

Načini vezave makromolekul pri pripravi dostavnih sistemov za biološka zdravila

Tina Maver, Dragica Maja Smrke, Karin Stana Kleinschek, Uroš Maver

V zadnjem času znanstveniki vse več pozornosti namenjajo mehanizmom in pomenu interakcij med biološkimi zdravilnimi sistemi in dostavnimi sistemi zanje. Neslutene možnosti prepoznavanja in interakcij med molekulami so se pokazale šele ob številnih teoretičnih študijah na področju zvižanja proteinov (Dobson, 2003) in delovanja bioloških makromolekul v različnih organskih sistemih (Wildman, Thai, Lei, Ott, Wolf-Watz, Fenn, Pozharski, Wilson, Petsko, Karplus, Hübner, Kern, 2007).

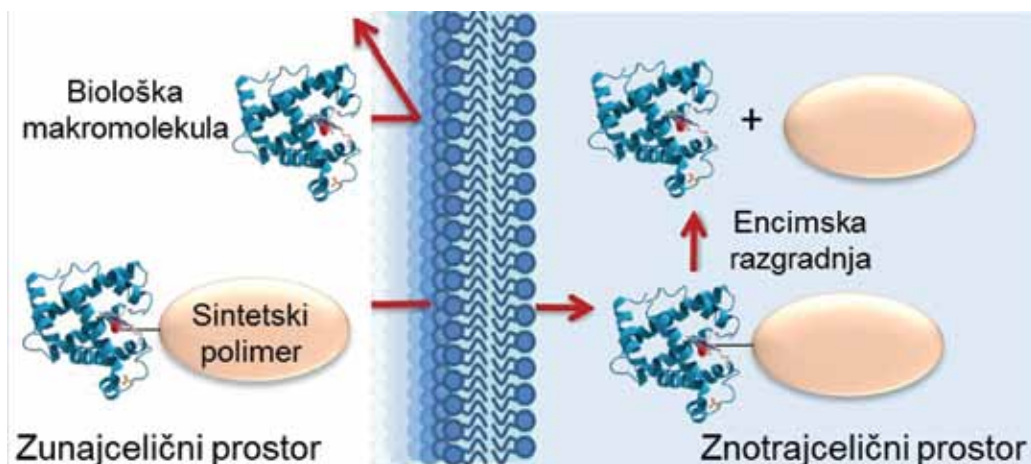
Sistemi za dostavo bioloških zdravilnih učinkovin so zanimivi iz več razlogov. Kljub dovoljšni majhnosti za ustrezeni prenos po telesu zaradi svoje izjemno velike površine omogočajo sestavljanje dovolj velikega števila bioloških molekul in tako lahko služijo kot akceptorji. Nabor materialov, ki se uporabljajo za jedra dostavnih sistemov, je izredno velik in vedno več je kliničnih študij, ki tudi potrjujejo njihovo netoksičnost in biokompatibilnost. Tako lahko danes izberemo jedra s posebnimi optičnimi, elektronskimi ali magnetnimi lastnostmi, ki zelo pripomorejo pri uspešnosti dostave. Da pa omenjeno lahko izkoristimo za učinkovito molekularno prepoznavo in ciljanje, moramo previdno snovati površinsko funkcionalizacijo, kar je mogoče zgolj ob dobrem poznavanju organske kemije (You, Chompoosor, Rotello, 2007).

Najbolj pogosto uporabljene funkcionalne skupine na površini dostavnih sistemov so hidroksilna, oksietilna, fenilna, karboksilna, aminska, dialkilna, fosfonatna in estrska skupina. McNamee in sodelavci (2007) so preiskovali vpliv nekaterih funkcionalnih

skupin iz omenjenih skupin na adhezivnost ob stiku z rakavo celico. Želeli so namreč ugotoviti, katera od preiskovanih skupin bi bila najbolj primerna za pripenjanje bioloških zdravilnih učinkovin na dostavni sistem in katero skupino naj ima biološka učinkovina/površina dostavnega sistema, da se bo ta združba najbolj učinkovito približala površini rakave celice. Ugotovili so, da je pri preučevanem tipu rakavih celic najboljše prijemala karboksilna skupina, is česar so sklepali, da je površina rakave celice, ki se pojavlja pri melanomih, bolj pozitivno nabita. Iz tega sledi, da prihaja na površini celic, ki imajo izpostavljene bolj pozitivne skupine, do prevelikega izražanja molekul/receptorjev (Lee, MacKay, Fréchet, Szoka, 2005). Funkcionalne skupine za površinsko funkcionalizacijo dostavnih sistemov se v grobem delijo na kovalentne in nekovalentne zaradi same narave vezi, ki je enkrat reverzibilna in drugič ireverzibilna, ter zaradi razdalj, na katerih delujejo sile, ki vzpostavljajo omejene vezi.

Kovalentna vezava

Kovalentna vezava bioloških zdravilnih učinkovin je bila prvič uporabljena za izdelavo dostavnih sistemov, ko so zaradi kratkih razpolovnih časov in posledično neustrezne biološke uporabnosti samega zdravila farmacevtski tehnologi začeli izdelovati predzdravila. Ta sama po sebi nimajo oziroma imajo le majhen farmakološki učinek in se šele med presnovo v organizmu pretvorijo v aktivno obliko, torej v zdravilo. Prva predzdravila so bila sestavljena iz kombinacije sintetskega polimera (pogosto so to bili različni derivati polietilenoksida – PEO) in



Slika 1: Shematski prikaz delovanja predzdravila: ob dodatku sintetskega polimera biološki makromolekuli lahko slednja vstopa v celico. Znotraj celice pride do encimske razgradnje predzdravila v zdravila. Avtorica: Tina Maver.

biološke učinkovine (slika 1). Predzdravilo ima takšne lastnosti, da se v prebavni cevi bolje absorbira kot aktivna oblika učinkovine, velikokrat pa se z njihovo uporabo zmanjša tudi učinek prvega prehoda, torej izgube zaradi metabolizma v jetrih.

V sintezi predzdravil obstaja zelo širok nabor kemijskih vezi, ki jih lahko uporabimo za kovalentno vezavo različnih bioloških makromolekul na površino dostavnih sistemov. Odvisno od namena vezave največ uporabljajo amidno, estrsko in etrsko vez

za povečanje stabilnosti ter sulfatno, hemisukcinatno in aminometilbenzoatno vez za povečanje vodotopnosti (tabela 1).

Kovalentno vezavo s pridom uporabljamo

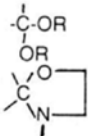
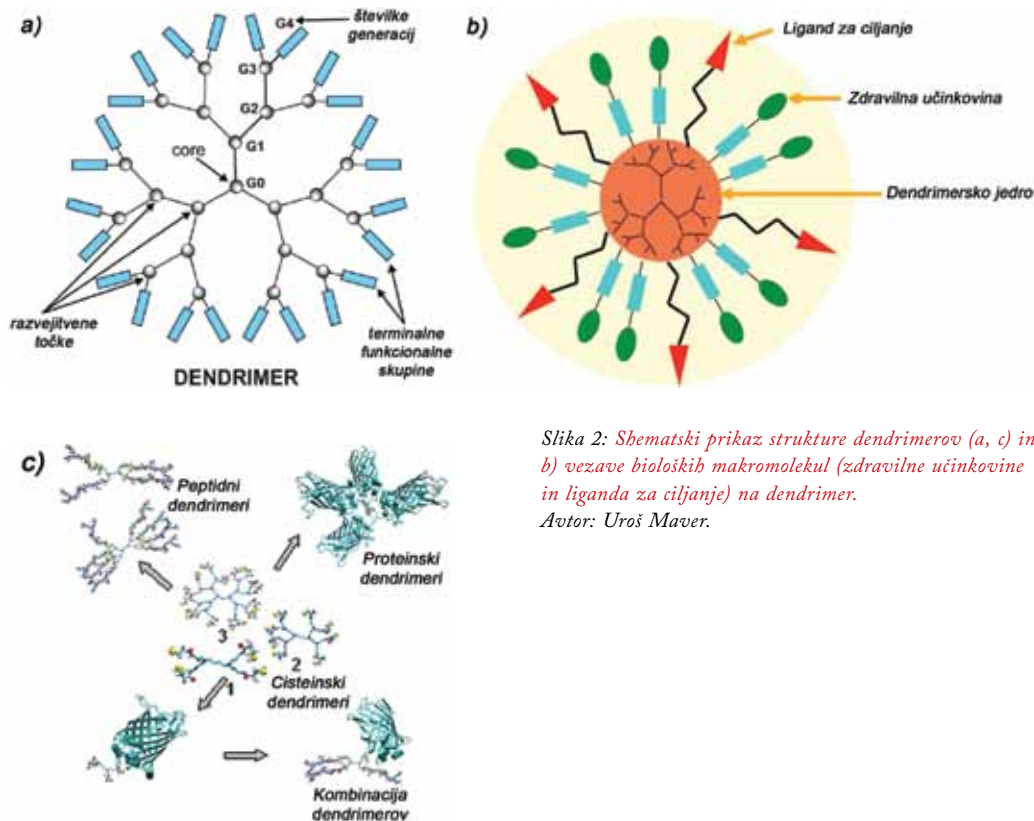
Funkcionalna skupina	Kemijska vez		
<i>Povečanje stabilnosti</i>			
-NH ₂	$\begin{array}{c} \text{-NH-C-R} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \text{-NH-C-OR} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \text{-NH-CH}_2\text{-N-C-R} \\ \parallel \\ \text{R} \quad \text{O} \end{array}$	-COOH	$\begin{array}{c} \text{-COOR} \\ \text{-COOCHOOCH} \\ \text{R} \end{array}$
-OH	$\begin{array}{c} \text{-OR} \\ \text{-OCHOOCH} \\ \text{R} \end{array}$	-CO-	
<i>Povečanje vodotopnosti</i>			
Sulfatna	D-O-SO ₃ ⁻		
Hemisukcinatna	$\text{D-O-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$		
Aminometilbenzoatna	$\text{D-O-C(=O)-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-N}^+\text{(R}_1\text{)(R}_2\text{)}$		

Tabela 1: Kemijske vezi, ki se uporabljajo pri pripravi predzdravil. Razlikujejo se po svoji stabilnosti v fizioloških tekočinah in svoji občutljivosti za encime v telesu.



Slika 2: Shematski prikaz strukture dendrimerov (a, c) in (b) vezave bioloških makromolekul (zdravilne učinkovine in liganda za ciljanje) na dendrimer.

Avtor: Uroš Maver.

predvsem v primeru dostavnih sistemov na osnovi dendrimerov – sinteznih polimerov nanovelikosti, s homogeno in drevesu podobno razvejeno strukturo. Neomejene sintezne možnosti dendrimerov omogočajo pripenjanje velikega števila različnih bioloških makromolekul naenkrat (slika 2).

S kovalentno vezavo bioloških učinkovin posredujemo dostavnemu sistemu nekaj posebnih lastnosti, ki jih drugi tipi vezi ne omogočajo. Dostavni sistem tako dobi možnost ciljanja, poveča pa se tudi stabilnost nanj pripete biološke makromolekule (Gillies, Fréchet, 2005), ki se lahko v primeru drugih, nekovalentnih povezav nenadzorovano sprostijo, kar vodi do izgube učinkovine in včasih celo do toksičnih učinkov (McNamee, Aso, Yamamoto, Fukumori, Ichikawa, Higashitani, 2007).

Glavne namene kovalentne vezave bioloških

zdravilnih učinkovin na nosilni dostavni sistem lahko razdelimo v tri glavne skupine: povečevanje topnosti zelo hidrofnobnih proteinskih molekul, povečanje stabilnosti proti proteolitični razgradnji in povečanje prehoda čez intestinalni epitelij (Peppas, Kavimandana, 2006). Dostavni sistemi, ki jih preiskujejo v te namene, vključujejo vse od različnih polimernih delcev, nanoemulzij, liposomov, kletk, proteinskih in nukleinskih molekul do različnih vrst anorganskih nanodelcev (Dileo, Banerjee, Whitmore, Nayak, Falo, Huang, 2003).

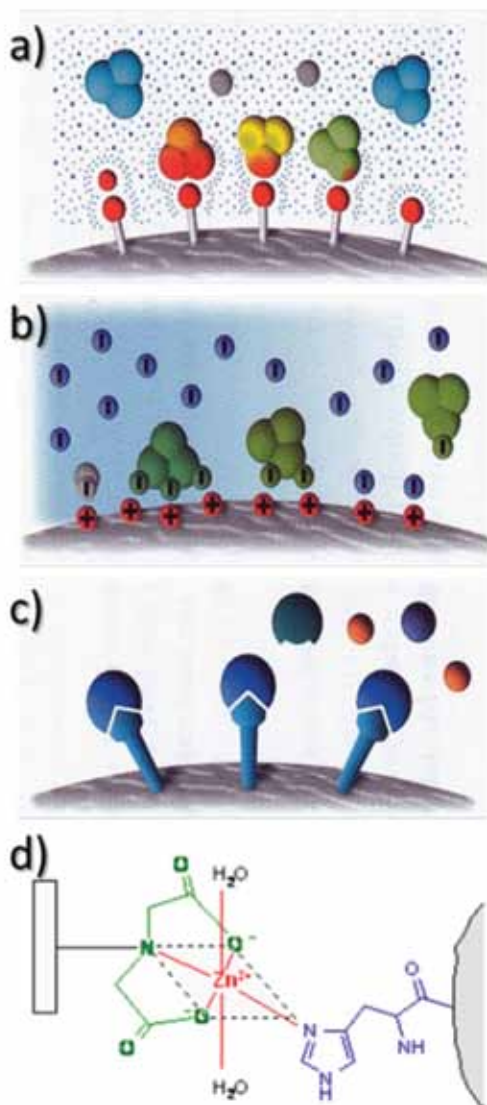
Nekovalentna vezava

V bioloških sistemih so nekovalentne povezave običajno temelj za molekulsko prepoznavanje. Pod molekulskim prepoznavanjem razumemo tvorbo šibkih nekovalentnih vezi, kot so vodikove vezi in hidrofnobne ali

elektrostatske interakcije med vsaj dvema molekulama (slika 3), ki vodijo do specifičnega prepoznavanja in povezovanja sodelujočih molekul. Primeri takega prepoznavanja so kompleksi encim-substrat, povezave protitelo-antigen, povezave receptor-ligand in drugi. Ob dobrem poznavanju teh interakcij v naravnih procesih lahko sodelujoče funkcionalne enote vgradimo v različne dostavne sisteme in tako posnemamo naravno

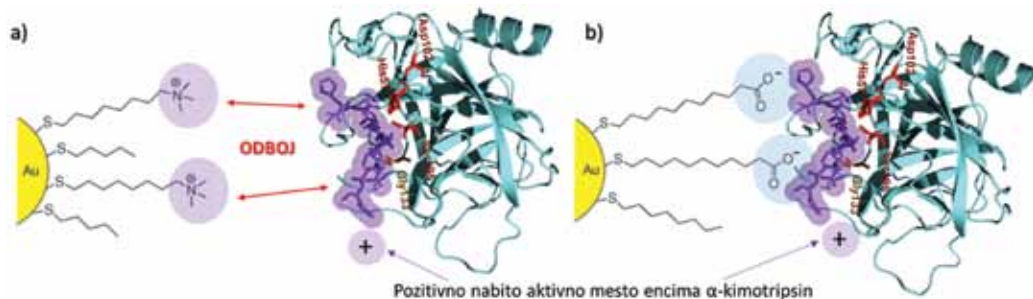
molekularno prepoznavanje, kar ima številne prednosti.

Na potek molekularnega prepoznavanja vplivata molekularna zgradba, še posebej položaj atomov in funkcionalnih skupin v molekuli, ter termodinamika vezavne interakcije (kinetične in ravnotežne vezavne konstante). Izbrane nekovalentne povezave, ki jih želimo vgraditi v dostavni sistem, lahko računalniško modeliramo z različnimi termodinamskimi modeli. V primeru interakcije receptor-ligand lahko tako določimo recimo afiniteto liganda do receptorja in selektivnost njune vezave. Ravnotežna konstanta disociacije predstavlja običajni parameter za izražanje moči kovalentne interakcije, ki jo določimo ob upoštevanju termodinamike interakcije (Bayer, Peppas, 2008).



Slika 3: Biološko makromolekulo lahko na površino dostavnega sistema nekovalentno vezemo na različne načine. a) s hidrofobno interakcijo, b) elektrostatsko, c) s specifično afinitetno interakcijo (na primer biotin-avidin), d) s koordinativno vezjo. Avtor: Tina Maver, delno povzeto po:

http://grad.md.chula.ac.th/english%20old/index.php?option=com_content&view=article&id=11:international-workshop-&catid=18:international-workshop&Itemid=8



Slika 4: a) Aktivno mesto encima α-kimotripsin je pozitivno nabito in zaradi izpostavljenih pozitivno nabitih skupin na dostavnem sistemu pribaja do odboja. Posledično ne pride do vezave aktivnega mesta encima z dostavnim sistemom. b) Na površju dostavnega sistema so negativno nabite molekule in aktivno mesto encima se zaradi privlaka elektrostatskih sil veže na dostavni sistem. Avtor: Tina Maver.

a) Elektrostatska vezava/ionska vez

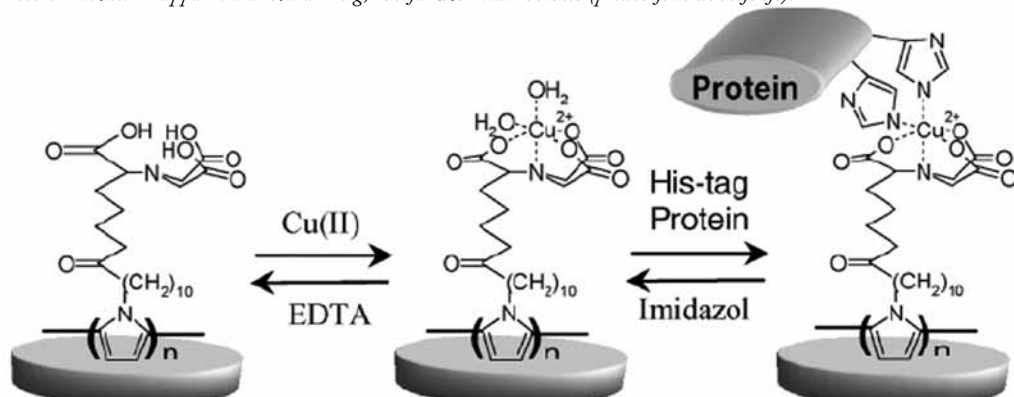
Elektrostatsko vezavo lahko zelo dobro uporabimo za nadzorovano sproščanje v dostavnem sistemu vezane učinkovine na specifičnem mestu v celici, saj za razliko od mehanizmov in procesov na molekularni ravni, ki jih še ne poznamo dobro, zelo dobro poznamo sestavo telesnih tekočin na vseh mestih v telesu.

Elektrostatska vezava je vrsta kemijske vezi, pri kateri se z elektrostatskim privlakom povežeta največkrat kovina (kovinski atom/

ion) in neki nekovinski ion. Vez se tvori s privlačnimi silami dveh nasprotno nabitih ionov. Običajno je kovinski ion že vezan na neki molekuli kot njen prostetični del in ima tako pozitiven naboj. S tem privlači že obstoječe nekovinske anione, ki so na primer deli zdravilne učinkovine. Na sliki 4 je prikazano, kako lahko na podlagi poznavanja zgradbe molekularskih struktur in s pomočjo elektrostatskih vezi vplivamo na selektivno vezavo ustreznega pripravljenega dostavnega sistema na želeno tarčno mesto v telesu.

Slika 5: LEVO: Nosilec poli(pirrol)-NTA, ki ima proste skupine, ki služijo kot ligandi pri koordinacijski vezavi. SREDINA: Ob dodatku centralnega iona (Cu(II)) se ta veže na nosilec; v nasprotni smeri se ob dodatku EDTA, ki je močnejši ligand, ion odcepi z nosilca in se veže v EDTA. DESNO: ob dodatku proteina s histidini bogato verigo = (histidinski rep (His-tag Protein)), se ta veže v koordinativno vez (protein je imobiliziran). Ob dodatku imidazola, ki ima večjo afiniteto do vezave v koordinativno vez s Cu(II), imidazol izpodrine vezani protein, ki se tako odcepi (Kruppa, Knig, 2006).

Avtor: Michael Kruppa in Burkhard Knig, revija Chemical reviews (pridobljeno dovoljenje).



b) Koordinativna vez

Po definiciji gre pri tej vezavi za produkt, pri katerem nevtralne molekule ali anioni (imenovani ligandi) tvorijo vezi s centralnim (navadno) kovinskim atomom (ali ionom) s tako imenovano *koordinativno kovalentno vezjo* (angl. *coordinate covalent bond*). Posebnost te vezave je, da je ligand dajalec celotnega elektronskega para, medtem ko je centralni ion prejemnik elektronskega para. Atoma ostaneta skupaj, ker skupni elektronski par privlačiata jedri obeh atomov. Običajno centralni ion obdaja več ligandov. Ta vezava nam omogoča na eni strani zelo trdno in stabilno zgradbo dostavnega sistema, na drugi strani pa lahko vez zelo preprosto razcepimo (kar pride v poštev za nadomeščanje nekega vezanega liganda ali za nadzorovano odpuščanje vezane učinkovine), in sicer bodisi s spremembo pH ali pa z dodatkom specifičnih ligandov, ki imajo večjo afiniteto do centralnega atoma kot poprej vezani ligandi oziroma molekule učinkovine. Tovrstni mehanizem lahko poteka tudi na tarčnem mestu, kjer lahko koordinativni kompleks razpade, ker morda na tem mestu obstaja tak centralni atom, do katerega imajo na naš dostavni sistem vezani ligandi (biološke makromolekule) večjo afiniteto (Kruppa, Knig, 2006).

Zaključek

Širok nabor informacij o posameznih sestavnih delih dostavnega sistema, o tarčnem mestu ter o transportni poti zdravila po telesu je pogoj za pravilni izbor načina vezave zdravilne učinkovine na dostavni sistem, ki omogoči ciljano zdravljenje in maksimalni učinek zdravljenja. Pri tem so še posebej pomembne interakcije med posameznimi deli sistema kot tudi tiste s tarčnim mestom. Tako lahko zaključimo, da je za razvoj področja priprave bioloških zdravil dobro poznavanje interakcij ključnega pomena.

Literatura:

- Dobson, C. M., 2003: *Protein folding and misfolding. Nature*, 426: 18-25.
- Wildman, K. H., Thai, V., Lei, M., Ott, M., Wolf-Watz, M., Fenn, T., Pozharski, E., Wilson, M. A., Petsko, G. A., Karplus, M., Hübner, C. G., Kern, D., 2007: *Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. Nature*, 450: 838-844.
- You, C.-C., Chomposor, A., Rotello, V. M., 2007: *The biomacromolecule-nanoparticle interface. NanoToday*, 2 (3): 34-43.
- Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J., Szoka, F. C., 2005: *Designing dendrimers for biological applications. Nature Biotechnology*, 23 (12): 1517-1526.
- Gillies, E. R., Fréchet, J. M. J., 2005: *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. Drug Discovery Today*, 10: 35-43.
- McNamee, C. E., Aso, Y., Yamamoto, S., Fukumori, Y., Ichikawa, H., Higashitani, K., 2007: *Chemical Groups that Adhere to the Surfaces of Living Malignant Cells. Pharmaceutical Research*, 24 (12): 2370-2380.
- Peppas, N. A., Kavimandana, N. J., 2006: *Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29: 183-197.
- Dileo, J., Banerjee, R., Whitmore, M., Nayak, J., Falo, L., Huang, L., 2003: *LPD mediated antigen delivery to antigen presenting cells results in enhanced anti-tumor immune responses. Molecular Therapy*, 7: 640-648.
- Bayer, C. L., Peppas, N. A., 2008: *Advances in cognitive, conductive and responsive delivery systems. Journal of Controlled Release*, 132: 216-221.
- Kruppa, M., Knig, B., 2006: *Reversible coordinative bonds in molecular recognition. Chemical reviews*, 106 (9): 3520-3560.