



УДК 577.152.34.042:577.112.34

МОДИФИКАЦИЯ ОСНОВНОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ ПРОИЗВОДНЫМИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 1998 г. О.П. Тюрина[‡], Е.В. Малых, Н.Г. Балабушевич, Н.И. Ларионова

Московский государственный университет им.М.В.Ломоносова, химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 12.08.97 г. Принята к печати 19.01.98 г.

Разработан метод модификации основного панкреатического ингибитора протеиназ (ВРТИ) N-гидроксисукцинимидными эфирами олеиновой и стеариновой кислот в смеси органических растворителей диметилсульфоксид – диметилформамид – диоксан – пиридин. Получены препараты ВРТИ, содержащие от 1 до 3 ацилированных аминогрупп. Показано, что модификация ВРТИ по одной аминогруппе с предварительной обратимой защитой активного центра практически не влияет на активность гидрофобизованных препаратов. С увеличением числа ацилированных аминогрупп до трех удельная активность ингибитора уменьшается до 28% от первоначальной. Увеличение гидрофобности модифицированного ингибитора относительно нативного продемонстрировано спектральным методом и распределением в системе вода – тритон X-114.

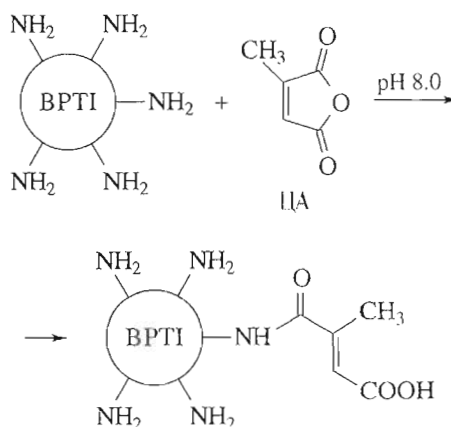
Ключевые слова: основной панкреатический ингибитор протеиназ, гидрофобизация, органические растворители; спектр поглощения; фазовое распределение.

Создание лекарственных препаратов, способных проникать через мембрану внутрь клетки, – одна из важных проблем фармакологии. Белки и полипептиды в силу своей высокой специфичности и эффективности являются перспективными лекарственными средствами. Анализ литературы показывает, что модификации белков и полипептидов, увеличивающие их мембранотропность, повышают эффективность взаимодействия модифицированных соединений с гидрофобными компонентами мембраны [1]. Известно, что в состав фосфолипидов входят остатки жирных кислот, образующие в бислоистой структуре мембраны внутреннюю неполярную область. Поэтому одним из самых распространенных методов гидрофобизации белков является их модификация с использованием ацилирующих реагентов на основе жирных кислот [2, 3].

Настоящее исследование посвящено разработке метода модификации производными жирных кислот основного панкреатического ингибитора протеиназ (ВРТИ), широко применяющегося в клинической практике более 40 лет [4], и изучению свойств полученных препаратов.

На поверхности молекулы ВРТИ находится 5 свободных NH₂-групп (Lys в положениях 15, 26,

41, 46 и Arg1), одна из которых – ε-NH₂-группа остатка Lys15 – входит в активный центр [5]. Ее модификация приводит к полной потере активности белком [6], поэтому для получения высокоактивного гидрофобизованного препарата необходимо предварительно обратимо защитить данную группу. Предварительные эксперименты показали, что наиболее простым и эффективным методом защиты ε-NH₂-группы ВРТИ является ее цитраконилирование:



При подборе условий реакции необходимо было учитывать следующие требования: после цитраконилирования при максимально возможной в данных условиях потере ингибирующей активности ВРТИ должны оставаться свободными 1–3 NH₂-группы для последующей модификации. Для

Сокращения: ВРТИ – основной панкреатический ингибитор протеиназ, ЦА – цитраконовый ангидрид.

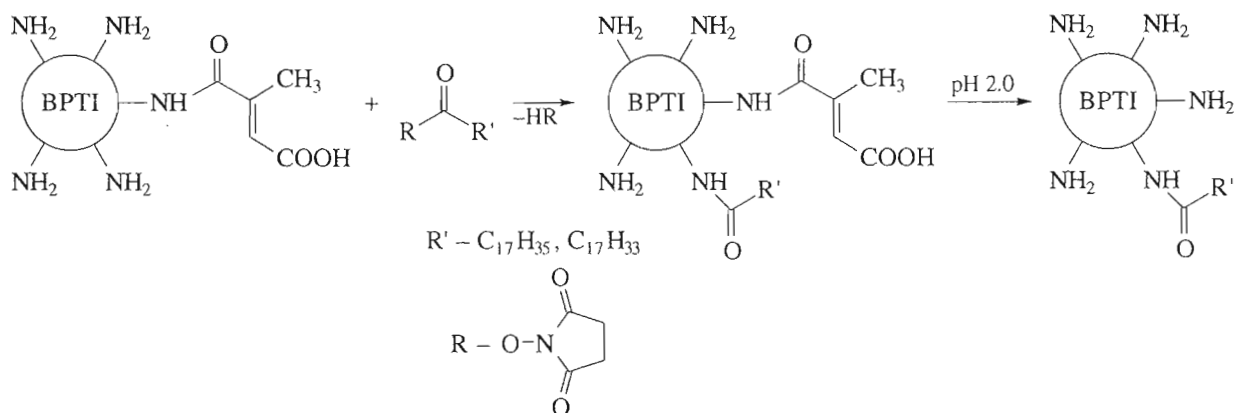
[‡] Автор для переписки.

этого при проведении реакции с цитраконовым ангидридом (ЦА) варьировались такие параметры, как концентрация белка, мольное соотношение [ЦА] : [ВРТИ]. Были получены цитраконилированные образцы, содержащие 1–3 свободных NH_2 -группы на 1 моль белка и обладающие остаточной активностью 0–20 %.

Ацилирование белков и полипептидов реагентами на основе жирных кислот осуществляется часто в среде органических растворителей. Наиболее распространены диметилсульфоксид [7], диметилформамид [8] или их смеси в различных соотношениях [9]. Однако необходимо учитывать возможное денатурирующее действие таких сред на белок [10].

ВРТИ растворяется как в DMSO, так и в смеси DMSO–DMF и, выделенный из данных растворов, сохраняет более 50% ингибирующей активности. В моделирующей реакции ацилирования системе, содержащей DMF, белок растворяется быстрее и активность сохраняется более высокой (табл. 1).

В данной работе в качестве модифицирующих агентов использовали N-гидроксисукцинимидные эфиры стеариновой и олеиновой кислот. Как было показано ранее [11, 12], такие реагенты – одни из самых реакционноспособных модификаторов, достаточно устойчивы как в водной, так и в органической среде. Реакцию проводили с эквивалентным по отношению к числу свободных NH_2 -групп количеством реагента с последующим снятием цитраконовой защиты:



Выделение препаратов гидрофобизованных белков обычно осуществляется хроматографическими методами, например [3,13]. Нами был применен более простой и быстрый метод, основанный на известном принципе изоионного осаждения [14].

Таблица 1. Растворимость препаратов ВРТИ в смеси органических растворителей

Смесь*	Остаточная активность ВРТИ, %	Время растворения ВРТИ (2,5 мг/мл), мин
DMSO–диоксан–пиридин (8 : 1 : 0.25)	52	120
DMSO–DMF–диоксан–пиридин (7 : 1 : 1 : 0.25)	70	15

*Смесь растворителей моделирует реакционную среду (без добавления ацилирующего агента): диоксан – растворитель для N-гидроксисукцинимидных эфиров жирных кислот, пиридин – основание и катализатор реакции ацилирования.

Согласно этому принципу, некоторые белки способны осаждаться из водных растворов при рН, близком к величине их pI , за счет «слипания» белковых глобул. Из табл. 2 видно, что изоионное осаждение после снятия цитраконовой защиты наблюдается только для гидрофобных препаратов ВРТИ. Следовательно, в данном случае модифицированные белки имеют более низкие значения pI , чем нативный белок (pI ВРТИ – 10.5 [15]), в соответствии с интервалами рН их осаждения. Изменение pI гидрофобизованных белков связано, по-видимому, с уменьшением общего положительного заряда за счет модификации NH_2 -групп.

С помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле было показано отсутствие нативного ингибитора в гидрофобизованных образцах, выделенных с помощью изоионного осаждения. Важно, что при помощи изоионного осаждения оказывается возможным получить активный модифицированный препарат, содержащий только одну ацилированную жирной кислотой аминоксигруппу.

Препараты ВРТИ, содержащие одну модифицированную аминоксигруппу, сохраняют 85–93%

Таблица 2. Свойства гидрофобизованных препаратов ВРТИ

Препарат*	Число модифицированных NH ₂ -групп	Способность к осаждению**	Остаточная активность белка, %	Выход по белку, %	Содержание белка в фазе тритона X-114, %	Содержание белка в водной фазе, %
ВРТИ	–	–(pH 2–12)	100	–	37	59
ВРТИ'	–	–(pH 2–12)	70	80	28	72
Олеоил – ВРТИ	1	+(pH 8–10)	65	35	62	38
Олеоил – ВРТИ'	3	+(pH < 8)	20	15	76	24
Стеароил – ВРТИ	1	+(pH 8–10)	60	23	67	33
Стеароил – ВРТИ'	3	+(pH < 8)	20	20	80	20

* Препарат ВРТИ – цитраконилированный, выдержанный в среде ацилирования без добавления ацилирующего агента и децитраконилированный.

** В скобках указан интервал pH, при котором нет (–) или есть (+) осаждение.

активности цитраконилированного ВРТИ, выдержанного в среде ацилирования без добавления ацилирующих реагентов, и децитраконилированного (обозначен ВРТИ'). Следовательно, модификация ВРТИ по одной аминогруппе практически не влияет на активность гидрофобизованных препаратов. С увеличением числа ацилированных аминокислотных групп активность препаратов ВРТИ уменьшается.

Невысокий выход каждого из гидрофобизованных препаратов по сравнению с образцом ВРТИ имеет несколько причин – прежде всего недостаточно полное осаждение ацетоном гидрофобизованных препаратов. Объяснить это можно их частичным растворением в ацетоне за счет большей гидрофобности. С другой стороны, в использованных условиях реакции ацилирования из исходного цитраконилированного ВРТИ с определенным содержанием свободных NH₂-групп в отсутствие избытка модификатора всегда получается препарат, содержащий примесь нативного белка.

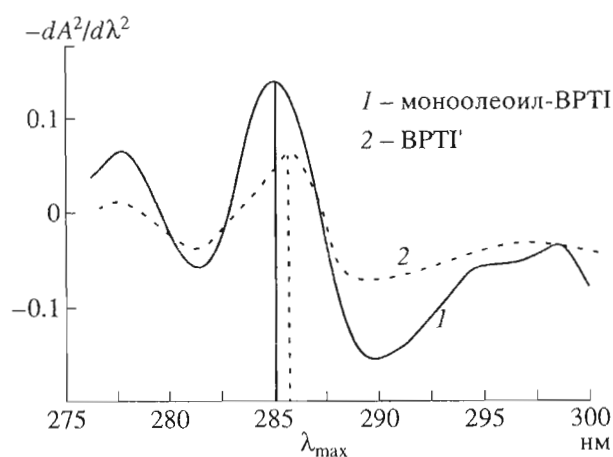
Для исследования гидрофобности полученных препаратов ВРТИ были сняты вторые производные спектров УФ-поглощения (рисунок) [16]. Известно, что в диапазоне длин волн 275–300 нм в молекуле белка поглощают только ароматические остатки Тр и Туг (в состав молекулы ВРТИ входят четыре остатка Туг в положениях 10, 21, 23, 35). При обсуждении влияния модификации на спектр поглощения остатков Туг нужно помнить, что в молекуле ВРТИ могут ацилироваться четыре остатка Lys (15, 26, 41, 46) и Arg1. Согласно данным рентгеноструктурного анализа [17], остатки Туг10 и Туг21 находятся в непосредственной близости от остатков Lys41 и Lys46 соответственно. Можно предположить, что модификация этих остатков Lys производными жирных кислот повлияет на полярность микроокружения остатков Туг, что отразится на виде спектра.

Из полученных данных видно, что значение максимальной длины волны (λ_{\max}) для спектра

моноолеил-ВРТИ сдвинуто по сравнению с λ_{\max} для ВРТИ' в длинноволновую область. Этот факт говорит об уменьшении полярности микроокружения остатков тирозина у гидрофобизованного белка, что хорошо согласуется с приведенными выше рассуждениями.

Другим доказательством большей гидрофобности модифицированных препаратов ВРТИ являются результаты распределения этих образцов в системе вода – тритон X-114 (табл. 2). Данный метод позволяет определять содержание белка в каждой фазе отдельно [18].

С увеличением числа модифицированных аминокислотных групп наблюдается тенденция к увеличению содержания препаратов в органической фазе. Следовательно, повышается гидрофобность белка. Стеароил-ВРТИ проявляет меньшее сродство к водной фазе по сравнению с олеоил-ВРТИ, что



Вторая производная спектров УФ-поглощения остатков тирозина препаратов ВРТИ' и моноолеил-ВРТИ. Условия определения: концентрация белковых препаратов 0,5 мг/мл, препараты были растворены в подкисленной 0,05 М HCl до pH 6,0.

связано с отсутствием ненасыщенной связи в гидрофобном радикале.

Таким образом, в результате данной работы синтезированы активные, очищенные от нативного белка и других примесей гидрофобные производные основного панкреатического ингибитора протеиназ, содержащие от 1 до 3 модифицированных аминокрупп.

Необходимо подчеркнуть, что разработанный нами метод гидрофобизации может быть применим и к другим белкам, способным растворяться в органических растворителях и не подвергаться под их действием существенным конформационным изменениям.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N-гидроксисукцинимидные эфиры стеариновой и олеиновой кислот, цитраконовый ангидрид, тритон X-114 (Sigma, США), другие реактивы были отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

Ингибирующую активность препаратов ВРТИ измеряли как описано в работе [19]. Концентрацию белка определяли методом Лоури [20]. Содержание аминокрупп в препаратах нативного и модифицированного ингибитора контролировали спектрофотометрически с помощью 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты [21]. Распределение препаратов ВРТИ в системе вода-тритон X-114 определяли по методике, описанной в работе [18].

Получение цитраконилированного ВРТИ. 80 мг ВРТИ растворяли в 4 мл 1 М NaHCO₃ (рН 8.0). Затем добавляли 30 мкл раствора цитраконового ангидрида в 1 М NaHCO₃ и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Количество добавляемого в отдельных опытах ангидрида составляло 2–4 моль на 1 NH₂-группу. Обессоливание цитраконилированных образцов ВРТИ проводили с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-25 (3 × 32 см) в растворе 0.05 М бикарбоната аммония. Фракции, содержащие обессоленный цитраконилированный ингибитор, объединяли и лиофильно высушивали. Полученные образцы содержали 1–3 свободные NH₂-группы на 1 моль белка, остаточная ингибирующая активность составляла 0–20%.

Ацилирование цитраконилированного ВРТИ в среде органических растворителей. 16 мг цитраконилированного ВРТИ перемешивали 15 мин в 7 мл смеси DMSO – DMF (7 : 1). К раствору добавляли 0.8 мл раствора N-гидроксисукцинимидного эфира стеариновой или олеиновой кислот в диоксане. Количество модификатора рассчитывали по числу свободных аминокрупп в ацилируемом препарате цитраконилированного ВРТИ из расчета 1 : 1. К реакционной смеси добавляли пиридин (0.2 мл) и перемешивали 12 ч при комнатной тем-

пературе. Белок осаждали пятикратным объемом холодного (–20°C) ацетона и отделяли центрифугированием (10 мин, 4200 об./мин). Осадок 3 раза промывали холодным ацетоном и высушивали на воздухе.

Снятие цитраконовой защиты и изоионное осаждение. Полученный цитраконилированный, ацилированный препарат растворяли в воде, доведенной 20% NaOH до рН 11, затем подкисляли раствором 5 М HCl до рН 2 и перемешивали 5 ч при комнатной температуре для снятия защиты.

Для проведения изоионного осаждения добавляли 20% раствор NaOH до значения рН среды, при котором начинается помутнение. Затем раствор оставляли при комнатной температуре на 2–3 ч. Образовавшийся осадок центрифугировали (10 мин, 1600 об./мин) и 2 раза промывали водой с соответствующим рН. Полученный препарат лиофильно высушивали и характеризовали по следующим параметрам: содержанию свободных NH₂-групп, содержанию белка и остаточной активности.

Данная работа частично финансировалась из средств Государственной научно-технической программы 08.05 “Новейшие методы биоинженерии” (направление – “Инженерная энзимология”, грант № 2-23/0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lipid Modification of Proteins/ Ed. N.M. Hooper, A.J. Turner: Oxford–New York–Tokyo: Oxford University Press, 1992.
2. Левашов А.В., Кабанов А.В., Хмельницкий Ю.Л., Березин И.В., Мартинек К.// Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. С. 246–249.
3. Ekrami H.M., Kennedy A.R., Shen Wei-Chiang// FEBS Lett. 1995. V. 371. P. 283–286.
4. Сыновец А.С., Левицкий А.П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. Киев: Здоровье, 1985. С. 71.
5. Stroud R.M., Kay L.M., Dickerson R.E.// Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1972. V. 36. P. 125–140.
6. Chauvet J., Acher R.// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. P. 230–235.
7. Ando Y., Inoue M., Utsumi T., Morino Y., Araki S.// FEBS Lett. 1988. V. 240. P. 216–220.
8. Muneaki H., Kanji T., Yoshiaki K.// Pharm. Res. 1989. V. 6. P. 171–175.
9. Kurtzhals P., Havelund S.// J. Biochem. 1995. V. 312. P. 725–731.
10. Белова А.Б., Можяев В.В., Левашов А.В., Сергеева М.В., Мартинек К., Хмельницкий Ю.Л.// Биохимия. 1991. Т. 56. С. 1923–1945.
11. Lapidot Y., Rappoport S., Wolman Y.// J. Lipid Res. 1967. V. 8. P. 142–145.
12. Sloodboom A.L., Willigen G.V., Akkerman J.W.N. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 238. P. 70–76.

13. Кабанов А.В., Клибанов А.Л., Торчилин В.П., Мартинек К., Леващов А.В.// Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 1321–1324.
14. Скоулс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985.
15. Kassel B., Radicevic M., Berlow S., Peanasky R.J., Laskowski M.S.// J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 3274–3278.
16. Шевченко А.А., Кост О.А., Казанская Н.Ф.//Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 263–267.
17. Wlodawer A., Walter J., Huber R.// J. Mol. Biol. 1984. V. 180. P. 301–329.
18. Bordier C.// J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 1604–1607.
19. Ларионова Н.И., Казанская Н.Ф., Сахаров И.Ю.// Биохимия. 1977. Т. 42. С. 1237–1243.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.// J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
21. Fields R.// J. Biochem. 1971. V. 124. P. 581–590.

The Modification of Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor by Fatty Acid Derivatives

O. P. Tyurina^{*}, E. V. Malykh, N. G. Balabushevich, and N. I. Larionova

Department of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

A procedure was developed for the modification of basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by *N*-hydroxysuccinimide esters of oleic and stearic acids in a DMSO–DMF–dioxane–pyridine mixture with a temporary citraconyl protection of the amino group belonging to its active site. The BPTI derivatives containing from one to three acylated amino groups were obtained. It was shown that the hydrophobized BPTI with one amino group modified retained practically the full activity of the native inhibitor. An increase up to three acylated groups resulted in a decrease in the specific activity of the inhibitor to 28% of the initial activity. An increase in hydrophobicity of the modified inhibitors was demonstrated by the spectral method and by the distribution in a water–triton X-114 system.

Key words: basic pancreatic trypsin inhibitor, hydrophobization, organic solvents; absorption spectrum; phase distribution

^{*} To whom correspondence should be addressed.