



УДК 547.96.04

СПОСОБ УЛУЧШЕНИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ГИДРОФИЛЬНОГО БЕЛКА
С ЛИПОСОМАМИ*Торчилин В. П., Клибанов А. Л.**Всесоюзный кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

В последние годы в литературе все активнее обсуждается вопрос о возможности направленного транспорта лекарств с помощью липосом [1, 2]. С этой целью с наружной поверхностью липосомы, несущей лекарство, предполагается связывать макромолекулу, обладающую специфическим средством к ткани или органу-мишени. При этом большое значение приобретает разработка способов прочного связывания с липосомами достаточного количества аффинного белка без ухудшения его распознающей и связывающей способности.

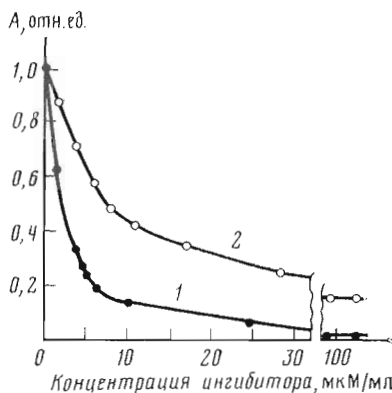
Ранее нами был описан способ ковалентного связывания белков с поверхностью липосом через «ножку» [3], позволяющий достаточно эффективно связывать с мембраной гидрофильные белки, которые при этом сохраняют свои специфические свойства. Применимость такого подхода была уже доказана на примере антител против сердечного миозина, когда в эксперименте на животных связанные описанным способом антитела оказались способны транспортировать «груженые» липосомы в зону некроза при экспериментальном инфаркте миокарда [4]. Тем не менее ни в одном случае нам не удалось связать с липосомой белок в количестве более $7 \cdot 10^{-5}$ моль/моль липида.

В то же время хорошо известно, что интегральные мембранные белки легко встраиваются в мембрану липосом в больших количествах — до 1 молекулы белка на 14 молекул липида, как, например, в случае цитохрома b_5 [5]. Как было выяснено в многочисленных опытах по реконструкции природных биомембран, основное отличие интегральных мембранных белков от немембранных состоит в том, что первые содержат значительные

Встраивание нативного и гидрофобизованного
 α -химотрипсина в мембрану липосом

Степень модификации аминогруппы белка пальмитат-хлоридом, %	Связанный белок, моль/моль липиды
—	$1,3 \cdot 10^{-5}$
6	$1,3 \cdot 10^{-4}$
22	$3 \cdot 10^{-4}$

Примечание. Концентрация белка в растворе при получении липосом $2,5 \cdot 10^{-5}$ М. Количество α -химотрипсина, связанного с поверхностью липосом, определяли по его каталитической активности.



Ингибирование высокомолекулярным панкреатическим ингибитором гидролиза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина пассивным α -химотрипсином (1) и пальмитоилированным α -химотрипсином, встроенным в мембрану липосомы (2)

гидрофобные участки или «хвосты» и прочно удерживаются в мембране за счет гидрофобных взаимодействий [6].

Отсюда естественно возникает мысль об искусственной гидрофобизации гидрофильных белков, которые в результате должны значительно повысить свое сродство к фосфолипидной мембране. Одним из простейших методов такой гидрофобизации может служить тривиальная модификация свободных аминогрупп белка реакционноспособными производными длинноцепных жирных кислот. При этом степень «гидрофобизации» можно легко регулировать типом жирной кислоты или глубиной модификации.

Правомерность такого подхода была проверена нами на модельной системе из липосом, полученных из смеси яичного лецитина и холестерина (мольное отношение 8 : 2), и гидрофильного немембранного белка — α -химотрипсина, гидрофобизацию которого проводили ацилированием свободных аминогрупп хлорагидридом пальмитиновой кислоты. Предварительно было показано, что использованная предельная глубина модификации не слишком сказывается на активности фермента.

Для связывания модифицированного белка с липосомами использовали холатный метод [7], обычно применяемый для реконструкции систем с интегральными мембранными белками.

Как следует из данных таблицы, по мере увеличения степени модификации белка, т. е. его «гидрофобности», связывание белка с липосомами возрастает, указывая на решающую роль именно гидрофобного взаимодействия в этом связывании. В результате удается связать до $3 \cdot 10^{-4}$ моль активного белка на 1 моль липида, что заметно превышает величину, достигнутую при ковалентном связывании [3].

Интересно, что при разрушении полученных описанным способом липосом с пассивным и пальмитоилированным α -химотрипсином тритоном X-100 ферментативная активность системы возрастала в случае нативного фермента в 5 раз, а в случае модифицированного — только в 2 раза. Это может указывать на полное встраивание содержащегося в липосомах модифицированного белка в мембрану и на его равномерное распределение между наружной и внутренней сторонами бислоя липидов.

Исследование способности встроенного описанным способом в липосому фермента взаимодействовать с высокомолекулярным ингибитором (своего рода модель взаимодействия связанной аффинной молекулы с мишенью), результаты которого приведены на рисунке, показало, что ингибирование панкреатическим ингибитором иммобилизованного на липосоме пальмитоилированного белка лишь немногим хуже, чем ингибирование нативного фермента.

Таким образом, искусственное уподобление немембранного гидрофильного белка мембранному гидрофобному может заметно улучшить его способность связываться с липосомами. Разумеется, условия «гидрофобизации» и последующего связывания должны быть выбраны так, чтобы возможно меньше изменить специфические свойства белка.

Экспериментальная часть

Использовали α -химотрипсин, яичный лецитин, холестерин, холевую кислоту и панкреатический ингибитор трипсина — продукты фирмы Sigma (США), пальмитоилхлорид (Supelco, США), этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Koch-Light, Англия), [^{14}C]холестерин (43 Ки/моль, Amersham, Англия).

Для получения пальмитоилированного химотрипсина в раствор 1% холата добавляли раствор пальмитоилхлорида в ацетоне до итоговой концентрации 1—4 мг/мл, обрабатывали смесь ультразвуком для диспергирования и быстро добавляли раствор фермента до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. Затем смесь инкубировали 2 ч при 4°С и рН 8. Осадок отделяли центрифугированием в течение 1 ч при 20 000*g*. Степень модификации варьировали изменением концентрации пальмитоилхлорида.

Степень модификации аминокрупп белка определяли спектрофотометрическим титрованием свободных аминокрупп тринитробензолсульфонкислотой [8].

Для получения белоксодержащих липосом раствор нативного или модифицированного фермента в 1%-ном холате (концентрация белка $\sim 2,5 \cdot 10^{-5}$ М) смешивали с раствором яичного лецитина и холестерина, содержащего следовые количества [^{14}C] холестерина (мольное отношение 8:2) в таком же растворе холата. Конечная концентрация липидов 10 мг/мл. Холат удаляли диализом. В результате удаления детергента происходило образование липосом, которые отделяли от несвязанного фермента гель-хроматографией на колонке с сефарозой-4В.

Концентрацию липосом оценивали по количеству встроенного в мембрану [^{14}C]холестерина, которое оценивали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark-III (США).

Концентрацию белка определяли по модифицированному методу Лоури [9].

Ферментативную активность (*A*) нативного и иммобилизованного α -химотрипсина определяли по начальным скоростям каталитического гидролиза специфического субстрата — этилового эфира *N*-ацетил-*L*-тирозина на рН-стате Radiometer-TTT1d (Дания) в стандартных условиях [10]. В опытах по ингибированию добавляли раствор ингибитора известной концентрации и следили за сокращением ферментативной активности [3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Finkelstein M., Weissmann G. (1978) *J. Lipid Res.*, **19**, 289—303.
2. Gregoriadis G. (1977) *Nature*, **265**, 407—411.
3. Torchilin V. P., Goldmacher V. S., Smirnov V. N. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **85**, 983—990.
4. Torchilin V. P., Khaw B. A., Smirnov V. N., Haber E. (1979) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1114—1119.
5. Tajima S., Sato R. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **550**, 357—361.
6. Singer S. J. (1977) *J. Supramol. Struct.*, **6**, 313—323.
7. Kagawa Y., Racker E. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477—5487.
8. Fields R. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 581—590.
9. Hartree E. F. (1972) *Analyt. Biochem.*, **48**, 422—427.
10. Wilcox P. E. (1970) in: *Methods in Enzymology*, vol. **19**, p. 73. Acad. Press, N. Y.

Поступило в редакцию
1.XI.1979.

A PROCEDURE TO IMPROVE THE HYDROPHOBIC PROTEIN BINDING WITH LIPOSOMES

TORCHILIN V. P., KLIBANOV A. L.

All-Union Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

A hydrophobic protein, α -chymotrypsin, was incorporated into liposomes after preliminary modification of the protein with palmitoyl chloride. It was shown that such «hydrophobization» facilitates the protein incorporation into the liposomal membrane. The total amount of active bound protein was $3 \cdot 10^{-4}$ mole per mole of lipid, which is several times higher than can be achieved by a covalent coupling. Nearly 80% of the incorporated enzyme preserve the capability to interact with a high molecular weight inhibitor.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.02.80 Подписано к печати 31.03.80 Т-01485 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Уч.-изд. л. 15,3 Бум. л. 5,0 Тираж 875 экз. Зак. 2811

Издательство «Наука», 103717, ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер. 10