

УДК 612.015(088.8)

©Коллектив авторов

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ЛИПОСОМ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ
ИНСУЛИНА, СПЕЦИФИЧЕСКИ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С
КЛЕТКАМИ РС 12.**

Д.Л МАСЛОВ., ПРОЗОРОВСКИЙ В.Н.

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва, ул. Погодинская, д.10;
факс (095) 245-0857.

В работе исследовали возможность использования синтетических фрагментов инсулина для специфической адсорбции и эндоцитоза липосом опухолевыми клетками РС12 (феохромоцитомы). Синтезированные фрагменты (Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn и Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn) способны устойчиво связывать липосомы с инсулиновым рецептором, что приводит к эндоцитозу липосом клетками РС 12.

Ключевые слова: липосомальный вектор, синтетические фрагменты инсулина, лиганд-рецепторное взаимодействие, феохромоцитомы.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из путей обеспечения максимального лечебного эффекта и минимизации побочного действия химиотерапевтических препаратов является применение липосом. Липосомы - микрокапсулы из природных или синтетических фосфолипидов, - оказались во многих отношениях практически идеальными носителями для транспорта лекарственных соединений в организме. Их широкому использованию, однако, препятствует быстрая аккумуляция липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы и гепатоцитами, а так же деструкция липосомальной мембраны при взаимодействии с некоторыми компонентами крови при системном введении липосом в организм [1]. Одни из существующих подходов к повышению эффективности липосомальных препаратов сводятся главным образом к продлению времени циркуляции интактных липосом в кровотоке [2]. Другие - к повышению их сродства к органу-мишени посредством лиганд-рецепторного взаимодействия [3]. Создав

специфический липосомный вектор, можно индуцировать рецептор-опосредованный эндоцитоз, и, как следствие этого процесса, транспорт различных веществ и соединений (заключенных во внутреннем объеме или встроенных в стенку липосом) непосредственно внутрь клетки [4].

Большой интерес представляют инсулиновые рецепторы, обнаруженные практически во всех тканях организма [5]. Особый интерес представляют опухолевые клетки, многие из которых имеют высокую степень экспрессии рецепторов к инсулину [6,7,8].

В структуре каждого гормона можно выделить центры, определяющие их взаимодействие только с клетками-мишенями [9]. В связи с этим представляется возможным создание липосомального вектора, основанного на структуре участка молекулы инсулина, отвечающего за связывание с рецептором. Из литературных данных известно, что за связывание и проявление биологической активности отвечает район на С-концевых участках А- и В-цепей молекулы инсулина [10].

В ходе работы синтезирован декапептид, соответствующий своей аминокислотной последовательностью 19-26 аминокислотным остаткам В-цепи (Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr) и 20-21 остаткам А-цепи (Cys-Asn) молекулы инсулина, связанных между собой пептидной связью (Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn). Способность этого пептида связываться с рецептором инсулина и оказывать инсулиноподобное действие *in vitro* уже была доказана [11]. Синтезирован и более короткий фрагмент, соответствующий своей аминокислотной последовательностью 23-26 аминокислотным остаткам В-цепи (Gly-Phe-Phe-Tyr) и 20-21 остаткам А-цепи (Cys-Asn) молекулы инсулина, соединенных между собой пептидной связью (Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn). В его состав входит гидрофобный участок С-конца В-цепи молекулы инсулина. Этот участок является важнейшей областью, ответственной за связывание с рецептором, образование димеров [12]. Оба пептида были ацилированы по N-концу эфиром пальмитиновой кислоты. После этого они были встроены в липидный бислой. Полученные ацилированные пептиды, включенные в состав липосом, способны *in vitro* устойчиво связываться с инсулиновым рецептором клеток феохромоцитомы крысы PC12. Это, в дальнейшем, приводит к рецепторно-опосредованному эндоцитозу липосом.

МЕТОДИКА. Синтез пептида. Синтез проводили на пептидном синтезаторе Peptide Synthesizer 413A (Applied Biosystems, США) дициклогексилкарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола с использованием 9-флуоренилметоксикарбонил-(Fmoc)-защищенных L-аминокислот и D-аминокислот. В качестве твердой фазы для синтеза пептида использовали смолу Fmoc-Asn-(Trt) resin (Novabiohem, Швейцария). Каждую стадию присоединения новой аминокислоты контролировали качественной нингидриновой реакцией (Кайзер-тестом) [13].

Анализ пептида. Для анализа образец пептида необходимо снять со смолы и удалить защитные группы с аминокислот. Для этого его инкубировали в течении 4 часов в атмосфере азота в смеси: 90% трифторуксусная кислота (ТФУ), 5% тионизол, 3% этандитиол, 2% анизол. Раствор отфильтровывали; выпавшие в холодном диэтиловом эфире кристаллы выделяли, сушили под вакуумом над

P_2O_5 . Полученный пептид очищали от избытка реагентов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0,1% ТФУ от 30 до 80% в течении часа на колонке Ultrasphere-ODS, 5 мкм (10 мм x 15 см) (Altex, США). Фракцию с пептидным материалом лиофилизировали. Для подтверждения наличия данного пептида в собранной фракции производили определение его аминокислотного состава с использованием метода разделения фенилтиокарбамаильных производных аминокислот (ФТК) путем жидкостной хроматографией высокого давления (ЖХВД) [14]. Вначале проводили кислотный гидролиз высушенного пептида. К небольшому количеству пептида добавляли 6 М соляную кислоту (200 мкл). Гидролиз проводили при температуре 110°C, 24 часа, под вакуумом. Полученные аминокислоты высушивали на роторном испарителе, а затем растворяли в 100 мкл буфера (5% N-метилморфолин в растворе метанол/вода (70:30) с 10% циклогексиламином и 0,05% бета-меркаптоэтанола) и добавляли 5 мкл реактива Эдмана (10% фенилизотиоцианат в ацетонитриле). Смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Аналогичным образом получали ФТК-производные стандартных аминокислот (Sigma, США). Разделение ФТК-производных аминокислот проводилось на хроматографе Waters (Millipore, США) с использованием колонки Ultraspher (tm)-I.P. 5мкм, (4.6 мм x 15 см) (Altex, США). Спектрофотометрирование производили при 254 нм. Двухфазная система состояла из ацетонитрила и ацетатно-аммониевого буфера (pH 6,8). Элюцию вели в течении 1 часа с увеличением градиента ацетонитрила с 5% до 60%. В результате разделения и сравнения ФТК-производных аминокислот гидролизованного пептида и стандартного набора было получено точное сходство по времени выхода с колонки имеющихся в наличии аминокислот, что позволяет сделать вывод о правильно прошедшем синтезе пептида.

Ацилирование пептида по N-концу эфиром пальмитиновой кислоты. N-конец пептида до снятия его с твердой фазы и депротекции боковых радикалов аминокислотных остатков ацилировали эфиром пальмитиновой кислоты (Sigma, США) дициклогексилкарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзо-триазола. Процесс ацилирования контролировали качественной нингидриновой реакцией (Кайзер-тестом) [13].

Очистка ацилированного пептида. Для снятия со смолы и депротекции боковых радикалов аминокислотных остатков ацилированный пальмитиновой кислотой пептид инкубировали в течении 4 часов в атмосфере азота в смеси: 90 % трифторуксусная кислота (ТФУ), 5% тионизол, 3% этандитиол, 2% анизол. Раствор отфильтровывали; выпавшие в холодном диэтиловом эфире кристаллы выделяли, сушили под вакуумом над P_2O_5 . Полученный ацилированный пептид очищали от избытка реагентов методом ВЭЖХ с помощью градиентного элюирования ацетонитрилом в 0,1% ТФУ от 30 до 80% в течении часа на колонке Ultrasphere-ODS., 5 мкм (10 мм x 15 см) (Altex, США). Фракцию с пептидным материалом лиофилизировали.

Получение липосом. Препарат фосфолипидов, выделенных из сои Natin SM-100 (Natterman, Германия), смешивали в молярном соотношении 100:1 с флуоресцентным зондом - пиреном (benzo[def]phenanthrene) (Serva, Германия).

Полученную смесь растворяли в хлороформе (10 мл хлороформа на 100 мг фосфолипида) [15]. Хлороформ отгоняли на роторном испарителе при 60°C. Мультиламеллярные липосомы формировали в среде RPMI-1640 (2 мг фосфолипида на 10 мл среды) интенсивным перемешиванием в течении 20 минут. Получившиеся в результате липосомы имели размер от 200 до 500 нм в диаметре. Растворенный в среде RPMI-1640 ацилированный пептид в несколько приемов, постоянно перемешивая, добавляли к половине полученных липосом (5 мг ацилированного пептида на 100 мг фосфолипидов). Ко второй половине липосом добавляли эквивалентный объем среды, не содержащей ацилированного пептида. Для того, чтобы избавиться от не встроенного в липосомы ацилированного пептида, трижды (в течении 3 часов каждый) был проведен диализ против 50-кратного избытка среды RPMI-1640.

Культура клеток. Клетки феохромоцитомы крысы PC12 культивировали в 24 луночных планшетах при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин (2 мМ), гентамицин (50 мкг/мл), 10% эмбриональную телячью сыворотку. Через 24 часа после пассирования клетки промывали раствором Эрла и меняли ростовую среду на среду RPMI-1640 с 0,5% эмбриональной телячьей сывороткой. Подсчет количества клеток осуществляли после их окраски кристалл виолетом на приборе Dombi Plate (Россия) при 540 нм [16].

Взаимодействие липосом с инсулиновым рецептором на поверхности клеток. В предварительно охлажденную до 4°C плашку с культурой клеток вносили по 300 мкл липосом в каждую лунку (в опыте - липосомы со встроенным ацилированным пептидом, в контроле - липосомы, не содержащие ацилированного пептида). Инкубацию проводили в течении 2 часов при 4°C, что позволяло избежать эндоцитоза липосом клетками [17]. Для удаления неспецифически связавшихся с поверхностью клеток липосом клеточный монослой по окончании инкубации промывали 7 раз ледяным раствором Эрла. Затем клетки лизировали раствором Эрла, содержащем 5% Тритон X-100 (Serva, Германия). Лизаты клеток флуориметрировали при длине волны возбуждения 330 нм и длине эмиссии 400 нм [18] на спектрофлуориметре Luminescence Spectrometer LS 50B (Perkin-Elmer, Англия). Для доказательства предположения, что специфическое связывание липосом происходит за счет их взаимодействия именно с инсулиновым рецептором был проведен следующий опыт. В предварительно охлажденную до 4°C плашку с культурой клеток вносили 100 мкл (в каждую лунку) раствора инсулина (50 мг на 100 мл среды RPMI 1640) и 300 мкл липосом со встроенным ацилированным пептидом. Инкубацию, подсчет проводили по вышеописанной методике.

Исследование эндоцитоза липосом. В плашку с культурой клеток вносили по 300 мкл липосом (в каждую лунку). Инкубацию проводили в течении 7 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ [19]. Для удаления неспецифически и специфически связавшихся с поверхностью клеток липосом клеточный монослой по окончании инкубации промывали 7 раз ледяным раствором Эрла с 4,5 М мочевиной (Serva, Германия) [5].

Представленные результаты являются средним значением ± стандартные отклонения из четырех независимых опытов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для создания липосомального вектора к опухолевым клеткам, имеющим высокую степень экспрессии инсулинового рецептора, были синтезированы пептиды, соответствующие аминокислотным остаткам молекулы инсулина A[20-21] - B[19-26] и более короткий фрагмент, соответствующий аминокислотным остаткам молекулы инсулина A[20-21] - B[23-26]. После синтеза они были ацилированы пальмитиновой кислотой. В результате были получены конъюгат I (пальмитиновая кислота - Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn) и конъюгат II (пальмитиновая кислота - Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn). Полученные ацилированные пептиды, встроенные в липидный слой липосом за счет жирной кислоты, способствуют специфическому связыванию липосом с поверхностью клеток.

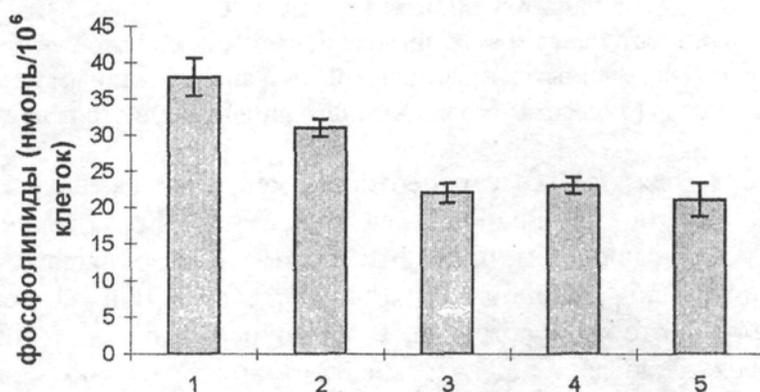


Рисунок 1.

Связывание липосом с клетками PC 12.

1. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом I.
2. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом II
3. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом I при их совместном добавлении со 100 мкл инсулина.
4. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом II при их совместном добавлении со 100 мкл инсулина.
5. — Контроль (липосомы без встроенного ацилированного пептида).

Увеличение в 1,8 (конъюгат I) и 1,4 (конъюгат II) раза (рис.1 и 2) связавшихся липосом в опыте по сравнению с контролем (неспецифическим связыванием) (рис. 1) свидетельствует об имевшей место специфической рецепторно-опосредованной адсорбции липосом клетками. Преинкубация (в течении 20 минут) клеток с избыточным количеством инсулина ведет к резкому уменьшению специфического связывания. Это доказывает, что специфическая адсорбция липосом происходит за счет связывания конъюгатов с инсулиновым рецептором на поверхности клеток.

Проведение инкубации липосом с клетками в течении 7 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ [19] с последующей обработкой 4,5 М мочевиной позволило оценить уровень эндоцитоза опытных и контрольных липосом (рис.2).

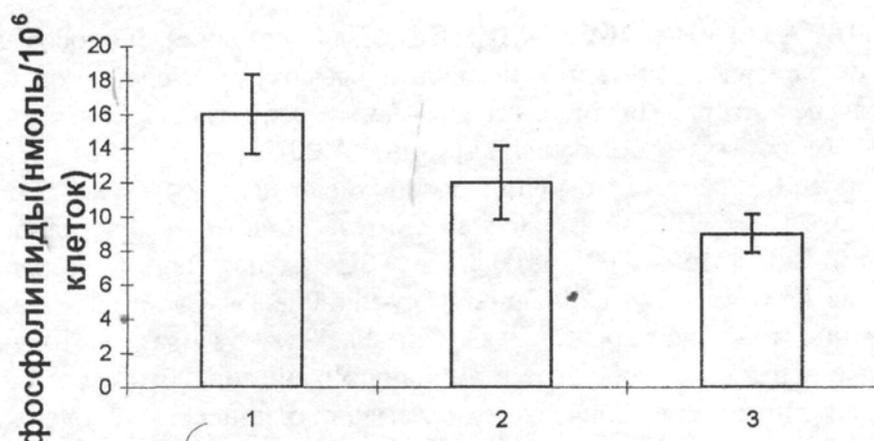


Рисунок 2.

Эндоцитоз липосом клетками РС 12.

1. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом I.
2. — Липосомы со встроенным в их липидный слой ацилированным пептидом II.
3. — Контроль (липосомы без встроенного ацилированного пептида).

Способность связываться с рецептором менее выражена у конъюгата II (пальмитиновая кислота - Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn) - в 1,4 раза выше контроля (у конъюгата I в 1,8 выше контроля). Это может быть объяснено небольшим расстоянием между гидрофобной областью, ответственной за связывание, и жирной кислотой, которая встроена в липидный слой липосом. Близость липидного слоя могла препятствовать приобретению необходимой пространственной формы и взаимодействию с рецептором инсулина. Можно предположить, что включение в состав пептида гидрофильных или алифатических аминокислот следом за гидрофобным участком приведет к способности принимать необходимую пространственную конформацию, занимать максимально выгодное положение и в конечном итоге приведет к увеличению связывания пептида с рецептором.

Исходя из полученных результатов можно предположить наличие *in vivo* селективного поглощения полученных лиганд-модифицированных липосом клетками печени, мышечными, жировыми и в значительной степени опухолевыми клетками [6-8].

ЛИТЕРАТУРА.

1. Бердичевский В.Р. (1982), Использование липосом для транспорта лекарств в организме. Автореф. Дисс.
2. Allen T.M., Hansen C, Martin F., Redemann C., Yau-Young A. (1991). *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36.
3. Harvie P., Desormeaux A., Bergeron M.C., Tremblay M., Beauchamp D., Poulin L., Bergeron M.G. (1996). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 225-229.
4. Камуков В.Ю. (1997). Рецепторные системы человека и их использование для направленного транспорта лекарственных препаратов. Медицина. Москва.

5. *Ефимов А.С., Бездробный Ю.В.* (1987). Структура и функции инсулиновых рецепторов. Наук.думка. Киев.
6. *Frittitta L., Sciacca L., Catalfamo R., Ippolito A., Gangemi P., Pezzino V., Filetti S., Vigneri R.* (1999) *Cancer Jan* **85(2)**:492-8.
7. *Belfiore A., Pandini G., Vella V., Squatrito S., Vigneri R.* (1999) *Biochimie.* **81**, 403-407.
8. *Sciacca L., Costantino A., Pandini G., Mineo R., Frasca F., Scalia P., Sbraccia P., Goldfine I.D., Vigneri R., Belfiore A.* (1999) *Oncogene Apr.* **15**; **18**, 2471-9.
9. *Лакин В.В.* (1982) В кн.: Белково-пептидные гормоны. Биохимическая фармакология. Москва, с.228-244.
10. *Drejer K.* (1992) *Diabetes/Metabolism Rev.*, **8**, 259-286.
11. *Прозоровский В.Н., Максимова Е.М., Алексеева А.Е., Гребенщикова О.Г., Абакумова О.Ю., Куценко Н.Г., Цветкова Т.А., Арчаков А.И.* (1996), *Вопр. мед. химии*, **42**, 284-91.
12. *Weitzel G., Hoppe-Seylers Z.* (1971) *Physiol.Chem.*, **352**, 1735-1738.
13. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* (1970). *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598.
14. *Heinrikson R.L., Meredith S.C.* (1984) *Anal. Biochem.*, **136**, 65-74.
15. *Filion M.C., Phillips N.C.* (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1329**, 345-356.
16. *Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rankhmilevich A.L.* (1990) *Biomed. Sci.*, **1**, 261-266.
17. *Ishiwata H., Sato S.B., Kobayashi S., Oku M., Vertut-Doi A., Miyajima K.* (1998), *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) Dec.*, **46**, 1907-1913.
18. *Cheng S., Thomas J.K., Kulpa C.F.* (1974), *Biochemistry*, **13**, 1135.
18. *Vertut-Doi A., Ishiwata H., Miyajima K.* (1996). *Biochim. Biophys. Acta*, **1278**, 19-28.

Поступила 20.03.2000.

THE STUDY OF THE INTERACTION LIPOSOMES COATED BY SYNTHETIC FRAGMENTS OF INSULIN WITH PC12 CELLS.

D.L.MASLOV, V.N.PROZOROVSKIY.

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, 119832, Moscow, Pogodinskaya Street, 10.

The synthesized peptides represent the functionally important site for binding to insulin receptor. Amino acids of peptide I correlate with B-chain of insulin at the position B19-B26 and A-chain at the position A20-A21. Amino acids of peptide II correlate with B-chain of insulin at position B23-B26 and A-chain at the position A20-A21. It was shown, that the these peptides increased liposomal binding followed by receptor-mediated endocytosis by cells PC12.

Key words: liposome vector, peptide, insulin receptor, ligand-receptor interaction, pheochromocytoma.