



Кальций-фосфатные наночастицы как носители для биологических и синтетических молекул

Ольга Ротань и Проф. Др. Маттиас Эппле

Институт неорганической химии и Центр Наноинтеграции
Дуйсбург-Эссен (CeNIDE), Университет Дуйсбург-Эссен

Екатеринбург 12.11.2013

Содержание

- Германо-российский сетевой проект NanoBRIDGE
- Введение и мотивация
- Использование кальций-фосфатных наночастиц как носителей для биологических и синтетических молекул через клеточную мембрану
- Выводы



NanoBRIDGE Германия

NanoBRIDGE
Germany - Russia

Компетенция 6 Федеральных земель и нанотехнологических кластеров в Германии:

- Гессен (Hessen)
- Бавария (Bayern)
- Северная Рейн-Вестфалия (Nordrhein-Westfalen)
- Саксония-Анхальт (Sachsen-Anhalt)
- Саар (Saarland)
- Мекленбург-передняя Померания (Mecklenburg-Vorpomerania)



AN INITIATIVE OF THE
Federal Ministry
of Education
and Research

Research in
Germany



Land of Ideas



Цели

Интенсификация и расширение партнерской сети в России

Содействие обмену молодыми учеными, исследователями и предпринимателями

Концепции для тренингов в области нанотехнологий и создание команд по развитию проектов

NanoBRIDGE Germany - Russia будет создан в качестве бренда для устойчивого германо-российского сотрудничества



AN INITIATIVE OF THE

Federal Ministry
of Education
and Research

Research in
Germany



Land of Ideas



Целевые группы

- **Университеты и исследовательские институты**
(научные проекты, партнерства, приглашенные профессора, исследовательские поездки, тренинги)
- **Аспиранты и молодые ученые**
(ознакомительные поездки в немецкие учреждения и институты, стажировки в малых и средних предприятиях (МСП), двусторонние летние школы)
- **Инновационные МСП в Германии и России**
(совместные проекты, совместных предприятия и бизнес-устройство)



AN INITIATIVE OF THE

Federal Ministry
of Education
and Research

Research in
Germany



Land of Ideas



Направления деятельности

NanoBRIDGE
Germany - Russia

- Создание совместных консорциумов для инициирования двусторонних и многосторонних проектов между исследовательскими группами и для поддержки МСП.
- Содействие мобильности и интеграции молодых ученых и аспирантов обеих стран.
- Анализ спроса на германо-российские образовательные структуры в области нанотехнологий, их биомедицинское применение и аналитические методы.
- Интеграция дальнейших партнеров в сеть, и создание информационного и коммуникационного портала.



AN INITIATIVE OF THE

Federal Ministry
of Education
and Research

Research in
Germany



Land of Ideas

Приглашение к партнерству

Мы будем рады видеть Вас в качестве члена NanoBRIDGE.

Пожалуйста, присоединяйтесь к нам по адресу:

www.nanobridge.owwz.de



Дополнительная информация :

Координатор проекта:
East-West-Science Centre (OWWZ)
UniKasselTransfer
University of Kassel
Dr. Gabriele Gorzka
Phone: + 49 561 804 3609
gorzka@uni-kassel.de

UniKassel**Transfer**

Ost-West-Wissenschaftszentrum



AN INITIATIVE OF THE

Federal Ministry
of Education
and Research

Research in
Germany

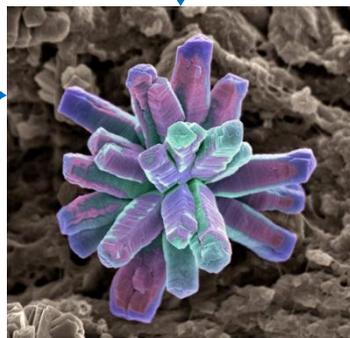
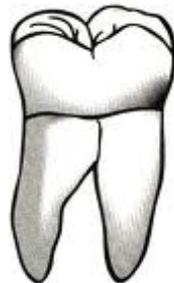


Land of Ideas

Главные научные интересы

- Разработка и применение биоматериалов (микро-структурированных полимеров, керамики из фосфата кальция) в тесном сотрудничестве с медиками.
- Биомиметическая кристаллизации неорганических материалов. Исследование биогенных минералов в биологии и медицине ("биоминерализация" и патологическая кристаллизация).
- Синтез и функционализация неорганических наночастиц, в том числе для переноса генов (трансфекции) и „замалчивания генов“ (gen silencing).
- Реакционная способность твердых тел, механистические исследования динамическими *in situ* методами, термохимическая и термодинамическая характеристика, синтез твердых тел с определенными морфологическими свойствами.

Биодеградируемые наночастицы из фосфата кальция



Нетоксичность

Биодеградируемость

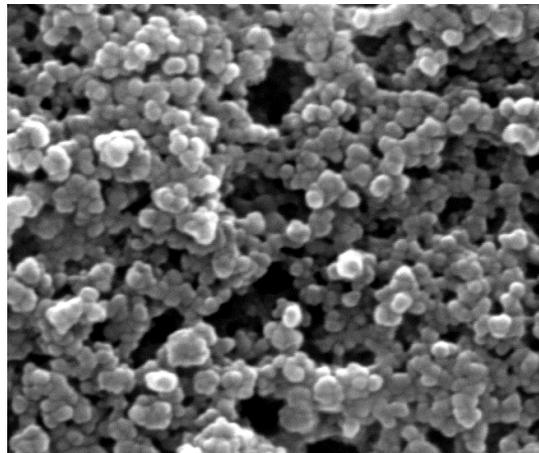
Высокая аффинность к НК

Высокая биосовместимость

Области применения наночастиц из фосфата кальция

Трансфекция

«Замалчивание генов»
Gen silencing



Кальций-фосфатные
наночастицы

Иммунизация

Транспорт веществ в клетку
(Наномедицина)

Схема приготовления функционализированных кальций-фосфатных наночастиц

Растворы и условия:

6,25 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

3,74 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

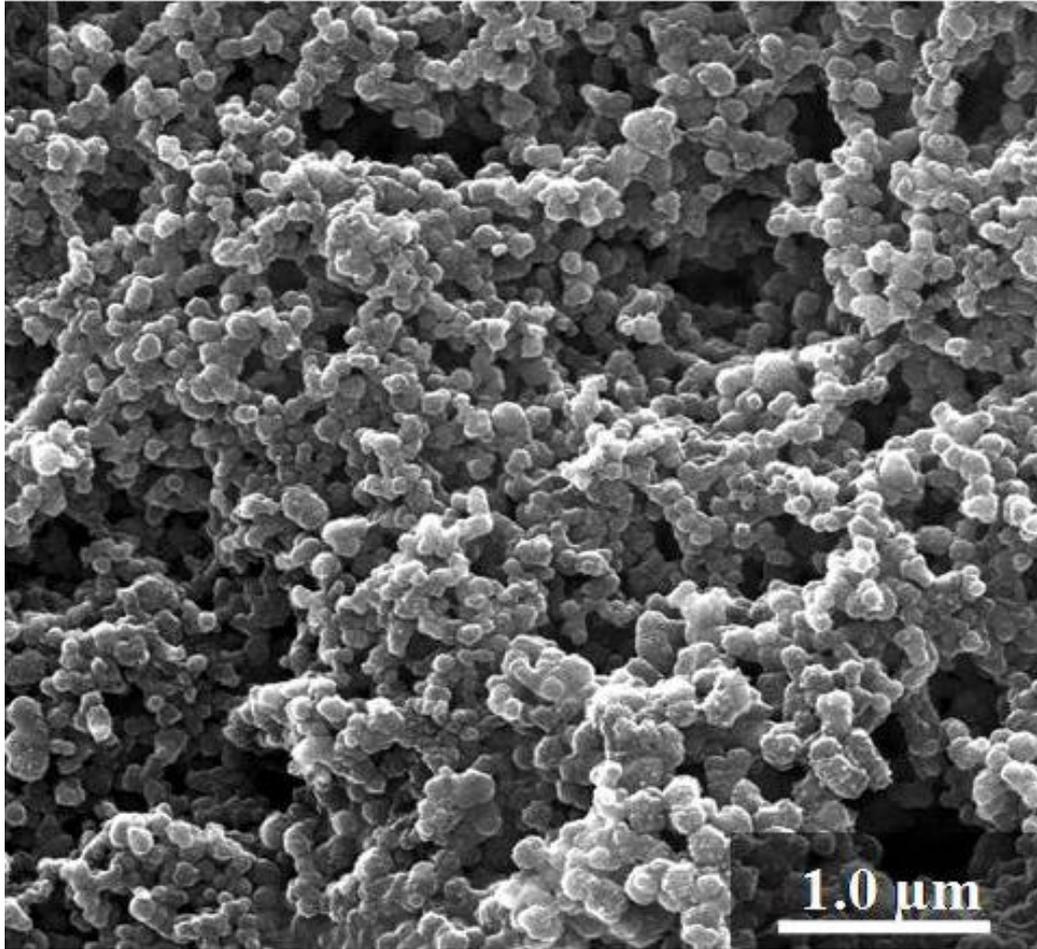
pH=9; комнатная температура

1 мг/мл ДНК-плазида

2 мг/мл ПЭИ (полиэтиленимин)

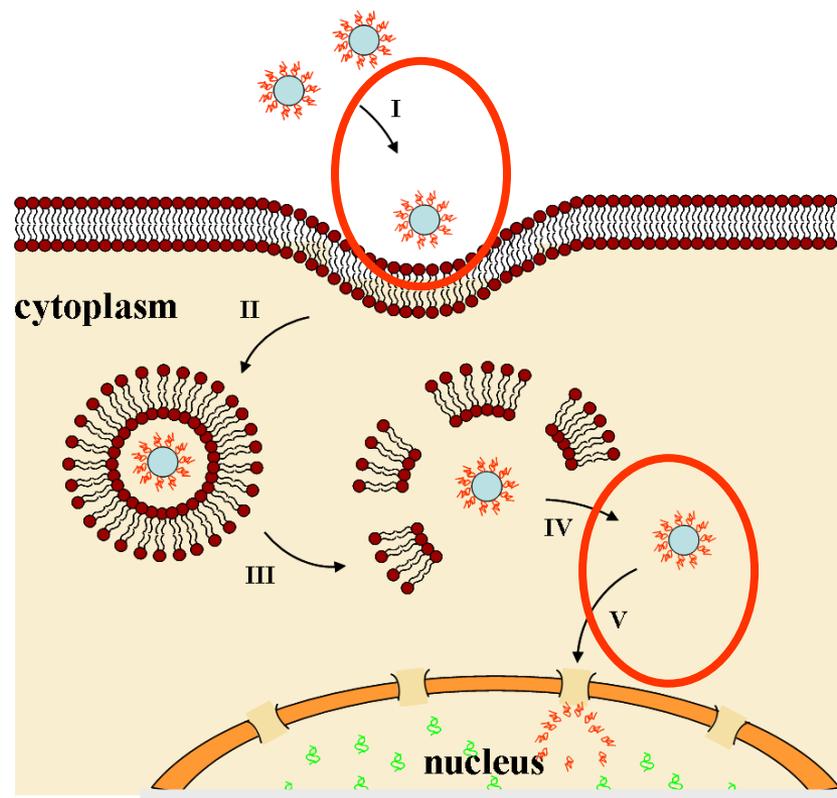
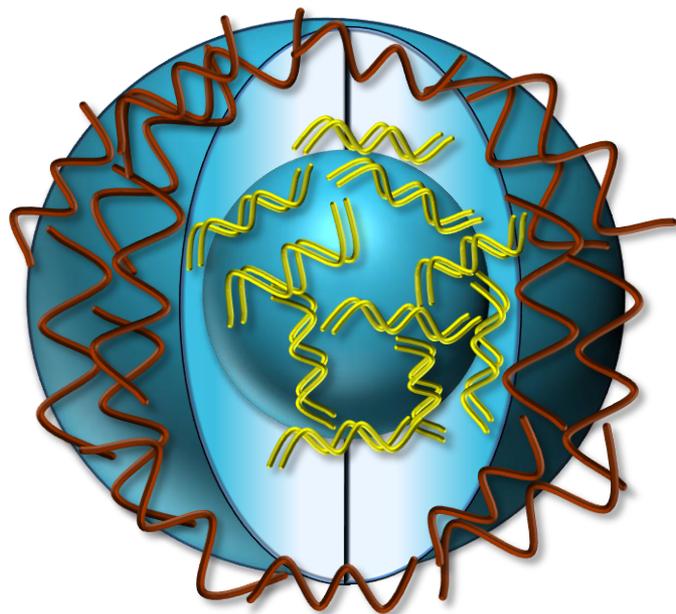


Сканирующая электронная микроскопия кальций фосфатных наночастиц, функционализированных ДНК и ПЭИ



Размер (динамическое рассеивание света): **150 nm**
 ζ -потенциал: **+37 mV**

Схематический рисунок структуры трехслойных наночастиц



V. Sokolova, S. Neumann, A. Kovtun, S. Chernousova, R. Heumann, M. Epple, "An outer shell of positively charged poly(ethylenimine) strongly increases the transfection efficiency of calcium phosphate-DNA nanoparticles", J. Mater. Sci. 45 (2010) 4952-4957

Световая и флуоресцентная микроскопия HeLa, T24 и NIH3T3 клеток после трансфекции

Polyfect®

CaP/DNA/CaP/PEI

HeLa

T24

NIH3T3

30 ± 2 %

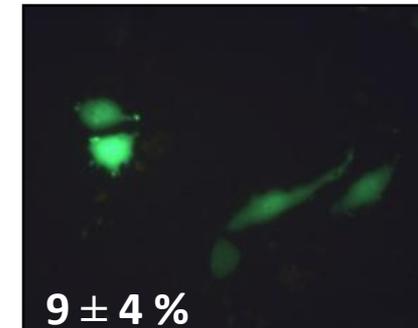
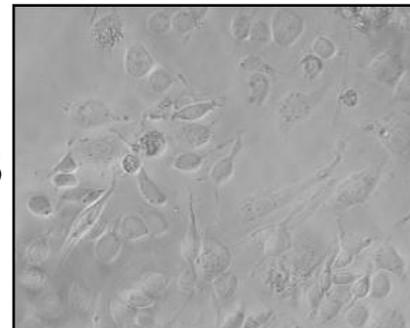
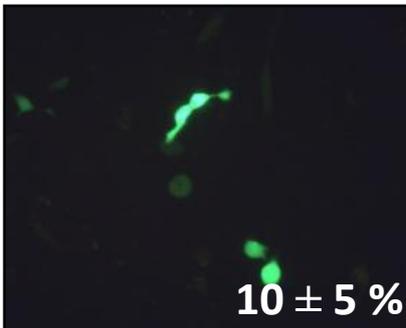
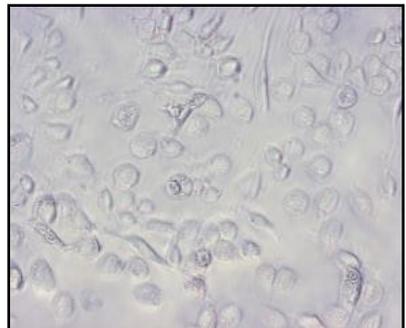
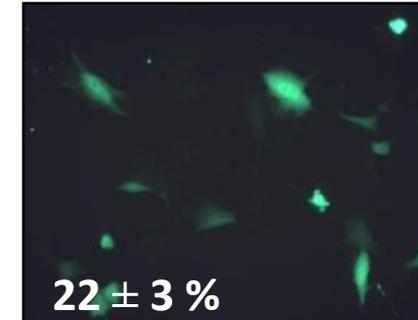
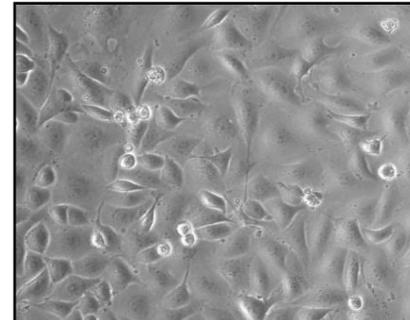
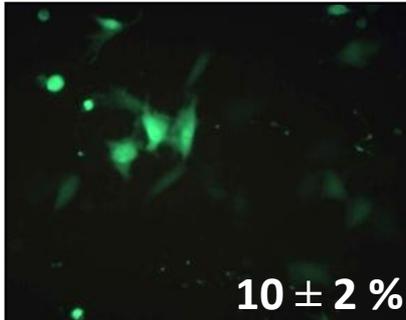
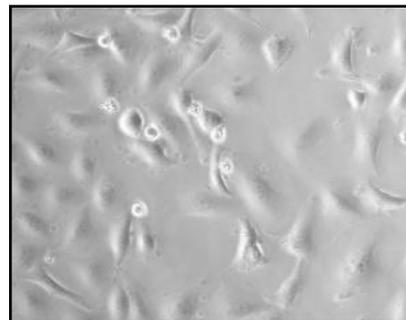
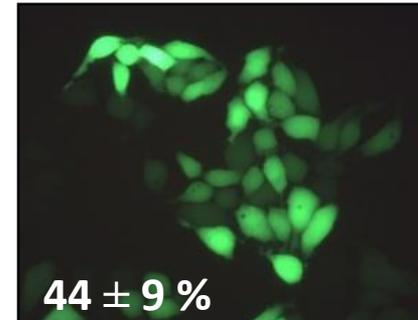
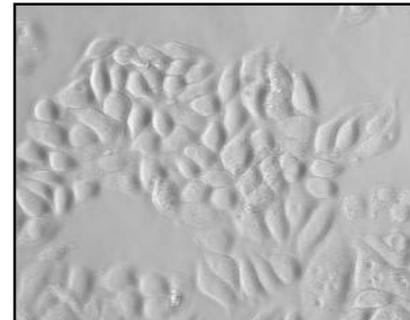
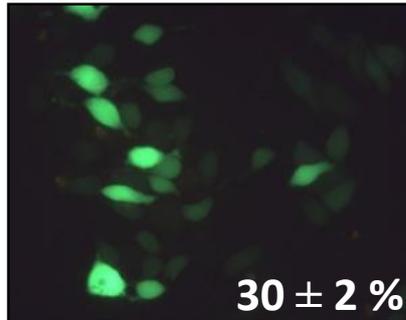
10 ± 2 %

10 ± 5 %

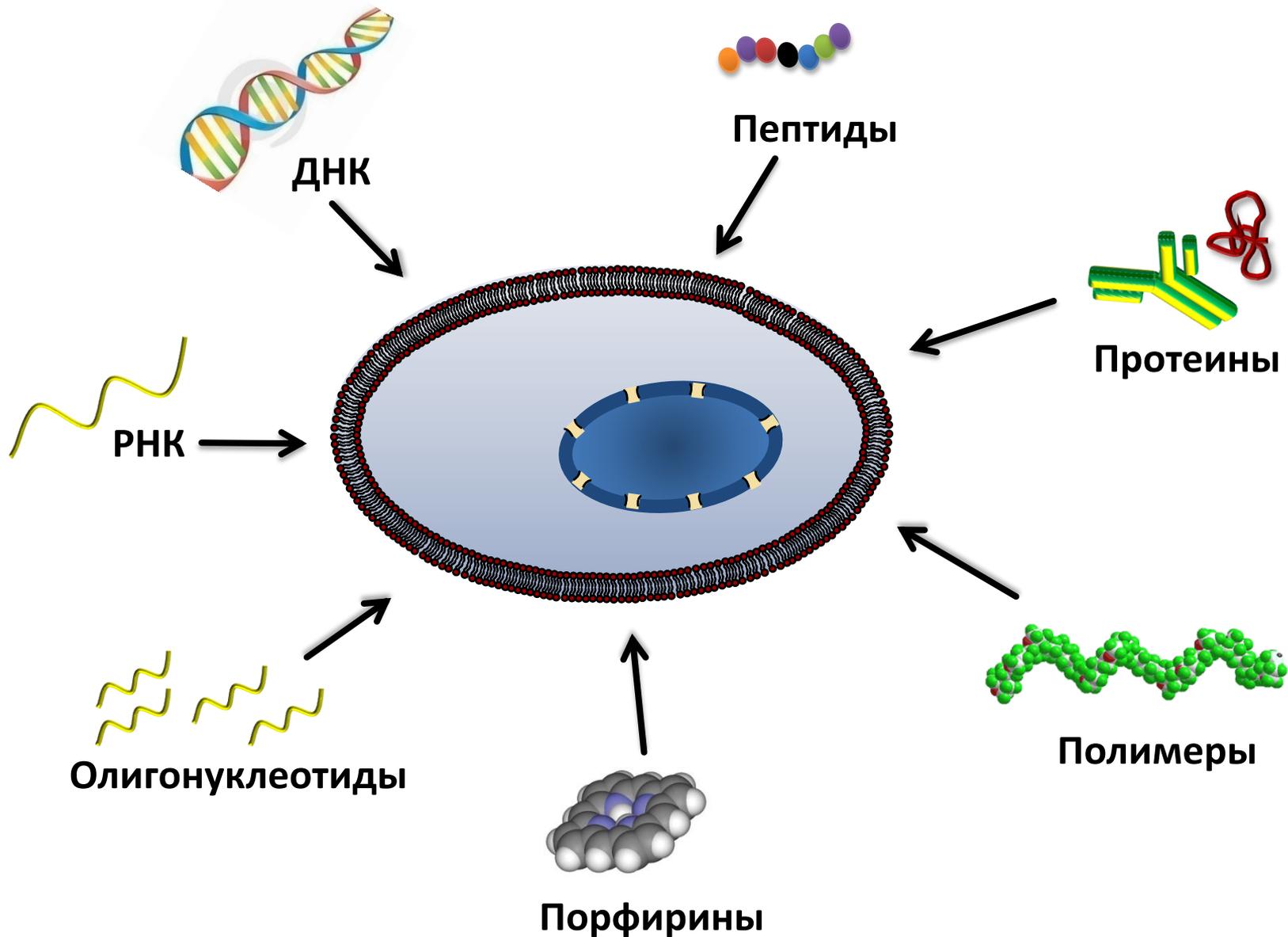
44 ± 9 %

22 ± 3 %

9 ± 4 %



Транспорт различных молекул через мембрану клетки



Использованные молекулы



Олигонуклеотиды

CpG (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3')



Протеины

BSA (бычий сывороточный альбумин)



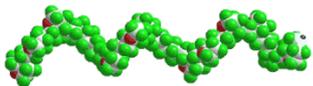
Антитела

DEC205 (антитела, специфичные к дендритным клеткам)



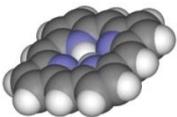
Пептиды

Модельный пептид (MPGCHANCL)



Полимеры

PEI (Полиэтиленимин)



Порфирины

pTHPP (5,10,15,20-тетракис (4-гидроксифенил)-21H,23H-порфин)

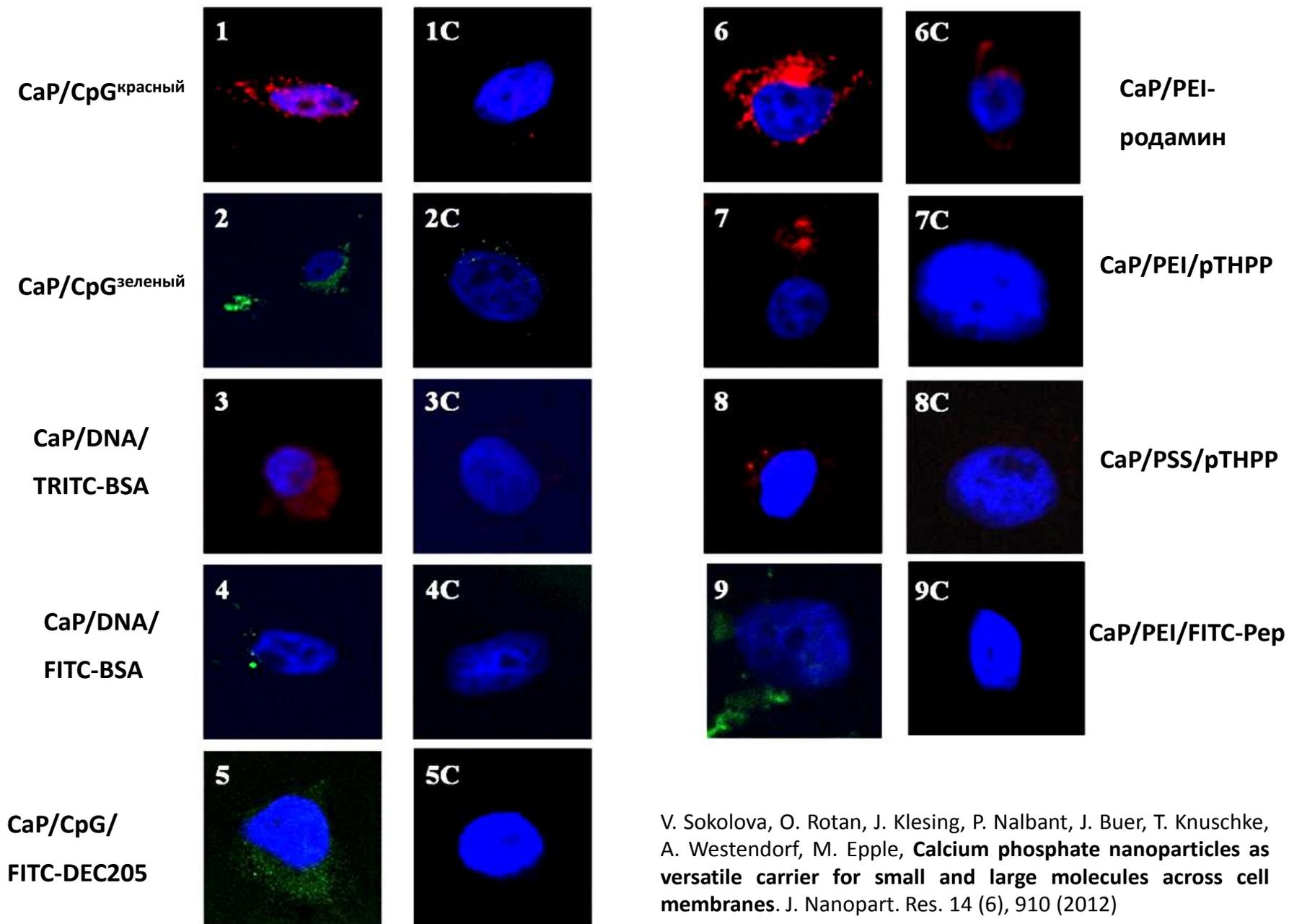
Характеристика наночастиц фосфата кальция, функционализированных различными молекулами

Проба	Размер / nm (DLS)	PDI	Размер / nm (NTA)	ζ -потенциал / mV	Концентрация флуоресцирующих молекул / $\mu\text{g mL}^{-1}$
1 CaP/CpG ^{красный}	240	0.295	139	-24 (4)	58
2 CaP/CpG ^{зеленый}	289	0.338	147	-22 (7)	58
3 CaP/DNA/TRITC-BSA	227	0.482	209	-21 (6)	95
4 CaP/DNA/FITC-BSA	256	0.370	189	-20 (6)	63
5 CaP/CpG/FITC- DEC205	243	0.650	226	-19 (5)	40
6 CaP/PEI-родамин	138	0.165	185	+34 (6)	1000
7 CaP/PEI/pTHPP	117	0.236	173	+15 (4)	5
8 CaP/PSS/pTHPP	122	0.198	203	-18 (5)	7
9 CaP/PEI/FITC-Perp	109	0.169	230	+12 (6)	49

PDI – индекс полидисперсности; **DLS** – Динамическое рассеивание света; **NTA** - *Nanoparticle Tracking Analysis*

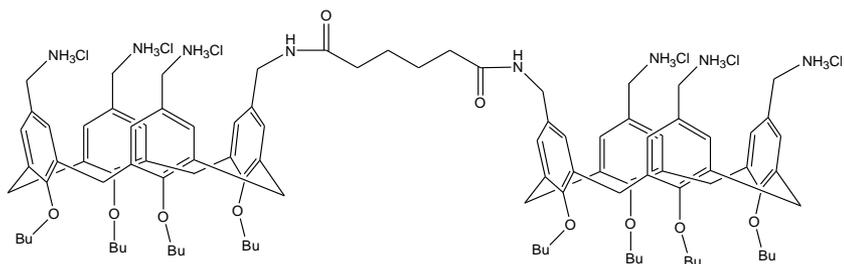
V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. Westendorf, M. Epple, **Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes**. J. Nanopart. Res. 14 (6), 910 (2012)

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток HeLa

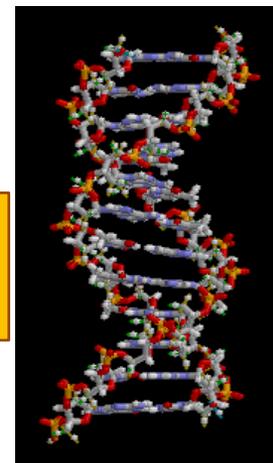


V. Sokolova, O. Rotan, J. Klesing, P. Nalbant, J. Buer, T. Knuschke, A. Westendorf, M. Eppler, **Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes.** J. Nanopart. Res. 14 (6), 910 (2012)

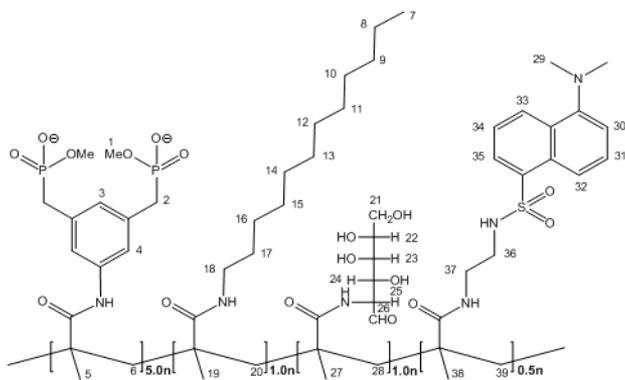
Использованные синтетические молекулы



**Связывание с ДНК в
большой бороздке**



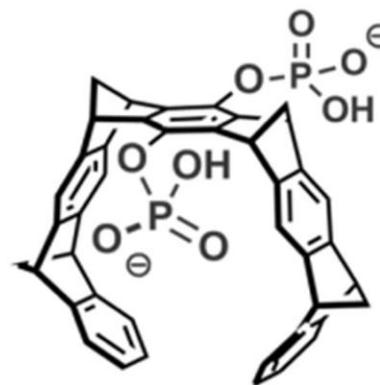
Каликсарены: поликатионный димер



Полианионный кополимер



Ингибирование ферментов



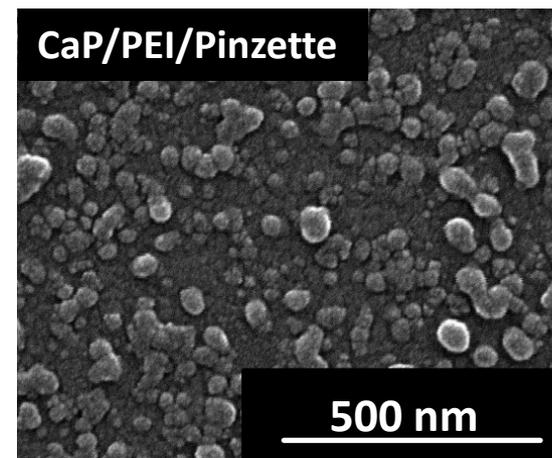
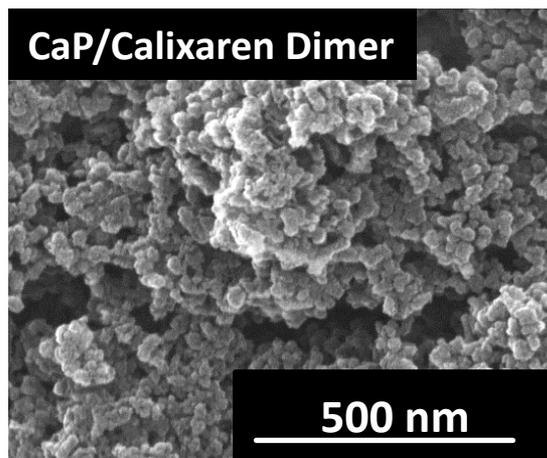
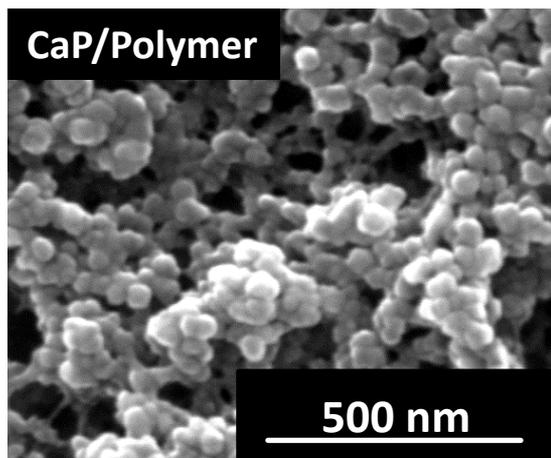
Молекулярные пинцеты



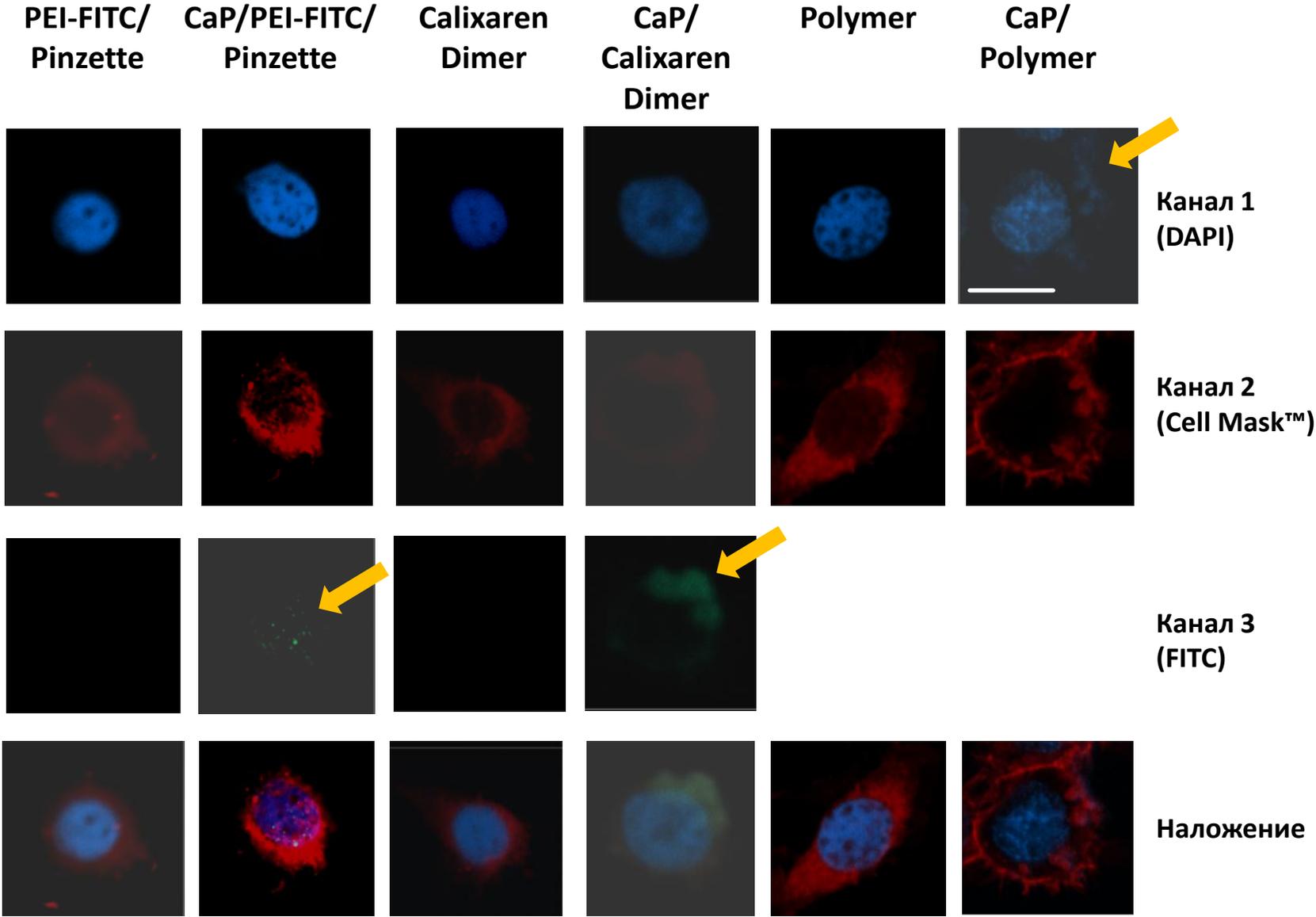
**Ингибирование взаимодействия
между белками**

Характеристика функционализированных кальций-фосфатных наночастиц

Проба	PDI	Размер (DLS) / nm	Размер (NTA) / nm	ζ -потенциал / mV	Концентрация молекул на наночастицах / $\mu\text{g mL}^{-1}$
CaP/Polymer	0.380	377	156	-17 ± 8	37
CaP/Calixaren Dimer	0.331	169	212	$+22 \pm 2$	86
CaP/PEI/Pinzette	0.315	140	150	$+44 \pm 6$	78



Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия клеток HeLa



Rotan, O., Sokolova, V., Gilles, P., Hu, W., Dutt, S., Schrader, T., Epple, M., **Transport of supramolecular drugs across the cell membrane by calcium phosphate nanoparticles**, Materwiss. Werksttech. Vol. 44 (2013); Nr. 2-3, pp. 76-182

Выводы

1. Процесс синтеза наночастиц фосфата кальция, функционализированных различными биологическими и синтетическими молекулами, был оптимизирован и охарактеризован.
2. Было показано, что функционализированные наночастицы фосфата кальция способны транспортировать различные молекулы в клетки, которые сами в растворенном виде, как правило, не способны проникать через клеточную мембрану.
3. Данные функционализированные наночастицы представляют собой хорошо охарактеризованную систему доставки различных молекул для дальнейшего использования как *in vitro*, так и *in vivo* (Т. Knuschke, V. Sokolova, O. Rotan, *et al.*, "***Immunization with biodegradable nanoparticles efficiently induces cellular immunity and protects against influenza virus infection***", The Journal of Immunology 190 (2013) 6221–6229.).

Наночастицы фосфата кальция представляют собой альтернативный и гибкий инструмент для применения в биомедицине и других областях.



Благодарю за внимание!