

Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov - korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov

Lectin-mediated drug delivery - a step forward in development of bioadhesive drug delivery systems

Petra Kocbek, Julijana Kristl

Povzetek: Razvoj novih sistemov za dostavo učinkovin je dandanes velik izziv farmacevtske tehnologije. Sodoben in obetajoč pristop predstavlja uporaba lektinov. Lektini so proteini ali glikoproteini, ki imajo v strukturi vsaj eno domeno s katero prepoznajo in se reverzibilno vežejo na specifični mono- ali oligosaharid. Interakcije med lektini in sladkorji so specifične, saj jih lahko primerjamo z interakcijami encim-substrat ali antigen-protitelo. Za dostavo učinkovin imajo velik pomen bioprepoznavne lastnosti lektinov, ki interagirajo s specifičnimi sladkorji glikoproteinov mukusa ali glikokaliksa celic in vodijo do mukoadhezije, citoadhezije in/ali citoinvazije. Tako predstavlja uporaba lektinov možnost ciljanega dostavljanja učinkovin v tarčne celice in tkiva po različnih poteh dajanja (oralno, peroralno, pulmonalno, okularno). Uporaba lektinov nudi perspektivno možnost za dostavo proteinskih učinkovin, vakcin in terapevtskih genov. Ciljanje dosežemo tako, da pripravimo konjugate učinkovine z lektini tj. lektinizirano predzdravilo, ali pa modificiramo površino nanodelcev, mikrosfer ali liposomov tako, da nanje pripnemo molekule lektina. Kljub številnim prednostim lektinov, pa moramo biti pri izbiri lektinov za dostavo učinkovin pozorni na toksičnost in imunogenost določenih lektinov.

Ključne besede: lektini, bioadhezija, ciljano dostavljanje, predzdravila, nosilni sistemi

Abstract: Very promising and up-to-date approach in development of new drug delivery systems represents an application of lectins. Lectins are proteins or glycoproteins which have in structure at least one carbohydrate recognition-domain that is capable to bind reversibly to specific mono- or oligosaccharide. Interactions between lectins and sugars are highly specific, comparable to those between the enzyme and substrate, or antigen and antibody. Great importance of lectins in bioadhesive drug delivery arises from their biorecognition properties making them possible to interact with specific sugars in the mucus or cell glycocalix, leading to the mucoadhesion, citoadhesion and/or citoinvasion. Furthermore, lectins can be used as ligand molecules directing various delivery systems to specific cells and tissues following different routes of application such as oral, peroral, pulmonal, or ocular. They offer possibility for delivery of protein drugs, vaccines and therapeutic genes. Targeting can be achieved by conjugating lectins to specific drugs (lectinized prodrugs) or attaching them to the surface of nanoparticles, microspheres or liposomes. Despite many advantages lectins should be used by caution since some of them might attest with toxicity or immunogenicity.

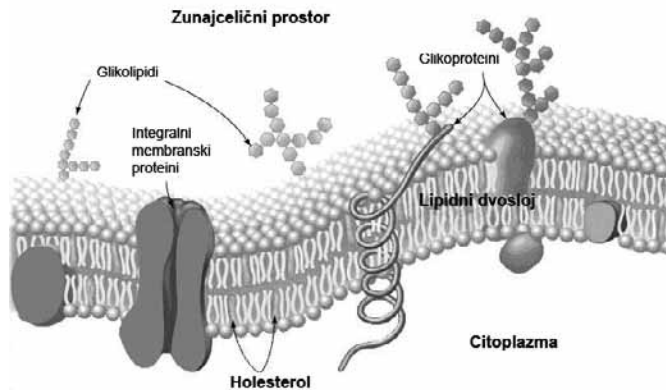
Keywords: lectins, bioadhesion, drug targeting, prodrugs, carrier systems

1 Uvod

Začetki lektinologije segajo v leto 1888, ko je Stillmark ugotovil, da izvleček iz ricinusovih semen povzroči aglutinacijo eritrocitov (1). Nato so snovi s podobno biološko aktivnostjo, ki so jih izolirali iz rastlin, poimenovali hemaglutinini (2). Ko so opazili, da nekateri hemaglutinini selektivno aglutinirajo krvne celice glede na krvne skupine ABO, so te hemaglutinine poimenovali lektini. Beseda lektini izvira iz latinske

besede »legere«, kar pomeni izbrati; torej lektini selektivno izberejo vezalno mesto na glikoziliranih površinah (3, 4). Dandanes so lektini definirani kot proteini ali glikoproteini, ki imajo v strukturi vsaj eno domeno s katero prepoznajo in se reverzibilno vežejo na specifični mono- ali oligosaharid. Ali drugače, lektini so receptorji za sladkorne molekule (2, 3, 5, 6). Nekateri lektini so zgrajeni iz podenot z različnimi vezalnimi mesti za sladkorje. Lektini so v naravi zelo razširjeni. Izolirali so jih iz mikroorganizmov, rastlin in živali, virusov, bakterij, alg, gliv,

telesnih tekočin vretenčarjev in celičnih membran sesalcev (7). Interakcije med lektini in sladkorji so zelo specifične, saj jih lahko primerjamo z interakcijami encim–substrat ali antigen–protitelo (5, 8). Lektini se lahko vežejo na proste sladkorje ali na določene sladkorne komponente polisaharidov, glikoproteinov ali glikolipidov, prostih ali vezanih v celičnih membranah (slika 1).



Slika 1: Zgradba celične membrane, kjer so sladkorji vezani na membranske proteine in lipide zunanje strani celične membrane.

Figure 1: Schematic presentation of cell membrane structure. Sugars are bound to membrane proteins and lipids on the extracellular side of the cell membrane.

Interakcije med sladkorji in laktini na celični površini imajo pomembno vlogo v človeškem organizmu pri procesih kot so opsonizacija mikrobov, fagocitoza, aktivacija in diferenciacija celic, adhezija in migracija celic, apoptoza idr.. Tudi patogene bakterije in bakterije, ki so del normalne mikrobne flore, se pritrjujejo včasih na zelo specifičen del črevesa preko interakcij med lektini in določenimi sladkorji (5, 6). Tovrstne možnosti izkoriščajo za razvoj lektiniziranih dostavnih sistemov (DS).

2 Vloga lektinov pri ciljani dostavi učinkovin

Zelo specifične interakcije med lektini in sladkorji so temelj uporabe parov lektin-oligosaharid za ciljano dostavo učinkovin. V osnovi ločimo dva načina takšnega ciljanja. Pri prvem načinu t.i. neposrednem ciljanju je oligosaharid del DS. Endogeni lektini na površini celic prepoznajo sladkorni del DS, ki je neke vrste »naslov« za ciljano dostavo učinkovin v tarčne celice. Na podlagi sladkorne kode lahko lektini tarčnih celic prepoznajo, vežejo in internalizirajo lektiniziran DS (9). DS pripravimo s kovalentno vezavo sladkorjev na polimere in druge aglikone. Namenjeni so predvsem zdravljenju virusnih obolenj, imunski terapiji, nadomestnemu encimskemu zdravljenju in genskemu zdravljenju (5).

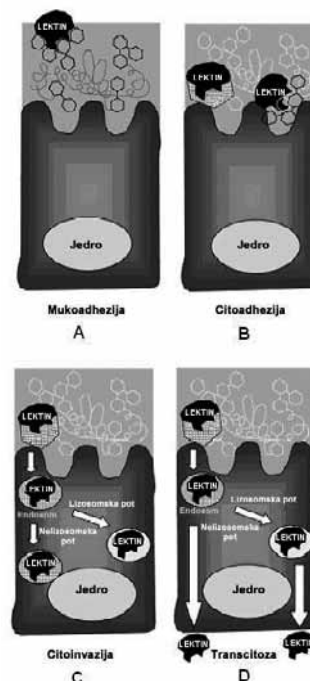
Drugi način t.i. reverzno ciljanje predstavlja obratni mehanizem prvega. DS je na površini prekrit z molekulami eksogenega lektina s specifičnostjo za določen sladkor. V ta namen se večinoma uporabljajo rastlinski lektini. Takšen DS lahko vstopa v interakcije s sladkornimi deli endogenih proteoglikanov, glikoproteinov ali glikolipidov na površini celic (9).

Glede na literaturne podatke je mnogo bolj poznano in raziskovano pripenjanje lektinov na DS, ki specifično prepozna sladkor na ciljnem mestu, kot pripenjanje sladkorjev na DS, ki jih specifično prepoznajo endogeni lektini na tarčnem mestu. Tako je tudi vsebina tega članka usmerjena k t.i. reverznemu ciljanju.

3 Bioadhezija, mukoadhezija in citoadhezija

Razvoj lektiniziranih DS temelji na natančnem poznavanju interakcij med sladkornimi ligandi na površini celic in lektini. Za dostavo učinkovin imajo velik pomen bioprepoznavne lastnosti lektinov preko interakcij s specifičnimi sladkorji, rezultat česar so mukoadhezija, citoadhezija in/ali citoinvazija (9).

Bioadhezija je sposobnost medsebojne vezave dveh komponent od katerih je vsaj ena biološka (10). Tako definiran izraz je zelo širok in obsega mukoadhezijo in citoadhezijo. Mukoadhezija pomeni vezavo na mukus, ki prekriva sluznice, citoadhezija vezavo neposredno na celično površino (slika 2).



Slika 2: Interakcije lektinov s celicami, vstop v celice in prehod skozi enterocite (9).

Figure 2: Lectin interactions with cells, entry into the cells and crossing through the enterocytes (9).

Ideja o bioadhezivnih dostavnih sistemih sega kakšnih dvajset let nazaj (11) in še vedno predstavlja izziv za številne raziskovalce. Kljub prednostim poznanih bioadhezivnih polimerov, le-ti niso brez pomanjkljivosti, saj se vežejo na ciljno mesto z nespecifičnimi fizikalno-kemijskimi interakcijami kot so Van der Waalsove in vodikove vezi. Takšni polimeri, kot so hitosan, natrijev alginat, karboksimetilceluloza, hidroksipropilceluloza idr., pri vezavi ne ločijo med slojem mukusa, ki prekriva celično površino, in med mukusom, ki je že odluščen, ter med površinami drugih komponent črevesne vsebine. Ciljano vezavo mukoadhezivnega DS na tarčno mesto na površini sluznic lahko tako preprečijo predhodne interakcije z drugimi komponentami. Pomanjkljivost takšnega DS je poleg nespecifičnih interakcij tudi vezava na sloj mukusa, ki prekriva sluznice, in ne neposredna vezava na površino epitela, kjer poteka absorpcija. Čas zadrževanja takšnega mukoadhezivnega pripravka na vezalnem mestu je omejen s časom obnavljanja mukusnega sloja (1–3 ure) (6).

V nasprotju z mukoadhezijo (slika 2A), ki temelji na nespecifičnih interakcijah med verigami mukoadhezivnih polimerov in mukusom, predstavljajo interakcije med lektini in sladkorji na površini celic korak naprej pri dostavi učinkovin, saj je vezava lektinov na tarčno mesto zelo specifična (slika 2B) (6, 9). Za proces citoadhezije lektinov je značilno, da so interakcije zelo specifične in jih lahko primerjamo s specifičnostjo interakcij med antigenom in protitelesom. Prednost citoadhezije pred mukoadhezijo je neposredna vezava na površino celic, kar pomaga pri prehajanju epitelijskih absorpcijskih barier. Prednosti takšnih DS so:

- (I) podaljšano zadrževanje neposredno na površini celic, neodvisno od obnavljanja mukusnega sloja,
- (II) sprožanje in sodelovanje pri vezikularnih transportnih procesih (endo- in transcitoza) in
- (III) sprememba permeabilnosti epitela z receptorsko posredovanim odpiranjem tesnih stikov med epitelijskimi celicami (8).

3.1 Mukoadhezivne lastnosti rastlinskih lektinov

Prebavni trakt sesalcev prekriva sloj mukusa, ki deluje kot drsilo; lajša gibanje himusa in ščiti pod njim ležeče tkivo pred delovanjem želodčnega soka, proteazami, patogenimi mikroorganizmi in tudi pred mehanskimi poškodbami (12). Pri človeku je debelina mukusnega sloja v različnih delih prebavnega trakta zelo različna in se giblje od 50–500 μm v želodcu do 50–150 μm v kolonu (13). V povprečju tvori mukus v prebavnem traktu človeka sloj z debelino 192 μm (3). Mucini so glikoproteini z molekulska maso večjo od 2×10^6 Da in so tvorilci gela (9). Glikoproteini črevesnega mukusa vsebujejo 77,5 % ogljikovih hidratov sestavljenih iz N-acetil-galaktozamina, N-acetil-glukozamina, galaktoze, fukoze in sialične kisline (3). Mucini predstavljajo le 0,5–4,0 % mase mukusa. Poleg mucinov in vode (~ 95 %) vsebuje mukus tudi soli (0,5–1 %), proste beljakovine (1 %), lipide in odluščene epitelijske celice (14).

Značilnosti interakcij med lektini in mucini so specifičnost, pH-odvisnost in reverzibilnost. Pri proučevanju interakcij med fluorescenčno označenimi analogi rastlinskih lektinov in glikoproteini želodčnega mukusa prašičev so ugotovili, da vpliva na vezalno kapaciteto mucinov za lektine pri nevtralnem pH poleg števila

specifičnih vezalnih mest tudi njihova sterična dostopnost. Ugotovili so, da imajo prašičji želodčni mucini največjo vezalno kapaciteto med preskušanimi lektini za aglutinin iz pšeničnih kalčkov («wheat germ agglutinin», WGA), saj se le-ta veže na sialično kislino, ki je pogosto terminalni del linearnih ali razvejanih glikoproteinov (12).

Vsebnost nativnih glikoproteinov je v želodčnem mukusu prašičev primerljiva z vsebnostjo glikoproteinov v črevesnem mukusu človeka, zato želodčni mukus prašičev uporabljajo v *in vitro* študijah za proučevanje interakcij med lektini in mukusom. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo na interakcije med mucini in lektini v prebavnem traktu človeka (12). Rezultati interakcij med WGA in prašičjimi želodčnimi mucini so pokazali največjo stopnjo vezave pri pH 5, kar pomeni, da se po peroralnem dajanju večina WGA veže v zgornjem delu duodenuma. Tako lahko sklepamo, da se le majhen delež lektiniziranega DS zaradi vezave na želodčni mukus ne adsorbira na mukus v tankem črevesu (9).

Čeprav predstavlja mukusni sloj difuzijsko bariero, so lahko mucini »lovilci« za lektinizirane DS zaradi specifičnih interakcij z lektini. Mukoadhezija lektiniziranih DS predstavlja prvo stopnjo v procesu ciljane dostave učinkovin. V raziskavah so ugotovili, da so interakcije med mucini in WGA reverzibilne, zato se lahko lektini sprostijo z mucinov in se specifično vežejo na prosta vezalna mesta na površini celičnih membran (6, 12).

3.2 Citoadhezivne lastnosti rastlinskih lektinov

Klasični polimerni mukoadhezivni DS se vežejo na mukus, kjer se učinkovina sprosti. Lektinizirani sistemi ciljajo dostavo učinkovin neposredno na celično površino enterocitov, kjer poteka absorpcija. Specifične interakcije med lektini in sladkorji glikokaliksa skrajšajo difuzijsko razdaljo, ki jo mora preiti učinkovina v procesu absorpcije. Hkrati pa velika lokalna koncentracija učinkovine na samem mestu absorpcije poveča koncentracijski gradient in s tem hitrost absorpcije ter zmanjša razgradnjo učinkovine z encimi v svetlini prebavnega trakta (5, 15).

Z namenom, da bi ocenili vezalno kapaciteto za lektine in proučili vzorec glikozilacije humanim enterocitom podobnih celičnih linij (Caco-2, HT-29, HCT-8), celic karcinoma prostate (Du-145) in celic karcinoma mehurja (5637) so s pretočno citometrijo in fluorimetrijo ugotavljali interakcije določenih lektinov z različnimi sladkorji (16, 17). Ugotovili so, da imajo celične linije največjo vezalno kapaciteto za lektin iz *Triticum vulgare*. WGA se ne veže le na rakave celice kolona, ampak tudi na humane kolonocite. Le-ti imajo petnajstkrat manjšo vezalno kapaciteto za WGA, še zmeraj pa nudijo veliko število vezalnih mest za lektinizirane DS (17).

Raziskave vezave WGA na izolirane receptorje za epidermalni rastni faktor («epidermal growth factor», EGF) in na *in vitro* model intestinalnega epitela (monosloj Caco-2 celic) so potrdile, da EGF-receptorji sodelujejo pri citoadheziji WGA (19). Ključna vloga EGF-receptorja pri vezavi lektinov odpira dve zanimivi področji za uporabo WGA pri dostavi učinkovin (15):

1. EGF-receptor je prekomerno izražen pri številnih rakavih obolenjih (npr. rak jeter, prsi, pljuč, mehurja), zato lahko pričakujemo, da bodo

z WGA lektinizirana predzdravila ali DS primerni za ciljano dostavo protitumornih učinkovin.

2. Celice, ki imajo izražen EGF-receptor so prisotne tudi v večini zdravih tkiv, zato lahko citoadhezivne lastnosti vezanega lektina omogočijo receptorsko pot privzema učinkovin in s tem povečanje njihove biološke uporabnosti.

4 Modificirana dostava učinkovin z lektini

Sluznice prebavnega, dihalnega in urogenitalnega trakta ter očesna sluznica, nudijo dve tarčni mesti za dostavo učinkovin s pomočjo lektinov: gelski sloj mukusa in glikokaliks epitelijskih celic. Mukus prekriva večino epitelov, kjer poteka absorpcija, in je prvo tarčno mesto za lektinizirane sisteme. Kadar lektiniziran DS preide sloj mukusa, je glikokaliks celic sekundarno tarčno mesto. Glikokaliks sestavljajo sladkorni deli proteoglikanov, glikolipidov in glikoproteinov, ki so zasidrani v lipidni dvosloj celičnih membran (15). Različne vrste celic imajo na površini izražene različne sladkorje. Prav tako se po vzorcu glikozilacije med seboj razlikujejo zdrave od obolelih celic (npr. rakavih). Tako lahko z uporabo lektinov dosežemo ciljano dostavo učinkovin v specifične celice in tkiva (1, 6).

4.1 Privzem lektinov v celice

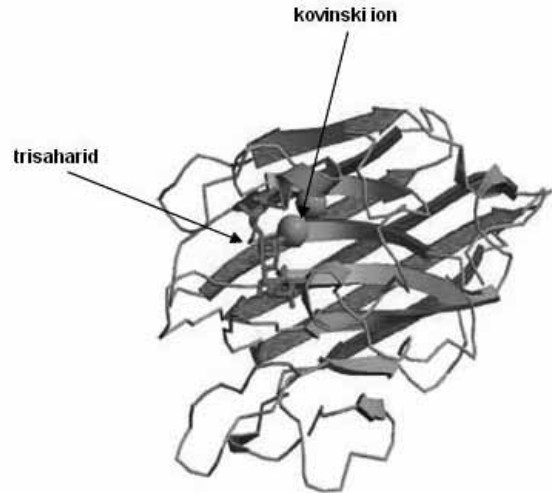
Vezavi lektiniziranih DS na membrane celic lahko sledi citoinvazija, ki jo sprožijo lektini. Privzem lektiniziranih DS v celice povzroči sprostitve vezalnih mest za lektine na površini celic. Rezultat je lahko pospešen intracelularni privzem lektiniziranih DS (6, 12), ki se lahko v celici razgradijo ali pa sledi transcelularni transport (3). V nasprotju s citoadhezijo, ki je konstantna in neodvisna od temperature, sta za proces privzema v celice potrebna povišana temperatura in daljši čas, kar so ugotovili z *in vitro* študijami vezave WGA na Caco-2 celice. Povečana fluidnost celičnih membran igra ključno vlogo pri privzemu lektinov v celice (3, 15). Glavna značilnost citoinvazije (slika 2C), ki jo sprožijo lektini, je aktiven transport. V skladu z ugotovitvijo, da je receptor za EGF vezavno mesto za lektine, lahko privzem lektinov pripišemo receptorski endocitozi. Kar 60 % WGA se po vstopu v celice nahaja v lizosomih. Ta lizosomska pot (slika 2 C in D) v celici je primerna za dostavo učinkovin, ki so stabilne v kislem. Učinkovina se iz lektiniziranega DS sprosti, ko pride do razgradnje ogrodja DS v lizosomih tarčnih celic (3). Receptorska pot privzema v celice omogoča premostitev epitelijske absorpcijske bariere po peroralnem dajanju, lahko pa jo izkoristimo tudi za prevajanje signalov v celice z namenom sprožanja vezikularnih transportnih procesov v ali skozi polarizirane epitelijske celice (2).

Receptorsko posredovan privzem učinkovin, vključno z lektinizacijo in ciljanjem glikoziliranih zunajceličnih domen membranskih receptorjev, je obetajoč pristop za povečanje absorpcije učinkovin z majhno biološko uporabnostjo. Veliko raziskovalnega dela pa je še potrebno, da bi ugotovili prednosti in slabosti takšnega ciljanja v *in vivo* pogojih.

4.2 Transcitoza lektinov

Na Caco-2 celicah so proučevali transport fluorescenčno označenih delcev z velikostjo 50 nm, ki so imeli na površini vezane lektine. Ugotovili so, da s pripenjanjem WGA na površino nanodelcev

dosežejo povečanje transcitoze za 20 %. Podobne izsledke so dobili tudi v raziskavah s konkavalinom A (slika 3) (20). Rezultati torej kažejo, da lektinizacija površine koloidnih dostavnih sistemov poveča njihov transcelularni transport (slika 2D) v *in vitro* pogojih. Nekateri strokovnjaki menijo, da tudi v *in vivo* pogojih pride do transcitoznega transporta lektinov, kar potrjuje detekcija aglutinina iz arašidov (lektin prisoten v prehrani) v periferni venski krvi (2).



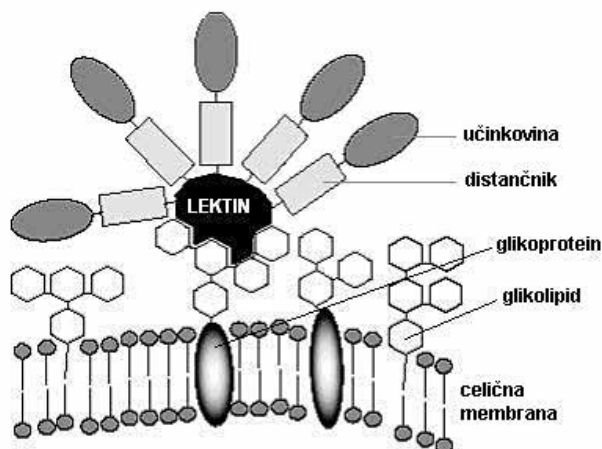
Slika 3: Struktura kompleksa konkavalina A s trisaharidom manoze (7).

Figure 3: Structure of concavalin A in complex with the trisaccharide of mannose (7).

5 Lektinizirana predzdravila

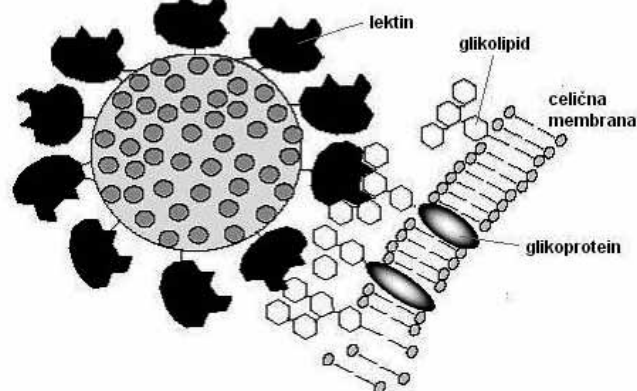
Lektinizirano predzdravilo je zgrajeno iz lektina kot dela namenjenega ciljanju specifičnih sladkorjev, učinkovine kot aktivnega dela in distančnika, ki povezuje oba dela (slika 4). Topnost takšnega predzdravila v vodnem okolju je pogoj za njegovo absorpcijo. Kadar lektiniziramo lipofilne učinkovine, zagotavlja topnost konjugata v vodi hidrofilni del, ki ga predstavlja lektin. Z izbiro ustreznega distančnika, ki povezuje molekulo učinkovine in lektin, lahko dosežemo sproščanje učinkovine pod točno določenimi pogoji (9). Kot primer lahko navedemo konjugat doksorubicina in WGA s cis-akonitinskim distančnikom, ki je nestabilen v kislem. Učinek ciljanja rakavih celic kolona s takšnim predzdravilom je posledica velike vezalne kapacitete rakavih celic kolona za WGA in sproščanja citostatika šele, ko le-ta doseže kislo okolje v lizosomih tarčnih celic (21).

Za učinkovito peroralno dostavo proteinov so potrebne oblike, ki preprečujejo inaktivacijo in izboljšajo absorpcijo takšnih učinkovin. Da bi odkrili, ali z lektini posredovana citoadhezija in citoinvazija poveča absorpcijo proteinov, so s stabilno amidno vezjo povezali fluorescenčno označen goveji serumski albumin in WGA ter spremljali vezavo in vstop takšnega konjugata v Caco-2 celice. Izsledki kažejo,



Slika 4: Shematski prikaz lektiniziranega predzdravila in njegovih interakcij z glikokaliksom enterocitov (3).

Figure 4: Schematic presentation of lectin-grafted prodrug and its interactions with the glycocalyx of enterocytes (3).



Slika 5: Shematski prikaz lektiniziranega nosilnega sistema z vgrajeno učinkovino in njegovih interakcij z glikokaliksom enterocitov (3).

Figure 5: Schematic presentation of lectin-grafted carrier system with incorporated drug and its interactions with the glycocalyx of enterocytes (3).

da WGA vpliva na privzem proteinov velike molekulske mase v celice in da lahko z uporabo lektinov premostimo membransko bariero pri dostavi proteinskih učinkovin (22).

6 Nosilni sistemi

Lektinizirani nosilni sistemi so DS pri katerih je površina rezervoarja (kot so mikrodcelci (23), nanodcelci (24) ali liposomi (25)) z vgrajeno učinkovino prekrita z lektini. Lektini na površini tako vodijo rezervoar z učinkovino na samo mesto absorpcije (slika 5).

Vgrajevanje učinkovin v ustrezne nosilne sisteme zaščiti učinkovine pred škodljivimi vplivi okolja (pH-vrednost, encimi). Hkrati je količina vgrajene učinkovine v nosilnem sistemu večja v primerjavi s količino učinkovine v predzdravilu, zato z dajanjem učinkovine vgrajene v mikrodcelce, nanodcelce ali liposome lažje dosežemo terapevtske koncentracije kot pri dajanju učinkovine v obliki predzdravila. Nadalje lahko ogrodje nosilnega sistema, omogoča nadzorovano sproščanje učinkovine (3). Modifikacija takšnega »trojanskega konja« z lektini pa lahko pripelje učinkovino neposredno na glikozilirano površino epiteljskih celic in sproži privzem DS v celice.

V procesu specifičnega ciljanja oligosaharidov z lektini so mucini prvo tarčno mesto. V kakšnem obsegu prevlada mukoadhezija nad ciljanjem sladkorjev glikokaliksa je odvisno od velikosti dostavnega sistema. Nanodcelci preidejo skozi sloj mukusa, medtem ko mikrodcelce večje od 1 μm zadrži sloj viskoznega mukusa (13, 26, 27). Po drugi strani so reverzibilne interakcije med mucini in lektini lahko prednost, saj zadrževanje DS v gelskem sloju mukusa upočasni hitrost potovanja lektinizirane oblike skozi prebavni trakt (9).

Prednost lektiniziranih koloidnih pred večjimi DS so tudi citoinvazivne lastnosti, ki so posledica lektinskega plašča. Osnovni pogoj, da lahko pripravimo lektinizirane nosilne sisteme, je prisotnost reaktivnih funkcionalnih skupin na površini delcev na katere lahko kovalentno vežemo izbrane lektine (28). Sinteza novih biorazgradljivih polimerov z reaktivnimi funkcionalnimi skupinami predstavlja tako korak naprej v razvoju lektiniziranih DS (29).

V študijah so proučevali možnost uporabe različnih lektinov (npr. WGA, konkavalina A) za izboljšanje transporta nanoddelcev iz črevesa v krvni obtok. Ugotavljali so vpliv velikosti, gostote lektinov na površini delcev in prisotnosti inhibitorjev na privzem lektiniziranih nanoddelcev (20). Raziskave so pokazale, da ima največji vpliv na stopnjo privzema gostota lektinov na površini delcev, manjši vpliv pa imata velikost in vrsta vezanega lektina (5).

Zanimivo je, da izkazujejo lektini vezani na nanodcelce večjo stopnjo transcitoze kot prosti lektini. Stopnja transcitoze se poveča z naraščajočo gostoto lektinov na površini nanoddelcev (20). Ta ugotovitev kaže, da lektinizirani nanodcelci verjetno sprožijo drugo pot prehoda skozi celice kot pa prosti lektini. Znanstveniki menijo, da lahko vezava lektinov na površino koloidnih delcev povzroči organizacijo receptorjev v skupke (klastre), kar vodi v povečan transcitozni prenos (3).

Z lektini modificirana dostava učinkovin, ki vključuje aktivne transportne procese epiteljskih celic, lahko postane učinkovit način za povečanje biološke uporabnosti učinkovin z majhno permeabilnostjo.

7 Dejavniki, ki omejujejo peroralno uporabo lektinov

7.1 Vpliv hrane in prebavnih encimov

Ciljanje tarčnega mesta z lektini lahko ovirajo ogljikovi hidrati prisotni v običajni prehrani ljudi. Obseg takšne neželene vezave je odvisen od specifičnosti uporabljenih lektinov. Tako lahko pričakujemo, da bodo DS z vezanimi lektini s specifičnostjo za glukozo ali galaktozo v veliki meri inaktivirale komponente hrane preden dosežejo tarčno mesto, medtem ko bodo DS z vezanimi lektini s specifičnostjo za sladkorje, ki jih je v prehrani le malo ali jih ni, pripeljali takšen DS na tarčno mesto (9).

Drug pomemben dejavnik povezan s peroralnim dajanjem je prisotnost proteolitičnih encimov v prebavnem traktu. Lektini kot del DS morajo biti odporni na encimsko razgradnjo, da lahko ohranijo sposobnost vezave na specifične sladkorje (9). Nekateri lektini (npr. WGA in lektin iz paradižnika) so odporni na kislo okolje in prisotnost proteolitičnih encimov v prebavnem traktu, kar sta dva temeljna pogoja za peroralno uporabo (3).

7.2 Imunogenost lektinov

Uporabnost lektinov v razvoju novih farmacevtskih oblik lahko zmanjšajo njihove antigenske lastnosti. Lektini so organizmu tuji proteini z veliko molekulsko maso in rigidno strukturo, zato lahko pričakujemo, da bodo v telesu izzvali lokalni in/ali sistemski imunski odgovor (9). Rastlinski lektini se med seboj močno razlikujejo v imunogenosti. Na primeru lektina iz paradižnika so dokazali, da peroralno zaužitje povzroči tvorbo specifičnih protiteles tako pri miših kot pri človeku (30). Posledično lahko prisotna protitelesa IgG in IgA nevtralizirajo tisti del lektiniziranega DS, ki predstavlja »naslov« za specifično ciljanje, in tako zmanjšajo privzem lektiniziranih predzdravil ali nosilnih sistemov (9).

Pri uporabi lektinov za dostavo učinkovin se moramo zavedati, da so že v krvi zdravih ljudi prisotna protitelesa proti proteinom v prehrani (tudi proti rastlinskim lektinom). Ugotovili so, da so interakcije protein-protein in ne interakcije ogljikov hidrat-protein tiste, ki so vključene v interakcije med protitelesi in lektini. Ker vezava protiteles na lektine ne vpliva na aglutinacijske lastnosti lektinov, lahko sklepamo, da sta vezavno mesto, ki predstavlja antigensko determinanto, in vezavno mesto za ogljikov hidrat, različni (9).

Običajno je del lektina, ki se specifično veže na določen oligosaharid, le majhen del celotne lektinske molekule. Ta ugotovitev kaže perspektivno pot za razvoj (s tehnologijo rekombinantne DNA) veliko manjših, lektinom podobnih molekul (lektinomimetikov), ki bodo manj toksični in/ali imunogeni kot nekateri naravni lektini, ohranili pa bodo sposobnost specifične citoadhezije in/ali citoinvazije (9).

Medtem ko je imunogenost nezaželen stranski učinek pri dostavi učinkovin, je imunostimulativni učinek nekaterih lektinov cilj peroralnega cepljenja. Vrsta imunskega odgovora, ki ga na tak način izzovemo, je močno odvisna od mesta absorpcije. Privzem antigena skozi Peyerjeve ploščice lahko povzroči lokalni imunski odgovor (IgA), medtem ko transport antigena skozi enterocite izzove sistemski imunski odziv (IgG) (3). Pri peroralnem cepljenju lahko vgradimo cepiva oz. antigene, ki povzročijo imunski odziv, v ustrezen DS.

Imunski odziv pri dajanju takšnega pripravka je odvisen od deleža absorbiranega antigena. S pripenjanjem lektinov na površino DS lahko povečamo transport v točno določen tip celic, kar sproži večji imunski odgovor.

Glikokaliks M celic se močno razlikuje od glikokaliksa enterocitov. Površino M celic prekriva tanjši sloj mukusa kot površino enterocitov kar olajša nanodelcem dostop do površine celic in omogoči povečanje transciptoznega transporta nanodelcev (13).

7.3 Toksičnost lektinov

Pred uporabo lektinov pri oblikovanju farmacevtskih oblik so nujne tudi študije varnosti le-teh. 30 % prehrane človeka, surove in kuhane, vsebuje sestavine z znatno hemaglutininso aktivnostjo in v 53 užitnih rastlinah najdemo lektine. Tako so nekateri lektini (npr. lektin iz paradižnika, WGA iz pšeničnih kalčnov) sestavni del človekove prehrane. Ti lektini naj bi bili z vidika toksičnosti za človeka varni. Obstajajo pa tudi podatki o znanih toksičnih učinkih določenih lektinov. Zelo znan primer povezan s toksičnostjo lektinov se je zgodil leta 1973 v Londonu. Sovjetska tajna služba je ubila tajnega agenta s konico dežnika, ki je bila prepojena z ricinom (3). Ricin (slika 6) je citotoksični protein iz semen rastline *Ricinus communis*, ki specifično in ireverzibilno blokira sintezo proteinov na ribosomih eukariotskih celic (31).



Slika 6: Struktura kompleksa prve domene podenote B ricina z laktozo (7).

Figure 6: Structure of the first domain of the B-subunit ricin in complex with lactose (7).

Dandanes še ni dokazana (ne)toksičnosti uporabe lektinov za ciljano dostavo učinkovin. Večina razpoložljivih podatkov je rezultat spremljanja uživanja lektinov v prehrani. Tako strokovnjaki menijo, da mikrogramske količine lektinov, ki so potrebne za z lektini posredovano dostavo učinkovin, nimajo toksičnih učinkov. Ta trditev izhaja iz razpoložljivih podatkov uživanja WGA v običajni prehrani (9).

Toksične učinke lektinov pa lahko izkoriščamo v terapevtske namene npr. v terapiji raka. Tako lahko lektin s toksičnim učinkom deluje kot molekula za specifično ciljanje določenega mesta oz. celic s specifičnim vzorcem glikozilacije, hkrati pa ima citotoksičen učinek (32).

8 Zaključek

Kljub številnim vprašanjem, ki še zmeraj ostajajo neodgovorjena, je ideja uporabe lektinov pri dostavi učinkovin več kot aktualna. Ker lektini selektivno prepoznajo določene sladkorje, ki so sestavni del glikokaliksa epitelijjskih celic, predstavlja oblikovanje lektiniziranih DS možnost selektivnega ciljanja določenega dela črevesa ali celo ciljanja določene vrste celic (npr. M celic). Citoadhezija in citoinvazija sta predpogoj za transcelularno absorpcijo, kar vodi v uspešno dostavo učinkovin, ki imajo drugače majhno biološko uporabnost.

Poleg specifičnega prepoznavanja sladkorjev lahko lektini izboljšajo dostavo učinkovin v sistemski krvni obtok s sprožanjem receptorske endo- ali transcitoze. Z lektini konjugirane učinkovine ali lektinizirani DS povečajo dostavo učinkovin skozi sluznice tako, da podaljšajo čas zadrževanja na mestu absorpcije in vzpodbujajo privzem v enterocite.

Koncept lektiniziranih dostavnih sistemov je aktualen zadnjih deset let. Omejitvam uporabnosti naravnih lektinov se lahko izognemo z modifikacijo lektinov z genskim inženiringom in biotehnologijo. Ekspresija rekombinantnih proteinov, ki imajo v strukturi vezavne domene za ciljanje absorpcijskega okna in sprožanje specifične endo- in transcitoze so možnosti, ki jih nudijo in izkoriščajo nove tehnologije za oblikovanje učinkovitejših in varnejših dostavnih sistemov.

9 Literatura

- Kennedy JF, Palva PMG, Corella MTS et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr Polym* 1995; 26: 219–230.
- Bies C, Lehr M, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 425–435.
- Gabor F, Wirth M. Lectin-mediated drug delivery: fundamentals and perspectives. *S.T.P. Pharma Sciences* 2003; 13: 3–16.
- Irache JM, Durrer C, Duchêne D et al. Bioadhesion of lectin-latex conjugates to rat intestinal mucosa. *Pharm Res* 1996; 13: 1716–1719.
- Minko T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Del Rev* 2004; 56: 491–509.
- Lehr CM. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J Control Release* 2000; 65: 19–29.
- Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 198–208.
- Haltner E, Easson JH, Lehr CM. Lectins and bacterial invasion factors for controlling endo- and transcytosis of bioadhesive drug carrier systems. *Eur J Pharm Biopharm* 1997; 44: 3–13.
- Gabor F, Bogner E, Weissenboeck A et al. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 459–480.
- Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Del Rev* 2005; 57: 1556–1568.
- Peppas NA, Buri PA. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Control Release* 1985; 2: 257–275.
- Wirth M, Gerhardt K, Wurm C et al. Lectin-mediated drug delivery: influence of mucin on cytoadhesion of plant lectins in vitro. *J Control Release* 2002; 79: 183–191.
- Zang N, Ping QN, Huang GH et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *Int J Pharm* 2005; 294: 247–259.
- Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through the mucus. *Adv Drug Del Rev* 2001; 48: 173–193.
- Wirth M, Kneuer C, Lehr CM et al. Studying cellular binding and uptake of bioadhesive lectins. V: Cell culture models of biological barriers. Taylor & Francis, New York, 2002.
- Gabor F, Stangl M, Wirth M. Lectin-mediated bioadhesion: binding characteristics of plant lectins on the enterocyte-like cell lines Caco-2, HT-29 and HCT-8. *J Control Release* 1998; 55: 131–142.
- Gabor F, Klausegger U, Wirth M. The interactions between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *Int J Pharm* 2001; 221: 35–47.
- Gabor F, Wirth M, Jurkovich B et al. Lectin-mediated bioadhesion: proteolytic stability and binding-characteristics of wheat germ agglutinin and *Solanum tuberosum* lectin on Caco-2, HT-29 and human colonocytes. *J Control Release* 1997; 49: 27–37.
- Lochner N, Pittner F, Wirth M et al. Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Pharm Res* 2003; 20: 833–839.
- Russell-Jones GJ, Veitch H, Arthur L. Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int J Pharm* 1999; 190: 165–174.
- Wirth M, Fuchs A, Wolf M et al. Lectin-mediated drug targeting: preparation, binding characteristics and antiproliferative activity of wheatgerm agglutinin conjugated doxorubicin in Caco-2 cells. *Pharm Res* 1998; 15: 1031–1037.
- Gabor F, Schwarzbauer A., Wirth M. Lectin-mediated drug delivery: binding and uptake of BSA-WGA conjugates using the Caco-2 model. *Int J Pharm* 2002; 237: 227–239.
- Kim BY, Jeong JH, Park K et al. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery systems. *J Control Release* 2005; 102: 525–538.
- Mo Y, Lim LY. Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *J Control Release* 2005; 107: 30–42.
- Ponchel G, Irache JM. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv Drug Del Rev* 1998; 34: 191–219.
- Hussain N, Jaitley V, Florence AT. Recent advances in understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv Drug Rev* 2001; 50: 107–142.
- Desai MP, Labhasetwar V, Walter E et al. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997; 14: 1568–1573.
- Montisci MJ, Giovannuci G, Duchêne D et al. Covalent coupling of asparagus pea and tomato lectins to poly(lactide)microspheres. *Int J Pharm* 2001; 215: 153–161.
- Rodrigues JS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB et al. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. *J Control Release* 2003; 92: 103–112.
- Naisbett B, Woodley J. The potential use of tomato lectin for oral drug delivery. 4. Immunological consequences. *Int J Pharm* 1995; 120: 247–254.
- Roberts LM, Smith DC. Ricin: the endoplasmic reticulum connection. *Toxicon* 2004; 44: 469–472.
- Heinrich EL, Welty Lily, Banner LR et al. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. *Acta Histochem* 2005; 107: 335–344.