

УДК 573.6

Д.А. МАКАРОВ, Р.С. ЕСИПОВ\*

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»  
Российской академии наук (ИБХ РАН), 117997, Москва

e-mail: esipov@ibch.ru

## Разработка способов получения аналогов тимозин-бета 4 в виде конъюгатов, устойчивых к деградации в токе крови

В работе представлен способ получения моноконъюгатов рекомбинантного тимозин-бета 4 (Тβ4) человека с капроновой кислотой, полисиаловой кислотой и полиэтиленгликолем (ПЭГ). Реакцию ацилирования проводили с использованием ангидрида гексановой кислоты, салирования — бутиральдегидного производного полисиаловой кислоты (14 кДа) и ПЭГилирования — пропиональдегидного производного ПЭГ (10 кДа). В результате многофакторных экспериментов были определены компоненты реакционной смеси и оптимизированы условия проведения данных реакций. Для каждого из аналогов разработана схема одностадийной очистки с помощью ОФ-ВЭЖХ; степень чистоты при этом составила не менее 98%. Результаты пептидного картирования в совокупности с хромато-масс-спектрометрическим и электрофоретическим методами анализа показали, что полученные аналоги тимозин-бета 4 являются моноконъюгатами, в которых исходный пептид модифицирован по N-концевому серину. Полученные аналоги обладают повышенной устойчивостью к деградации в плазме крови по сравнению с немодифицированным тимозин-бета 4 и рассматриваются как перспективные кандидаты для дальнейших биологических испытаний.

*Ключевые слова:* ангидрид гексановой кислоты, полисиаловая кислота, полиэтиленгликоль, тимозин-бета 4, химическая модификация белка.

Тимозин-бета 4 (Тβ4) — высоко консервативный пептид, содержащий 43 аминокислоты (pI = 4,6), который был впервые выделен из ткани вилочковой железы крупного рогатого скота [1] и является основным клеточным компонентом во многих тканях [2]. Тβ4 имеет многочисленные физиологические функции, наиболее значимой из которых является регулирование полимеризации акти-

на в ядросодержащих клетках млекопитающих. Таким образом, тимозин-бета 4 опосредованно участвует в организации цитоскелета, необходимого для клеточной подвижности, органогенеза и других важных клеточных функций [2, 3].

В 2004 г. было показано, что Тβ4 стимулирует миграцию и способствует выживанию кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток [4], а в 2006 г.

---

Макаров Дмитрий Александрович, Есипов Роман Станиславович.

*Список сокращений:* ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ОФ-ВЭЖХ — обращенно-фазовая ВЭЖХ; ПААГ — полиакриламидный гель; ПСК — полисиаловая кислота; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ТФУ — трифторуксусная кислота; Ас — ацетат; АсCN — ацетонитрил; SDS — додецилсульфат натрия; Тβ4 — тимозин-бета 4.

\*Автор для переписки.

было обнаружено, что тимозин-бета 4 играет существенную роль во всех ключевых процессах развития сердечных сосудов: васкулогенезе, ангиогенезе и артериогенезе [5]. Результаты упомянутых исследований подтвердили, что Тβ4 имеет существенный терапевтический потенциал в качестве препарата для защиты миокарда и способствует выживанию кардиомиоцитов в острой стадии ишемической болезни сердца.

Тимозин-бета 4 является короткоживущим пептидом, что создает трудности при его введении, а период его полувыведения из крови напрямую зависит от вводимой в организм дозы [6, 7]. Стандартный подход, применяемый для повышения стабильности терапевтического белка, заключается в присоединении к нему химическими или энзиматическими методами различных групп, обеспечивающих защиту от протеолитических ферментов [8—11].

Наиболее известными способами химической модификации терапевтических белков являются сиапирование и ПЭГилирование. Полисиаловая кислота (ПСК) неиммуногенна и подвергается биодegradации, а кроме того, уменьшает иммуногенность самого модифицируемого белка. Модифицированные полисиаловой кислотой молекулы белка не подвержены фагоцитозу, а время их циркуляции в крови значительно увеличивается [12, 13]. Использование ПЭГ (как и ПСК) для химической модификации молекулы белка адресно направлено на улучшение переносимости препарата, снижение его иммуногенности и повышение периода полужизни [14]. Важным свойством модифицированных полиэтиленгликолем молекул белков является их высокая гидрофильность; кроме того, молекула ПЭГ, обволакивая молекулу белка, придает ему принципиально новые физико-химические свойства [15, 16]. Высокое содержание атомов водорода позволяет молекуле ПЭГ связываться с молекулами воды, что влечет за собой формирование “водного облака” вокруг модифицированной молекулы “ПЭГ—белок”, за счет чего значительно повышается ее гидродинамический радиус по сравнению с исходной белковой молекулой [17].

Еще одним способом химической модификации терапевтических белков является ацилирование жирными кислотами, придающее молекуле белка липофильные свойства, что приводит к увеличению сродства модифицированного белка с мембранами и последующему взаимодействию с другими белками систем клеточной сигнализации [18—22].

Цель настоящей работы заключалась в разработке химических способов селективной моди-

фикации рекомбинантного тимозин-бета 4 по N-концевому серину, а также эффективного метода очистки полученных аналогов тимозин-бета 4 (моногоксаноилтимозин-бета 4 и моноконъюгатов ПЭГ и полисиаловой кислоты с тимозин-бета 4) для увеличения срока жизни данных пептидов в организме.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы.** В работе использовали очищенный рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 человека, ранее полученный в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [23], цианборгидрид натрия (Sigma-Aldrich, США), бутанол (Catrosa, Испания), ацетонитрил (Catrosa), ледяную уксусную кислоту (Catrosa), ацетат натрия (Catrosa), гидроксид натрия (Catrosa) и трифторуксусную кислоту (Sigma-Aldrich). В качестве модифицирующих агентов применяли линейное активированное пропиональдегидное производное ПЭГ с молекулярной массой 10 кДа SUNBRIGHT ME-100AL (NOF Corporation, США); линейное активированное бутиральдегидное производное полисиаловой кислоты со средней молекулярной массой 14 кДа, полученное от LipoXen Facilities (Англия); ангидрид гексановой кислоты (Sigma-Aldrich) и Asp-N-протеиназу из мутантного штамма *Pseudomonas fragi* (Sigma-Aldrich). Coumassi R-250 получали от Bio-Rad, США; иодид бария — от Sigma-Aldrich.

**Подбор условий проведения реакции ацилирования дезацетилтимозин-бета 4 ангидридом гексановой кислоты.** К 1 мл буферного раствора (50 мМ ацетата натрия, 0—30% ацетонитрила, 0—30% бутанола, pH 3,0; 4,5; 6,0), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 2,25 мкл ангидрида гексановой кислоты (мольное соотношение 1:50). Реакцию проводили при 25° и тщательном перемешивании в течение 5 ч. Контроль образования моногексаноилтимозина-бета 4 проводили с использованием метода ОФ-ВЭЖХ.

**Масштабирование реакции ацилирования деацетилтимозин-бета 4 ангидридом гексановой кислоты.** К 10 мл буферного раствора (50 мМ ацетат натрия, 30% ацетонитрила, 15% бутанола, pH 3,0), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 22,5 мкл ангидрида гексановой кислоты (мольное соотношение 1:50). Реакцию проводили при 25° и тщательном перемешивании в течение 3 ч. Контроль образования моногексаноилтимозин-бета 4 проводили с использованием метода ОФ-ВЭЖХ.

**Очистка моногексаноилтимозин-бета 4.**

Реакционную смесь объемом 10 мл разбавляли в 10 раз дистиллированной водой и наносили на колонну «Диасорб» 130 С16Т, 8 мкм, 15 × 250 мм. Разделение проводили в градиенте смеси 80%-ного ацетонитрила с 0,1%-ной ТФУ (15—30% за 60 мин). Фракции, содержащие более 98% моногексаноилтимозин-бета 4, объединяли и лиофилизировали.

**Подбор условий проведения реакции сиа-лирования дезацетилтимозин-бета 4.** К 1 мл буферного раствора (50 мМ ацетат натрия, 0—30% ацетонитрила, pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 8 мг цианборгидрида натрия и от 2,8 до 28 мг (с шагом в 2,8 мг) бутиральдегидного производного полисиаловой кислоты (конечное мольное соотношение белок — ПСК = 1:2, 1:3, 1:4, ..., 1:10) и инкубировали при 25° и тщательном перемешивании в течение 5 ч. Образование конъюгата полисиаловой кислоты с тимозином-бета 4 контролировали с использованием методов ОФ-ВЭЖХ и SDS-электрофореза в 15%-ном ПААГ.

**Масштабирование реакции сиа-лирования дезацетилтимозин-бета 4.** К 10 мл буферного раствора (50 мМ ацетат натрия, 30% ацетонитрила, pH 4,5), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 80 мг цианборгидрида натрия и 140 мг бутиральдегидного производного полисиаловой кислоты (мольное соотношение 1:5). Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 3 ч при 25°. Контроль образования моносиалированного тимозин-бета 4 осуществляли с использованием метода ОФ-ВЭЖХ.

**Очистка моносиалированного тимозина-бета 4.** Реакционную смесь объемом 10 мл разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и наносили на колонну «Диасорб» 130 С16Т, 8 мкм, 15 × 250 мм. Разделение проводили в градиенте смеси 80% ацетонитрила с 1% NH<sub>4</sub>OAc (8—23% за 60 мин). Фракции, содержащие более 98% моносиалированного тимозина-бета 4, объединяли и лиофилизировали.

**Подбор условий проведения реакции ПЭ-Гилирования дезацетилтимозин-бета 4.** К 1 мл буферного раствора (50 мМ ацетат натрия, 0—30% ацетонитрила, pH 3,0; 4,5; 6,0), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 8 мг цианборгидрида натрия и от 2 до 10 мг (с шагом в 1 мг) пропиональдегидного производного ПЭГ (конечное мольное соотношение белок — ПЭГ = 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5, ..., 1:5). Реакцию проводили при 25° и

тщательном перемешивании в течение 5 ч. Образование конъюгата ПЭГ с тимозином-бета 4 контролировали с использованием методов ОФ-ВЭЖХ и SDS-электрофореза в 13%-ном ПААГ.

**Масштабирование реакции ПЭГилирования дезацетилтимозин-бета 4.** К 10 мл буферного раствора (50 мМ ацетат натрия, pH 4,0), содержащего рекомбинантный дезацетилтимозин-бета 4 в концентрации 1 мг/мл, добавляли 80 мг цианборгидрида натрия и 80 мг пропиональдегидного производного ПЭГ (мольное соотношение 1:4). Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 3 ч при 25°. Контроль образования моноПЭГилированного тимозин-бета 4 проводили с использованием метода ОФ-ВЭЖХ.

**Очистка моноПЭГилированного тимозин-бета 4.** Реакционную смесь объемом 10 мл разбавляли в 10 раз дистиллированной водой и наносили на колонну «Диасорб» 130 С16Т, 8 мкм, 15 × 250 мм. Разделение проводили в градиенте смеси 80% ацетонитрила с 0,1% ТФУ (30—70% за 60 мин). Фракции, содержащие более 98% моноПЭГилированного тимозин-бета 4, объединяли и лиофилизировали.

**Определение структуры модифицированного тимозин-бета 4.** Лиофилизованные производные тимозин-бета 4 в количестве 200 мкг (массу рассчитывали по пептиду) растворяли в 50 мкл буфера (50 мМ трис-НСl, pH 8,0), затем добавляли 5 мкл 0,067 мг/мл раствора Asp-N-протеиназы (0,335 мкг) и инкубировали в течение 3 ч при 37°. Протеолитическую смесь анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. Расщепление ангиотензин-конвертирующим ферментом проводили сразу после обработки пептида Asp-N-протеиназой. К 55 мкл гидролизата добавляли 4 мкл 4 М NaCl до конечной концентрации 300 мМ, 5 мкл (0,03 мг/мл) раствора ангиотензин-конвертирующего фермента, и смесь инкубировали в течение 3 ч при 37°, а затем анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

**Тестирование стабильности аналогов тимозин-бета 4 и химически синтезированного тимозин-бета 4 с использованием сыворотки крови.** Стабильность пептида определяли как время, за которое в сыворотке крови оставалось 50% пептида от его исходного количества ( $T_{1/2}$ ). Количество оставшегося пептида определяли как отношение площади хроматографического пика исследуемого образца в момент времени  $t$  к площади хроматографического пика исследуемого образца в начальный момент времени ( $S_t/S_0$ , где  $S_t$  — площадь пика исследуемого образца в момент времени  $t$ ,  $S_0$  — площадь пика исходного исследуемого образца). Сыворотку выделяли из крови кролика в соот-

ветствии с рекомендациями, описанными в статье [24], расфасовывали по 50 мкл и замораживали при  $-70^{\circ}$ . Расфасованную сыворотку крови использовали однократно. Тестируемые образцы в количестве 50 мкг (по пептиду) растворяли в стерильном физиологическом растворе и вводили в концентрации 10 мг/мл в 50 мкл сыворотки крови. Инкубацию проводили в течение 1—12 ч при  $37^{\circ}$ . Смесь анализировали методом хромато-масс-спектрометрии.

**Аналитические методы контроля.** Разделение белков производили на электрофоретической системе PowerPac HC (BioRad, США) в 15%- и 13%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в трис-глициновой буферной системе. Гели обрабатывали раствором Coomassie R-250 (2,5 мг/мл) для проявления белка и 5%-ным раствором иодида бария для окрашивания ПЭГ [25]. Анализ фракций, содержащих производные Тβ4, осуществляли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Prosphere C18 300 А 5 μ (Alltech). Пептидные продукты реакции ПЭГилирования и ацилирования тимозин-бета 4 элюировали в градиенте концентрации 80%-ного ацетонитрила (30—70%, 19 мин и 15—50%, 13 мин, соответственно) в 0,1%-ной ТФУ со скоростью элюции 0,7 мл/мин. Пептидные продукты сialiрования элюировали в градиенте концентрации 80%-ного ацетонитрила (15—50%, 13 мин) в 1%-ном  $\text{NH}_4\text{OAc}$  со скоростью 0,7 мл/мин. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе 6224 TOF LC/MS (Agilent Technologies, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологическая активность тимозин-бета 4 определяется его активными сайтами, представляющими собой короткие пептидные последовательности. Так, например, его основной активный сайт представлен аминокислотными остатками 17—22 [2, 26], а основной сайт, проявляющий антиапоптозную активность, — аминокислотными остатками 1—15 [27]. С-Концевой тетрапептид 40—43 влияет на миграцию эмбриональных кардиомиоцитов и функциональную стабильность сердца после ишемии [28], а сайт, представляющий собой первые четыре аминокислотных остатка SDKP, обладает широким спектром биологической активности [27, 29, 30]. В работе Х. Ли и др. [31] показано, что неацелированная форма пептида также обладает полноценной биологической активностью, сопоставимой с биологической активностью нативного тимозин-бета 4. Литературные данные и в первую очередь тот

факт, что ацетильная группа, присоединяемая в результате посттрансляционной модификации к первой аминокислоте тимозин-бета 4 серину, никак не связана с биологической активностью пептида и необходима только для увеличения продолжительности его жизни в токе крови, свидетельствуют о том, что замена этой группы на другие стабилизирующие группы является наиболее логичным подходом к разработке селективного способа получения аналогов тимозин-бета 4 с пролонгированным временем жизни.

## Ацилирование дезацетилтимозин-бета 4 ангидридом гексановой кислоты

Гексановая кислота обладает сильными гидрофобными свойствами: присоединение этой группы к молекуле полипептида увеличивает его липофильные свойства, что в свою очередь повышает растворимость полипептида в липопротеинах низкой плотности. В качестве ацилирующего агента использовали ангидрид гексановой кислоты. Поскольку последний обладает низкой растворимостью в воде, в реакционную смесь добавляли менее полярные, чем вода, растворители, такие как ацетонитрил и бутанол. Был проведен многофакторный эксперимент по исследованию зависимости выхода моногексаноилтимозин-бета 4 от времени реакции, pH среды, содержания бутанола и ацетонитрила при постоянной температуре  $25^{\circ}$  (табл. 1).

В результате многофакторного эксперимента были определены условия для проведения реакции (pH реакционной смеси 3,0, 15% бутанола, 30% ацетонитрила,  $25^{\circ}$ ), при которых выход реакции составил 30% от теоретически возможного.

Следующей стадией исследований стало изучение кинетики реакции ацилирования при подобранных ранее условиях (рис. 1). Исследование кинетики реакции ацилирования показало, что выход моногексаноилтимозин-бета 4, так же, как и в случае ацелирования дезацетилтимозин-бета 4 [23], достигает определенного значения, после чего с течением времени увеличивается незначительно. При этом происходит накопление побочных продуктов реакции. Для ацилирования тимозин-бета 4 ангидридом гексановой кислоты оптимальным временем инкубирования оказалось 180 мин.

Затем осуществляли препаративное получение гексаноилтимозин-бета 4 и его очистку с помощью полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ (рис. 2). Первый пик на профиле полупрепаративной хроматографии относится к фракции, содержащей непрореагировавший дезацетилтимозин-бета 4. Пики под

**Содержание моногексаноилтимозин-бета 4 в реакционной смеси, %, через 3 ч после начала реакции**

**Contents of monohexanoyl thymosin beta 4 in reaction mixture, %, 3 h after the reaction beginning**

C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH, %	0			15			30			
	AcCN, %	0	15	30	0	15	30	0	15	30
pH										
3,0		3	5	15	7	22	<b>30*</b>	8	15	26
4,5		5	8	14	8	20	22	10	18	20
6,0		6	10	11	8	15	10	8	14	15

\*Жирным шрифтом выделено максимальное накопление продукта.

\*Maximum product accumulation is typed bold.

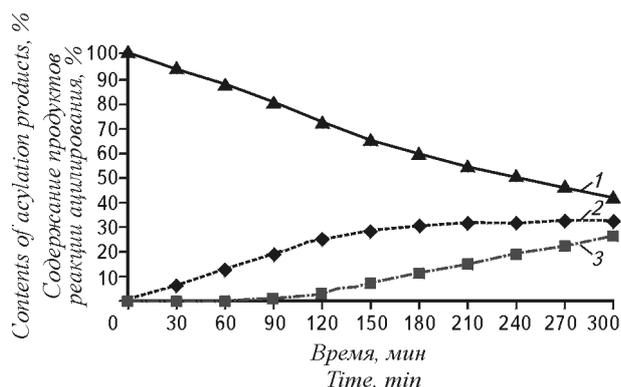
номера 2, 3, 4 и 5 соответствовали фракциям с одинаковой молекулярной массой 5018,55 Да (см. рис. 2, С), которые различались временем удерживания (см. рис 2., В). Для определения структуры полученных аналогов тимозин-бета 4 проводили пептидное картирование (см. раздел «Условия эксперимента», подраздел «Определение структуры полученных аналогов тимозин-бета 4»). Как показало исследование, только вторая фракция содержала тимозин-бета 4, модифицированный по

N-концевой альфа-аминогруппе. Остальные аналоги Тβ4 были продуктами модификации эпсилон-аминогрупп лизинов.

**Сиамирование дезацетилтимозин-бета 4**

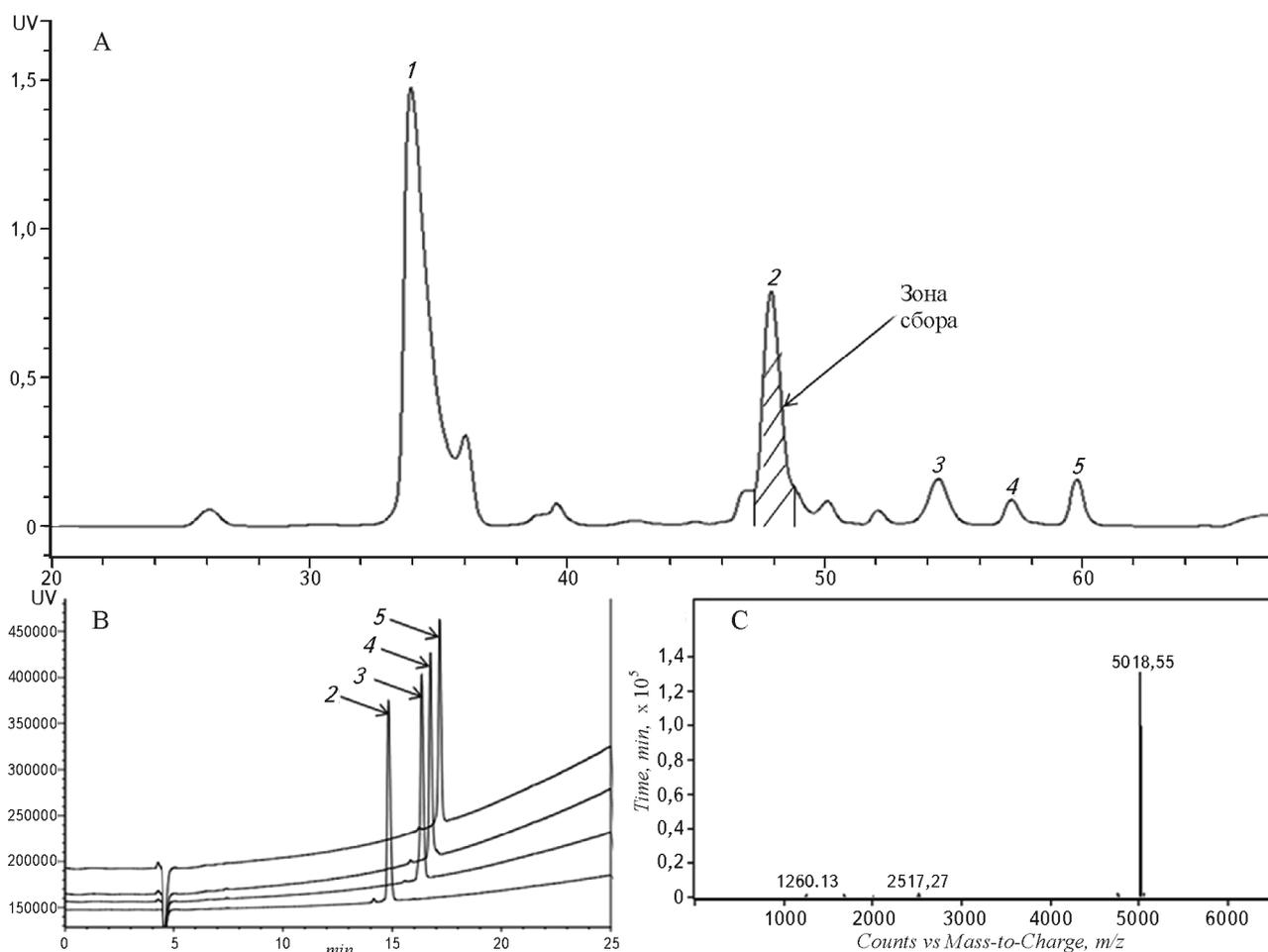
В качестве сиалирующего агента использовали бутиральдегидное производное полисиаловой кислоты (14 кДа). Реакция сиамирования протекает в две стадии: результатом первой является образование нестабильной кратной связи —CH=N— (основания Шиффа), которая на второй стадии при восстановлении цианборгидридом натрия переходит в прочную связь —CH<sub>2</sub>—NH— [32].

Оптимальные условия для указанной реакции определяли экспериментально путем изменения соотношения ПСК—белок от 1:1 до 10:1, а также pH (3—6) и содержания ацетонитрила (0—30%) при времени инкубации реакционной смеси 3 ч (рис. 3). После первых экспериментов мы обнаружили, что изменение pH раствора в диапазоне от 4,5 до 6,0 практически не влияло на выход сиамированного тимозин-бета 4, а при pH ниже 4,0 происходило разрушение полисиаловой кислоты. Поэтому мы приняли решение проводить все последующие эксперименты с фиксированным значением pH выше 4,0. В результате исследований были подобраны такие условия реакции, при которых достигался 58%-ный выход: 30% ацетонитрила, отношение белок—ПСК=1:5, pH 4,5—6,0.



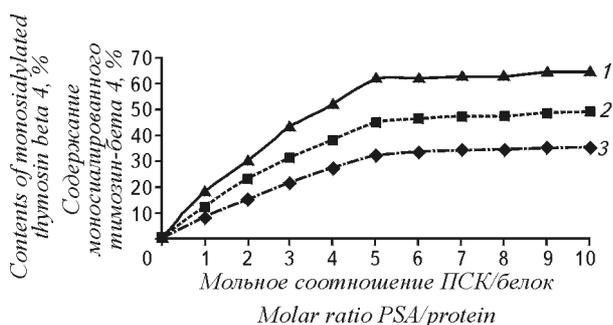
**Рис. 1.** Зависимость содержания продуктов реакции ацилирования от времени инкубации при pH 3,0, 15% бутанола, 30% ацетонитрила и 25°С: 1 — дезацетилтимозин-бета 4; 2 — моногексаноилтимозин-бета 4; 3 — побочные продукты

**Fig. 1.** Dependency of acylation reaction product contents on time of incubation at pH 3.0, 15% butanol, 30% acetonitrile and 25°С: (1), deacetyl thymosin beta 4; (2), monohexanoyl thymosin beta 4; (3), by-products



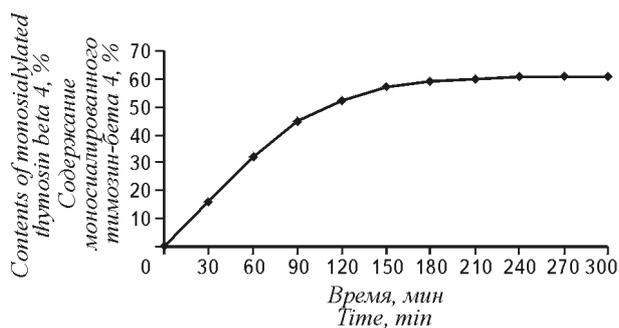
**Рис. 2.** Анализ продуктов реакции ацилирования дезацетилтимозин-бета 4 ангидридом гексановой кислоты: А — профиль полупрепаративной хроматографии (колонка «Диасорб» 130 С16Т, 8 мкм, 15×250 мм). Разделение проводили в градиенте смеси 80% ацетонитрила с 0,1% ТФУ (15—30%): 1 — дезацетилтимозин-бета 4, 2 — моногексаноилтимозин-бета 4, 3—5 — побочные продукты реакции; В — результаты ОФ-ВЭЖХ фракций 2—5 (колонка Prosphere C18 300 А 5 μ); С — масс-спектр фракций аналитической ОФ-ВЭЖХ

**Fig. 2.** Products of deacetyl thymosin beta 4 acylation by hexanoic acid anhydride: A, profile of semi-preparative chromatography (column Diasorb, 130 C16T, 8 μ, 15×250 mm). Separation was performed in the gradient of mixture of 80% acetonitrile with 0.1% TFA (15—30%): (1), deacetyl thymosin beta 4; (2), monohexanoyl thymosin beta 4; (3)—(5), reaction by-products; B, RP HPLC of fractions 2—5 (column Prosphere C18 300 A 5 μ); C, mass-spectra of fractions after analytical RP HPLC



**Рис. 3.** Зависимость содержания моноацелированного тимозин-бета 4 от мольного соотношения ПСК—белок при разной концентрации ацетонитрила и температуре 25°: 1 — 30% AcCN; 2 — 15% AcCN; 3 — 0% AcCN

**Fig. 3.** Dependency of monosialylated thymosin beta 4 on molar polysialic acid/protein ratio at various concentrations of acetonitrile at 25°C: (1), 30% AcCN; (2), 15% AcCN; (3), 0% AcCN



**Рис. 4.** Кинетика реакции сиалирования дезацетилтимозин-бета 4 при соотношении белок—ПСК = 1:5, содержании ацетонитрила 30%, pH 4,5 и температуре 25°

**Fig. 4.** Kinetics of sialylation of deacetyl thymosin beta 4 at protein/PSA ratio of 1:5, acetonitrile content 30%, pH 4,5 and 25°C

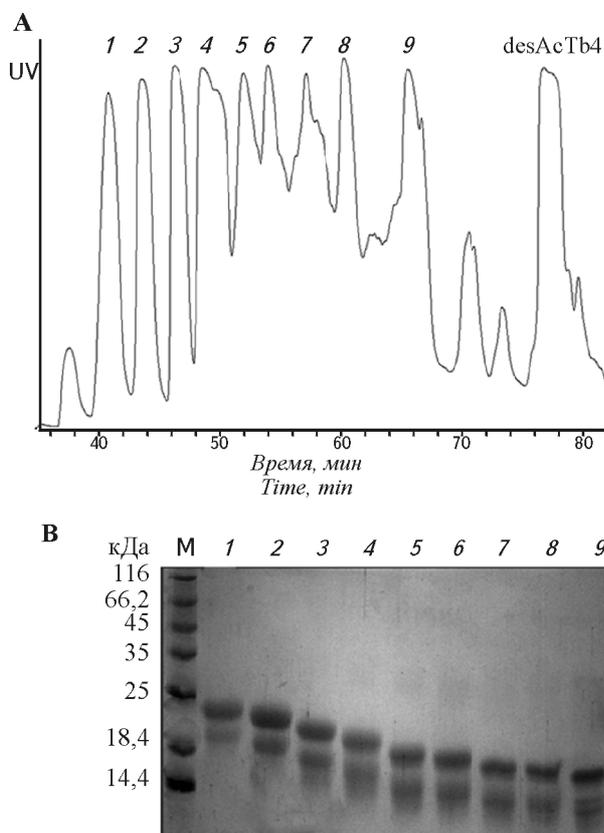
Далее была определена зависимость выхода моносиалированного тимозин-бета 4 от времени реакции (рис. 4). Реакция сиалирования практически полностью останавливалась через 180 мин; дальнейшее инкубирование раствора было нецелесообразным.

Затем осуществляли препаративное получение сиалированного тимозин-бета 4 и очистку полученного аналога с помощью полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ (рис. 5, А). При этом среди продуктов сиалирования тимозин-бета 4 было обнаружено несколько фракций модифицированного пептида с различной молекулярной массой (см. рис 5, В). Связано это было с неоднородностью самой исходной ПСК, в которой присутствовали ее бутираль-

дегидные производные с молекулярной массой от 10 до 18 кДа, что и приводило к образованию продуктов сиалирования дезацетилтимозин-бета 4 с разной молекулярной массой. Фракции с 3 по 7, представляющие собой сиалированный тимозин-бета 4 с молекулярной массой от 18 до 13 кДа, объединяли и лиофилизовали. Полученный лиофилизат использовали для биологических исследований.

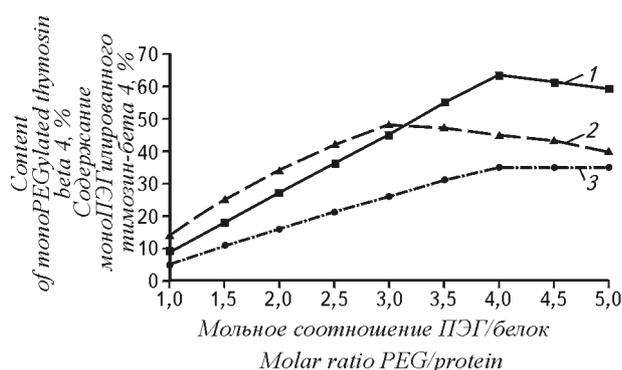
#### ПЭГилирование дезацетилтимозин-бета 4

На сегодняшний день фармацевтический рынок представлен широким спектром ПЭГилирующих агентов. В нашем эксперименте мы исполь-



**Рис. 5.** Анализ продуктов реакции сиалирования дезацетилтимозин-бета 4: А — профиль хроматографической очистки продуктов путем ОФ-ВЭЖХ (колонка «Диасорб» 130 С16Т, 8 мкм, 15 Ч 250 мм). Разделение проводили в градиенте смеси 80% ацетонитрила с 5% NH<sub>4</sub>OAc (8—23%); В — электрофорез фракций; цифры 1—9 — номера фракций; М — маркеры молекулярной массы белков. Фракции с молекулярной массой 9—15 кДа — продукты реакции сиалирования дезацетилтимозин-бета 4

**Fig. 5.** Products of deacetyl thymosin beta 4 sialylation: А, profile of RP HPLC preparative chromatography (column Diasorb, 130 C16T, 8 м, 15 Ч 250 mm). Separation was performed in the gradient of a mixture of 80% acetonitrile with 5% NH<sub>4</sub>OAc (8—23%); В, electrophoresis of fractions; figures 1—9, fraction numbers; М, protein MM markers. Fractions with MM 9—15 kDa are products of deacetyl thymosin beta 4 sialylation



**Рис. 6.** Содержание моноПЭГилированного тимозин-бета 4 в реакционной смеси в зависимости от соотношения белок—ПЭГ при 25° и различных значениях pH: 1 — 4,0; 2 — 5,0; 3 — 3,0

**Fig. 6.** Content of monoPEGylated thymosin beta 4 in reaction mixture depending on protein/PEG ratio at 25°C and various pH values: (1) — 4,0; (2) — 5,0; (3) — 3,0

зовали пропиональдегидное производное ПЭГ второго поколения с молекулярной массой 10 кДа (NOF Corporation, США). По механизму реакция ПЭГилирования аналогична реакции сиапирования: она идет с образованием основания Шиффа и последующим восстановлением кратной связи цианборгидридом натрия. Как и в случае сиапирования, мы попробовали использовать ацетонитрил в качестве органического растворителя для ускорения реакции и увеличения выхода моноПЭГилированного тимозин-бета 4. Однако первые эксперименты показали, что использование ацетонитрила приводило к значительному увеличению доли ди- и триПЭГилированных продуктов в реакционной смеси, поэтому в дальнейших опытах от использования ацетонитрила мы отказались. В качестве переменных параметров использовали pH среды и мольное соотношение ПЭГ—белок с шагом 0,5 (рис. 6). Все эксперименты проводили при постоянной температуре 25° в течение 24 ч.

В результате проведенных экспериментов было обнаружено, что при значении pH 4,0 и мольном соотношении белок—ПЭГ = 1:4 выход реакции ПЭГилирования достигал 63%.

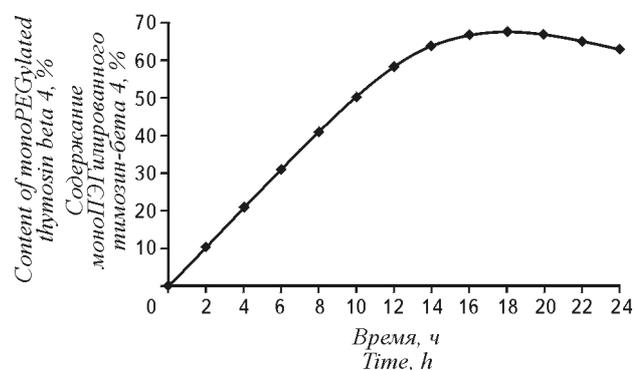
Параллельно с определением оптимального мольного соотношения и pH среды исследовали кинетику реакции ПЭГилирования (рис. 7). Проведенные исследования показали, что при значении pH 4,0, соотношении белок—ПЭГ = 1:4 и 18 ч инкубации достигается максимальный выход ПЭГилированного тимозин-бета 4, равный 68%. Уменьшение выхода целевого продукта со временем связано с образованием побочных продуктов реакции, а именно ди- и триПЭГилированного тимозин-бета 4. На рис. 8, А изображен профиль полупрепаративной хроматографии моноПЭГилированного тимозина-бета 4. Чистоту полученного конъюгата подтверждали методом электрофоретического анализа (см. рис 8, В).

Известно, что молекула ПЭГ обладает высокой гидрофильностью и способна обволакивать

молекулу белка, придавая ей совершенно новую электрофоретическую подвижность. Как видно из электрофореграммы, модифицированная молекула тимозин-бета 4 располагается в области 30 кДа, что не соответствует расчетной массе в 15кДа. ПЭГ-бутиральдегид располагается в области 25 кДа (см. рис 8, В, дорожка Р), т.е. на 5 кДа (масса пептида) ниже ПЭГилированного тимозин-бета 4, что является прямым доказательством того, что получен моноПЭГилированный тимозин-бета 4.

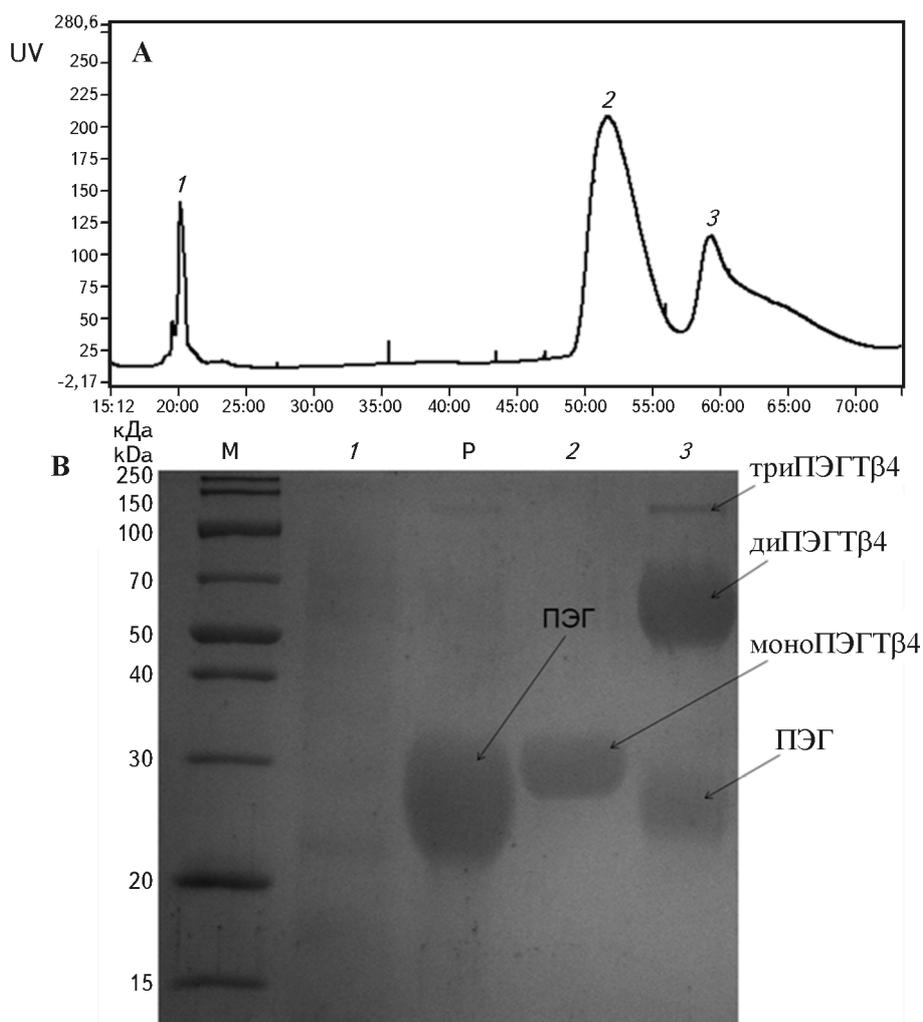
### Определение структуры полученных аналогов тимозин-бета 4

Структуру полученных аналогов подтверждали пептидным картированием. В качестве протеолитического фермента использовали Asp-N-протеиназу из *Pseudomonas fragi*. Продукты протеолиза анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 9). Из литературных источников известно, что данная протеиназа кроме Asp-N-активности обладает еще и Glu-N-активностью [33], поэтому расщепле-



**Рис. 7.** Кинетическая кривая ПЭГилирования тимозин-бета 4 при pH 4,0, 25° и соотношении белок—ПЭГ = 1:4

**Fig. 7.** Kinetic curve of thymosin beta 4 PEGylation at pH 4,0, 25°C and protein/PEG ratio 1:4



**Рис. 8.** Анализ продуктов реакции ПЭГилирования тимозин-бета 4: А — профиль полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ: 1 — дезацетилтимозин-бета 4; 2 — моноПЭГилированный тимозин-бета 4; 3 — побочные продукты реакции; В — электрофорез фракций после ОФ-ВЭЖХ: М — маркеры молекулярной массы белков; 1—3 — номера фракций, Р — ПЭГ

**Fig. 8.** Products of deacetyl thymosin beta 4 PEGylation: A, profile of RP HPLC semi-preparative chromatography: (1), deacetyl thymosin beta 4; (2), monoPEGylated thymosin beta 4; (3), reaction by-products; B, electrophoresis of RP HPLC fractions; M, MM markers; (1)—(3), fraction numbers; P means PEG

ТриПЭГТβ4, диПЭГТβ4 and моноПЭГТβ4 mean triPEGylated, diPEGylated and monoPEGylated thymosin beta 4, respectively; ПЭГ means PEG

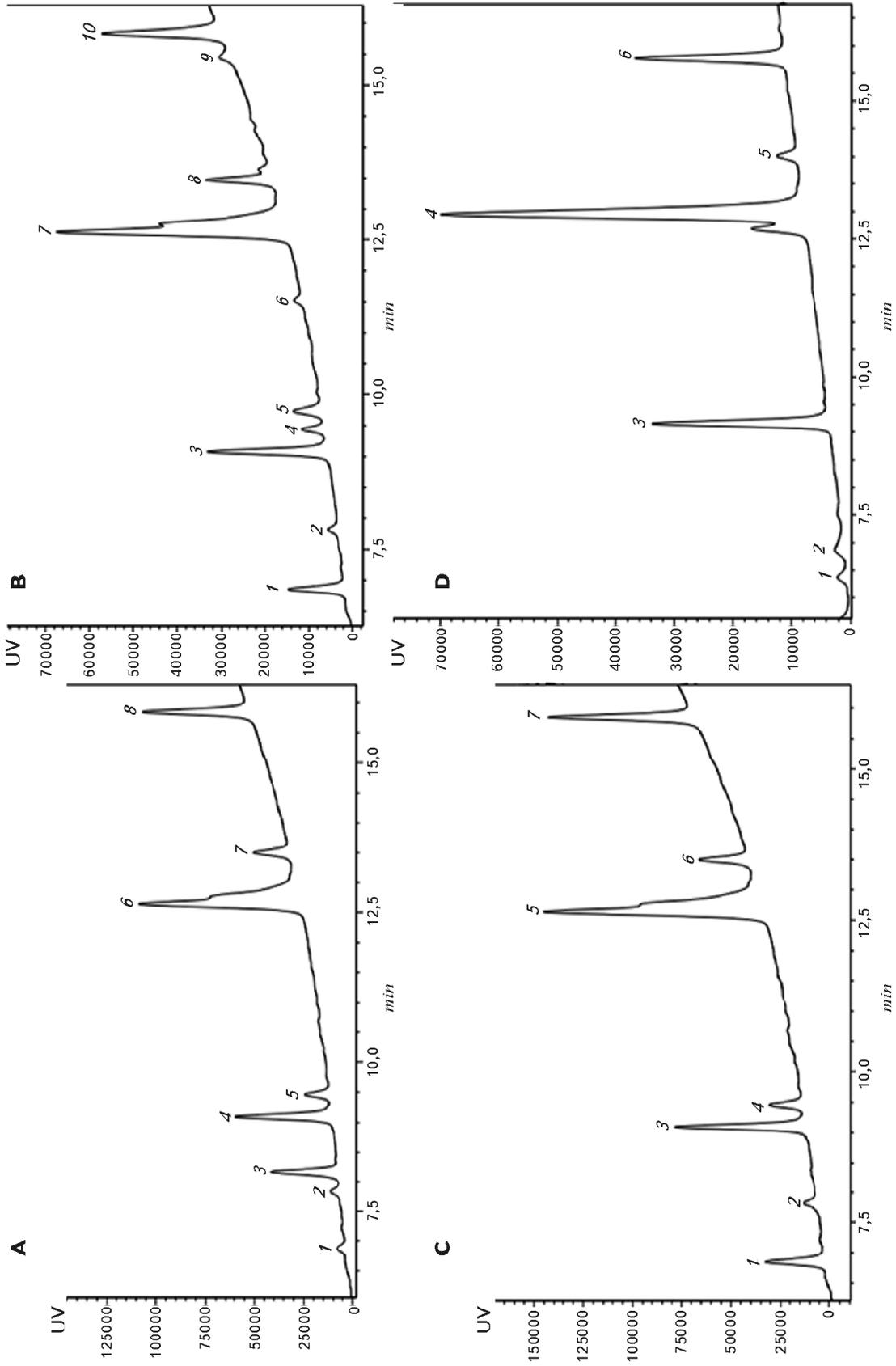
ние происходило кроме аспарагиновой также по N-концу глутаминовой кислоты. Результаты масс-спектрометрического анализа представлены в табл. 2; там указана также масса полученных коротких пептидных последовательностей, соответствующих фракциям на рис. 9.

Из данных, приведенных на рис. 9 и в табл. 2, можно сделать следующие выводы о действии использованной протеиназы на различные субстраты и их составе.

**Тимозин-бета 4.** Asp-N-протеиназа при расщеплении данного соединения гидролизовала пеп-

тидную связь между N-концевыми остатками серина и аспарагиновой кислоты только на 10%; об этом свидетельствует наличие фракции, содержащей нерасщепленный тетрапептид Ac-SDKP (пик 3) в реакционной смеси (см. рис. 9, А). Трипептид DKP (пик 1) присутствует в реакционной смеси в малых количествах (см. рис. 9, А).

**Гексаноилтимозин-бета 4.** Asp-N-протеиназа полностью гидролизовала пептидную связь между остатками модифицированного серина и аспарагиновой кислоты (см. рис. 9, В). Методом масс-спектрометрического анализа был обнару-



**Рис. 9.** Хроматографический профиль продуктов протеолитического расщепления Asp-N-протеиназой различных субстратов: А — тимозин-бета 4; В — моногексано-ИЛТМЗОИИИ-бета 4; С — конъюгат полисалиловой кислоты с тимозин-бета 4; D — конъюгат ПЭГ с тимозин-бета 4

**Fig. 9.** Chromatography profile of products of proteolytic cleavage by Asp-N-proteinase of various substrates: A, thymosin beta 4; B, monohexanoyl thymosin beta 4; C, conjugate of polysialic acid with thymosin beta 4; and D, conjugate of PEG with thymosin beta 4

**Результаты протеолитического расщепления тимозин-бета 4 и его аналогов (см. рис. 9) по данным масс-спектрометрического анализа**

**Results of proteolytic cleavage of thymosin beta 4 and its analogs (Fig. 9) according to spectromassmetric data**

SDKPDMAEIEKFDKSKLKKKTETQEK NPLPSKETIEQEKQAGES*					
	Номер пика на рис. 9 Peak number in Fig. 9	Экспериментальное значение m/z m/z experimental value	Расчетное значение m/z m/z rated value	Соответствует пептиду Corresponds to a peptide	Аминокислотная последовательность Aminoacid sequence
A	1	358,19	358,40	2—4	DKP
	2	335,12	335,38	5—7	DMA
	3	487,24	1305,49	1—4	SDKP +acetate
	4	1304,74	1306,47	13—23	DKSKLKKKTETQ
	5	1305,74	675,75	13—23	DKSKLKKKTET(Q)→E
	6	2243,13	2242,41	24—43	EKNPLPSKETIEQEKQAGES
	7	664,36	664,76	8—12	EIEKF
	8	981,47	982,11	5—12	DMAEIEKF
B	1	358,19	358,4	2—4	DKP
	2	335,12	335,38	5—7	DMA
	3	1304,74	1305,49	13—23	DKSKLKKKTETQ
	4	1305,74	1306,47	13—23	DKSKLKKKTET(Q)→E
	5	675,29	675,75	2—7	DKPDMA
	6	377,31	376,37	21—23	ETQ
	7	2243,13	2242,41	24—43	EKNPLPSKETIEQEKQAGES
		203,12	203,1	1	S + C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O
	8	664,36	664,76	8—12	EIEKF
	9	997,44	998,11	5—12	DMAEIEKF+Oxidation(M)
10	981,47	982,11	5—12	DMAEIEKF	
C	1	358,19	358,4	2—4	DKP
	2	335,12	335,38	5—7	DMA
	3	1304,74	1305,49	13—23	DKSKLKKKTETQ
	4	1305,74	1306,47	13—23	DKSKLKKKTET(Q)→E
	5	2243,13	2242,41	24—43	EKNPLPSKETIEQEKQAGES
	6	664,36	664,76	8—12	EIEKF
	7	981,47	982,11	5—12	DMAEIEKF
D	1	1004,43	1005,00	35—43	EQEKQAGES
	2	335,12	335,38	5—7	DMA
	3	1304,74	1305,49	13—23	DKSKLKKKTETQ
	4	2243,13	2242,41	24—43	EKNPLPSKETIEQEKQAGES
	5	664,36	664,76	8—12	EIEKF
	6	981,47	982,11	5—12	DMAEIEKF

\* Однобуквенная последовательность дезацетилтимозин-бета 4.

\* One-letter sequence of deacetyl thymosin beta 4.

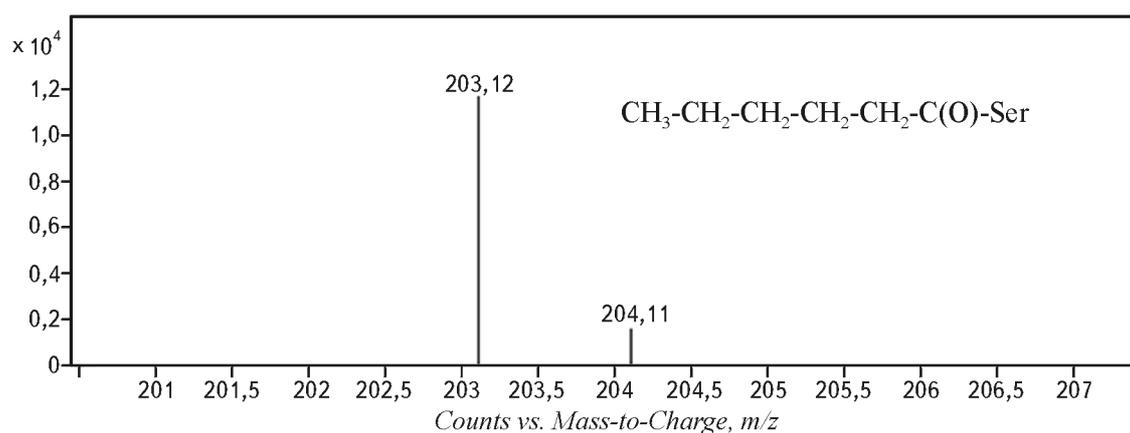


Рис. 10. Масс-спектр фракции 7 (см. рис. 9, В) из смеси продуктов протеолиза моногексаноилтимозин-бета 4

Fig. 10. Mass spectrum of fraction 7 (see Fig. 9, B) from mixture of proteolysis products of monohexanoyl thymosin beta 4

жен ион, соответствующий модифицированному серину (рис. 10), находящийся во фракции, которая соответствует пику 7 (см. рис. 9, В), что является прямым доказательством модификации N-концевого серина.

**Сиалированный тимозин-бета 4.** При анализе гидролизата сиалированного тимозин-бета 4 модифицированный серин обнаружен не был. Сиалированный серин имеет сильный отрицательный заряд и не связывается с сорбентом, используемым при аналитической ОФ-ВЭЖХ. Стоит отметить, что профили гидролизата сиалированного тимозин-бета 4 и гидролизата исходного тимозин-бета 4 похожи (см. рис. 9, С). Если бы модифицированным оказался любой другой аминокислотный остаток в молекуле пептида, то наблюдались бы значительные различия в хроматографических профилях протеолитического расщепления исходного тимозин-бета 4 и сиалированного продукта. Используя полученные данные, мы можем с высокой долей вероятности утверждать, что модификация подверглась N-концевой серин тимозин-бета 4.

**ПЭГилированный тимозин-бета 4.** Хроматографический анализ гидролизата ПЭГилированного тимозин-бета 4 в совокупности с масс-спектрометрическим анализом полученных фракций показал, что модификации подвергся N-концевой тетрапептид SDKP (см. рис. 9, D). Однако идентифицировать тетрапептид было невозможно из-за того, что ПЭГилированный фрагмент утратил точно фиксируемую массу. Необходимо отметить, что в тетрапептиде SDKP кроме аминокислотной группы N-концевого остатка серина содержится аминокислотная группа остатка лизина, которая также могла оказаться модифицированной. Для доказательства кор-

ректного ПЭГилирования тимозин-бета 4 модифицированный тетрапептид обработали ангиотензин-конвертирующим ферментом. Этот фермент является дипептидил-карбоксипептидазой и способен расщеплять тетрапептид SDKP на два дипептида [34]. Ангиотензин-конвертирующий фермент добавляли в смесь после протеолитического расщепления ПЭГилированного тимозин-бета 4 Asp-N-протеиназой. В результате такого протеолиза модифицированный тетрапептид SDKP расщеплялся на модифицированный дипептид SD и дипептид KP, который был обнаружен в протеолитическом гидролизате методом масс-спектрометрии (рис. 11).

Таким образом, данные масс-спектрометрического анализа гидролизата тетрапептида показали, что модификации подвергся дипептид SD, который содержит единственную свободную аминогруппу, по которой могло произойти ПЭГилирование — альфа-аминогруппу N-концевого серина.

#### Определение стабильности полученных аналогов тимозин-бета 4

Стабильность полученных аналогов тимозин-бета 4 и самого тимозин-бета 4 определяли в среде сыворотки крови кролика. Лиофилизированные образцы растворяли в физиологическом растворе и вводили в 50 мкл сыворотки крови. Смесь инкубировали при 37°C в течение 12 ч; пробы отбирали с интервалом в 1 ч. Для каждого пептида эксперимент повторяли 10 раз. Исследование кинетики деградации тимозин-бета 4 и его аналогов показало, что время, за которое содержание пептида

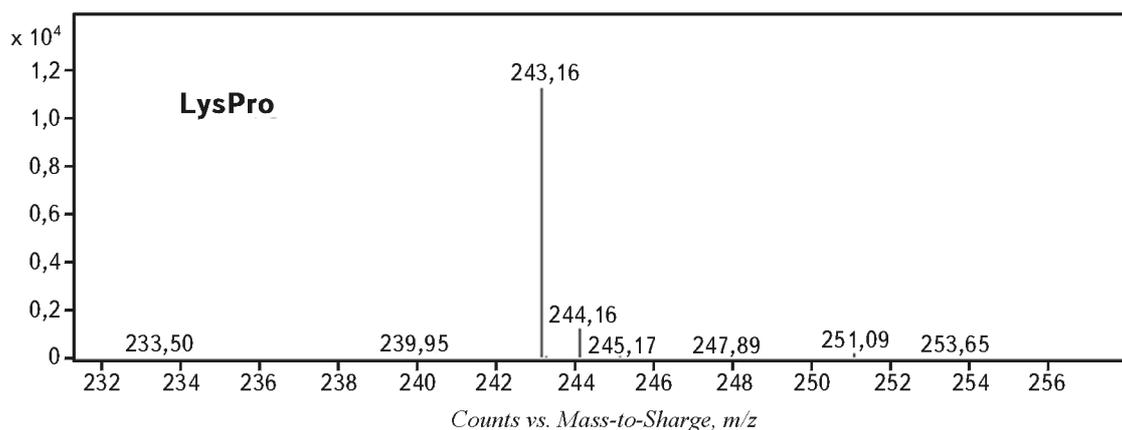


Рис. 11. Масс-спектр продуктов протеолиза ПЭГилированного тетрапептида SDKP

Fig. 11. Mass spectrum of products of proteolysis of SDKP PEGylated tetrapeptide

уменьшилось вдвое, для тимозин-бета 4 соответствует 2 ч, для моногексаноилтимозин-бета 4 — 8 ч, для моносиалированного тимозин-бета 4 — 6 ч и для моноПЭГилированного тимозин-бета 4 — 10 ч. Таким образом, все аналоги тимозин-бета 4 показали пролонгированное время жизни в сыворотке крови кролика по сравнению с исходным препаратом.

Итак, в настоящей работе были получены моноконъюгаты ПЭГ, полисиаловой и капроновой кислот с тимозин-бета 4. Был разработан эффективный метод региоселективной модификации пептида пропиональдегидным производным ПЭГ, бутиральдегидным производным полисиаловой кислоты и ангидридом гексановой кислоты. Было показано, что полученные аналоги являются производными тимозин-бета 4, модифицированного по N-концевой альфа-аминогруппе пептида. Исследование стабильности полученных аналогов показало, что внесенные модификации значительно увеличили время жизни пептида. Следующей стадией исследований предположительно будет проверка биологической активности полученных аналогов на мышинных тест-моделях.

Ангиотензин-конвертирующий фермент любезно предоставил О.А. Кость, сотрудник кафедры химической энзимологии МГУ имени М. В. Ломоносова.

Angiotensin was kindly provided by Dr. O.A. Kost', a Dept. Chemical Enzymology, Moscow State University staff.

Получено 23.03.16

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein, A.L. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) / A.L. Goldstein, F.D. Slater, A. White // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1966. — V. 56. — P. 1010—1014.
2. Safer, D. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable / D Safer, M. Elzinga, V.T. Nachmias // J. Biol. Chem. — 1991. — V. 266(7). — P. 4029—4032.
3. Mannherz, H.G. The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family / H.G. Mannherz, E. Hannappel // Cell Motil. Cytoskeleton. — 2009. — V. 66. — P. 839—851.
4. Bock-Marquette, I. Thymosin 4: activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair / I. Bock-Marquette, A. Saxena, M.D. White, J.M. Dimaio, D. Srivastava // Nature. — 2004. — V. 432. — P. 466—472.
5. Smart, N. Thymosin 4: induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization / N. Smart, C.A. Risebero, A.A. Melville, K. Moses, R.J. Schwartz, K.R. Chien, P.R. Riley // Nature. — 2007. — V. 445. — P. 177—182.
6. Mora, C.A. Biodistribution of synthetic thymosin beta 4 in the serum, urine, and major organs of mice / C.A. Mora, C.A. Baumann, J.E. Paino, A.L. Goldstein, M. Badamchian // Int. J. Immunopharmacol. — 1997. — V. 19(1). — P. 1—8.
7. Ruff, D. A randomized, placebo-controlled, single and multiple dose study of intravenous thymosin beta4 in healthy volunteers / D. Ruff, D. Crockford, G. Girardi, Y. Zhang // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2010. — V. 1194. — P. 223—229.
8. Ilyushin, D.G. Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo / D.G. Ilyushin, I.V. Smirnov, A.A. Belogurov, Jr., I.A. Dyachenko, T.Iu. Zharmukhamedova, T.I. Novozhilova, E.A. Bychikhin, M.V. Serebryakova,

- O.N. Kharybin, A.N. Murashev, K.A. Anikienko, E.N. Nikolaev, N.A. Ponomarenko, D.D. Genkin, G.M. Blackburn, P. Masson, A.G. Gabibov // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2013. — V.110(4). — P. 1243—1248.
9. *Jevsevar, S.* PEGylation of therapeutic proteins / S. Jevsevar, M. Kunstelj, V.G. Porekar // Biotechnol. J. — 2010. — V.5(1). — P. 113—128.
  10. *Santi, D.V.* Predictable and tunable half-life extension of therapeutic agents by controlled chemical release from macromolecular conjugates / D.V. Santi, E.L. Schneider, R. Reid, L. Robinson, G.W. Ashley // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — V.109(16). — P. 6211—6216.
  11. *Schlapschy, M.* PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins / M. Schlapschy, U. Binder, C. Börger, I. Theobald, K. Wachinger, S. Kisling, D. Haller, A. Skerra // Protein Eng. Des. Sel. — 2013. — V. 26(8). — P. 489—501.
  12. *Fernandes, A.I.* Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics // A.I. Fernandes, G. Gregoriadis // Biochim. Biophys. Acta. — 1997. — V. 1341(1). — P. 26—34.
  13. *Fernandes, I.* The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics // I. Fernandes, G. Gregoriadis // Int. J. Pharm. — 2001. — V. 217. (1). — P. 215—222.
  14. *Veronese, F.M.* Introduction and overview of peptide and protein pegylation // F.M. Veronese, J.M. Harris // Adv. Drug Deliv. Rev. — 2002. — V. 54 (4). — P. 453—456.
  15. *Delgado, C.* The uses and properties of PEG-linked proteins / C. Delgado, G.E. Francis., D. Fisher // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. — 1992. — V. 9(3, 4). — P. 249—304.
  16. *Gabizon, A.* Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin / A. Gabizon, F. Martin // Drugs. — 1997. — V. 54 (4). — P. 15—21.
  17. *Resh, M.D.* Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins // Cell. Signalling. — 1996. — V. 8(6). — P. 403—412.
  18. *Wilson, J.P.* Proteomic Analysis of Fatty-acylated Proteins in Mammalian Cells with Chemical Reporters Reveals S-Acylation of Histone H3 Variants // J.P. Wilson, A.S. Raghavan, Yu-Ying Yang, G. Charron, H.C. Hang // Mol. Cell Proteomics. — 2011. — V. 10(3).
  19. *Resh, M.D.* Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins // Biochim. Biophys. Acta. — 1999. — V.1451 (1). — P. 1—16.
  20. *Mumby, S.M.* Reversible palmitoylation of signaling proteins // Curr. Opin. Cell Biol. — 1997. — V. 9(2). — P. 148—154.
  21. *Dunphy, J.T.* Signalling functions of protein palmitoylation / J.T. Dunphy, M.E. Linder // Biochim. Biophys. Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids. — 1998. — V. 1436 (1—2). — P. 245—261.
  22. *Resh, M.D.* / Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins // Nat. Chem. Biol. — 2006. — V. 2. — P. 584—590.
  23. *Makarov, D.A.* Optimization and Scaling of a Laboratory Method for Obtaining of Human Recombinant Thymosin  $\beta$  4 up to Pilot Process / D.A. Makarov, T.I. Muraviova, V.N. Stepanenko, V.I. Shvets, R.S. Esipov // Biotekhnologiya (Biotechnology). — 2014. — V. 4. — P. 35—44.
  24. *Tuck, M.K.* Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group / M.K. Tuck, D.W. Chan, D. Chia, A.K. Godwin, W.E. Grizzle, K.E. Krueger, W. Rom, M. Sanda, L. Sorbara, S. Stass, W. Wang, D.E. Brenner // J. Proteome Res. — 2009. — V. 8(1). — P. 113—117.
  25. *Kurfürst, M.M.* Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // Anal. Biochemi. — 1992. — V. 200(2). — P. 244—248.
  26. *Mannherz, H.G.* The beta thymosins: Intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family / H.G. Mannherz, E. Hannappel // Cell Motil. Cytoskeleton. — 2009. — V. 66. — P. 839—851.
  27. *Sosne, G.* Biological activities of thymosin 4 defined by activities in short peptide sequences / G. Sosne, P. Qiu, A.L. Goldstein, M. Wheeler // The FASEB J. — 2010. — V. 24. — P. 2144—2151.
  28. *Goldstein, A.L.* Advances in the basic and clinical applications of thymosin b4 / A.L. Goldstein, H.K. Kleinman // Expert Opin. Biol. Ther. — 2015. — V.15(1). — P. 1—7.
  29. *Nakagawa, P.* N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline (Ac-SDKP) Delays the Development of Hypertension and Renal Damage in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) / P. Nakagawa, T-D. Liao, M. Worou, H. Basha, E. Peterson, B. Janic, X.-P. Yang, N.-E. Rhaleb, O. Carretero // FASEB J. — 2015. — V. 29(667). — P. 7.
  30. *Liao, T.-D.* N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline: mechanisms of renal protection in mouse model of systemic lupus erythematosus / T.-D. Liao, P. Nakagawa, B. Janic, M. D'Ambrosio, M.E. Worou, E.L. Peterson, N.-E. Rhaleb, X.-P. Yang, O.A. Carretero // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2015. — V. 308(10). — P. 1146—1154.
  31. *Li, X.* Recombinant thymosin beta 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing / X. Li, L. Zheng, F. Peng, C. Qi, X. Zhang, A. Zhou, Z. Liu, S. Wu // Prot. Expr. Purif. — 2007. — V. 56 — P. 229—236.
  32. *Kinstler, O.B.* Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF / O.B. Kinstler, D.N. Brems, S.L. Lauren, A.G. Paige, J.B. Hamburger, M.J. Treuheit // Pharm. Res. — 1996. — V. 13(7). — V. 996—1002.
  33. *Ingrosso, D.* Specificity of endoproteinase Asp-N (*Pseudomonas fragi*): cleavage at glutamyl residues in two proteins / D. Ingrosso, A.V. Fowler, J. Bleibaum, S. Clarke // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1989. — V. 162(3). — P. 1528—1534.
  34. *Rasoul, S.* Antifibrotic effect of Ac-SDKP and angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension / S. Rasoul, O.A. Carretero, H. Peng, M.A. Cavaasin, J. Zhuo, A. Sanchez-Mendoza, D.R. Brigstock, N.E. Rhaleb // J. Hypertens. — 2004. — V. 22(3). — P. 593—603.

D.A. MAKAROV, and R.S. ESIPOV\*

The Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Russ Acad. Sci., 117997, Moscow Russia

*e-mail:* esipov@ibch.ru

### Development of Methods for Obtaining Thymosin Beta 4 Analogs as Conjugates Resistant to Degradation in Bloodstream

A method for the production of monocojugates of recombinant human thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) with capronic acid, polysialic acid (PSA) and polyethylene glycol (PEG) has been developed. The acylation reaction was carried out using hexanoic anhydride; sialylation, by butyraldehyde derivative of polysialic acid (14 kDa) and PEGylation, by a PEG propionaldehyde derivative (10

kDa). As a result of multifactorial experiments, the components of the reaction mixtures were identified, and conditions of those reactions were optimized. For each analog, we developed a single-stage RP HPLC purification procedure that enabled to attain the purity of no less than 98%. The peptide mapping results backed up by chromatography-mass spectrometry and electrophoresis demonstrated that the produced T $\beta$ 4 analogs are monoconjugates in which the initial peptide is modified at the N-terminal serine residue. The produced analogs feature a higher resistance to degradation in the blood plasma as compared to non-modified T $\beta$ 4, and they can be regarded as promising candidates for further biological testing.

*Key words:* chemical modification of proteins, hexanoic anhydride, polyethylene glycol, polysialic acid, thymosin beta 4.

*Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32. P. 57—71.*

---

\*Author for correspondence.