

На КОНКУРС «Дедал и Икар»
IV Интернет - олимпиады по нанотехнологиям

Проект

**Разработка новых наночастичек для «адресной» доставки
лекарственных препаратов**

Автор:

Маракасова Екатерина Семеновна

Москва-2010

Оглавление

Аннотация.....	2
Введение.....	2
Основная научная часть.....	3
Возможная область применения и эффекты практического применения	6
Бизнес-обоснование	6
Техника безопасности использования результатов проекта.....	7
Выводы.....	7
Список использованных источников	8

Аннотация

Проект «Разработка новых наночастичек для «адресной» доставки лекарственных препаратов» основан на применении липосом и методов белковой инженерии. Результаты данного проекта открывают новые перспективы для лечения и диагностики широкого спектра инфекционных заболеваний. В работе приведено теоретическое обоснование для конструирования наночастичек для лечения рака без оперативного вмешательства.

Введение

В начале XX века человечество страдало от огромного количества смертей в результате бактериальных инфекций. В первой половине XX столетия А. Флеминг дал надежду людям и вооружил врачей антибиотиками¹. Но теперь возникла другая проблема – это множественная резистентность патогенов к антибиотикам. Тем не менее, ученые создают новые антибиотики, а они в скором времени становятся неэффективными. Замечу также, что время разработки антибиотика значительно превышает время адаптации патогенных бактерий к этому антибиотику. Этот процесс, с одной стороны, связан с тем, что некоторые врачи значительно превышают дозы, а с другой стороны, пациенты часто не придерживаются прописанного курса лечения. В наше время антибиотики часто назначаются и в тех случаях, когда без этого можно обойтись.

Решить эту проблему можно с помощью разработок препаратов, что будут действовать на микроуровне. Такие препараты должны быть высокоспецифическими, то есть действовать избирательно на зараженные клетки. Только при попадании антибиотика в патогенную клетку можно добиться остановки роста множественной резистентности патогенных микроорганизмов к антибиотикам.

Известно, что существует большое количество противораковых антибиотиков, эффективность которых доказана лабораторными исследованиями. Но использование таких антибиотиков ограничено высокой токсичностью для нормальных клеток, плохая всасываемость в кровяное русло, а также высокой ценой таких препаратов.

Описанная дальше идея позволяет доставить препарат непосредственно в целевую клетку (на примере раковой клетки) таким образом, что нормальные клетки останутся жизнеспособными. Кроме этого, необходима небольшая доза для атаки отдельных раковых клеток, вследствие чего снижается общая цена лечения даже дорогостоящими препаратами.

¹ В 1929 году А. Флеминг открыл первый антибиотик - пенициллин

Основная научная часть

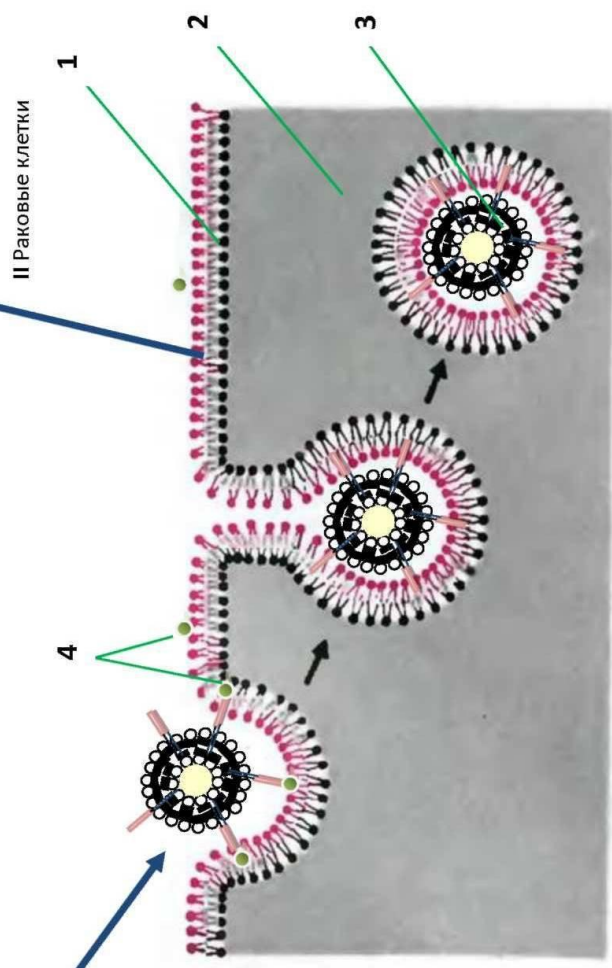
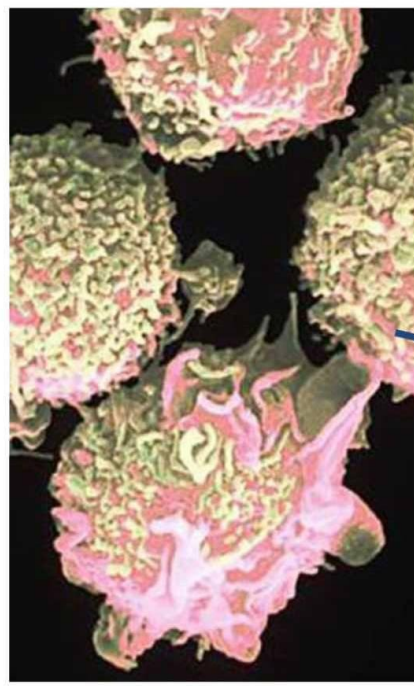
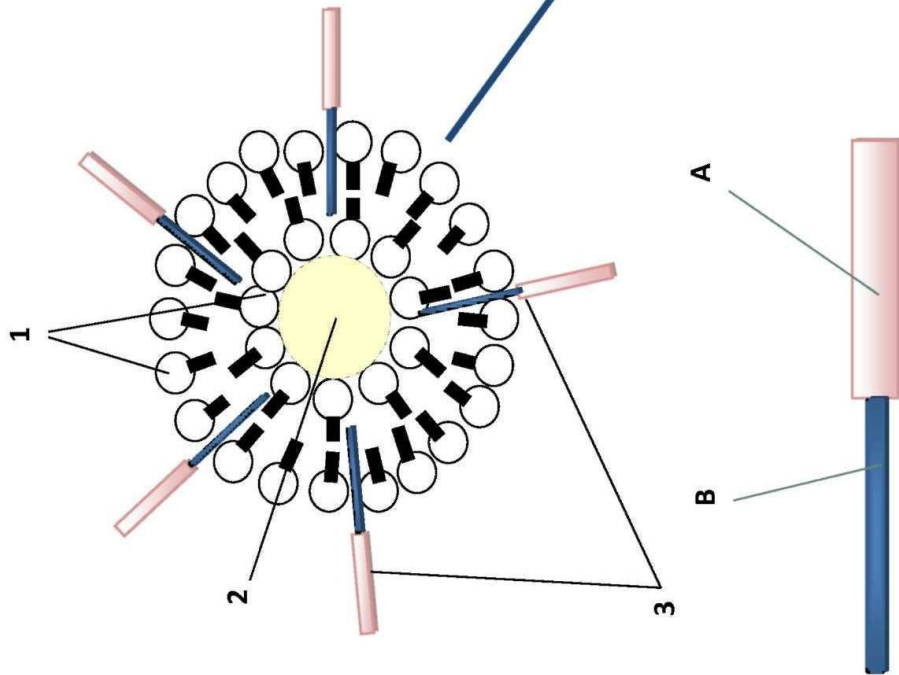
Еще в середине 60-х годов A.D. Bangham и его группа наблюдали за формированием сложных частиц, очень похожих по строению на мембранные структуры клетки [1]. Позже эти частички были названы липосомами. Свойства липосом и их поведение определяются прежде всего наличием у них замкнутой мембранной оболочки. Несмотря на молекулярную толщину (около 4 нм), липидный бислой отличается исключительной механической прочностью и гибкостью. Благодаря этому липосомы сохраняют целостность при различных повреждающих воздействиях, а их мембрана обладает способностью к самозалечиванию возникающих в ней структурных дефектов. Вместе с тем, гибкость бислоя и его текучесть придают липосомам высокую пластичность.

Для практического применения липосом и везикул исключительно важна их способность включать в себя и удерживать вещества различной природы. Круг веществ, включаемых в липосомы, необычайно широк - от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот [2]. Именно этими свойствами липосом обусловлен наш выбор в пользу именно этих наночастичек для создания нового типа наночастичек для «адресной» доставки лекарств.

Так, мы можем сформировать липосомы из фосфолипидов в присутствии лекарственного препарата, таким образом, чтоб сформировался бислой наподобие клеточной мембраны (см. Рис. III). Также для формирования липосом можно использовать катионные липиды. А как же обеспечить адресную доставку липосом в клетку?

Для этого я предлагаю использовать лектины. Лектины – это белки, что способны высокоспецифично связывать олигосахаридные остатки на поверхности клеток. Олигосахаридные структуры представленные на поверхности клеток, а также включены в внеклеточный матрикс и прикреплены к секретируемым гликопротеинам. Эти олигосахариды могут выполнять структурную роль, выступать в качестве посредника в транспорте гликоконъюгатов к клеточной поверхности, или выступать в качестве промежуточных маркеров во взаимодействии клетка-клетка (клетка-матрикс). Неструктурные функции сахаров, в общем, требуют участия сахаросвязывающих лектинов. Лектины представляют собой комплексные мультидоменные протеины. Функция связывания сахаров часто приписывается одному модулю внутри лектинового полипептида. Этот модуль называют карбонат узнающий домен (CRD) [3].

Основываясь на структуре CRD лектинов, определяют принадлежность к определенной лектиновой группе. Среди восьми точно установленных семейств четыре содержат лектины, что выполняют преимущественно внутриклеточную функцию, и четыре содержат лектины, как правило, с функциями вне клетки. К первой группе относят: семейство калнексиновых лектинов, M-, L-, и R-типичные лектины. Эти лектины локализуются в люминальных компартментах секреторного пути клетки; и принимают участие в транспортировке, сортировке незрелых гликопротеинов. Ко второму семейству принадлежат: C-, R-типичные лектины, сиглексы и галектины. Любой из перечисленных лектинов второй группы секретируется во внеклеточный матрикс или жидкости тела, или локализуется в плазматической мембране. Представители второго семейства выполняют разнообразные функции, включая клеточную адгезию, перенос сигнала внутри клетки, обмене поверхностных гликопротеинов, а также в распознавании патогенных микроорганизмов [4].



Недавние исследования показали наличие новых групп лектинов: F-box лектины, фиколины, хитиназо-подобные лектины, F-типичные лектины.

Каждая группа лектинов характеризуется определенным строением молекулы, спектром узнаваемых сахаров (лигандов), локализацией и функциями в клетках.

Синтез специфических поверхностных сахаров нормальных клеток находится под строжайшим контролем, а при раке это равновесие нарушается. В литературе неоднократно отмечалась очень высокая степень гликозилирования поверхности раковых клеток (в 100 и более раз). Так, например, при обработке двух препаратов одной и той же ткани (в одном - здоровые клетки, в другом - раковые) одной и той же дозой лектина раковые клетки слипаются в огромный бесформенный комок, а здоровые остаются без изменений или агглютинируют в очень незначительной степени.

Другим примером может служить исследование рака груди и его метастазирования в головной мозг М.А. Mayoral и коллегами. Они показали, что раковые клетки узнаются агглютинином *Machaeroscereus egiaca* (альфа 1,2 (GalNAc альфа 1,3) Galss1,4 в комплексе с муцином), но не лектинами из *Amaranthus leucocarpus* (Galss1,3-GalNAc-альфа 1,0-Ser/Thr) и *Arachis hypogaea* (Galss1,3GalNAc/Galss1,4GlcNAc).

Таким образом, эта группа ученых пришла к выводу, что муцин-подобные гликаны есть в раковых тканях, но их нет в нормальных тканях. Этот факт свидетельствует про повышенный синтез О-гликанов и галектина 3 на протяжении развития рака и метастазирования в мозг [5].

Также в литературе описаны гистохимические эксперименты с использованием лектинов для высокоспецифической детекции не только раковых, но и других дефектных (больных) клеток [6].

Как было отмечено выше, на поверхности раковых клеток наблюдалась повышенная экспрессия О-сцепленных сахаров. Для высокоспецифичной доставки лекарства в раковую клетку можно использовать разнообразные лектины, в зависимости от представленных сахаров на поверхности клетки (например, лектины R типа, что специфично связываются с О- гликанами).

Лектины R типа представляют собой белковые молекулы с несколькими CRD. В то время как лектины L типа содержат лишь один CRD, но также у них есть трансмембранный домен (данный класс лектинов относится к трансмембранным протеинам I группы) [7]. Для создания конструкции на основе липосом необходимо, чтоб рецепторная молекула (лектин) была крепко закреплена на поверхности липосомы. Для этого можно использовать несколько подходов. Например, в случае лектинов, для которых характерно наличие в структуре трансмембранного домена (L лектины), необходимо с помощью белковой инженерии создать белок, что будет состоять лишь из CRD и трансмембранного домена. А при использовании R лектинов можно создать гибридный белок, состоящий из CRD (одного или нескольких) и гидрофобного аминокислотного хвоста. Такой аминокислотный хвост, как и трансмембранный домен L лектинов, будет служить своеобразным наноразмерным якорем в мембране липосомы (см. Рис III и IV). Использование лектинов имеет множество преимуществ перед другими молекулами, перспективными для использования для конструирования «адресных» наночастичек, например, специфичных моноклональных антител. Для взаимодействия антител с мишенью необходимо достаточно большое время, а лектины взаимодействуют с мишенью практически мгновенно. Кроме этого, получать антитела сложнее, чем лектины: молекулы лектинов значительно меньше по размерам и состоят из отдельных доменов, что позволяет их экспрессировать в клетках *E. coli*.

Новосинтезированные молекулы лектинов фолдируются правильно, даже если состоят из гибридных доменов.

Оптимальный размер наночастичек будет колебаться в диапазоне 70-120 нм. Впрочем, размер таких липосомовых наночастичек и их вместительность при создании конструкции будет зависеть от степени гликозилирования больных клеток по сравнению со здоровыми клетками. Соответственно, можно рассчитать необходимую дозу препарата в корреляции с гликозилированием больных и здоровых клеток.

Таким образом, на основе липосомовых наночастичек и высокоспецифичных молекул лектинов мы можем собрать конструкцию, что позволит доставить препарат в больную клетку (Рис. II). Рецепторные молекулы специфично свяжутся с гликозилированными лигандами на поверхности целевых клеток, в результате чего липосомная наночастичка поглотится с помощью эндоцитоза больной клеткой (см. Рис. I). При попадании в клетку препарат высвободится благодаря действию лизосом. Лекарство свяжется со своей целью, что приведет к остановке метаболизма и смерти раковой клетки.

Возможная область применения и эффекты практического применения

Вышеописанная концепция может найти широкое применение в медицине. Данный принцип может использоваться для лечения широкого спектра заболеваний с помощью уже существующих лекарственных препаратов. Метод может быть адаптирован для лечения бактериальных, вирусных, грибковых и других инфекций, а также для лечения рака без оперативного вмешательства.

Моя идея позволяет доставить препарат непосредственно в целевую клетку (например, раковую клетку) таким образом, что нормальные клетки останутся жизнеспособными. Кроме этого, необходима лишь небольшая доза для атаки отдельных раковых клеток, вследствие чего снижается общая цена лечения даже дорогостоящими препаратами.

При «адресной» доставке лекарство попадает прямо в целевую клетку, а, значит, вероятность образования популяции резистентных клонов сводится к минимуму.

Кроме этого, вышеописанную концепцию можно использовать для диагностики широкого спектра заболеваний. В этом случае липосомы должны содержать другие наночастички, например, квантовые точки.

Бизнес-обоснование

Данный проект реально выполнить в течение двух лет. При выполнении проекта предвидятся такие расходы:

Код по КПС	Вид расходов	Всего на 2010 г (руб.)
211	Заработная плата	84000

212	Прочие выплаты (командировки и служебные разъезды в части суточных)	0
213	Начисления на фонд оплаты труда (единый социальный налог) – 26,2%, включая тариф на обязательное социальное страхование от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний	2208
221	Услуги связи	0
222	Транспортные услуги, в том числе, оплата транспортных расходов в командировках и служебных разъездах	0
224	Арендная плата за пользование имуществом	0
225	Услуги по содержанию имущества	0
226	Прочие услуги, в том числе, оплата проживания во время нахождения в служебной командировке	0
290	Прочие расходы	0
310	Увеличение стоимости основных средств	0
340	Увеличение стоимости материальных запасов, в т.ч.: Проведение клонирования и экспрессии лектиновых гибридов; выделение и очистка белка; сбор наночастичек; прибор для культивирования E. coli	590700
800	ИТОГО РАСХОДОВ	676908

Техника безопасности использования результатов проекта

Готовый препарат следует вводить прямо в зараженную область, или в кровь. Лечение должно проводиться в амбулаторных условиях под наблюдением врача. Также следует соблюдать правила хранения препарата во избежание преждевременного разрушения наночастичек.

Выводы

В данной работе описан новый принцип конструирования наночастичек для «адресной» доставки лекарственных препаратов в больную клетку. Такие наночастички состоят из липосомы и рецепторной молекулы (высокоспецифический к поверхностным сахарам лектин). Лектиновый гибридный белок состоит из домена, что взаимодействует с определенными сахарными остатками (CRD), а также наноякоря для закрепления на липосоме. Вышеописанный принцип открывает широкие перспективы для лечения и диагностики широкого спектра заболеваний, в т.ч. рака.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bangham A.D., Horne R.W. Negative Staining of Phospholipids and their Structured Modification by Surface Agents as Observed in the Electron Microscope // J. Mol. Biol. 1964. Vol. 8. P. 660-668.
2. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский Образовательный журнал. Биология. – 1998. (<http://www.pereplet.ru/portal.new.html>)
3. Dodd R.B., Drickamer K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity // Glycobiology. 2001 May;11(5):71R-9R.
4. Drickamer, K. and Taylor, M.E. Evolving views of protein glycosylation // Trends Biochem. Sci. 1998. 23, P. 321-324.
5. Mayoral M.A., Mayoral C., Meneses A., and other. Identification of galectin-3 and mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain // Cancer Invest. 2008 Jul. Vol. 26(6), P. 615-23.
6. Santaella-Verdejo A., Gallegos B., Pérez-Campos E. Use of amaranthus leucocarpus lectin to differentiate cervical dysplasia (CIN) // Prep Biochem Biotechnol. 2007. Vol. 37(3), P. 219-28.
7. Taylor, M.E. Evolution of a family of receptors containing multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains // Glycobiology. 1997. Vol. 7, R5-R8.