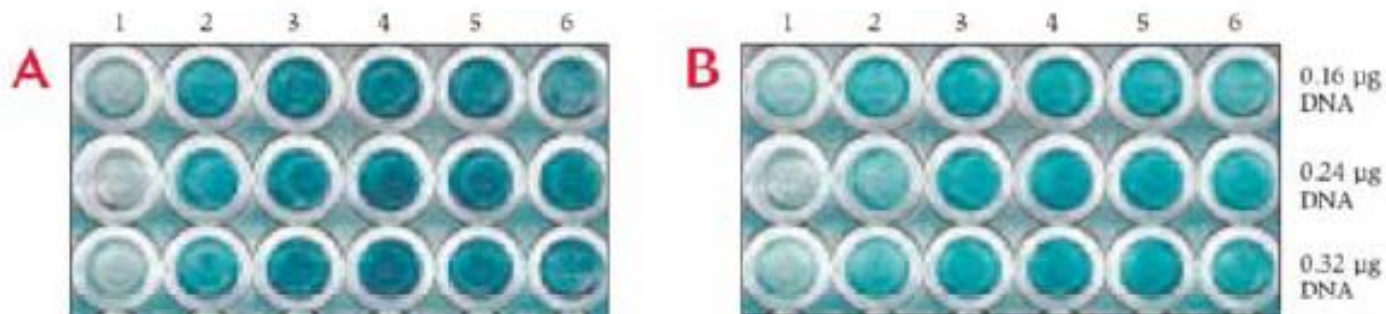
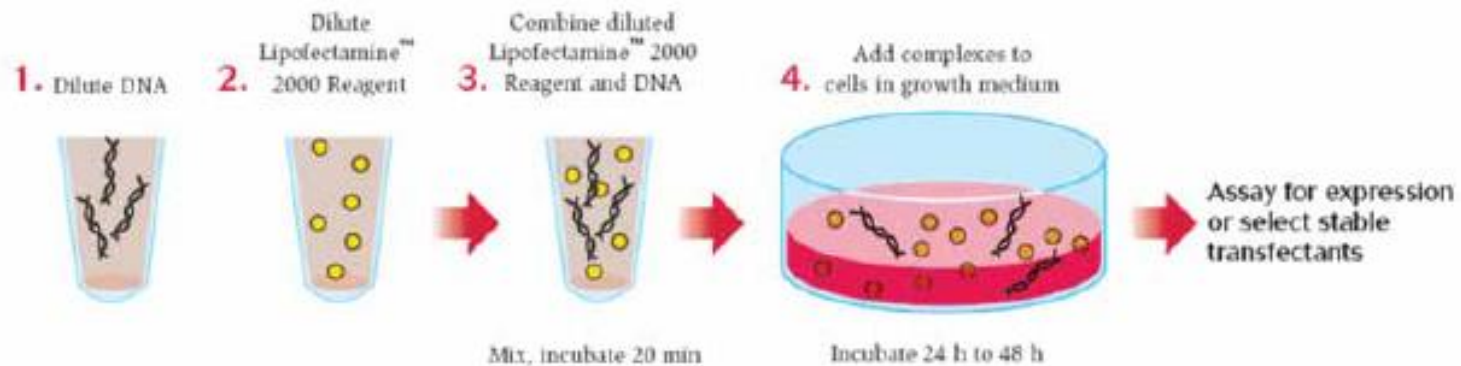
Τα νανοσωματίδια ως φορείς για επιλεγμένη-στοχευμένη θεραπεία

- η αναστολή της αντίδρασης του ανοσοποιητικού μας συστήματος,
- η αντοχή τους στον οργανισμό
- η προσκόλληση στα καρκινικά κύτταρα,
- η απελευθέρωση των δραστικών ουσιών τη σωστή στιγμή στο σωστό μέρος.

- Αυτό επιτυγχάνεται με κατασκευή από συγκεκριμένα υλικά όπως ο χρυσός που είναι βιολογικά αδρανή
- Με βάση υδρόφιλα – υδρόφοβα τμήματα
- Με την χρήση από μονοκλωνικά αντισώματα, πρωτεΐνες που προσκολώνονται σε υποδοχείς που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, ολιγοπεπτίδια , λιποσώματα

Liposomes

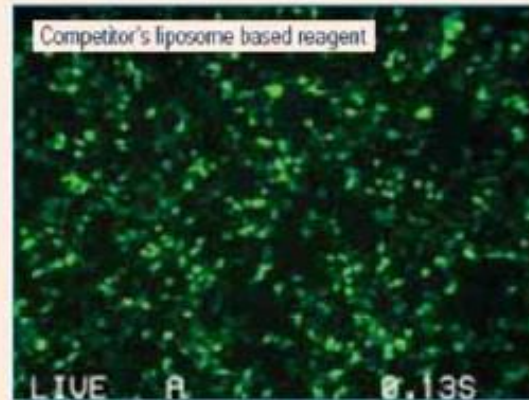
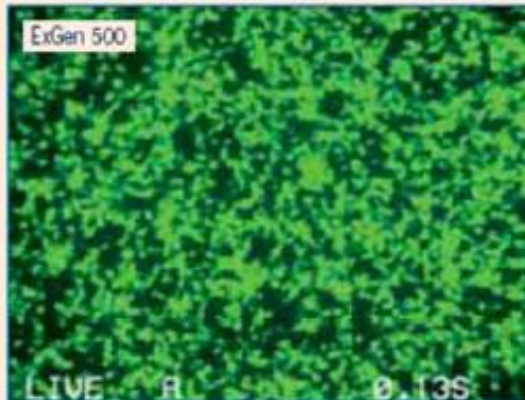




CHO-S cells were transfected with pCMV•SPORT-βgal DNA (0.16 µg to 0.32 µg) and Lipofectamine™ 2000 Reagent (0.2 µl to 1.2 µl, columns 1-6 respectively) in 96-well plates. After 24 hours, cells were stained with X-gal. **Panel A:** Cells (2×10^4) were plated the day before transfection in growth medium containing serum. **Panel B:** The day of transfection, cells were trypsinized, counted, and 5×10^4 cells were added directly to the wells containing the complexes.

Cell Line	Cell Type	Transfection efficiency (%)
293-F	Human kidney	99
293-H	Human kidney	99
CHO-S	Hamster ovary	96
COS-7L	Monkey kidney	99
BE(2)C	Human neuroblastoma	77
SKBR3	Human breast cancer	49
MDCK	Dog kidney	43
HT1080	Human fibrosarcoma	81
Human fibroblasts	Primary passaged	48
HeLa	Human cervical carcinoma	94
CV-1	Monkey kidney	70
Vero	Monkey kidney	86
PC12	Rat pheochromocytoma	85
Murine ES	Mouse embryonic stem	75
Rat Hepatocytes	Primary liver	50
E18 Cortical Neurons	Rat primary	25
E18 Hippocampal Neurons	Rat primary	30

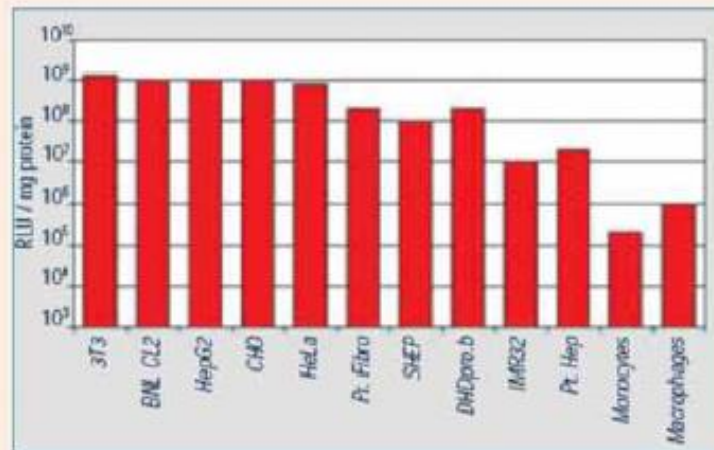
ExGen 500 performs when other transfection reagents fail

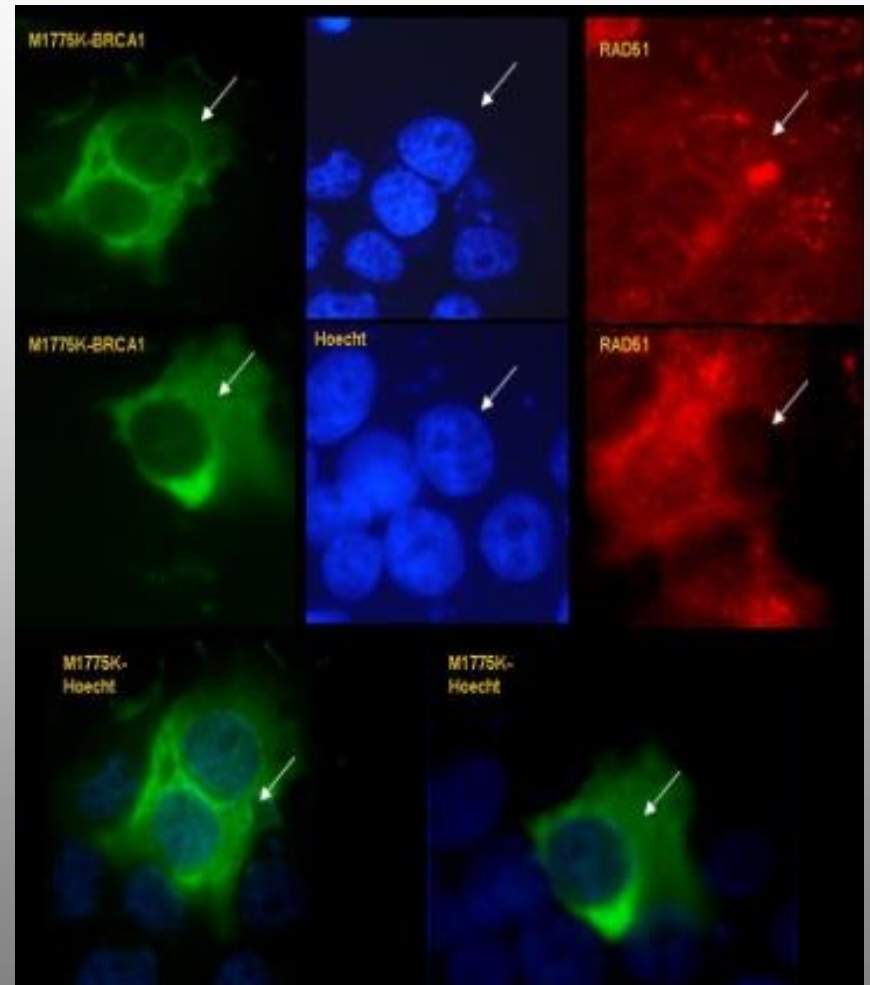
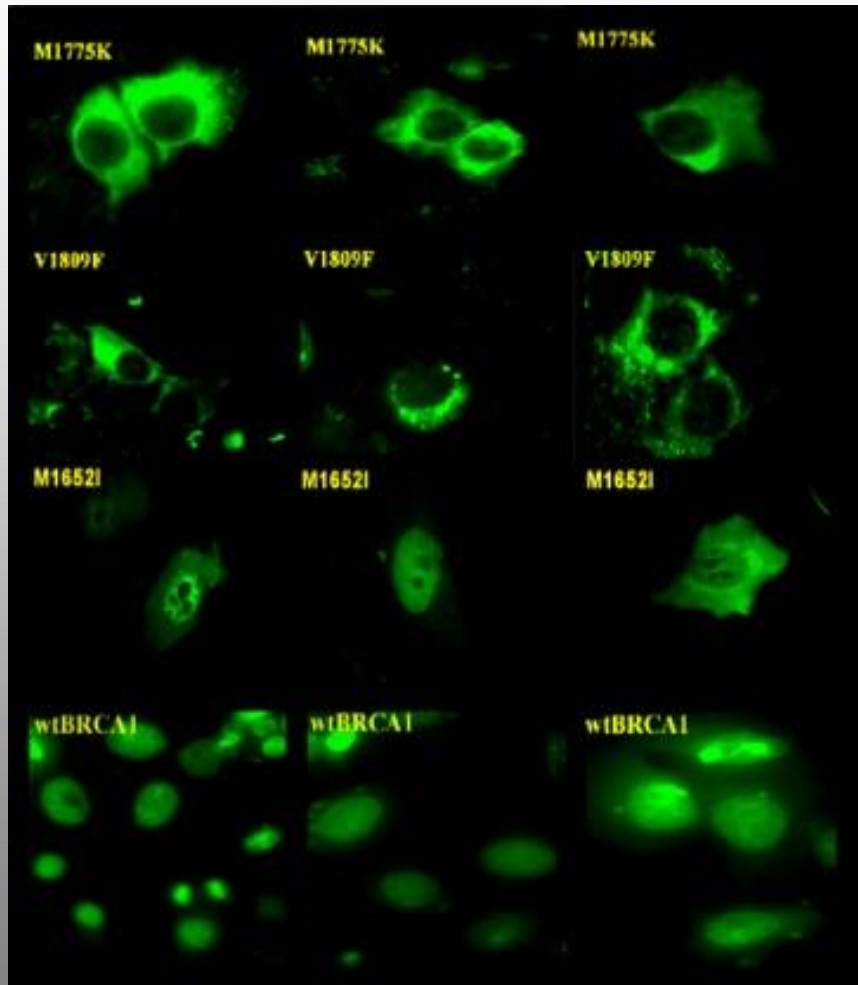


Expression of Green Fluorescent Protein (GFP) in 293 cells.

Cells were transfected with a vector containing the GFP coding sequence using ExGen 500 and competitor's liposome based reagent.

ExGen 500 transfects a wide variety of cell types





Τύποι μη ιϊκών νανοσωματιδίων για γονιδιακή μεταφορά

Έχουν αναπτυχθεί πολλοί τύποι συνθετικών φορέων που έχουν ως στόχο την μεταφορά του DNA μέχρι την ενσωμάτωση στον πυρήνα. Τέτοια είναι τα:

- ✓ Κατιονικά λιπίδια
- ✓ Κατιονικά πολυμερή
- ✓ Νανοσωματίδια χρυσού
- ✓ Μαγνητικά νανοσωματίδια
- ✓ Κβαντικά νανοσωματίδια
- ✓ Νανοσωματίδια πυριτίου
- ✓ Νανοσωματίδια φθορισμού

Type of DDS

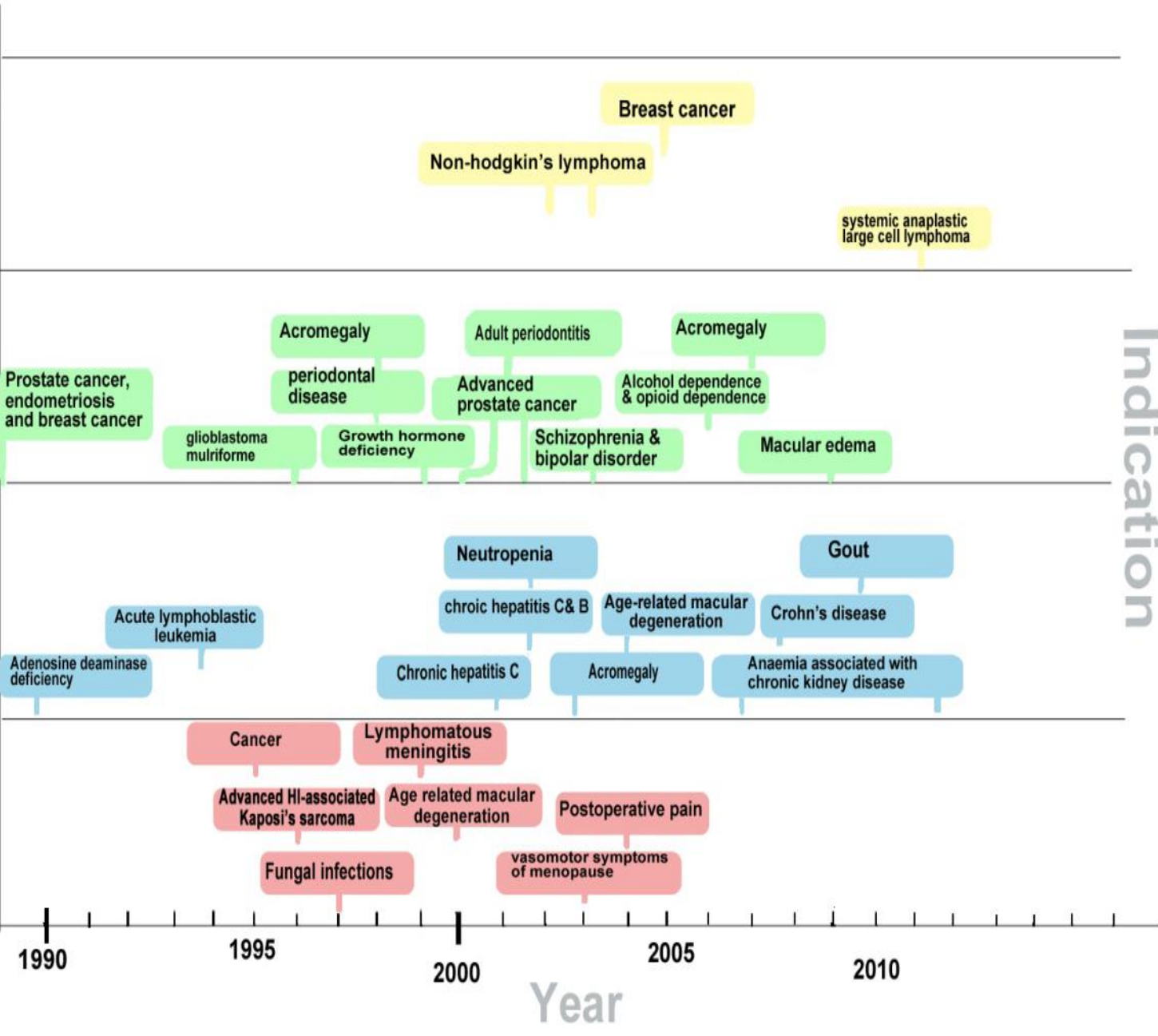
Indication

Protein-based DDS

Biodegradable materials

Polymer-drug conjugates

Liposomes & micelles



1990

1995

2000

2005

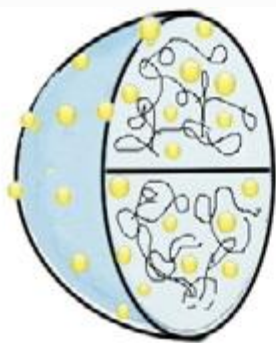
2010

Year

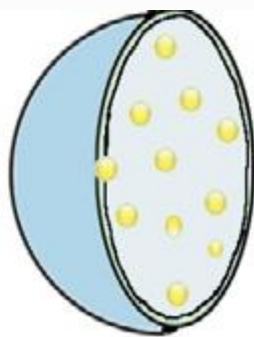
siRNA στην θεραπευτική πρακτική

- ✓ Τα siRNAs έχουν μεγάλες δυνατότητες και μπορεί να αποτελέσουν κορυφαίο θεραπευτικό εργαλείο σε πολλές ασθένειες.
- ✓ Ωστόσο, το σημαντικό εμπόδιο που παρεμποδίζει την ευρεία χρήση τους είναι η in vivo στόχευση σε επίπεδο ιστού των συγκεκριμένων μορίων RNAi (siRNAs).
- ✓ Τα μόρια δεν είναι εύκολα διαπερατά και είναι υπερβολικά ευμετάβλητα για να εισαχθούν στα κύτταρα.
- ✓ Είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν φορείς με τους οποίους αυτά τα μόρια μπορεί να προστατεύονται όσο και να διευκολύνεται η επίτευξη του στόχου τους.

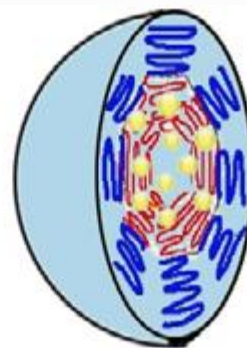
- ✓ Το πεδίο της χρήσης των siRNAs άρχισε να κερδίζει μεγάλο ενδιαφέρον, έπειτα απο την ανακάλυψη απο τους Fire και Mello, πριν από περίπου δύο δεκαετίες.
- ✓ Η τυπική κατανόηση της ρύθμισης των γονιδίων έχει προσδιορισθεί μετά από λειτουργικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο *C. elegans*, όπου είχαν εντοπιστεί δίκλινα μόρια RNA που προκαλούσαν σίγαση σε γονίδια.
- ✓ Τα siRNAs έχουν βρεθεί σε φυτά και έδειξαν να κατευθύνουν την εξαρτώμενη αποικοδόμηση των mRNA που συνδέονται μαζί τους.
- ✓ Η σταθερότητα τους στον ορό είναι εξαιρετικά μεταβλητή και τα siRNAs μπορεί να υποστούν αποικοδόμηση από αρκετά ένζυμα του ορού και των ιστών.
- ✓ Αποτέλεσμα είναι ο βραχύς χρόνος ημιζωής που κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως και μία ώρα.



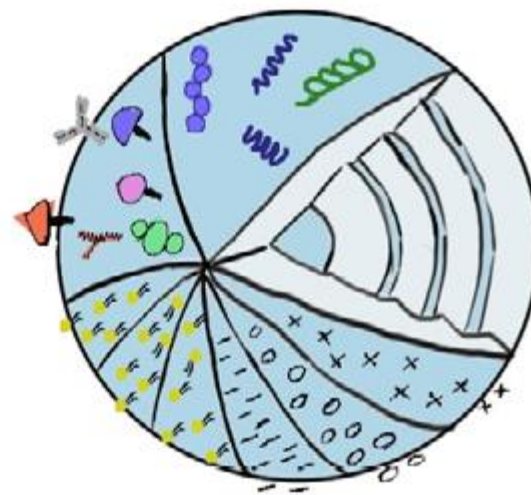
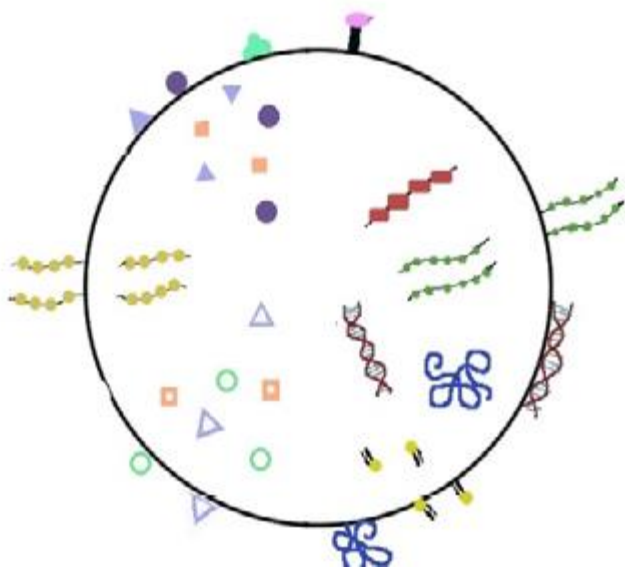
Nanosphere



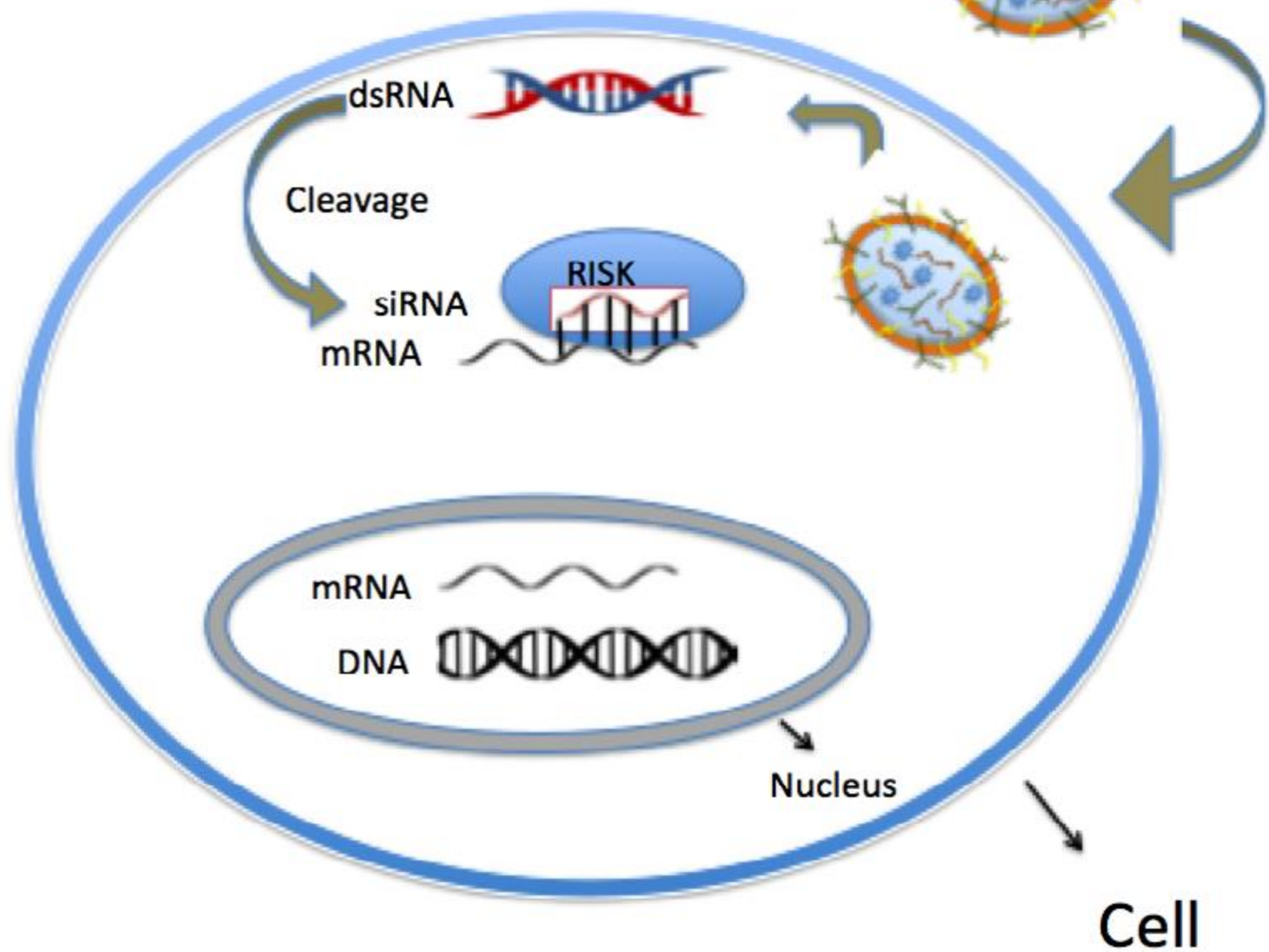
Nanocapsule



Nanomicelle

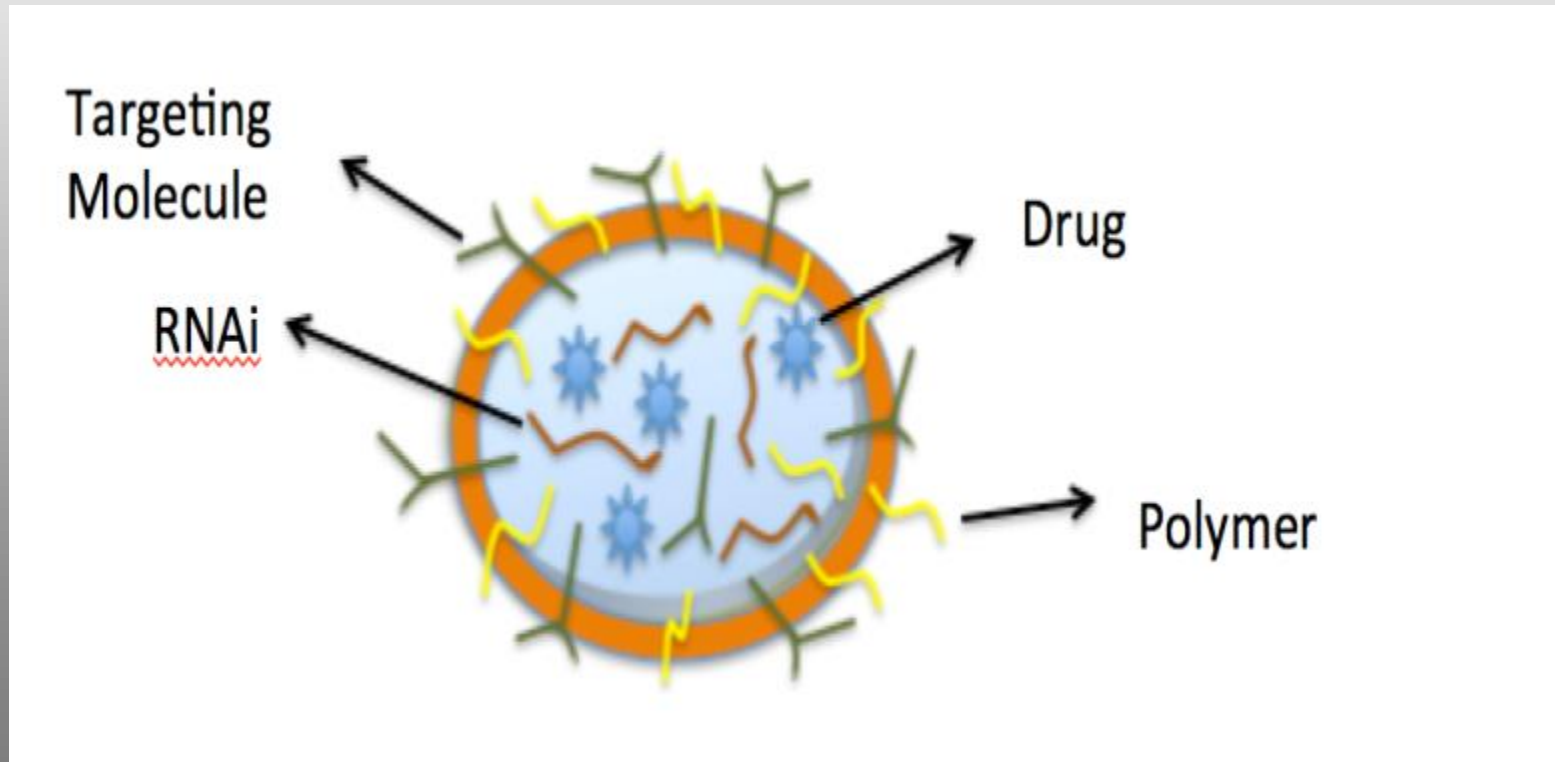


loaded with specific RNAi Molecules



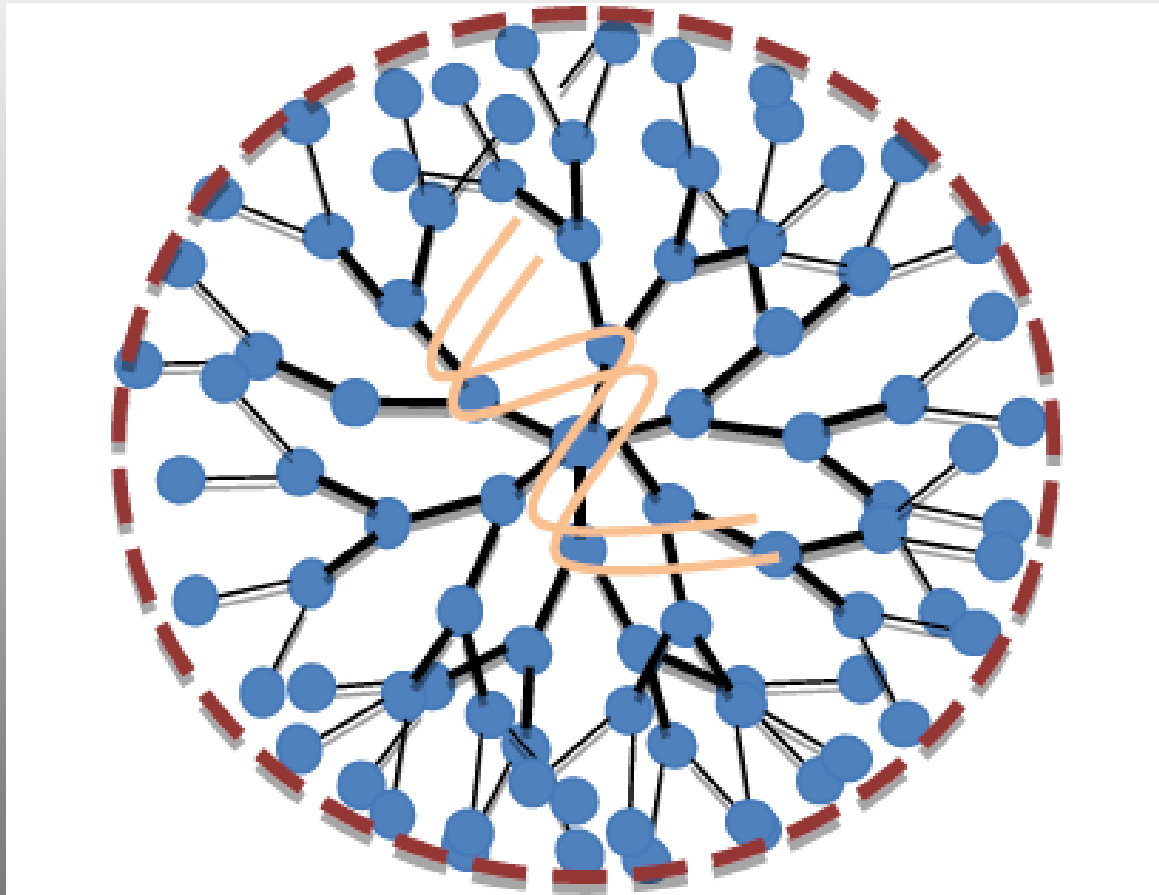
Νανοσωματίδια πολυμερών

Είναι πολυμερή νανοσωματίδια (PNPs) που μεταφέρουν γονίδια ή θεραπευτικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων τα οποία μπορούν είτε να είναι διαλυμένα ή ενθυλακωμένα μέσα τους σχηματίζοντας ένα νανοσωματίδιο και μια νανοκάψουλα αντίστοιχα.



Δενδριμερή νανοσωματίδια για την απόδοση γονιδίων

Τα δενδριμερή είναι σωματίδια τρισδιάστατα, σφαιρικά συνθετικά μακρομόρια με μέγεθος 1-10 nm. Τα δενδριμερή είναι ιδιαίτερα διακλαδισμένα και έχουν χαρακτηριστική διασπορά.



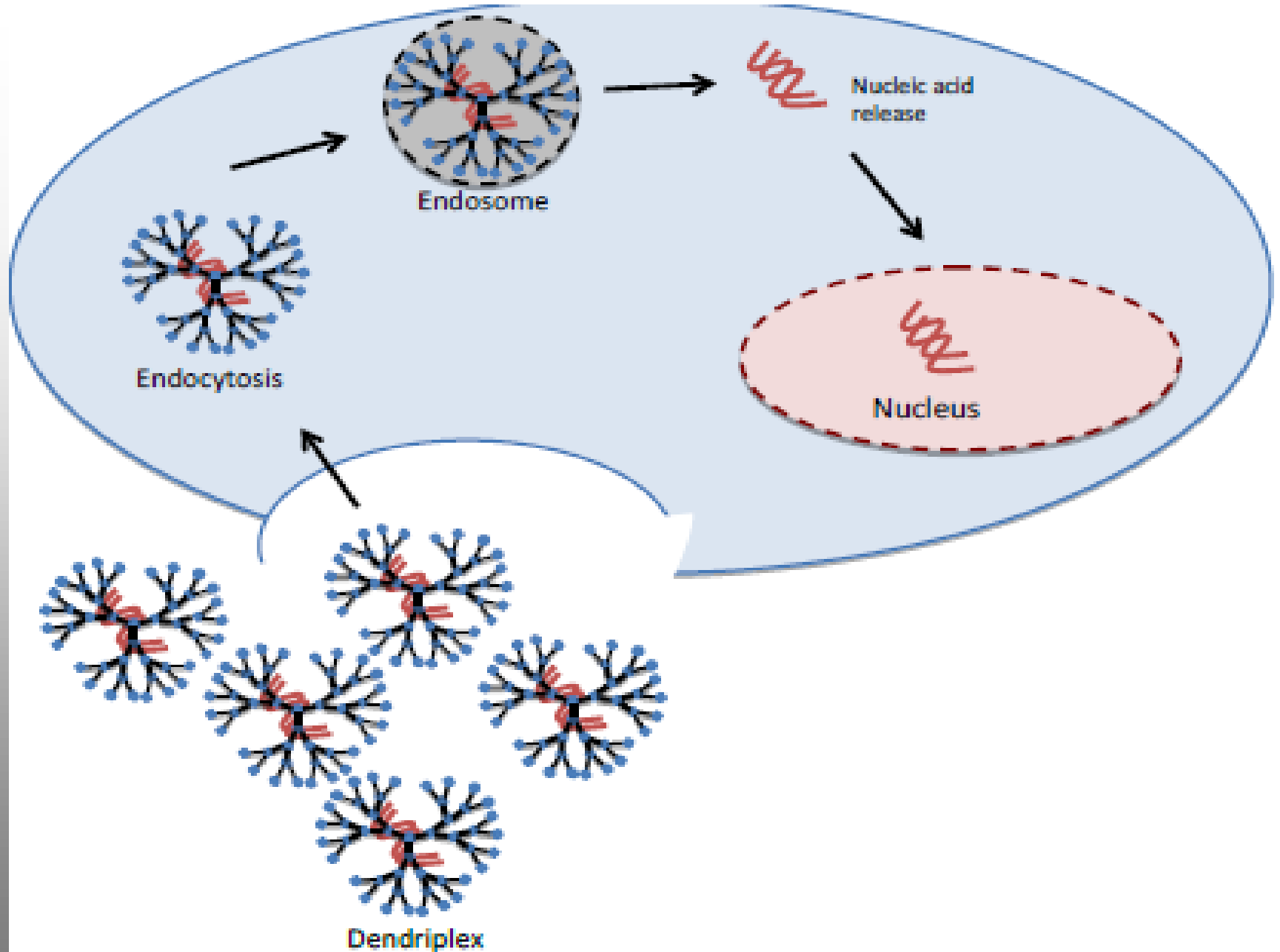


Figure 7: Dendrimers-mediated gene delivery.

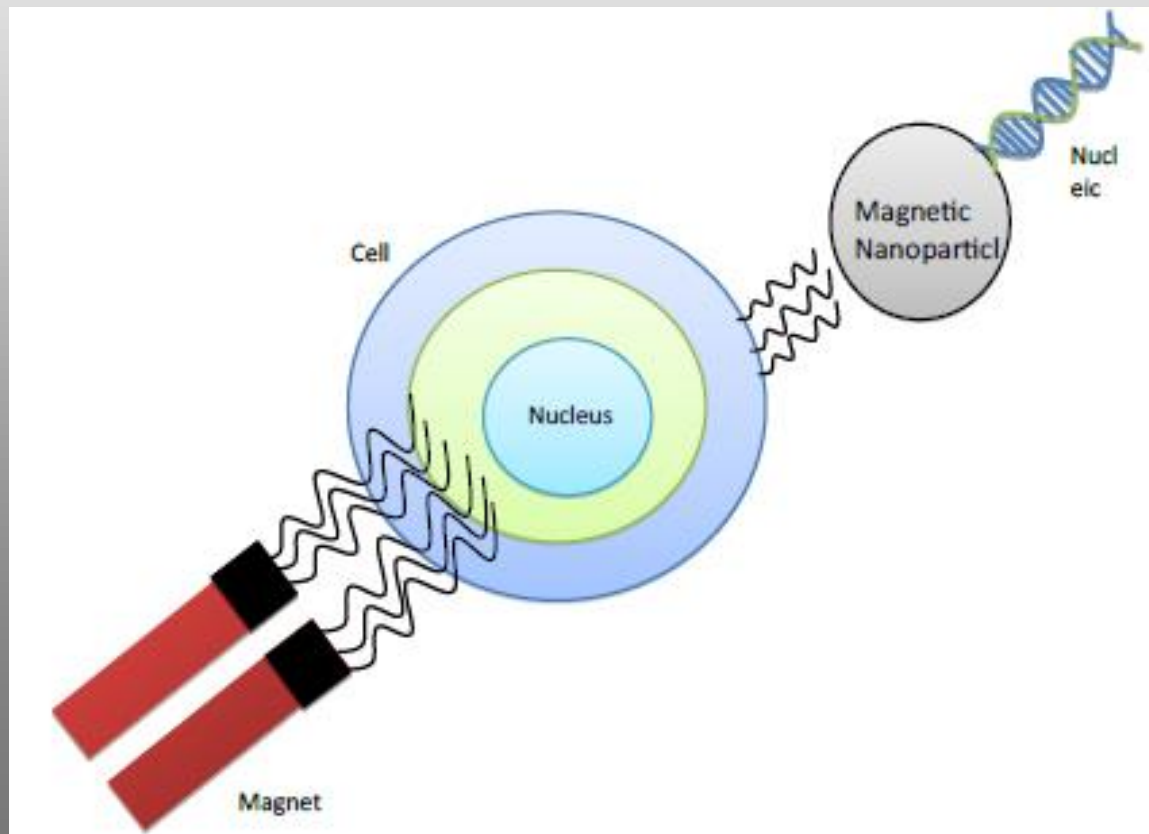
Πολυαμιδοαμίνες (PAMAM): Τα PAMAM είναι έξι γενεών δενδριμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς για την απόδοση γονιδίων. Η δομή των PAMAM έχει υψηλή πυκνότητα αμίνων στην περιφέρεια, η οποία επιτρέπει τη συμπύκνωση του νουκλεϊκού οξέος.

Πολυπροπυλενιμίνες (PPI): Τα δενδριμερή πολυπροπυλενιμίνης (PPI) είναι ιδανικά για δέσμευση DNA και παροχή γονιδίων, καθώς η επιφάνεια τους αποτελείται από άζωτο.

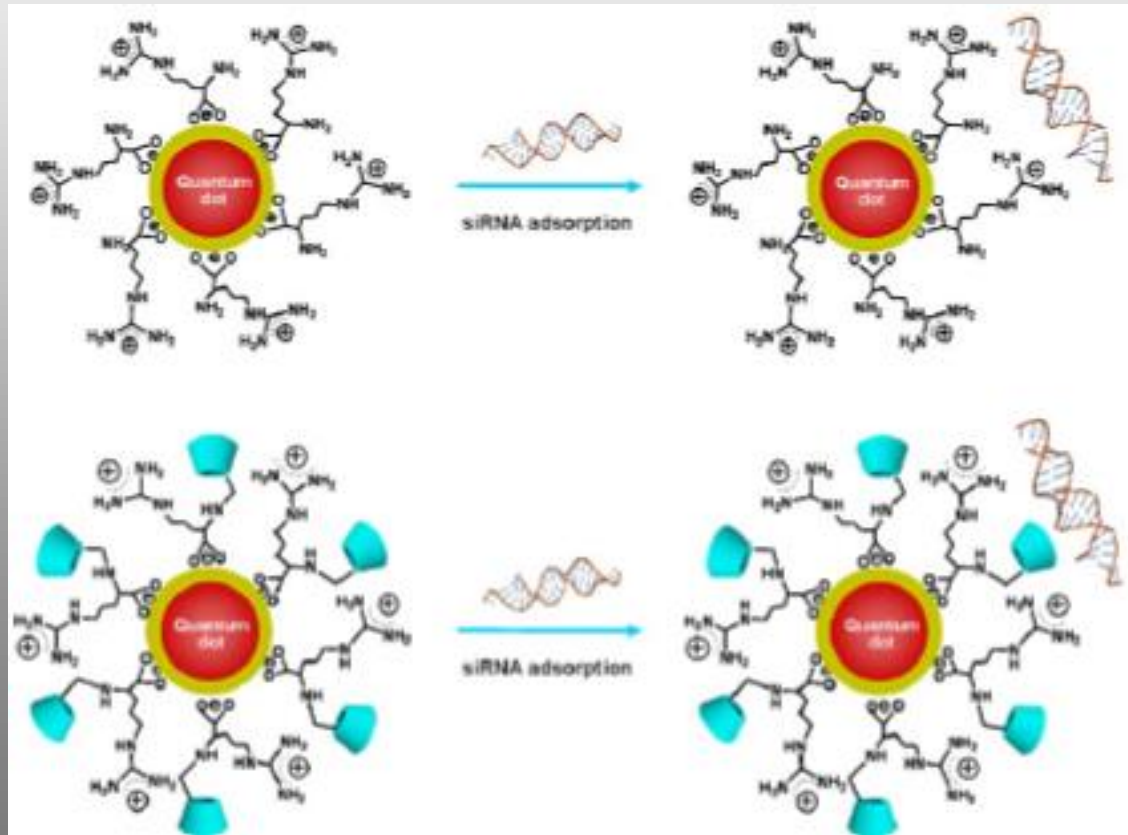
Πολυαιθυλενιμίνες (PEI): Τα δενδριμερή αυτά είναι υδατοδιαλυτά πολυμερή που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA, επειδή είναι θετικά φορτισμένα και οδηγούν σε προστασία του DNA από την αποικοδόμηση. Αυτό τα καθιστά εξαιρετικό εργαλείο για την απόδοση των siRNA και του DNA.

Μαγνητικά νανοσωματίδια: Είναι παραμαγνητικά νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων. Η συσσώρευσή τους καθοδηγείται στους ιστούς-στόχους χρησιμοποιώντας ισχυρά μαγνητικά πεδία και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην θεραπεία του καρκίνου.

Νανοσωματίδια χρυσού: Είναι κατάλληλα οχήματα παροχής γονιδίων. Οι οπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητες τους επιτρέπουν την εύκολη διαμόλυνση τόσο στα κύτταρα και η μοναδική βιοσυμβατότητα τους τα καθιστά μη τοξικά.



Κβαντικές κουκίδες για μεταφορά γενετικού υλικού: Οι Κβαντικές κουκίδες (QDs) είναι κρυσταλλικά νανοσωματίδια με ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες. Τα QDs έχουν εξαιρετική φωταύγεια και είναι κολλοειδείς ημιαγωγιμοί νανοκρύσταλλοι. Τα QD έχουν μοναδικές ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος τους, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά για εφαρμογές όπως η κατάλυση και η βιολογική επισήμανση.



Συμπεράσματα

- ✓ Η γονιδιακή θεραπεία είναι μία από τις πιο συναρπαστικές και επαναστατικές νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.
- ✓ Έχει αποδειχθεί ότι τα θεραπευτικά νανοϋλικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ελπιδοφόρα θεραπευτικά εργαλεία.
- ✓ Κυρίως λόγω της παροχής siRNA και mRNA στα κύτταρα-στόχους.
- ✓ Για την καλύτερη απόδοση των νανοϋλικών πρέπει να σχεδιάζονται, να χαρακτηρίζονται και να προσδιορίζονται σωστά οι οδοί χορήγησης των θεραπειών.