

НОВОСТИ НАУКИ

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Долгоживущие белки

Короткая продолжительность пребывания в кровотоке белковых препаратов снижает их эффективность. Применение подхода, который сочетает белковую и полимерную инженерию, позволяет увеличить скорость циркуляции и усилить поглощение опухолями лекарственных препаратов.

В последние 25 лет наблюдается стремительное увеличение числа одобренных для практического применения белковых препаратов, полученных с помощью генной инженерии и предназначенных для лечения гормональных, метаболических, иммунологических, гематологических и репродуктивных нарушений, а также рака. В ранних исследованиях учёные пытались точно копировать природную нативную структуру белков, что позволило получить множество препаратов первого поколения. Потом, специалисты по белкам начали адаптировать природные структуры, сначала осторожно (например, изменяя несколько аминокислотных остатков, чтобы сделать более прочными или более специфичными взаимодействия с молекулой-мишенью), потом более ощутимо (например, соединяя два различных белка для получения нового белка, обладающего комбинированной функциональной активностью, которая не встречается в природе); в результате этих усилий появились препараты второго поколения.

Одним из недостатков белковых препаратов является их быстрое выведение из общей системы циркуляции. Научная группа А. Chilkoty (Duke University, Дарен, США) разработала комбинированный подход на базе белковой и полимерной инженерии, который позволяет повысить время циркуляции белка и увеличить накопление препарата в опухолях [1].

Идея связывания полимера с белком впервые возникла в конце 1970-х годов, наглядно подтвердив, что конъюгация нескольких копий растворимого в воде полимера с довольно низким молекулярным весом, не содержащего ионогенных групп, например, полиэтиленгликоля (ПЭГ), может продлить циркуляцию лечебных ферментов. Это исследование привело к применению "ПЭГилирования" белковых препаратов, некоторые из которых уже поступили на рынок.

Одним из примеров такого рода было Пэгилирование аспарагиназы, о котором наш журнал рассказывал ранее [2]. Другим примером преимуществ и сложностей ПЭГилирования является интерферон- $\alpha 2a$. Препарат пришивали по аминокислотным остаткам лизина к разветвлённой цепи ПЭГ 40 кДа. Несмотря на то, что белок связан только с одной полимерной цепью, ПЭГ может быть присоединён к любому из четырёх участков; сам по себе, препарат представляет собой смесь четырёх изомеров. Такая пришивка увеличивает гидродинамический радиус, делая препарат более объёмным и обеспечивая более длительное удерживание в кровотоке. ПЭГилированный интерферон- $\alpha 2a$ является удачным средством для лечения хронического гепатита С.

Однако, пришивка полимера к белковым препаратам связана с многими сложностями. Одной такой сложностью, как уже отмечалось, является возможность множественных участков конъюгации полимера, что ведёт к получению гетерогенного препарата. Вторая - является следствием ограничений размера полимерной цепи, которая может быть пришта к белку. Пришить конец длинного полимера к поверхности белка также трудно, как найти конец длинной верёвки в клубке. Альтернативный подход, разработанный группой Чилкоти, заключается в увеличении полимерной цепи на белковом препарате посредством полимеризации, что, в принципе, позволит пришивать полимерную цепь любой длины.

Методика, разработанная Чилкоти и соавт., имеет множество преимуществ. Для решения проблемы множественных участков конъюгации полимера, учёные применили приём белковой инженерии, чтобы пришить единичную химическую группу на карбоксильный конец белка. Эту группу они использовали для присоединения иницирующей молекулы, чтобы осуществить реакцию полимеризации, выбирая стратегически эффективный инициатор для реакции полимеризации, который обеспечивает точный контроль длины полимера в щадящих условиях, сопоставимых с хрупкой природой белков. Это обеспечило рост очень длинной разветвлённой полимерной цепи, состоящей из длинной основной цепи, покрытой короткими ПЭГ цепочками по всей ее длине, с полимером, присоединённым к карбокси-концевому участку белка.

Результатом такой конвергенции белковой и полимерной инженерии стал довольно крупный, разветвлённый на карбоксильном конце модельного белка полимер, который увеличил свой гидродинамический радиус почти в 7 раз, с 3 до 20 нм; увеличение в размере соответствует почти 300-кратному увеличению гидродинамического объёма. Пришитая полимерная цепь обеспечила существенное увеличение скорости циркуляции, которая, как показали авторы, имеет важное значение для выявления новообразований.

Микроциркуляторная часть сосудистого русла опухоли, как известно, более рыхлая, по сравнению с большинством нормальных тканей, и это различие было использовано для направленной доставки препаратов, конъюгированных с полимерами: они медленно "вытекают" из здоровых микрососудов, но быстро - из микрососудов, питающих опухоли. Однако, если препарат длительно не циркулирует, у него мало времени на вытекание из опухолевых микрососудов. 20-нанометровый полимерно-белковый конъюгат, действительно, показал увеличение скорости циркуляции: он проникал в опухоли у мышей в 50 раз эффективнее, чем немодифицированный белок. Для лечения больных, необходимо создать препарат, конъюгированный с полимером, а не с модельным белком, о котором идет речь в данной работе, и доказать, что полимер, присоединённый к С-концу белка, не нарушает функциональной активности лекарственного препарата.

Лечебные белки уже оказывают огромное влияние на здоровье человека и белковые конъюгаты с ПЭГ составляют значительное меньшинство среди них; однако, метод синхронизированной инженерии белка для полимера и полимера для белка, использованный группой Чилкоти, открывает новые возможности для разработки белковых лекарственных средств.

1. Gao W., Liu W., Christensen T., Zalutsky M.R., Chilkoti A. (2010) In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**(38), 16432-16437.
2. Кучумова А.В., Красоткина Ю.В., Хасигов П.З., Соколов Н.Н. (2007) Легилирование рекомбинантой аспарагиназы *Erwinia Carotovora* полиэтиленгликолем-5000. Биомед. химия, **53**, 107-111.

ГЕНОМНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Мрачный прогноз в отношении пациентов с раком поджелудочной железы часто связан с поздним диагностированием. По предварительным оценкам, от образования опухоли до ее превращения в злокачественную, проходит, минимум, 15 лет и это вселяет надежду на раннее выявление и предупреждение развития заболевания.

Секвенирование ДНК опухолевых клеток в сочетании с морфологическим исследованием хромосомных aberrаций обеспечивает более глубокое понимание развития рака. В журнале Nature появились две научные статьи [1, 2], в которых представлены данные секвенирования экзонов более чем 20000 генов из геномов пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы (4-я стадия). Полученные беспрецедентные результаты обеспечивают первое изображение с высоким разрешением (на уровне пар единичных оснований) не-генеративного мутационного спектра опухолей поджелудочной железы и их метастатических узлов.

Уже давно признано, что нестабильность генома является признаком ракового заболевания, однако, её значение для развития рака долгое время было предметом споров. Чтобы прояснить этот вопрос, группа учёных под руководством R.J. Campbell [1] исследовала последовательности ДНК и хромосомных перестроек и обнаружила, что специфичные хромосомные перестройки (Hold back inversions, т.е. инверсии конъюгации плеч хромосом), происходят почти во всех метастатических образованиях пациента. Более того, в отличие от других хромосомных перестроек, которые, вероятно, происходят либо в первичной, родительской опухоли, либо в метастазах, группа Campbell выявила инверсии конъюгации плеч хромосом как в первичной, так и в метастатической опухолях. Поэтому учёные утверждают, что инверсии конъюгации плеч хромосом происходят в начале онкогенеза и, вероятно, являются важным фактором развития рака поджелудочной железы.

Точное происхождение инверсий конъюгации - неизвестно. Возможно, что связанная с репликацией ДНК деградация теломеров (концевых участков хромосом), вероятно, вследствие ослабленного или неправильно функционирующего фермента теломеразы, инициирует периодические циклы разрыв-слияние, которые, в свою очередь, вызывают постепенную потерю генетического материала, а значит, геномную нестабильность. Интересно, что активность теломеразы, вероятно, восстанавливается в инвазивных опухолях, которые могут иметь стабилизирующее влияние на многие перестройки, индуцированные циклами разрыв-слияние, но не на другие перестройки.

Результаты, полученные группой Campbell, подтверждают наличие геномной нестабильности при развитии рака поджелудочной железы, но из-за больших различий в количестве, типе и позиции перестроек у пациентов - и даже между метастазами в одном и том же органе одного пациента - функциональные последствия этой нестабильности остаются неясными. Исследования большего числа пациентов с использованием методики секвенирования нового поколения, вероятно, позволят заполнить пробелы и определить движущие силы, способствующие развитию опухоли и метастазирования в различных типах рака.

Вторая группа ученых во главе с S. Yachida [2] изучала важный с клинической точки зрения вопрос о временных сроках, связанных с развитием опухоли: они провели геномное секвенирование метастазов рака поджелудочной железы и исследовали их филогенетическую связь с соответствующими, ранее секвенированными первичными опухолями у семи пациентов. В результате, ученые установили три временных срока: время от образования опухоли до появления клетки родительского (не метастатического) клона; время между

появлением родительского клона и приобретением им метастатического потенциала; и время от метастазирования до смерти пациента.

Авторы отмечают, что время от появления опухоли до метастазирования составляет минимум десять лет, т.е. предоставляется возможность для медицинского вмешательства до того, как рак распространится на отдаленные органы. Этот вывод не противоречит заключению, сделанному на основе количественного анализа возрастной заболеваемости раком поджелудочной железы среди населения в целом. По данным общего математического описания, признающего случайный характер накопления мутаций и клонального размножения при раке поджелудочной железы, более ранний анализ на базе данных, полученных среди населения, показал, что среднее время от появления мутации инициирующей опухоль до клинического диагноза, может составлять от пяти до шести десятилетий.

На первый взгляд, временные оценки на основе анализов среди населения кажутся более продолжительными, чем полученные группой Yachida, однако, следует иметь в виду, что временные оценки на базе сиквенсов не являются общими: они не относятся к усредненному значению времени для всех поражений поджелудочной железы с раковым и метастатическим потенциалом в ткани; скорее, они относятся к единственному поражению в ткани, которое, случайно, приводит к образованию первой первичной опухоли в данной ткани. Таким образом, временные расчеты группы Yachida следует рассматривать как нижнюю границу для среднего времени поражения поджелудочной железы, типа интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы, которая может вызывать инвазивный и метастатический рак. С клинической точки зрения, важное значение имеет перспективный риск заболевания, который может повлечь за собой множественные поражения, каждое из которых, самостоятельно, может перерасти в рак. Таким образом, временные оценки, установленные группой Yachida, являются хотя и условными, но клинически важными.

Эти два исследования - одни из первых - связаны с изучением биологических и клинических аспектов данных о последовательностях для отдельных опухолей. Прогресс в технологии секвенирования - а он, действительно, имеет место, даже если мы его не замечаем, - позволит, вероятно, получить более интересные подробности об эволюционных процессах, участвующих в развитии опухоли. Следует надеяться, что такая информация не только углубит наше понимание развития ракового процесса, но и приведет к новым подходам для ранней диагностики рака, улучшения прогнозирования и, в конечном счёте, для предупреждения развития ракового заболевания.

1. *Campbell P.J., Yachida S., Mudie L.J., Stephens P.J., Pleasance E.D., Stebbings L.A., Morsberger L.A., Latimer C., McLaren S., Lin M.L., McBride D.J., Varela I., Nik-Zainal S.A., Leroy C., Jia M., Menzies A., Butler A.P., Teague J.W., Griffin C.A., Burton J., Swerdlow H., Quail M.A., Stratton M.R., Iacobuzio-Donahue C., Futreal P.A. (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. Nature, 467(7319), 1109-1113.*
2. *Yachida S., Jones S., Bozic I., Antal T., Leary R., Fu B., Kamiyama M., Hruban R.H., Eshleman J.R., Nowak M.A., Velculescu V.E., Kinzler K.W., Vogelstein B., Iacobuzio-Donahue C.A. (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. Nature, 467(7319), 1114-1117.*

ТЫСЯЧИ ГЕНОМОВ

Десять лет назад двух пальцев было достаточно, чтобы сосчитать количество секвенированных геномов человека. До прошлого года хватало пальцев на двух руках. Сегодня скорость секвенирования растет так быстро, что трудно уследить. Тем не менее редакция журнала Nature обратилась в более чем 90 геномных центров и лабораторий с просьбой подсчитать приблизительно количество последовательностей генома человека, находящихся в работе. Несмотря на то, что подсчет был далеко не полным, он показал, что к концу октября 2010 будет секвенировано, минимум 2700 геномов человека, а к концу 2011 г общее число секвенированных геномов превысит 3000.

Почему учёные хотят иметь десятки тысяч геномов - и больше?

1. Чтобы понимать население.

Сравнение множества геномов позволяет исследователям выявлять точки отличия отдельных геномов. Несмотря на возможное снижение стоимости исследований, секвенирование и анализ данных продолжают оставаться слишком дорогими. Поэтому многие исследователи сталкиваются с проблемой выбора между количеством объектов исследования и точностью секвенирования, которую они могут обеспечить. Для проектов, нацеленных на исследование общих отличий среди населения, секвенирование геномов большого числа людей с довольно низкой точностью или "глубиной покрытия" является вполне достаточным. Примерно 900 геномов, секвенированных на настоящий момент по Проекту 1000 Геномов, были прочитаны в среднем 3 раза.

2. Чтобы понимать заболевание.

Для выявления мутаций, связанных с редкими заболеваниями, которые ограничены, возможно, только одной семьей или одним человеком, требуется максимальная точность; как правило, каждый геном секвенируется, в среднем, 30 раз. Геномы раковых клеток, многие из которых секвенированы в результате большой совместной работы, составляют значительную часть последовательностей геномов, секвенированных на сегодняшний день. Начинают появляться проекты, предназначенные для исследования больных, страдающих диабетом, болезнью Крона и другими нарушениями. Анализ всех данных о геноме является такой же огромной проблемой, как и превращение генетических открытий в клинические выгоды.

3. Достижения науки на службе у населения.

Новейшие технологии секвенирования существуют уже не только в нескольких крупных центрах; Британский институт Сэнгера (компания Wellcome Trust) имеет 38 (из общего числа по стране) высокопроизводительных секвенаторов, остальные находятся на других 32 объектах. Удешевление процесса секвенирования означает, что геном человека становится доступным для исследований в отдельных лабораториях.

4. Появление геномных фабрик.

В некоторых лабораториях продолжают пока считать, что дешевле и легче секвенировать геном человека на стороне - у "провайдера сервисных услуг по секвенированию". Фирма BGI в Шэньдзэне, имеющая глобальные планы по распространению таких услуг, прогнозирует, что к концу 2011 г. будет секвенировано примерно 10000-20000 геномов человека.

5. Чтобы понимать отдельных людей.

Скорость, с которой секвенируются геномы человека - по крайней мере, в мега-проектах - будет, вероятно, сбавляться, тем более, что исследователям удалось выявить большую часть общей изменчивости, существующей между населением и вследствие заболеваний. Однако, каждый человек генетически уникален; если стоимость секвенирования генома станет незначительной, а эффективность результатов будет расти (благодаря гено-ориентированной медицине), то секвенирование персонального генома будет способствовать всё большему увеличению числа сиквенсов геномов.

По материалам журнала Nature.
Перевод выполнен Григорян Е.А.