



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.96.04 + 577.21

СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ С ЛИПОСОМАМИ

*Торчилин В. П., Голдмахер В. С., Смирнов В. Н.**Всероссийский кардиологический научный центр
Академии медицинских наук СССР, Москва*

В последние годы липосомы особенно активно используются в качестве носителя для транспорта ферментных и других биологически активных соединений в организме [1]. Вещества, включенные внутрь липосом, не контактируют с компонентами крови, не вызывают аллергических реакций и не подвергаются биодegradации. Представляется также, что наиболее удобным объектом для осуществления направленного транспорта лекарств в организме также будет липосома, внутрь которой включен лекарственный препарат, а к наружной стороне мембраны тем или иным способом присоединена какая-либо аффинная молекула или антитело к соответствующему компоненту органа-мишени [2]. При присоединении нужного белка или антитела к липосоме необходимо выполнение следующих условий: прочная связь белка с липосомой; сохранение белком связывающей способности; сохранение целостности липосомы.

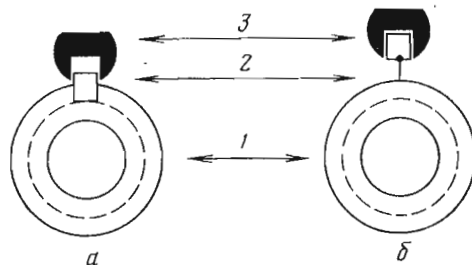
Известные способы присоединения белковых молекул к липосомам адсорбцией или встраиванием в мембрану [3, 4] мало отвечают этим требованиям. При адсорбции белки связываются с мембраной непрочной, а при встраивании частично погружаются в мембрану, что может приводить к стерическим затруднениям при связывании, например, антигена с встроеным антителом.

Мы сравнили перечисленные способы связывания белков с липосомами со способом ковалентного присоединения белка к поверхности липосомы через «ножку» на примере фермента α -химотрипсина, различными способами связанного с липосомами, построенными из яичного лецитина, холестерина и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина в молярном отношении 7 : 2 : 1. В качестве модели антитела — антигена мы изучили взаимодействие фермента с макромолекулярным белковым ингибитором.

Ковалентную иммобилизацию фермента на поверхности липосом мы осуществляли через аминокислотные группы белка, для чего поверхность липосом предварительно активировали глутаровым альдегидом, а затем подвергали воздействию ферментом.

Наши исследования показали, что количества белка, связывающегося на одно и то же количество липида в липосомах по механизмам адсорбции на готовых липосомах, встраивания в мембрану липосом в процессе их образования и ковалентного связывания с активированной липосомой, относятся между собой как 1 : 3 : 5. Это означает, что ковалентная прививка позволяет связать наибольшее количество белка.

К тому же можно полагать, что связывание белка с липосомой ковалентно через «ножку» устраняет стерические затруднения при его взаимодей-



Схематическое изображение липосомы (1) с ферментом или антителом (2), иммобилизованным на их поверхности методом встраивания в мембрану белка (а) и ковалентного присоединения к мембране через «ножку» (б), при их взаимодействии с макромолекулярным субстратом или антигеном (3)

ствии с макромолекулярным ингибитором (см. рисунок). И действительно, оказалось, что если для встроенного фермента константа ингибирования панкреатическим ингибитором трипсина в 5 раз больше (хуже), чем для нативного фермента, то для связанного через «ножку» фермента константа ингибирования совпадает с константой ингибирования нативного фермента. При этом ковалентное закрепление фермента на поверхности липосомы (как и при адсорбции или встраивании) не нарушает целостности липосомальной мембраны: количество остающейся внутри липосом ^3H -дезоксиглюкозы, которую можно рассматривать в то же время в качестве модели включенного в липосому лекарственного соединения, после всех манипуляций составляет не менее 80%.

Более того, если при встраивании часть белка оказывается заключенной внутри липосом (наши эксперименты по разрушению липосом тритоном X-100 показали, что содержание белка внутри липосом почти в 5 раз превосходит количество встроенного фермента), то метод ковалентной пришивки фермента к поверхности липосом полностью свободен от этого недостатка.

В результате проведенных экспериментов мы можем сделать вывод, что оптимальным методом присоединения к поверхности липосом аффинных белков, ферментов и других макромолекул можно признать, по-видимому, ковалентную пришивку, позволяющую связывать большие количества белка с сохранением его способности специфически связывать объемистые лиганды.

Экспериментальная часть

Препараты: α -химотрипсин, яичный лецитин, холестерин и фосфатидилэтаноламин (Sigma, США); глутаровый альдегид (Merk, ФРГ); этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (Koch-Light, Англия); ^{14}C -холестерин (43 Ки/ммоль) и ^3H -дезоксиглюкоза (8,5 Ки/ммоль) (Amersham, Англия); панкреатический ингибитор трипсина (Sigma, США).

Для получения липосом раствор липидов в хлороформе выпаривали, полученную липидную пленку заливали соответствующим водным раствором ^3H -дезоксиглюкозы, содержащим или не содержащим фермент, и подвергали воздействию ультразвука на ультразвуковом дезынтеграторе УЗДН-1.

С целью ковалентной иммобилизации поверхность липосом обрабатывали глутаровым альдегидом, удаляли его избыток диализом, добавляли фермент и инкубировали смесь 2 сут при 4° (рН 8,5).

Для встраивания α -химотрипсина в липосомы суспензию липидов в растворе фермента обрабатывали ультразвуком.

Адсорбцию фермента на поверхности липосом осуществляли инкубацией раствора белка с готовыми липосомами (2 сут, 4° , рН 8,5).

Концентрация раствора фермента во всех трех процедурах составляла 0,16 мМ. Несвязанный фермент отделяли хроматографией на колонке с сефарозой-4В.

Концентрацию липосом оценивали по количеству ^{14}C -холестерина, встроенного в их мембрану. За целостностью липосом следили по выходу ^3H -дезоксиглюкозы, включенной в липосому. Измерения вели с помощью сцинтилляционного счетчика Mark III (США).

Ферментативную активность как нативного, так и связанного фермента определяли по его способности гидролизовать специфический субстрат — этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина с помощью рН-стата Radiometer TTT-1с (Дания).

Способность иммобилизованного и нативного α -химотрипсина связывать специфический белковый ингибитор — панкреатический ингибитор трипсина оценивали по величине константы ингибирования ферментативной реакции при добавлении ингибитора [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gregoriadis G. (1976) *New Engl. J. Med.*, 295, 704—710, 765—770.
2. Gregoriadis G. (1977) *Nature*, 265, 407—411.
3. Kimelberg H. K. (1976) *Mol. Cell. Biochem.*, 10, 171—189.
4. Weissmann G., Blomgarden D., Kaplan R., Cohen C., Hoffstein S., Collins T., Gotlieb A., Nagle D. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 88—92.
5. Березин И. В., Клесов А. А. (1976) в кн. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, с. 79—84, МГУ, М.

Поступило в редакцию
3.IV.1978

PROTEIN BINDING TO LIPOSOMES

TORCHILIN V. P., GOLDMACHER V. S., SMIRNOV V. N.

*Cardiology Research Center, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow*

For the first time covalent binding of a protein-enzyme α -chymotrypsin—to the surface of liposome was performed. Comparative studies of different methods of protein immobilization on the liposome surface by means of adsorption, incorporation or covalent binding via «spacer» showed the latter to be the best one, since larger amounts of protein could be bound with complete preservation of its binding ability towards macromolecular ligands.