

УДК 577.152.3.042.2+577.352.27

© Коллектив авторов

ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ: ПОЛУЧЕНИЕ И СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

А.С. Балкина^{1}, А.А. Селищева², Н.И. Ларионова¹*

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва,
Ленинские Горы д.1 (11); тел.: (495) 939-34-17; факс: (495) 939-5417;
эл. почта: asbalkina@fromru.com

²Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва,
Ленинские Горы.

Изучена возможность капсулирования водорастворимых белков в мультиламеллярные липосомы из смесей соевых фосфолипидов цвиттер-ионов (фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ)). Исследовано влияние соотношения ФХ/ФЭ на включение в липосомы соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк (ВВІ) и апротинина (ВРТИ). Связывание с белками практически не влияло на размеры липосом. С помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии продемонстрировано, что белки локализованы в центре липосом, а также между бислоями. Как было показано при изучении антипротеазной активности (антитриптической и антихимотриптической), активные центры белков в составе липосом частично пространственно экранированы. Увеличение активности капсулированных ВВІ и ВРТИ под влиянием ионного детергента подтверждает эту гипотезу и предполагает, что экранирование обратимо. Исследована стабильность липосом в трех различных средах, моделирующих жидкости желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). По совокупности полученных данных можно сделать вывод, что разработанные липосомы являются перспективными системами доставки ВВІ и ВРТИ.

Ключевые слова: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, липосомы, апротинин, соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк.

ВВЕДЕНИЕ. Использование липосом для доставки лекарств имеет ряд важных преимуществ. Во-первых, фосфолипиды – основные структурные компоненты липосом – являются одним из основных компонентов клеточных мембран, они нетоксичны, биodeградируемы, а мембрана липосом может сливаться с клеточной мембраной, что обеспечивает внутриклеточную доставку их содержимого. Во-вторых, вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, имеющих склонность к разложению в биологических жидкостях. В-третьих, высвобождение лекарств из липосом происходит постепенно, тем самым достигается эффект пролонгированного действия. Кроме того, липосомальные препараты менее токсичны, чем препараты обычной формы. Все эти преимущества дают возможность использовать меньшие терапевтические дозы лекарств, что очень важно при применении препаратов, обладающих побочными действиями [1].

Липосомы потенциально очень эффективны в качестве системы доставки лекарственных средств ингаляционно. Легкие являются привлекательным органом для направленной доставки за счет громадной площади поверхности, которую занимают альвеолы, отделенные от кровяных сосудов очень тонкой мембраной.

* - адресат для переписки

Водорастворимые лекарственные средства быстро выводятся из легких, тогда как в клинических исследованиях показано, что более 80% липосомальной формы препарата оставалось в легких после восьми часов и 52–73% сохранялось после 24 часов [2].

Наиболее привлекательным способом доставки лекарственного средства является его пероральное введение, особенно при длительном курсе лечения, когда необходимо многократно вводить лекарственное средство для поддержания его действующей концентрации. Однако в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) существует множество барьеров, препятствующих абсорбции и доставке белковых лекарственных средств и вакцин [3]. В последнее время активно ведутся разработки липосом для пероральной доставки белков и пептидов [4].

Объектами настоящего исследования являются два белковых ингибитора протеиназ - апротинин (BPTI) и соевый ингибитор протеиназ типа Баумана-Бирк (BBI). BBI (М.м. 8 кДа) обладает противовоспалительным, антиканцерогенным и противоопухолевым действием [5]. BPTI (М.м. 6,5 кДа) применяется в клинической практике более 50 лет и обладает широким спектром антипротеазного действия [6]. Оба этих ингибитора исследуются для предотвращения ферментативной деградации белковых и пептидных лекарственных средств при создании их пероральных систем доставки [4]. Однако высокий терапевтический потенциал этих полипептидов ограничен их быстрым выведением из организма. При пероральном введении нативный BBI достигает кишечника в интактной форме, но лишь некоторое его количество попадает в кровоток, так как *in vivo* транспорт этого полипептида ограничен эпителиальным и эндотелиальным барьерами. Таким образом, чтобы повысить эффективность BPTI и BBI *in vivo* необходимо изменить их биораспределение и принцип транспортировки. В предыдущих работах мы включили BBI [7] и BPTI [8, 9] в мультиламеллярные везикулы из отрицательно заряженных фосфолипидов. Однако при исследованиях анионных липидов было установлено, что их везикулы быстро выводятся из кровотока [10], а везикулы нейтральных липидов, как правило, выводятся из кровотока медленнее, чем отрицательно заряженные [11].

Целью представляемой работы являлось создание системы доставки BBI и BPTI на основе электрически нейтральных липидов фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и оценка антипротеиназной активности белков и поведения разработанных систем в средах, моделирующих различные отделы ЖКТ.

МЕТОДИКА. Соевый ФХ 98% чистоты ("Lipoid", Германия) использовали без дальнейшей очистки. Индивидуальный соевый ФЭ получали из препарата S-21B ("Lipoid") путем осаждения фосфолипидов метанолом из хлороформного раствора препарата, затем ацетоном из раствора препарата в медицинском эфире, и далее разделением методом адсорбционной колоночной хроматографии на Silicagel-60 ("Merck", Германия). Индекс окисления всех фосфолипидных препаратов был меньше 0,3. BPTI получали из препарата "Gordox" ("Gedeon Richter", Венгрия), предварительно обессоленного на Sephadex G-25 Fine ("Pharmacia", Швеция) и лиофильно высушенного. Содержание активного ингибитора в препарате BPTI, определенное титрованием трипсином и химотрипсином с известным содержанием активных центров, составляло $54 \pm 2\%$. В работе также использовали BBI ("Sigma", США) (с содержанием активного ингибитора $92 \pm 2\%$), трипсин и химотрипсин ("Merck") с содержанием активных молекул 61 и 57% соответственно, субстраты – этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина (BAEE) и *пара*-нитроанилид N-бензоил-L-тирозина (BTrpNA) ("Sigma"), родамин Б изотиоцианат ("Sigma"), растворители марки х.ч. ("Химмед", Россия).

Включение белков в липосомы. Включение BPTI в липосомы в 0,001 М HCl проводили в условиях, описанных нами ранее [8]. Включение BBI в липосомы в 0,01 М HCl также проводили согласно ранее разработанному методу [7]. На конечной стадии, осажденные липосомы с белком диспергировали в 0,05 М трис-HCl буфере (pH 8,0). Определение содержания белка в супернатанте и в

осадке проводили модифицированным методом Лоури [12]. Количество фосфолипидов в препаратах определяли методом Диттмера, модифицированным Васьковским и Светашевым [13].

Определение размера и ζ -потенциала липосом. Размеры пустых липосом и липосом с белком измеряли методом лазерной дифракции (“MasterSizer”, “Malvern Instruments”, Великобритания). ζ -Потенциал липосом, диспергированных в 10 мМ растворе KCl был измерен с помощью прибора Zetasizer 4 (“Malvern Instruments”).

Флуоресцентные исследования. BBI и BPTI, меченые Родамин Б изотиоцианатом (BBI^{РБ} и BPTI^{РБ} соответственно), получали методом, описанным в работе [14]. Включение белков в липосомы проводили методом, описанным ранее. Интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью флуориметра HITACHI MPF-4 (Япония). Длина волны возбуждения для Родамина Б изотиоцианата была 358 нм. Для всех спектров флуоресценции учитывали вклад остаточной флуоресценции среды.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Морфологию липосом, содержащих флуоресцентно меченые белки, изучали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 (Германия). Размеры липосом фиксировали с помощью программного обеспечения Metamorph (v. 5.0, Universal Imaging Corporation). Измеряли размеры не менее 20 частиц каждого образца.

Определение антитриптической активности липосом, содержащих белки. Указанный метод описан нами ранее [7].

Определение антихимотриптической активности липосом, содержащих белки. В кювету на 1 мл вносили 0,1 мл раствора химотрипсина с концентрацией активного фермента 0,1 мг/мл в 0,001 М соляной кислоте (pH 3,0). Затем прибавляли от 0,100 до 0,300 мл водного раствора образца, и общий объем смеси доводили 0,05 М трис-буфером (pH 8,0) до 0,970 мл. Смесь инкубировали 10 минут при 25°C. Затем в кювету вносили 0,03 мл раствора субстрата BTrpNA с концентрацией 0,81 мг/мл в ацетонитриле. Регистрировали изменение оптической плотности раствора в течение 5 мин при длине волны 410 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-265 FW (Япония). Параллельно измеряли скорость гидролиза субстрата химотрипсином в отсутствие и в присутствии пустых липосом, чтобы учесть количество химотрипсина, связавшегося с фосфолипидами в данных условиях.

Определение антипротеазной активности липосом, содержащих белки, в присутствии дезоксихолата натрия (ДОХ). К 0,2 мл липосом добавляли 0,2 мл 8 мМ или 30 мМ раствора ДОХ. Образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C, разбавляли в соответствующее число раз и отбирали по 0,050–0,300 мл смеси для определения антитриптической или антихимотриптической активности ингибитора в составе липосом. Параллельно измеряли, скорость гидролиза соответствующего субстрата трипсином или химотрипсином в отсутствие и в присутствии индивидуальных липидов и ДОХ, чтобы учесть количество фермента, связавшегося с фосфолипидами в данных условиях, и количество фермента, потерявшего свою активность в присутствии ДОХ. Количество активного ингибитора в составе комплексов в присутствии ДОХ рассчитывали с учетом действия детергента на нативный белок.

Моделирование условий ЖКТ. Липосомы, содержащие флуоресцентно меченые белки, исследовали в условиях, моделирующих физиологические, в трех средах, по аналогии с протоколом, описанным ранее [15]: 1) буфер с pH 1,7, содержащий 0,32% (масса/объем) пепсина (“Sigma”); 2) 0,05 М трис-HCl буфер (pH 8,0), содержащий 8 мМ ДОХ или 30 мМ ДОХ; 3) раствор 0,01% (масса/объем) панкреатина (“Sigma”) в 0,05 М трис-HCl буфере (pH 8,0), где липазы были активированы добавлением CaCl₂ (концентрация 5 мМ). К образцу липосом добавляли эквивалентный объем модельной жидкости и инкубировали полученную смесь 1 час при 37°C. Затем проводили центрифугирование 10 мин при 9000 g, удаляли супернатант, а осадки разбавляли 0,05 М трис-HCl буфером (pH 8,0) до исходного объема и анализировали интенсивность флуоресценции раствора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Физико-химическая характеристика липосом, содержащих ВРТИ или ВВИ.

Результаты по определению содержания белка в составе липосом показывают, что наличие 50 и более процентов ФЭ в смеси с ФХ приводит к эффективному связыванию с обоими белками (табл.). Например, для смеси ФХ/ФЭ (33/67) содержание белка возрастает в два раза по сравнению с дисперсией ФХ. При максимальном содержании ФЭ в липосомах на одну молекулу ВВИ приходится в 3 раза больше молекул липидов, чем на одну молекулу ВРТИ. Здесь, очевидно, не последнюю роль играет уникальная третичная структура нативного ВВИ 61% β -листов и 38% неупорядоченной структуры, отсутствие спиралей, наличие семи дисульфидных связей [16, 17]. Кроме того, для ВВИ характерно отсутствие типичного для белков гидрофобного ядра и большая площадь экспонированных гидрофобных остатков $>1000 \text{ \AA}^2$ [18]. Что касается ВРТИ, то наличие прочных стэкинг-взаимодействий между ароматическими остатками, формирующими гидрофобную область, вероятно, является решающим фактором, увеличивающим эффективность его взаимодействия с агрегатами фосфолипидов [19]. Гидрофобность полипептидов обычно слишком низка, чтобы эффективно связываться с фосфолипидами цвиттер-ионами. Редкими исключениями являются, например, некоторые токсины, меллитин, магаинины, имеющие протяженные спирали в структуре [20]. В этом контексте наши результаты впервые показывают, что с фосфолипидами цвиттер-ионами способен связываться водорастворимый белок, не обладающий спиральными элементами структуры. При относительном увеличении содержания ФЭ в смеси ФХ/ФЭ количество фосфолипидов, приходящихся на 1 молекулу белка, увеличивалось для обоих белков (табл.). Как было показано ранее, такая закономерность объясняется меньшей гидратацией полярной части молекулы ФЭ, по сравнению с ФХ [21]. Пониженное количество гидратационной воды, по-видимому, облегчает процесс взаимодействия между полярными частями липидов и поверхностью водорастворимого белка.

Таблица 1. Состав липосом с включенными белками.

Состав липидных препаратов, вес. %	Эффективность включения белка в липосомы, вес. % от исходного содержания		Соотношение липид/белок в липосомах, Моль/Моль		Средний диаметр липосом, нм		
	ВРТИ	ВВИ	с ВРТИ	с ВВИ	Пустые	с ВРТИ	с ВВИ
ФХ (100)	11 \pm 2	14 \pm 3	80:1	95:1	610 \pm 31	580 \pm 29	580 \pm 29
ФХ/ФЭ (67/33)	16 \pm 2	18 \pm 3	120:1	160:1	590 \pm 30	580 \pm 29	600 \pm 30
ФХ/ФЭ (50/50)	18 \pm 3	28 \pm 6	115:1	290:1	610 \pm 31	580 \pm 29	530 \pm 26
ФХ/ФЭ (50/50)	12 \pm 3*	32 \pm 4**	-	-	-	-	-
ФХ/ФЭ (33/67)	20 \pm 2	20 \pm 3	130:1	410:1	540 \pm 27	500 \pm 25	460 \pm 24
ФХ/ФЭ (33/67)	16 \pm 3*	26 \pm 3**	-	-	-	-	-

Примечание: *ВРТИ+ВРТИ^{РБ}; **ВВИ+ВВИ^{РБ}

Присутствие белков практически не влияет на размер липосом. Достоверное уменьшение размера частиц (до 460 нм) характерно только для липосом, состоящих из ФХ/ФЭ(50/50) или ФХ/ФЭ(33/67) и ВВИ. По-видимому, эту закономерность можно объяснить наибольшей эффективностью взаимодействия упомянутых липидных дисперсий с ВВИ (290 и 410 молекул фосфолипидов на 1 молекулу белка), и, как следствие, наиболее компактным взаимным

расположением молекул обоих компонентов. Величины ζ -потенциала пустых липосом из ФХ/ФЭ (50/50) и липосом того же состава, содержащих белки, были близки к значению $-4(\pm 5)$ мВ. На основании этих данных можно предположить, что белки глубоко погружаются внутрь липосом.

Визуализация частиц методом КЛСМ (рис. 1) показывает, что белок (затемнённые области внутри везикул) находится между слоями мультиламеллярных липосом. При этом основная доля белка расположена в самом центре везикулы. Чтобы оценить влияние изменения гидрофобности белка при введении в его молекулу флуоресцентной метки на связывание с фосфолипидами сравнили связывание меченного и немеченого белка (табл.). Введение флуоресцентных меток, в целом, не меняет принципиальную картину получения липосом, содержащих белки.

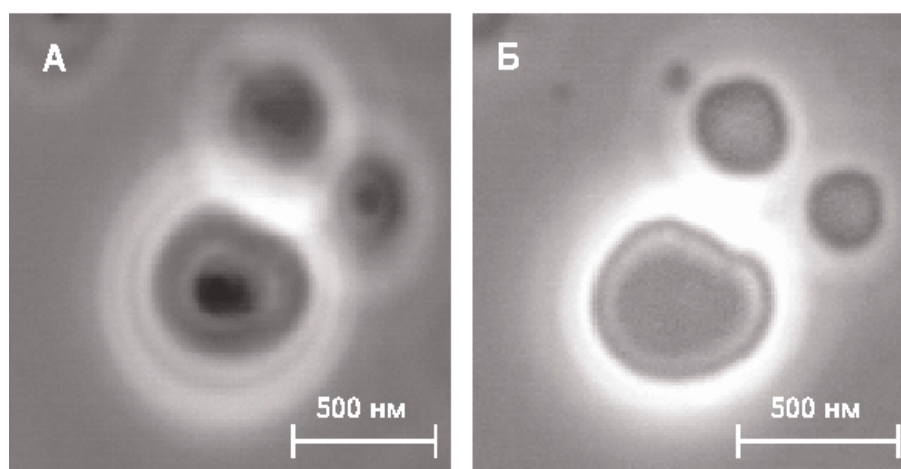


Рисунок 1.

Фотографии поперечного сечения (А) и центрального поперечного сечения (Б) липосом из ФХ/ФЭ (50/50), содержащих ВВІ^{РВ}, полученные методом КЛСМ. Расстояние между сечениями 180 нм.

Исследование антипротеазной активности ВВІ и ВРТІ в составе липосом из фосфолипидов цвиттер-ионов.

ВВІ является белком, состоящим из двух tandemных гомологичных областей на одной полипептидной цепи, каждая из которых имеет активный центр. Оба активных центра белка являются независимыми: один проявляет антитриптическую, а другой - антихимотриптическую активность [22]. ВРТІ – белок, состоящий из одного домена [6] и имеющий один активный центр, обладающий как антитриптической, так и антихимотриптической активностью. В связи с этим были изучены антитрипсиновая (рис. 2А) и антихимотрипсиновая (рис. 2Б) активности липосом с ВРТІ и ВВІ. Антипротеазные активности ВРТІ в составе липосом в зависимости от состава липидной фазы сохраняются приблизительно на 40%, в то время как ВВІ в составе липосом проявляет активность в 2 раза меньшую, чем ВРТІ. По-видимому, снижения антипротеиназной активности обоих белков при включении в липосомы и следовало ожидать, исходя из предыдущих данных о том, что белок локализован преимущественно внутри липидных агрегатов - его активные центры могут быть пространственно недоступны. Кроме того, причиной некоторого снижения антипротеазной активности ВВІ в составе липосом может быть также изменение конформации белка, в частности, увеличение доли β -структур, которое было выявлено нами методом ИК-спектроскопии (данные не приведены).

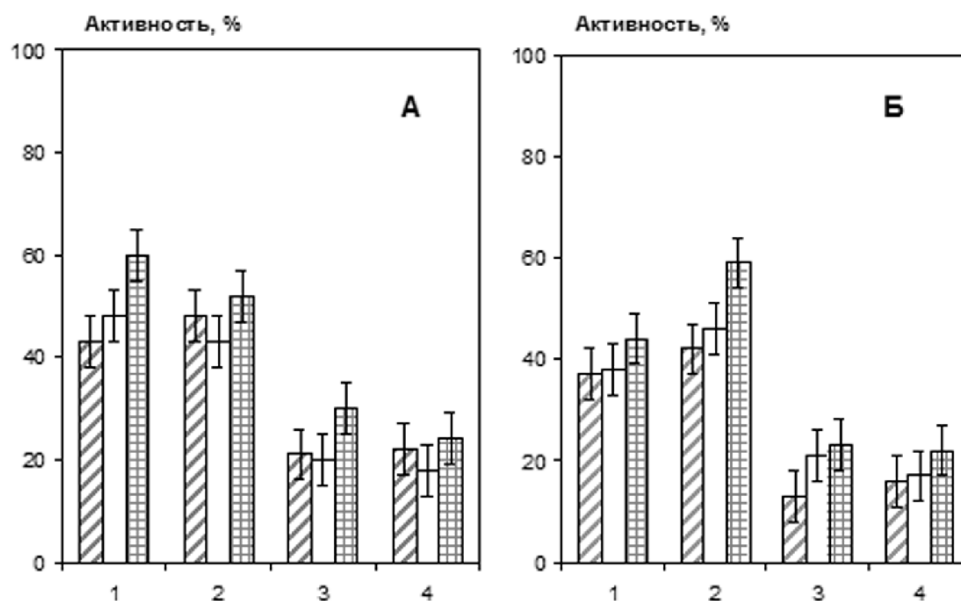


Рисунок 2.

Антитриптическая (А) и антихимотриптическая (Б) активности ВРТИ (1,2) и ВБИ (3,4) в составе липосом (▨), после инкубации липосом с 4 мМ ДОХ (1,0 ч, 37°C) (□), с 15 мМ ДОХ (1,0 ч, 37°C) (▤). 1,3 – липосомы из смеси ФХ/ФЭ(50/50); 2,4 – липосомы из смеси ФХ/ФЭ(33/67).

Условия измерения антитриптической активности $-[T]=2 \cdot 10^{-7}$ М, $[BAEE]=3 \cdot 10^{-4}$ М; антихимотриптической активности $-[X]=4 \cdot 10^{-7}$ М, $[BTrNA]=6 \cdot 10^{-5}$ М.

При полном или частичном снятии пространственного экранирования активных центров можно ожидать проявления более высокой биологической активности, как было продемонстрировано ранее [23]. Для проверки этого предположения, исследовали влияние физиологических концентраций ДОХ на изучаемые системы. При инкубации в течение 1 часа липосом с раствором 4 мМ ДОХ, выбранным в качестве модельной системы, отражающей содержимое тонкого кишечника натошак [24], величина активности, проявляемой белками, во всех случаях практически не менялась. В соответствии с общепринятой моделью действия детергентов [25], при инкубации с ДОХ образуются смешанные везикулы фосфолипидов и детергента, связывающие белок, размер которых меньше липосом. При изучении взаимодействия образцов того же состава с раствором 15 мМ ДОХ, отражающим содержимое дуоденума на полный желудок [24], антипротеазная активность препаратов повышалась (рис. 2). Таким образом, в присутствии ионного детергента белок остается частично связанным с везикулами, в которых активные центры ингибиторов более доступны для реакции с протеазами.

Помимо растворов ДОХ, в качестве модельных был выбран раствор пепсина (рН 1,7), моделирующий кислую ферментную среду желудка, и раствор панкреатина (рН 8,0) с некоторым содержанием липаз, моделирующий воздействие, которому подвергаются липосомы при попадании в верхний отдел тонкого кишечника [15]. Результаты взаимодействия липосом, содержащих флуоресцентно меченые белки, с каждой из трех модельных жидкостей представлены на рисунке 3. Уменьшение интенсивности флуоресценции обоих белков и сдвиги спектров флуоресценции в область больших длин волн после инкубации частиц в различных средах наблюдается во всех случаях и свидетельствует о переходе белков в более гидрофильное окружение [26], иными

словами, об их высвобождении в раствор из липосом. Максимально эффективно происходит высвобождение белков из липосом под действием раствора панкреатина, где липазы были специально активированы ионами Са и, по-видимому, более эффективно разрушали липидные частицы.

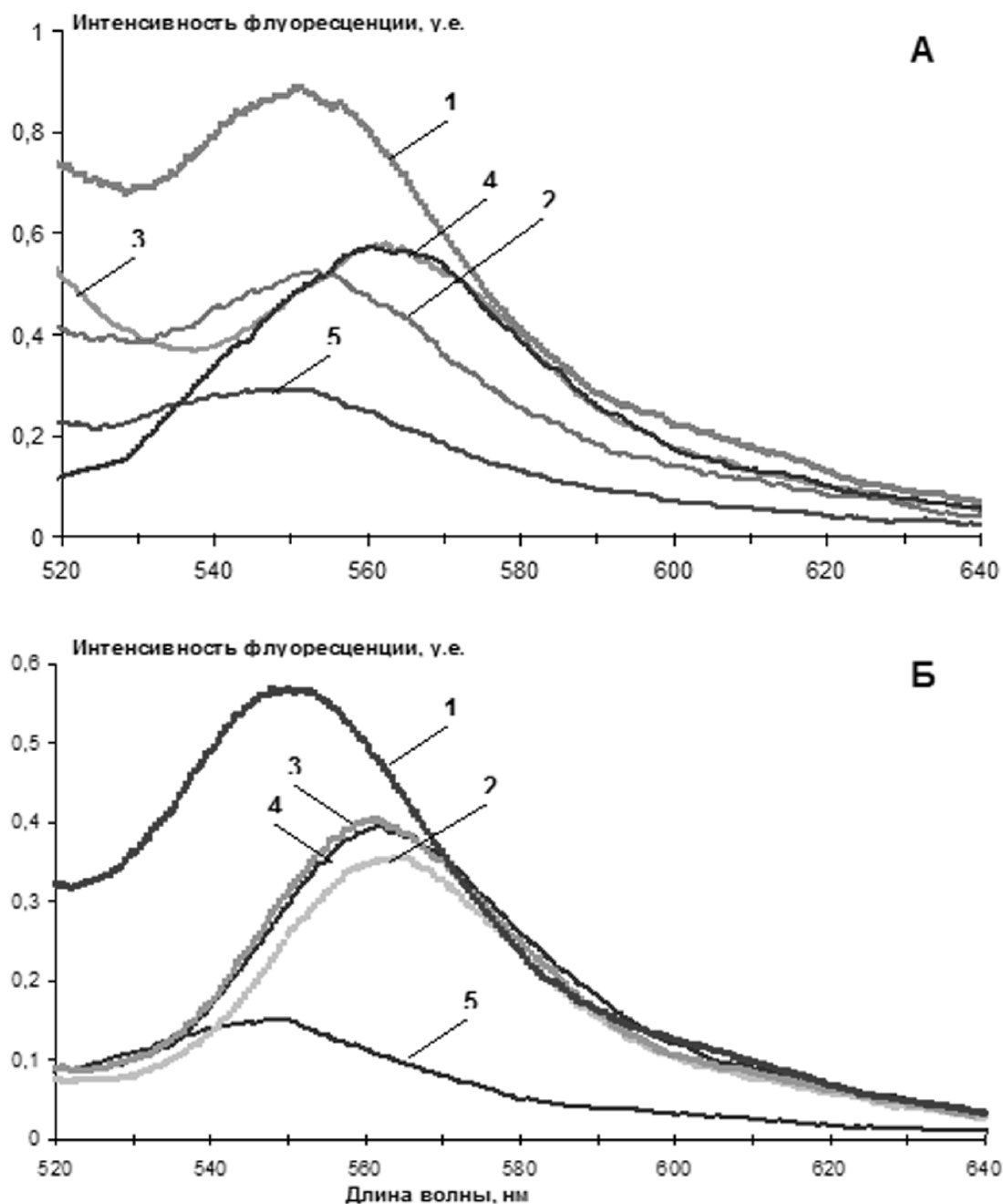


Рисунок 3.

Спектр флуоресценции липосом из смеси ФХ/ФЭ (50/50), содержащих ВРТГ^{РБ} (А) или ВВИ^{РБ} (Б) до (1) и после инкубации в течение 1 часа при 37°C в растворе пепсина (2); 4 мМ ДОХ (3); 15 мМ ДОХ (4); панкреатина (5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь прикладное значение. Проведенные исследования позволяют сделать важный шаг к получению более эффективных лекарственных форм ВВИ и апротинина, перспективных, в том числе, и для перорального применения. Можно представить следующую картину поведения липосом с исследуемыми белками в ЖКТ. При прохождении через желудок они подвергаются изменению, однако значительная часть белка остается связанной. При попадании в область тонкого кишечника, где значение pH близко к 8,0, липосомы будут постепенно диспергироваться и либо разрушаться с высвобождением активного ингибитора под действием липазы, либо в присутствии ионных детергентов восстанавливать свою активность. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о перспективности использования белок-липидных комплексов в качестве лекарственных средств для перорального применения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ (Госконтракт № 02.513.11.0019 от 14. 08. 2008 г).

ЛИТЕРАТУРА

1. Torchilin V.P. (2005) *Nature Rev.*, **4**, 145-160.
2. Chougule M.B., Padhi B.K., Jinturkar K.A., Misra A. (2007) *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **1**, 11-21.
3. Shahiwala A., Vyas T.K., Amiji M.M. (2007) *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **1**, 1-9.
4. Nagai T., Morishita M., Maitani Y. (1996) in: *Recent Adv. in Peptide and Protein Delivery*, 8-th Int. Pharm. Tech. Symp., Ankara, pp. 45-57.
5. Kennedy A.R. (1993) in: *Protease Inhibitors as Cancer Chemoprotective Agents* (W. Troll and A. Kennedy, eds.) Plenum Press, N.Y., London, pp. 9-64.
6. Ascenzi P., Bocedi A., Bolognesi M., Spallarossa A., Coletta M., De Cristofaro R., Menegatti E. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 231-251.
7. Балкина А.С., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Ларионова Н.И. (2006) *Биохимия*, **71**, 103-110.
8. Тюрина О.П., Шарф Т.П., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Ларионова Н.И. (2001) *Биохимия*, **66**, 419-424.
9. Tiourina O., Sharf T., Balkina A., Ollivon M., Selischeva A.A., Sorokoumova G.M., Larionova N.I. (2003) *J. Liposome Res.*, **13**, 213-229.
10. Senior J.H. (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 123-193.
11. Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D. (1999) *Pharm. Rev.*, **51**, 691-743.
12. Rodriguez-Vico F., Martinez-Cayuela M., Garcia-Peregrin E., Ramirez H. (1989) *Anal. Biochem.*, **183**, 275-278.
13. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. (1972) *J. Chromatogr.*, **65**, 451-453.
14. Mchedlov-Petrosyan N.O., Vodolazkaya N.A., Doroshenko A.O. (2003) *J. Fluorescence*, **13**, 235-247.
15. Martin C., Somavarapu S., Alpar H.O. (2005) *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **15**, 301-306.
16. Wu Y.V., Sessa D.J. (1994) *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2136-2138.
17. Voss R.H., Ermler U., Essen L.O., Wenzl G., Kim Y.M., Flecker P. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **242**, 122-131.
18. Werner M.H., Wemmer D.E. (1991) *Biochemistry*, **30**, 3356-3364.
19. Manning M.C., Woody R.W. (1989) *Biochemistry*, **28**, 8609-8613.
20. Lad M.D., Birembaut F., Clifton L.A., Frazier R.A., Webster J.R., Green R.J. (2007) *Biophys. J.*, **92**, 3575-3586.
21. Litzinger D.C., Huang L. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 201-227.
22. Birk Y. (1985) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **25**, 113-131.

23. Song K.-H., Chung C.-K., Shim S.-J. (2005) *J. Controlled Release*, **106**, 298–308.
24. Avdeef A. (2001) *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**, 277-351.
25. Paternostre M.-T., Roux M., Rigaud J.-L. (1988) *Biochemistry*, **27**, 2668-2677.
26. Lakowicz J.R. (1999) *Principles of fluorescence microscopy* (Plenum Press 2-nd ed.) N.Y.

Поступила: 02. 07. 2007.

LIPOSOMAL FORMULATIONS OF PROTEIN PROTEINASE INHIBITORS: PREPARATION AND SPECIFIC ACTIVITY

A.S. Balkina¹, A.A. Selischeva², N.I. Larionova¹

¹Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninsky Gory, 10, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495)939-34-17; fax: (495)939-54-17; e-mail: asbalkina@fromru.com

²Department of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia

Here we investigated encapsulation of water-soluble proteins into multilayer liposomes of soybean zwitterionic phospholipid mixtures (phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE)). The influence of the PC/PE w/w ratio on the incorporation efficiency of the Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor (BBI) and aprotinin (BPTI) into liposomes was studied. Protein encapsulation did not affect liposome sizes. Confocal laser scanning microscopy demonstrated that proteins were located in the central part of the spherical particle and between the bilayers. The biological activity (antitrypsin and antichymotrypsin) assay of the protein entrapped in liposomes showed its active sites were spatially shielded. The effect of an ionic detergent on the activity of the encapsulated BBI and BPTI confirmed this hypothesis and suggested that this shielding is reversible. The liposomes stability in three various media - artificial gastric juice and intestinal fluids was also examined. The liposomes prepared seem to be promising formulations for BBI and BPTI delivery.

Key words: phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, liposomes, aprotinin, Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor.