

УДК 577.15

©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ СОПОЛИМЕРОВ ПЭГ-ХИТОЗАНА ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA*

Е.В. Кудряшова^{1*}, К.В. Суховерков¹, Н.Н. Соколов²

¹Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Воробьевы горы, 1; эл. почта: helena_koudriachova@hotmail.com

²Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Предложен новый подход к регуляции каталитических свойств медицински значимых ферментов на примере нового рекомбинантного препарата L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* (EwA), перспективного для применения в онкологической практике. Синтезированы привитые со-полимеры “щёточной” структуры на основе хитозана, модифицированного молекулами полиэтиленгликоля (ПЭГ), ПЭГ-хитозан, различного состава. Полученные сополимеры были использованы для синтеза конъюгатов с EwA. Для оптимизации каталитических свойств аспарагиназы были получены два типа конъюгатов, отличающихся по своей архитектуре: (1) конъюгаты “короннообразного” типа, синтез которых проводили посредством реакции восстановительного аминирования между восстанавливающим концом в сополимере ПЭГ-хитозан и аминокетонами фермента; и (2) конъюгаты “многооточечного” типа, синтез которых осуществляли при помощи реакции образования многоточечных амидных связей между аминокетонами ПЭГ-хитозана и карбоксильными группами фермента в присутствии реактива Вудворда. Изучение структуры и состава полученных конъюгатов проводили методом ИК спектроскопии. Содержание сополимеров в конъюгатах контролировали по характеристической полосе поглощения C-O-C связей в структуре ПЭГ на частоте 1089 см⁻¹. Исследование каталитических характеристик препаратов EwA методом кондуктометрии показало, что конъюгаты фермента с ПЭГ-хитозаном оптимальной структуры и оптимального состава по своей каталитической эффективности (k_{cat}/K_m) при физиологических значениях pH превосходят нативный фермент в 5-8 раз. Предложенный подход - хитоПЭГилирование является эффективным для регуляции каталитических свойств аспарагиназы и представляется перспективным для разработки лекарственных форм пролонгированного действия как аспарагиназы, так и других ферментных препаратов медицинского назначения.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, ПЭГ-хитозан, разветвленные сополимеры, каталитическая активность, кондуктометрия, ИК-спектроскопия.

DOI: 10.18097/PBMC20156104480

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в результате интенсивного развития биотехнологии и генной инженерии ферменты и белки находят широкое применение в медицине. Так, бактериальные L-аспарагиназы – уникальные по механизму действия противоопухолевые препараты, – относятся к обязательным компонентам программ химиотерапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), лимфо- и ретикулобластом и неходжкинских лимфом высокой

степени злокачественности у детей [1-4]. В последнее время появились сообщения об использовании аспарагиназы для лечения острой миелобластной лейкемии, болезни Ходжкина, меланосаркомы и множественной миеломы [5-6]. Патенты последних лет также указывают на применимость аспарагиназы в лечении аутоиммунных заболеваний и иммунной недостаточности. Ведутся клинические испытания по применению препаратов аспарагиназы для лечения лимфом, связанных со СПИДом [7].

Принятые сокращения: EwA - L-аспарагиназа из *Erwinia carotovora*, ПЭГ - полиэтиленгликоль, mPEG-suc-NHS - метоксиполиэтиленгликоль-N-гидроксисукцинимидил-сукцинат, ПЭГ-хитозан – хитозан, модифицированный полиэтиленгликолем; ИК спектроскопия – инфракрасная спектроскопия.

* - адресат для переписки

Однако главными лимитирующими факторами использования L-аспарагиназы как лекарственного средства является быстрая инактивация и выведение фермента из организма, что делает необходимым частое введение препарата для поддержания его терапевтического уровня, а также развитие побочных эффектов от аллергических реакций вплоть до анафилактического шока, представляющего угрозу для жизни больного [3]. В настоящее время для повышения стабильности, растворимости и улучшения иммунологических и фармакокинетических свойств ферментов широко используется ПЭГилирование – ковалентное присоединение цепей полиэтиленгликоля (ПЭГ) к поверхности белковой молекулы [8-17].

Однако длительное терапевтическое применение ферментных препаратов, в том числе и ПЭГилированных форм, сопровождается рядом побочных эффектов. Так, получившая широкое применение ПЭГилированная форма аспарагиназы “Онкаспар” не в полной мере решает проблему и не достаточно уменьшает вероятность развития аллергических реакций: после превышения контрольного уровня антител применение как нативного, так и ПЭГилированного фермента является неэффективным и может привести к развитию у пациента гиперчувствительности вплоть до анафилактического шока [18].

В представленной работе для получения лекарственных форм пролонгированного действия предложен новый подход, основанный на образовании конъюгатов ферментов с привитыми сополимерами “щеточной” структуры на основе хитозана и ПЭГ – ХитоПЭГилирование. Хитозан – биосовместимый, биodeградируемый полисахарид, который широко применяются в косметической и фармацевтической промышленности. Физико-химические и соответственно биологические свойства хитозана можно целенаправленно варьировать в чрезвычайно широком диапазоне в зависимости от степени полимеризации, степени деацелирования и наличия заместителей [19]. Это даёт дополнительную “степень измерения”, расширяющую возможности создания систем с заданными свойствами. Кроме того, полиэлектролитная природа сополимеров обуславливает многочисленное электростатическое взаимодействие с поверхностью белка, что способствует стабилизации конформации фермента, а также создает специфическое микроокружение вблизи активного центра фермента, что позволяет регулировать каталитические свойства фермента [20].

Важным преимуществом использования технологии ХитоПЭГилирования по сравнению с традиционным ПЭГ является возможность целенаправленно изменять значение pH вблизи активного центра фермента, за счёт полиэлектролитных свойств хитозана, что особенно актуально для применения ферментов с pH оптимумом активности удалённым от физиологического значения,

таких как L-аспарагиназа, аргиназа и другие, pH оптимум которых находится в щелочной области (pH 8,6 и выше) [13].

Разработка нового подхода получения ферментных форм пролонгированного действия осуществлена на примере нового рекомбинантного фермента L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (EwA), продуцируемого генно-инженерными штаммами *E. coli* [21-25]. Доклинические испытания продемонстрировали высокую эффективность препарата EwA в проведённых тестах на противоопухолевую активность, гиперчувствительность и токсичность [22], что определяет перспективность разработки препарата пролонгированного действия на основе данного фермента.

Представленная работа посвящена синтезу конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозаном различной архитектуры и оптимизации каталитических свойств для разработки лекарственного препарата аспарагиназы пролонгированного действия.

МЕТОДИКА

Материалы

Препарат рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* получали с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/pACYC177_LANS, сконструированного ранее [23-24]. В 200 мл LB-среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, вносили 3 мл ночной культуры и выращивали при 37°C и перемешивании 150-180 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀=1,5-2,0. Затем в среду добавляли индуктор синтеза L-аспарагиназы ИПТГ в конечной концентрации 0,1 mM и клетки инкубировали в течение 16-20 ч при тех же условиях. Клетки собирали центрифугированием (15 мин, 15000 g) и хранили при -20°C. Выделение EwA осуществляли путём разрушения клеток на Френч-Прессе с последующим высаливанием целевого продукта сернокислым аммонием и хроматографической очисткой на колонке с SP-Сефарозой [21-22].

Полимеры

Образцы хитозана с молекулярной массой (MM) 15 кДа, степенью деацелирования 80% – препараты фирмы “Олигофарм” (Россия); активированное производное полиэтиленгликоля монометокси-полиэтиленгликоль-N-гидроксисукцинимидилсукцинат (mPEG-suc-NHS) с молекулярной массой 5 кДа – любезно предоставлено Н.С. Мелик-Нубаровым (химический факультет МГУ) [25].

Растворители

Этанол (96%); диметилформамид и диметилсульфоксид и другие растворители фирмы “Sigma” (США).

Прочие соединения, используемые для приготовления буферных растворов, – препараты фирмы “Sigma”; ледяная уксусная кислота – препарат фирмы “Lancaster” (США).

Синтез сополимеров ПЭГ-хитозан проводили с использованием препарата хитозана (ММ 15 кДа) и mPEG-suc-NHS (ММ 5 кДа). Хитозан в концентрации 5 мг/мл был растворен в 3%-ном растворе уксусной кислоты, pH 4,0. После получения прозрачного раствора, pH системы доводили до 6,5 с использованием 5 мМ натрий-фосфатного буфера. Конечная концентрация хитозана в растворе составила 3 мг/мл. В полученный раствор по каплям при перемешивании вводили 5-35-кратный молярный избыток раствора mPEG-suc-NHS в ДМСО в пересчёте на моль деацелированных аминокрупп хитозана. При проведении реакции pH раствора доводили до 7,5 натрий-фосфатным буфером. Реакцию проводили в течение 1-4 ч. Очистку производили методом диализа против 5 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,0. Полноту очистки контролировали методами FTIR и УФ-спектроскопии.

Измерение ИК спектров всех исследуемых образцов проводили на ИК спектрометре Фурье Bruker Tensor 27 (Германия), оснащённом МСТ детектором, охлаждаемым жидким азотом. Оборудование было подключено к системе продувки сухим воздухом Jun-Air. Измерения проводились в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) BioATR-II, с ZnSe кристаллом ("Bruker", Германия). В типичном эксперименте в ячейку НПВО ИК спектрометра помещали 30 мкл раствора образца с концентрацией 0,5-2 мг/мл. Спектры измеряли в интервале частот 4000-900 см^{-1} со спектральным разрешением 2 см^{-1} . Температура измерения 22°C. Для каждого спектра производилось 100-кратное сканирование и усреднение. Регистрацию фона проводили в аналогичных условиях. Анализ спектров проводили с помощью программы Opus 7.0.

Определение содержания цепей ПЭГ в образцах ПЭГ-хитозан и конъюгатах аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном методом ИК-спектроскопии

Метод основан на анализе интенсивности характеристической полосы поглощения молекул ПЭГ соответствующей валентным колебаниям С-О-С связи, расположенной на 1089 см^{-1} в ИК спектре исследуемых образцов. Данная полоса является высокоинтенсивной и расположена вдали от основных функциональных групп в биомолекулах, таких как карбонильная, гидроксильная, карбоксильная и аминокгруппа. В типичном эксперименте в ячейку НПВО ИК-спектрометра помещали 30 мкл раствора образца ПЭГ-хитозана или конъюгата аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном с концентрацией 0,5-2 мг/мл. Прописывали ИК-спектр как описано выше и определяли интенсивность полосы поглощения образца на частоте 1089 см^{-1} . Содержание цепей ПЭГ в образце рассчитывали с использованием калибровочной кривой, представленной как зависимость интенсивности полосы поглощения на частоте 1089 см^{-1} от концентрации ПЭГ, полученной в независимом эксперименте для свободного ПЭГ с ММ 5 кДа.

Получение конъюгатов аспарагиназы с сополимерами ПЭГ-хитозана

Конъюгаты аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном синтезировали двумя способами. В первом случае конъюгат получали модификацией аминокгрупп фермента по реакции образования основания Шиффа с восстанавливающим концом хитозана с последующим восстановлением боргидридом натрия. Препарат EwA (5 мг/мл) растворяли в 100 мМ натрий фосфатном буфере (pH 7,5) и добавляли порциями при перемешивании раствор ПЭГ-хитозан в молярном соотношении по отношению к ферменту 20:1. Реакционную смесь инкубировали в присутствии боргидрида натрия при перемешивании от 1 до 3 ч. Полученный конъюгат отделяли от непрореагировавшего сополимера диафильтрацией с применением фильтров "Amicon Ultra" (Centrifugal Filters for Protein Purification and Concentration, США). Полученный препарат фермента хранили при -20°C.

Синтез "многоочечных" конъюгатов проводили за счёт образования многоочечных амидных связей между аминокгруппами ПЭГ-хитозана и карбоксильными группами фермента в присутствии реактива Вудворда. Препарат EwA (5 мг/мл) растворяли в 100 мМ натрий ацетатном буфере pH 5, и смешивали с ПЭГ-хитозаном в молярном соотношении по отношению к ферменту 20:1. Реакционную смесь инкубировали при перемешивании в присутствии реактива Вудворда от 2 до 3 ч. Очистку и хранение полученного конъюгата проводили так же, как в случае "коронообразного" конъюгата.

Определение каталитической активности препаратов аспарагиназы

Скорости гидролиза L-аспарагина препаратами L-аспарагиназы определяли с помощью автоматического титратора, снабженного кондуктометрическим датчиком InLab 741 "Mettler Toledo T70" (Швейцария). Аликвоту фермента (10-20 мкл) добавляли к 2 мл 15 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7,5, содержащего L-аспарагин в концентрации 1-15 мМ. Конечная концентрация фермента составляла 0,01 мг/мл. За единицу активности L-аспарагиназы принимали количество фермента, гидролизующее 1 микромоль L-аспарагина в течение 1 мин при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения конъюгатов с EwA в работе синтезированы привитые сополимеры разветвлённой структуры на основе полиаминосахарида поликатионной природы, хитозана, модифицированного молекулами ПЭГ. Синтез со-полимеров ПЭГ-хитозана проводили путём химической модификации аминокгрупп хитозана активированным производным ПЭГ (mPEG-suc-NHS) (рис. 1). Данное соединение отличается высокой реакционной способностью и низкой токсичностью, что позволяет использовать его для получения аддуктов с различными биомолекулами медицинского назначения [15, 25].

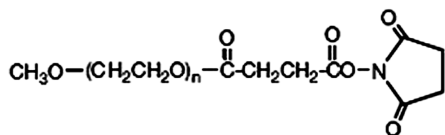


Рисунок 1. Структурная формула активированного производного ПЭГ, монометоксиполиэтиленгликоль-N-гидроксисукцинимидил-сукцинат (mPEG-suc-NHS).

Для получения конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозаном с оптимальными каталитическими свойствами, нами был синтезирован ряд препаратов ПЭГ-хитозана с различным содержанием ПЭГ. Полученные препараты были охарактеризованы при помощи ИК-спектроскопии Фурье (FTIR). На рисунке 2 представлены ИК-спектры одного из образцов сополимера ПЭГ-хитозан-20 и спектр активированного производного ПЭГ. В качестве контроля приведён спектр немодифицированного хитозана (рис. 2, вставка). В ИК-спектре хитозана наблюдается ряд характеристических полос поглощения, относящихся к функциональным группам в структуре полиаминосахарида. Полосы поглощения в области 3000-2900 см⁻¹, соответствуют валентным колебаниям связей С-Н. Присутствие свободных аминогрупп в структуре хитозана проявляется в наличии полосы в области 1600-1540 см⁻¹, которая соответствует ассиметричным деформационным колебаниям аминогрупп -NH₃⁺ и полосы при 1317 см⁻¹, которая соответствует симметричным деформационным колебаниям аминогрупп. Полосы поглощения в области 1430-1370 см⁻¹ обусловлены деформационными колебаниями -CH₂ и -ОН групп. Кроме вышеописанных максимумов, в ИК-спектрах хитозана присутствует набор полос поглощения в интервале частот 1200-950 см⁻¹, принадлежащих к колебаниям С-О-С, С-Н и С-С связей в структуре полисахарида [23-24].

В ИК-спектре mPEG-suc-NHS следует выделить высокоинтенсивную полосу поглощения при 1089 см⁻¹, отвечающую колебаниям С-О-С фрагментов ПЭГ (рис. 2). Наличие в ИК-спектре модифицированного производного хитозана характеристической полосы поглощения С-О-С группы при 1089 см⁻¹ при сохранении основных полос поглощения хитозана подтверждает прошедшую модификацию хитозана полиэтиленгликолем.

Количественно содержание цепей ПЭГ в полученных препаратах ПЭГ-хитозана определяли из калибровочной зависимости интенсивности пика при 1089 см⁻¹ от концентрации ПЭГ, полученной в независимом эксперименте. Из анализа ИК-спектров следует, что степени модификации хитозана ПЭГом в исследуемых образцах составляют 20 и 35 и 50% (обозначим данные образцы, соответственно, ПЭГ-хитозан-20; ПЭГ-хитозан-35 и ПЭГ-хитозан-50), что соответствует 8, 14 и 20 молекулам ПЭГ-5000 на каждую молекулу хитозана (ММ 15 кДа).

Синтез конъюгатов аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном

Для получения конъюгатов EwA с сополимерами с оптимальными свойствами исследовано влияние молекулярной архитектуры конъюгатов на каталитическую активность фермента. Кроме того оптимизацию свойств конъюгатов проводили варьированием состава сополимера (степени ПЭГилирования хитозана).

Синтез конъюгатов аспарагиназы препаратами ПЭГ-хитозана проводили двумя способами. В первом случае проводили модификацию фермента путём одностороннего взаимодействия аминогрупп фермента с восстанавливающим концом молекул ПЭГ-хитозана посредством реакции восстановительного аминирования в присутствии боргидрида натрия. Получаемый конъюгат в соответствии с условиями синтеза содержит

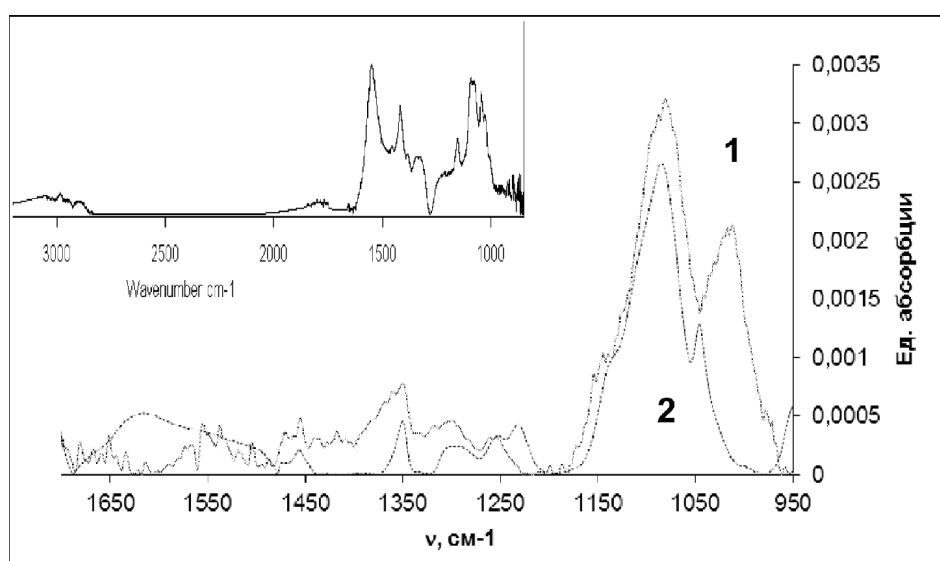


Рисунок 2. ИК спектры ПЭГ-хитозана-20 (кривая 1) в сравнении с mPEG-suc-NHS (кривая 2) в области характеристических полосы поглощения цепей ПЭГ и пиранозной структуры хитозана (1200-950 см⁻¹). Вставка: ИК-спектры хитозана. Экспериментальные условия: 5мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0.

несколько цепей ПЭГ-хитозана, связанных по аминогруппами с молекулой фермента. Такой конъюгат будем называть далее “коронообразный” (рис. 3). Во втором случае синтез конъюгата проводили за счёт многоточечного взаимодействия карбоксильных групп фермента со свободными аминогруппами хитозана в сополимере с образованием амидных связей в присутствии реактива Вудворда. В результате образуется конъюгат, в котором каждая молекула фермента многоточечно связана с молекулой полиэлектrolита (ПЭГ-хитозана). Такой конъюгат будем называть далее “многоточечным”. Структуры полученных конъюгатов первого и второго типов схематически приведены на рисунке 3.

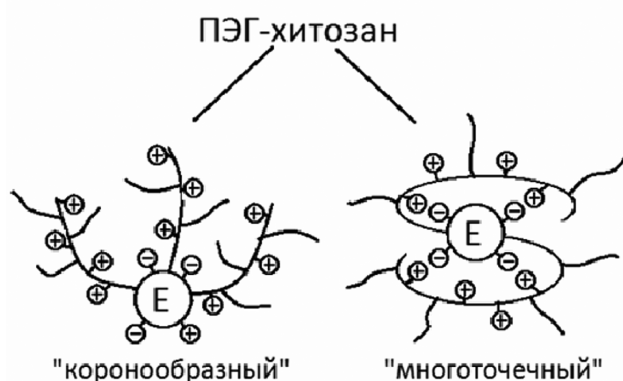


Рисунок 3. Схематические структуры конъюгатов “многоточечного” и “коронообразного” типа.

Конъюгаты ферментов, полученные обоими способами, были охарактеризованы методами ИК-спектроскопии. ИК-спектр “многоточечного” конъюгата EwA-ПЭГ-хитозан в сравнении со спектром нативного фермента (вставка) представлен на рисунке 4А. Из анализа ИК-спектров следует, что в результате модификации EwA с получением “многоточечного” конъюгата появляется интенсивная полоса на 1089 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям связи C-O-C, характерная для цепей ПЭГ; наблюдается увеличение интенсивности полос амид 2 и амид 3 ($1600\text{--}1500$ и $1300\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, соответственно), относящихся к деформационным колебаниям связей N-H и валентным колебаниям связей C-N), что, по-видимому, соответствует образованию многоточечных амидных связей между карбоксильными группами фермента и аминогруппами ПЭГ-хитозана. При образовании конъюгата наблюдается увеличение интенсивности пиков, относящихся к валентным колебаниям $\text{-CH}_2\text{-}$ групп в области $3000\text{--}2900\text{ см}^{-1}$, а также появление пиков, соответствующих колебаниям пиранозной структуры хитозана (валентные колебания C-O, C-N и C-C связи) в области $1200\text{--}950\text{ см}^{-1}$.

При получении “коронообразного” конъюгата также, как и в случае “многоточечного” варианта наблюдается появление интенсивной полосы на 1080 см^{-1} , характерной для цепей ПЭГ, а также появляются все основные пики, соответствующие колебаниям структуры хитозана. Однако в области

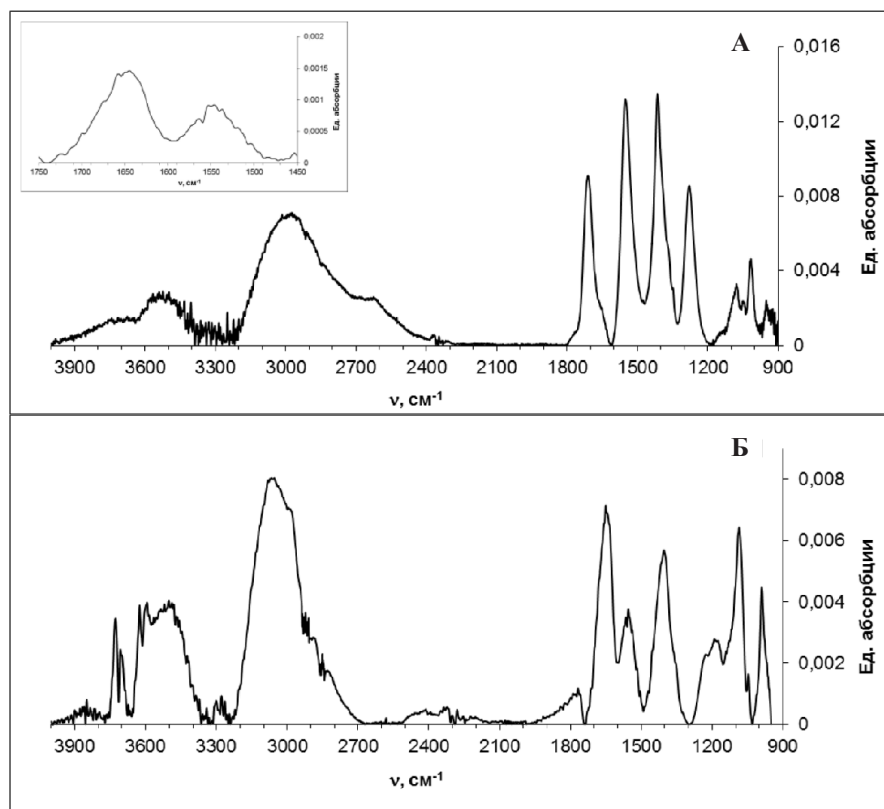


Рисунок 4. ИК-спектры конъюгатов EwA-ПЭГ-хитозан “многоточечного” типа (А) и “коронообразного” типа (Б). Вставка: ИК-спектр EwA в области амид 1 - амид 2.

поглощения амидной связи наблюдаются различия по сравнению с “многоточечным” конъюгатом. Так, при модификации фермента по аминок группам по реакции восстановительного алкилирования увеличения интенсивности пиков в областях амид 2 и амид 3 (1600-1500 см⁻¹ и 1300-1200 см⁻¹, соответственно) не наблюдается. Этот результат соответствует тому, что в случае “коронаобразного” конъюгата новых амидных связей между ферментом и ПЭГ-хитозаном не образуется. При рассмотрении ИК-спектра “коронаобразного” конъюгата (рис. 4Б) обращает внимание увеличение интенсивности полосы на 950 см⁻¹, относящейся, наиболее вероятно, к колебаниям связей C-N-C, образование которых происходит в результате реакции восстановительного алкилирования аминок групп фермента.

На основе анализа ИК спектров проводили определение состава конъюгатов. Из интенсивности пика при 1089 см⁻¹, соответствующего характеристическим колебаниям связей C-O-C, определяли содержание сополимера в полученных конъюгатах, а из интенсивностей пиков в интервале 1660-1630 см⁻¹ (амид 1 область), соответствующих поглощению пептидных связей в белке, определяли концентрацию фермента в системе.

Для всех полученных конъюгатов было рассчитано число молекул ПЭГ-хитозана, приходящееся на молекулу фермента (табл. 1). Из анализа ИК спектров следует, что в результате модификации аспарагиназы сополимерами, в которых содержание цепей ПЭГ, приходящееся на молекулу хитозана варьировалось от 8 до 20, были синтезированы “многоточечные” конъюгаты содержащие от 1 до 7 цепей сополимера на молекулу фермента. При синтезе “коронаобразных” конъюгатов аспарагиназы с теми же сополимерами содержание сополимера на молекулу фермента (n(PEG-chit)/n(enз)) было выше во всех случаях (от 8 до 38 цепей, табл. 1), как и ожидалось в соответствии со схемой синтеза конъюгатов.

Таблица 1. Определение состава конъюгатов EwA-ПЭГ-хитозан из анализа ИК-спектров.

Состав сополимеров ПЭГ-хитозан	Состав «многоточечных» конъюгатов	Состав «коронаобразных» конъюгатов
n(PEG)/n(chit)	n(PEG-chit)/n(enз)	n(PEG-chit)/n(enз)
8±2	7,4±2	19±2
14±2	1,5±0,5	38±4
20±2	1,2±0,5	8±2

Каталитическая активность конъюгатов аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном.

Каталитические свойства полученных конъюгатов аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном определяли методом кондуктометрии. За ходом реакции следили по увеличению электропроводности системы в ходе реакции гидролиза аспарагина. Увеличение электропроводности раствора с течением времени

реакции повышается за счёт образования L-аспарагиновой кислоты, содержащей больше ионогенных групп, чем молекула L-аспарагина, и молекулы аммиака, образующей при взаимодействии с водой два иона. Для определения кинетических параметров k_{cat} и K_M для конъюгатов аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном в сравнении с нативным ферментом анализировали полные кинетические кривые гидролиза аспарагина.

Обнаружено, что в случае “многоточечных” конъюгатов наблюдается снижение каталитической эффективности модифицированного фермента по сравнению с нативным. Так, для всех полученных конъюгатов “многоточечного” типа при варьировании содержания ПЭГ в сополимере ПЭГ-хитозан (n(PEG)/n(chit)) от 8 до 20 удельная активность фермента была в 1,5-2 раза ниже по сравнению с нативным ферментом. Уменьшение активности фермента в “многоточечных” конъюгатах происходит за счёт увеличения K_M в 1,5-3 раза в зависимости от состава конъюгата (табл. 1). По-видимому, при образовании конъюгатов данного типа снижается доступ субстрата к активному центру фермента, что приводит к увеличению кажущейся константы K_M .

Напротив, образование “коронаобразных” конъюгатов приводит к увеличению каталитической активности фермента по сравнению с нативной аспарагиназой. Причём каталитические параметры (V_{max} и K_M), зависят от степени ПЭГилирования сополимера. Так, при повышении содержания цепей ПЭГ в со-полимере ПЭГ-хитозан параметр V_{max} и каталитическая эффективность V_{max}/K_M для “коронаобразных” конъюгатов проходит через оптимум, который наблюдается при стехиометрическом соотношении ПЭГ:хитозан в сополимере 14:1 (табл. 2). Для наиболее активного конъюгата значение V_{max} в 3-4 раза превышает таковое для нативного фермента при этом значение K_M уменьшается в 1,5-2 раза (табл. 2). Результаты определения кинетических параметров аспарагиназы и её конъюгатов “коронаобразного” типа с различным соотношением ПЭГ:хитозан в сополимере приведены в таблице 2.

Таблица 2. Кинетические параметры “коронаобразных” конъюгатов EwA-ПЭГ-хитозан в сравнении с нативной EwA.

Фермент	V_{max} , ME	K_M , мкМ	Отношение V_{max}/K_M , ME/мкмоль
EwA	95±5	37±5	2,5
EwA-хитозан	240±10	115±10	2,1
EwA-ПЭГ-хитозан (PEG)/n(chit)=2	260±10	55±5	4,8
EwA-ПЭГ-хитозан (PEG)/n(chit)=8	310±10	38±5	8,2
EwA-ПЭГ-хитозан (PEG)/n(chit)=14	350±10	20±5	17,5
EwA-ПЭГ-хитозан (PEG)/n(chit)=20	270±10	18±3	15

Таким образом, исследование зависимости ферментативной активности аспарагиназы от молекулярной архитектуры конъюгатов и состава конъюгатов показало, что оптимальный метод получения конъюгатов – синтез с образованием “короннообразной” структуры, а оптимальное соотношение ПЭГ:хитозан в сополимере – 14:1. Образование такого конъюгата приводит к увеличению каталитической эффективности препарата в 5-6 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе предложен новый подход к регуляции каталитических свойств медицински значимых ферментов. Данный подход основан на образовании конъюгатов фермента с сополимером разветвленной архитектуры ПЭГ-хитозан. Для изучения структуры и состава полученных сополимеров ПЭГ-хитозан, а также их конъюгатов с EwA, применён метод ИК-спектроскопии. Продemonстрировано, что метод ИК-спектроскопии является чувствительным и высокоинформативным для контроля синтеза и характеристики как самих сополимеров, так и их конъюгатов с ферментом. Метод позволяет следить за образованием соответствующих ковалентных связей при получении сополимера, а также при синтезе конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозаном, что позволяет получать информацию о структуре полученных конъюгатов. Анализ ИК-спектров даёт возможность определять стехиометрическое соотношение компонентов в конъюгатах, содержащих несколько высокомолекулярных соединений: аминополисахарид – хитозан, белковую часть и ПЭГ.

Найдено, что оптимизация молекулярной архитектуры конъюгата и состава сополимера позволяет добиться значительного увеличения уровня каталитической активности фермента по сравнению с нативным при требуемых условиях (в данном случае при физиологических условиях). Повышение уровня каталитической активности фермента при образовании конъюгатов с сополимером на основе полисахарида поликатионной природы связано, по-видимому, с изменением pH оптимума активности фермента. Так, нами было обнаружено, что оптимум каталитической активности аспарагиназы в конъюгатах с ПЭГ-хитозаном может изменяться в зависимости от состава конъюгата более чем на единицу pH (от 8,6 для нативного фермента до 7,2 для конъюгата). Следует отметить, что возможность сдвигать pH оптимум и изменять микроокружение активного центра фермента позволяет увеличивать уровень каталитической активности в несколько раз. Данный прием может быть использован для любых терапевтически значимых белков и ферментов, и особенно эффективен, когда pH оптимума активности фермента существенно отличается от физиологических значений [13, 28].

Таким образом, предложенная в работе концепция применения сополимеров ПЭГ-полиаминосахаридов

представляется перспективной для создания ферментных препаратов пролонгированного действия. Преимуществом предложенной технологии является возможность целенаправленно регулировать физико-химические и биологические свойства конъюгатов фермента с сополимером в чрезвычайно широком диапазоне за счёт варьирования архитектуры сополимера, степени полимеризации, плотности заряда на полиэлектролите и др. Это даёт дополнительную “степень измерения”, расширяющую возможности создания систем с заданными свойствами, в частности, позволяет повысить уровень каталитической активности фермента в требуемых условиях, что в конечном итоге позволит существенно снизить терапевтическую дозу препарата и повысить качество лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pui C.H., Evans W.E. (2006) *N. Engl. J. Med.*, **354**, 166-178.
2. Redaelli A., Laskin B.L., Stephens J.M., Botteman M.F., Pashos C.L. (2005) *Eur. J. Cancer Care*, **14**, 53-62.
3. Uren J.R., Schumacher R.E. (1977) In: *Cancer: A comprehensive treatise* (Becker F.F., ed.). Plenum Press, New York, **5**, pp. 487-557.
4. Papageorgiou A.C., Posypanova G.A., Andersson C.S., Sokolov N.N., Krasotkina J. (2008) *FEBS J.*, **17**, 4306-4316.
5. Taylor C.W., Dorr R.T., Fanta P., Hersh E.M., Salmon S.E. (2001) *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **47**, 83-88.
6. Kobrinsky N.L., Spoto R., Shah N.R., Anderson J.R., DeLaat C., Morse M., Warkentin P., Gilchrist G.S., Cohen M.D., Shina D., Meadows A.T. (2001) *J. Clin. Oncol.*, **19**, 2390-2396.
7. Avramis V.I., Kwock R., Avramis I.A., Cohen L.J., Inderlied C. (2001) *In Vivo*, **15**, 1-9.
8. Soares A.L., Guimaraes G.M., Polakiewicz B., de Moraes Pitombo R.N., Abrahao-Neto J. (2002) *Inter. J. Pharm.*, **237**, 163-170.
9. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 459-476.
10. Pasut G., Sergi M., Veronese F.M. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 69-78.
11. Moreadith R.W., Collen D. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1337-1345.
12. Ton G.N., Fine J.P., Kwon C.S. (2005) *J. Control Release*, **104**, 129-139.
13. Cheng P.N., Lam T.L., Tsui S.M., Cheng A.W., Lo W.H., Leung Y.C. (2007) *Cancer Res.*, **67**, 309-317.
14. Kieseier B.C., Calabresi P.A. (2012) *CNS Drugs*, **26**, 205-214.
15. Кучумова А.В., Красоткина Ю.В., Хасигов П.З., Соколов Н.Н. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 107-111.
16. Mozhaev V.V., Kudryashova E.V., Efremova N., Topchieva I.N. (1996) *Biotech. Techniques*, **10**, 849-854.
17. Abuchowski A., Kazo G.M., Verhoest C.R. Jr., Van Es T., Kafkewitz D., Nucci M.L., Viau A.T., Davis F.F. (1984) *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**, 175-186.
18. Dinndorf P.A., Gootenberg J., Cohen M.H., Keegan P., Pazdur R. (2007) *Oncologist*, **12**, 991-998.
19. Lin W.J., Chen M.H. (2007) *Carbohydrate Polymers*, **67**, 474-480.
20. Кудряшова Е.В., Зоров И.Н., Васильева И.В., Сеницын А.П., Левашиов А.В. (2009) *Биорг. химия*, **35**, 1-8.

21. Борисова А.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Соколов Н.Н. (2003) Биомед. химия, **49**, 502-507.
22. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Сидорук К.В., Жгун А.А., Борисова А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Богуш В.Г., Красоткина Ю.В., Гервазиев Ю.В., Покровская М.В., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Скрябин К.Г., Арчаков А.И. (2005) Мол. медицина, **1**, 45-53.
23. Омелянюк Н.М., Борисова А.А., Александрова С.С., Покровская М.В., Эльдаров М.А., Арчаков А.И., Скрябин К.Г., Соколов Н.Н. (2005) Биотехнология, **3**, 27-34.
24. Эльдаров М.А., Жгун А.А., Гервазиев Ю.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Арчаков А.И., Скрябин К.Г., Соколов Н.Н. (2004) Патент на изобретение РФ №2221868 по заявке №2001123442. БИ № 2.
25. Карасев В.С., Бочкова О.П., Чугунов А.М., Мелик-Нубаров Н.С., Гроздова И.Д., Черновская Т.В., Денисов Л.А., Руденко Е.Г., Морозова Е.Л., Богуш В.Г., Сидорук К.В., Колтун И.О., Скатова Г.Е., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Соколов Н.Н. (2010) Патент на изобретение РФ №2441914 по заявке №2010140842. БИ № 4.
26. Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. (2010) Хитин и хитозан: природа, получение и применение. Изд.-во Российское Хитиновское Общество.
27. Озерин А.Н., Перов Н.С., Зеленецкий А.Н., Озерина Л.А., Сурин Н.М., Владимиров Л.В., Юловская В.Д. (2009) Рос. Нанотех., **4**, 107-113.
28. Pasut G., Veronese F.M. (2009) Adv. Drug Deliv. Rev., **61**, 1177-1188.

Поступила: 17. 07. 2013.

PEG-CHITOSAN BRANCHED COPOLYMERS TO IMPROVE THE BIOCATALYTIC PROPERTIES OF *ERWINIA CAROTOVORA* RECOMBINANT L-ASPARAGINASE

E.V. Kudryashova¹, K.V. Suhoverkov¹, N.N. Sokolov²

¹Moscow State University,

1 Vorobyovy Gory, Moscow, 119899 Russia; fax: +7(095)939-2742;

e-mail: Helena_koudriachova@hotmail.com

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya ul, Moscow, 119121 Russia

A new approach to the regulation of catalytic properties of medically relevant enzymes has been proposed using the novel recombinant preparation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* (EwA), a promising antitumor agent. New branched co-polymers of different composition based on chitosan modified with polyethylene glycol (PEG) molecules, designated as PEG-chitosan, have been synthesized. PEG-chitosan copolymers were further conjugated with EwA. In order to optimize the catalytic properties of asparaginase two types of conjugates differing in their architecture have been synthesized: (1) crown-type conjugates were synthesized by reductive amination reaction between the reducing end of the PEG-chitosan copolymer and enzyme amino groups; (2) multipoint-conjugates were synthesized using the reaction of multipoint amide bond formation between PEG-chitosan amino groups and carboxyl groups of the enzyme in the presence of the Woodward's reagent. The structure and composition of these conjugates were determined by IR spectroscopy. The content of the copolymers in the conjugates was controlled by the characteristic absorption band of C-O-C bonds in the PEG structure at the frequency of 1089 cm⁻¹. The study of catalytic characteristics of EwA preparations by conductometry showed that at physiological pH values the enzyme conjugates with PEG-chitosan with optimized structure and the optimal composition demonstrated 5-8-fold higher catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) than the native enzyme. To certain extent, this can be attributed to favorable shift of pH-optima in result of positively charged amino-groups introduction in the vicinity of the active site. The proposed approach, chito-pegylation, is effective for regulating the catalytic and pharmacokinetic properties of asparaginase, and is promising for the development of prolonged action dosage forms for other enzyme therapeutics.

Key words: L-asparaginase, PEG-chitosan, branched copolymers, catalytic activity, conductometry, IR spectroscopy.