

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 616-008.939.15-39:616.12-008.61

©Коллектив авторов

ПЕГИЛИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ 5000

А.В. Кучумова¹, Ю.В. Красоткина^{1}, П.З. Хасигов², Н.Н. Соколов¹*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им.В.Н.Ореховича, РАМН, Москва;
тел/факс (495) 246-3380; эл.почта: yulia.krasotkina@ibmc.msk.ru

²Медицинская академия им.И.М.Сеченова, Москва.

Разработан метод конъюгирования рекомбинантного фермента с полиэтиленгликолем с целью усиления терапевтических свойств аспарагиназы. В качестве модифицирующего реагента использовали метоксиполиэтиленгликоль-*n*-нитрофенилкарбонат с молекулярной массой 5000. В результате оптимизации процесса пегилирования показано, что при 4,5-кратном молярном соотношении метоксиполиэтиленгликоль-*n*-нитрофенилкарбоната и аспарагиназы удалось добиться высокой степени модификации фермента - более 10 молекул метокси-полиэтиленгликоля на 1 молекулу фермента. При этом сохраняется более 57% специфической активности аспарагиназы. Предложенная схема пегилирования аспарагиназы является простой, эффективной и может служить для получения фермента с улучшенными терапевтическими свойствами.

Ключевые слова: рекомбинантная L-аспарагиназа, пегилирование.

ВВЕДЕНИЕ. Бактериальные аспарагиназы широко применяются при комбинированной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза, миелобластной лейкемии, болезни Ходжкина и не-Ходжкинской лимфомы, меланосаркомы и множественной миеломы [1].

Использование препаратов аспарагиназы в противоопухолевой терапии ограничено различными побочными эффектами, поэтому только два наименее токсичных фермента, а именно нативный препарат L-аспарагиназы из *Escherichia coli* нативный фермент (EcA), а также модифицированный полиэтиленгликолем "пегилированный" (Oncaspar) и нативный фермент (ErA) *Erw. chrysanthemi*, нашли применение в онкотерапии [2]. Причем, наименее токсичными признаны препараты, полученные из *Erw. chrysanthemi*, что указывает на важность исследования аспарагиназ из рода *Erwinia*. Тем не менее, даже аспарагиназы штаммов *Erwinia* вызывают развитие иммунологической гиперчувствительности к L-аспарагиназе, проявляющееся в диапазоне от слабых аллергических реакций до анафилактического шока. Кроме того, эффективность применения аспарагиназ в противоопухолевой терапии ограничена быстрой протеолитической деградацией фермента в крови. В связи с этим, актуальным является получение модифицированных форм аспарагиназ штаммов *Erwinia*, устойчивых к протеолитической деградации в крови, обладающих низкой иммуногенностью при сохранении высокой ферментативной активности.

Одним из наиболее эффективных способов модификации терапевтически значимых ферментов является химическая модификация белка полиэтиленгликолем

*Адресат для переписки

ПЕГИЛИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АСПАРАГИНАЗЫ

(ПЭГ), т.н. пегилирование. Она заключается в физико-химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы белка с ПЭГ [3].

Недавно нами было осуществлено клонирование аспарагиназы *Erwinia carotovora* (ECAR_LANS) и рекомбинантный фермент был экспрессирован в *E. coli* [4]. Учитывая перспективность создания лекарственной формы на основе ECAR_LANS, целью данной работы явилось получение модифицированной ПЭГ рекомбинантной аспарагиназы *Erw. carotovora*.

МЕТОДИКА. Культивирование штамма *E.coli BL21 (DE3)/pACYCLANS* и экспрессию рекомбинантной аспарагиназы проводили, как описано в [4]. Выделение и очистку ECAR_LANS выполняли при 4°C. Клетки (12 г), суспендированные в 100 мл 20 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5,8 (буфер А), разрушали ультразвуком (дезинтегратор УЗДН-2Т, Россия) в течение 5 мин, при 22 кГц. Растворимую фракцию клеточного экстракта, полученную 30-минутным центрифугированием при 34000 g ("Beckman", США), наносили на колонку (2,5 см × 10 см) с SP-Сефарозой, уравновешенную буфером А. Сорбент промывали колоночным буфером pH 6,3 до исчезновения следов белка в элюате. Аспарагиназу элюировали 100 мл линейного градиента KCl от 0 до 0,8 М в буфере А, pH 6,0, при скорости потока 1 мл/мин. Фракции с максимальной аспарагиназной активностью объединяли, концентрировали до 10 мг/мл и хранили при -20°C. При необходимости смену буфера проводили с помощью гель-фильтрации на колонках PD10 ("Pharmacia", Швеция). Концентрацию белка в процессе хроматографической стадии очистки контролировали с помощью спектрофотометрической ячейки ("Single path monitor unit UV1", "Pharmacia", Швеция) при длине волны 280 нм. Степень очистки L-аспарагиназы оценивали с помощью электрофореза в 12%-ном ДСН-полиакриламидном геле по методу Laemmli.

Активность L-аспарагиназы определяли методом прямой несселеризации [5]. За единицу активности L-аспарагиназы принимали количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Удельную активность выражали в единицах активности L-аспарагиназы в расчете на 1 мг белка. Концентрацию белка определяли методом Лоури-Фолина [6] используя бычий сывороточный альбумин ("Sigma", США) в качестве стандарта.

Пегилирование аспарагиназы проводили с использованием метокси-ПЭГ *n*-нитрофенилкарбоната с молекулярной массой 5000 (mPEG-pNP), любезно предоставленного А.Ю. Суровым (Институт биоорганической химии, РАН). Лиофилизированный препарат аспарагиназы (10 мг) растворяли в 4 мл 100 мМ боратного буфера, pH 9,0-9,5, и смешивали в различном молярном соотношении с (mPEG-pNP). Реакционную смесь инкубировали при непрерывном перемешивании от 1 до 24 часов. По окончании реакции полученный продукт отделяли от не прореагировавшего mPEG-pNP гель-фильтрацией на колонке PD10, уравновешенной 20 мМ фосфатным буфером, pH 7,0. Фракции, содержащие L-аспарагиназу, объединяли и определяли суммарную активность фермента. Препарат пегилированного фермента хранили при -20°C. Полученные данные были статистически обработаны при помощи программы Origin 7.0 ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Согласно литературным данным [3], процесс конъюгирования белка с mPEG-pNP зависит от множества условий протекания реакции, таких как pH и ионная сила реакционного буфера, молярное соотношение белок/mPEG-pNP, температура и время инкубации, интенсивность перемешивания реакционной смеси и т.д. Тем не менее, за исключением работы [7], систематизированные данные по оптимизации пегилирования белков практически отсутствуют. Известно, что реакция связывания mPEG-pNP с белком протекает при pH 8,0-9,5. Принимая во внимание высокую стабильность аспарагиназы *Erw. carotovora* в щелочной области [8], пегилирование этого фермента проводили при pH 9,5. В щелочном диапазоне pH депротонированные ε-аминогруппы лизиновых остатков фермента ковалентно связываются с карбонатной группой активированного mPEG с образованием конъюгата

mPEG-фермент. Другим продуктом реакции является нитрофенол, удаление которого является необходимым для безопасного применения пегилированного препарата белка в качестве лекарственного средства. В данной работе этот токсичный компонент реакционной смеси удаляли вместе с не прореагировавшим mPEG-pNP методом гель-фильтрации.

Фракции ПЭГ-аспарагиназы после гель-фильтрации объединяли и определяли суммарную активность фермента. Аспарагиназа сохраняет активность после модификации mPEG-pNP. При этом активность фермента зависит от молярного соотношения mPEG-pNP/ECAR_LANS (рис. 1, А). Наблюдается прямая зависимость активности пегилированной аспарагиназы от количества модифицирующего реагента. Это, по-видимому, обусловлено стабилизацией четвертичной структуры конъюгированного фермента, которая быстрее достигается при использовании высоких концентраций mPEG-pNP. При увеличении времени инкубации активность mPEG-pNP/ECAR_LANS снижается (рис. 1, Б), вероятно, из-за термодинамической денатурации белка в щелочной среде.

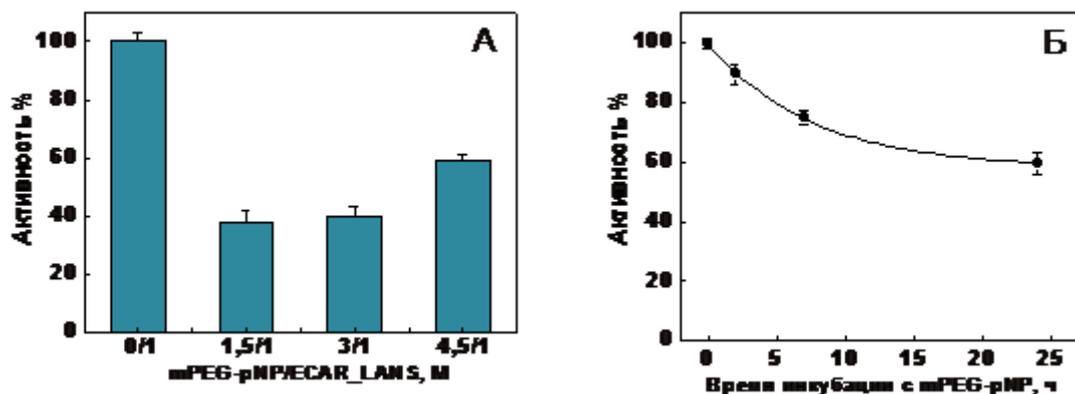


Рисунок 1.

Зависимость активности ПЭГ-аспарагиназы от (А) молярного соотношения mPEG-pNP/ECAR_LANS и (Б) времени инкубации.

Для определения степени модификации проводили электрофоретический анализ образцов реакционной смеси в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле, результаты которого (рис. 2) свидетельствуют об эффективной модификации mPEG-pNP препарата ECAR_LANS. В процессе пегилирования белок полностью переходит в модифицированный продукт, что подтверждается отсутствием на электрофореграмме полосы, соответствующей аспарагиназе. Даже при 1,5-кратном молярном соотношении mPEG-pNP/ECAR_LANS наблюдается полная модификация рекомбинантной аспарагиназы (рис. 2, трек 3), а при 4,5-кратном молярном соотношении более 10 молекул метоксиполиэтиленгликоля связывается с 1 молекулой фермента (рис. 2, трек 5). Такой результат является удовлетворительным и совпадает с литературными данными для пегилированной аспарагиназы *E. coli* [9].

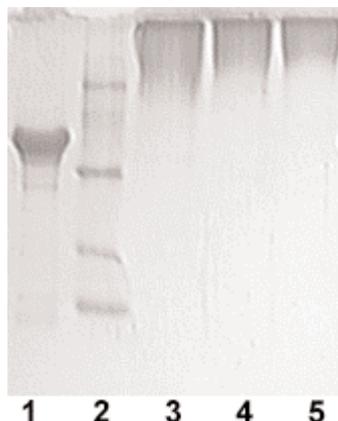


Рисунок 2.

Электрофоретический анализ в 10%-ном ПААГ/ДСН (1) нативной ECAR_LANS (20 мкг); (2) стандартов молекулярного веса 14, 20, 30, 45, 90 кДа; (3-5) конъюгатов mPEG-rNP/ECAR_LANS в молярном соотношении соответственно 1,5:1, 3:1 и 4,5:1.

Предложенная схема пегилирования аспарагиназы является простой, эффективной и может служить для получения фермента с улучшенными терапевтическими свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта №2828 Международного научного и технического центра (США), и гранта № 06-04-49792 Российского фонда фундаментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Avramis V.I., Panosyan E.H. (2005) Clin. Pharmacokinet., **44**, 367-393.
2. Rizzari C., Citterio M., Zucchetti M., Conter V., Chiesa R., Colombini A., Malguzzi S., Silvestri D., D'Incalci M. (2006) Haematologica, **91**, 24-31.
3. Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. (2002) Advanced Drug Delivery, **54**, 459-476.
4. 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.
5. Meister A. (1955) Methods Enzymol., **2**, Academic Press, New York, pp. 380-385.
6. Hartree E.F. (1991) Anal. Biochem., **192**, 215-218.
7. Xiong M.P., Kwon G.S. (2005) J. Pharm. Sciences, **94**, 1249-1258.
8. Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Yu.V., Sokolov N.N. (2004) Biotech. Appl. Biochem., **39**, 215-221.
9. Graham M.L. (2003) Adv. Drug. Delivery. Reviews, **55**, 1293-1302.

Поступила: 26. 11. 2006.

**MODIFICATION OF RECOMBINANT ASPARAGINASE FROM *ERWINIA CAROTOVORA*
WITH POLYETHYLENE GLYCOL 5000**

A.V. Kuchumova¹, Y.V. Krasotkina¹, P.Z. Khasigov², N.N. Sokolov¹

Institute of Biomedical chemistry RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow; tel./fax: (495) 246-3380;
e-mail: yulia.krasotkina@ibmc.msk.ru

²Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

A method for polyethylene conjugation with recombinant asparaginase has been developed to improve therapeutically important properties of this enzyme. Methoxy-nitrophenyl carbamate of polyethylene glycol with molecular weight 5000 was employed as the modification reagent. Optimization of pegylation procedure allowed achieving high level of the enzyme modification. Under 4.5 molar excess of modification reagent more than 10 molecules of methoxy-polyethylene bound per one asparaginase molecular. The modified asparaginase retained 57% of initial activity. A simple and efficient pegylation procedure described in this work can be used for asparaginase production with improved therapeutic properties.

Key words: recombinant L-asparaginase, pegylation.