

УДК 547.9;577.15

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *Erwinia carotovora* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЭГ-ХИТОЗАНА И ГЛИКОЛЬ-ХИТОЗАНА

© 2015 К.В. Суховерков, Е.В. Кудряшова*

Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва;
электронная почта: helena_koudriachova@hotmail.com

Поступила в редакцию 16.06.14
После доработки 26.07.14

Для разработки препаратов L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (EwA) пролонгированного действия предложен новый подход, основанный на образовании конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами хитозана, ПЭГ-хитозана и гликоль-хитозана. Оптимизация молекулярной архитектуры и состава конъюгатов приводит к увеличению каталитической эффективности фермента (k_{cat}/K_M) при физиологических условиях в 3–6 раз. Показано, что наблюдаемый эффект обусловлен главным образом сдвигом рН-профиля каталитической активности фермента в область более низких значений рН за счет поликатионной природы сополимера. Обнаружено, что конъюгирование аспарагиназы с производными хитозана приводит к повышению термостабильности фермента. Можно ожидать, что ХитоПЭГиление, аналогично ПЭГилованию, будет эффективным для улучшения биофармацевтических свойств и снижения иммуногенности данного медицински значимого фермента. Следует отметить, что для определения состава сополимеров ПЭГ-хитозана и конъюгатов сополимер–фермент был использован разработанный нами новый эффективный метод, основанный на ИК-спектроскопии. Данный метод является «безреагентным», позволяет быстро и надежно получать необходимые параметры из анализа единичного ИК-спектра в отличие от используемых ранее трудоемких и недостаточно точных методов, основанных на определении свободных аминок групп полимеров по реакции с TNBS или OPA.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: L-аспарагиназа, ИК-спектроскопия, хитозан, ПЭГ, конъюгаты, стабилизация, ВЭЖХ.

L-Аспарагиназа относится к классу треониновых амидогидролаз и катализирует реакцию гидролиза аспарагина до аспарагиновой кислоты с выделением аммиака. Для опухолевых лимфобластов аспарагин является незаменимой аминокислотой, без поступления которой нарушается синтез белков, и клетка становится неспособной к дальнейшему делению. Сниженная или полностью отсутствующая активность аспарагинсинтазы, синтезирующей аспарагин, является отличительной чертой лейкоэмических лимфобластов, миелобластов и целого ряда других опухолевых клеток, что определяет применение L-аспарагиназы в терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), лимфо- и ретикулобластом и неходжкинских лимфом высокой степени злокачественности у детей [1–4]. В последнее вре-

мя появились сообщения об использовании аспарагиназы для лечения острой миелобластной лейкемии, болезни Ходжкина, меланосаркомы и множественной миеломы [5, 6].

Однако использование бактериальных L-аспарагиназ в терапии осложнено их неустойчивостью в кровотоке и повышенной иммуногенностью, ведущей к развитию побочных эффектов – от аллергических реакций до анафилактического шока [4, 5]. Частично эта проблема решается модификацией фермента полиэтиленгликолем (ПЭГ) [7–9]. Однако длительное терапевтическое применение ферментных препаратов, в т.ч. и «ПЭГилованных» форм, сопровождается рядом побочных эффектов. В частности получившая широкое применение ПЭГилованная форма аспарагиназы «Онкаспар» недостаточно уменьшает вероятность развития аллергических реакций, в результате чего терапия перестает быть эффективной [10]. Таким образом, актуальной является задача разработки новых высокоэффективных аспарагиназных препаратов пролонгированного действия ново-

Принятые сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид, ПЭГ – полиэтиленгликоль, EwA – L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*, mPEG-suc-NHS – монометоксиполиэтиленгликоль-N-гидроксисукцинимидил-сукцинат.

* Адресат для корреспонденции.

го поколения, обладающих низкой иммунологической активностью.

Для решения данной задачи нами предложен подход, основанный на образовании конъюгатов фермента с производными хитозана — биосовместимого, биodeградируемого полисахарида, который широко применяется в косметической и фармацевтической промышленности. Полиэлектролитная природа полимеров на основе хитозана обуславливает многоточечное электростатическое взаимодействие с поверхностью белка, что способствует закреплению конформации фермента, а также создает специфическое высокогидратированное микроокружение вблизи активного центра фермента [11]. Следует также ожидать, что применение разветвленных полимеров приведет к снижению иммуногенности ферментного препарата, что может позволить снять ряд ограничений по применению бактериальных препаратов в терапии. Физико-химические и, соответственно, биологические свойства конъюгатов фермента с хитозаном можно целенаправленно варьировать в широком диапазоне в зависимости от степени полимеризации, плотности заряда на полиэлектролите и наличия заместителей (в т.ч. молекул ПЭГ) в полимерной цепи хитозана, что позволяет регулировать каталитические свойства фермента [12].

Разработка нового подхода получения ферментных форм пролонгированного действия осуществлена на примере нового рекомбинантного фермента L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (EwA), продуцируемого генно-инженерными штаммами *Escherichia coli* [13–15]. Доклинические испытания продемонстрировали высокую эффективность препарата EwA в проведенных тестах на противоопухолевую активность, гиперчувствительность и токсичность [13], что определяет перспективность разработки препарата пролонгированного действия на основе данного фермента.

Настоящая работа посвящена синтезу конъюгатов EwA с разветвленными сополимерами на основе хитозана различного состава и структуры для оптимизации каталитических свойств фермента, на основе которого может быть создан новый аспарагиназный противоопухолевый препарат с улучшенными биофармацевтическими характеристиками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Препарат рекомбинантной L-аспарагиназы (EwA) получен по ранее описанной методике [14]. Образцы хитозана (5 и 15 кДа) — препараты фирмы «Биопрогресс» (Россия), гли-

коль-хитозан (72 кДа) — фирмы «Sigma» (США), активированное производное ПЭГ — mPEG-suc-NHS (5 кДа) — любезно предоставлен Н.С. Мелик-Нубаровым (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) [15]. Прочие соединения: ДМСО, дигидрофосфат, моногидрофосфат и хлорид натрия — фирмы «Sigma» (США), ледяная уксусная кислота — фирмы «Lancaster» (США).

Синтез сополимеров ПЭГ-хитозана. Синтез сополимера ПЭГ-хитозана проводился с использованием препаратов хитозана и mPEG-suc-NHS. Хитозан в концентрации 5 мг/мл был растворен в 3%-ном растворе уксусной кислоты при интенсивном перемешивании. После того как был получен прозрачный раствор, рН системы довели до 6,5 с использованием 150 мМ натрий-фосфатного буфера. Конечная концентрация раствора хитозана составила 3 мг/мл. В полученный раствор по каплям при перемешивании вводили 1–3-кратный молярный избыток (в пересчете на моль деацелированных аминогрупп хитозана) раствора mPEG-suc-NHS в ДМСО. При проведении реакции рН раствора довели до рН 7,5 150 мМ натрий-фосфатным буфером. Смесь интенсивно перемешивали в течение 1–3 ч. Очистку производили методом диализа против 15 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,5) в течение 2 сут при комнатной температуре. Чистота препарата контролировалась с помощью гель-фильтрации методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Knauer» (Германия) на носителе BioFox 17 SEC в колонке размером 15 см × 1 см². Элюент — натрий-фосфатный буфер (15 мМ фосфат, рН 7,5, 150 мМ NaCl), скорость элюирования 0,5 мл/мин, 25°.

Получение конъюгатов аспарагиназы с сополимерами ПЭГ-хитозана. Конъюгаты аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном синтезировали путем модификации аминогрупп аспарагиназы по реакции восстановления аминирования. Для этого к раствору аспарагиназы (4 мг/мл) в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) добавляли порциями при перемешивании раствор ПЭГ-хитозана в молярном отношении к ферменту 20 : 1. Полученную смесь инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 40 мин при 16°. Далее к реакционной смеси добавляли цианборгидрид натрия (5-кратный молярный избыток по отношению к ферменту) и инкубировали еще 40 мин при непрерывном перемешивании. После этого реакционную смесь подвергали гель-фильтрации методом ВЭЖХ на носителе BioFox 17 SEC в условиях, аналогичных описанным выше. Полученный препарат хранили при –20°.

Синтез конъюгата с гликоль-хитозаном. Для синтеза конъюгата, содержащего три цепи гли-

коль-хитозана на одну белковую глобулу, к раствору аспарагиназы в концентрации 1,7 мг/мл в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5) добавляли раствор гликоль-хитозана в концентрации 10,8 мг/мл в том же буфере. Получившуюся смесь инкубировали 40 мин при 15°. Затем к ней добавляли 5-кратный молярный избыток (по отношению к белку) цианборгидрида натрия в виде раствора в 35 мкл 15 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,5). После этого реакционную смесь инкубировали 40 мин при 15°. Реакцию останавливали при помощи замораживания.

Регистрация спектров ИК. Измерение спектров всех исследуемых образцов проводили на ИК-спектрометре Фурье Bruker Tensor 27 («Bruker», Германия), оснащенный 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 в фосфатном буфере с концентрацией 0,5–2 мг/мл. Спектры измеряли в интервале частот 4000–950 см⁻¹ со спектральным разрешением 2 см⁻¹. Температура измерения 22°. Для каждого спектра производилось 100-кратное сканирование и усреднение. Регистрацию фона проводили в аналогичных условиях. Результирующие спектры по необходимости спрямляли методом Савицкого–Голла до спектрального разрешения 4 см⁻¹. Анализ спектров проводили с помощью программы Opus 7.0.

Определение каталитической активности аспарагиназы. Определение скорости гидролиза аспарагина проводили при помощи спектрометра кругового дихроизма (КД) «Jasco» J-815 (Япония). В типичном эксперименте к раствору аспарагина в 15 мМ натрий-фосфатном буфере добавляли раствор препарата EwA в том же буфере так, чтобы в получаемой смеси содержалось 0,002–0,015 мг/мл фермента и 20 мМ аспарагин. Реакция проводилась при 37° в кварцевой кювете (l = 1 мм). Далее регистрировали зависимость эллиптичности от времени при длине волны 210 нм.

Регистрация КД-спектров для аспарагина и аспарагиновой кислоты. КД-спектры аспарагина и аспарагиновой кислоты регистрировали с помощью спектрометра кругового дихроизма (КД) фирмы «Jasco» J-815 (Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 195–220 нм при 37° в кварцевой кювете (l = 1 мм). Спектры получали 5-кратным сканированием с шагом 1 нм. Ас-

парагин и аспарагиновую кислоту растворяли в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5), конечная концентрация аминокислот в системе составляла 5–20 мМ.

Исследование термостабильности препаратов L-аспарагиназы. Раствор образца фермента (0,5 мг/мл) в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5, 150 мМ NaCl) инкубировали при 45°. Через каждые 5–10 мин инкубации отбирали аликвоты растворов фермента, охлаждали в течение 10 мин до комнатной температуры. Каталитическую активность препаратов определяли при 37° методом КД-спектроскопии в реакционных смесях, содержащих 0,01 мг/мл ферментного препарата, 20 мМ субстрат в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения конъюгатов EwA с сополимерами, обладающих оптимальными биофармацевтическими свойствами, было исследовано влияние состава конъюгатов на каталитическую активность фермента. Синтез конъюгатов с производными хитозана различного состава осуществляли по реакции восстановительного аминирования между свободными аминогруппами фермента и восстанавливающим концом молекул хитозана. При этом получались конъюгаты «короннообразной» структуры (рис. 1).

Для образования конъюгатов применяли следующие производные хитозана: привитый сополимер хитозана (15 кДа) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) (5 кДа) (ПЭГ-хитозан) разветвленной структуры, содержащий различное количе-

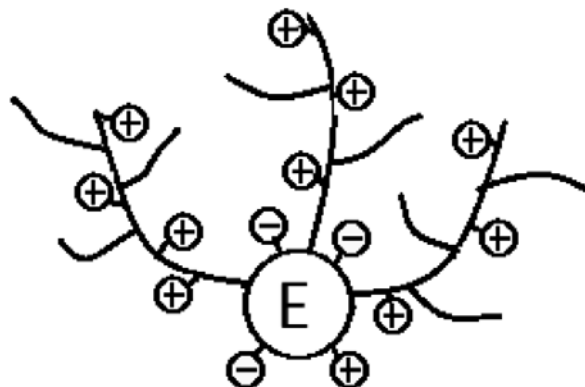


Рис. 1. Схематическое изображение строения «короннообразного» конъюгата фермента с разветвленными сополимерами на основе хитозана

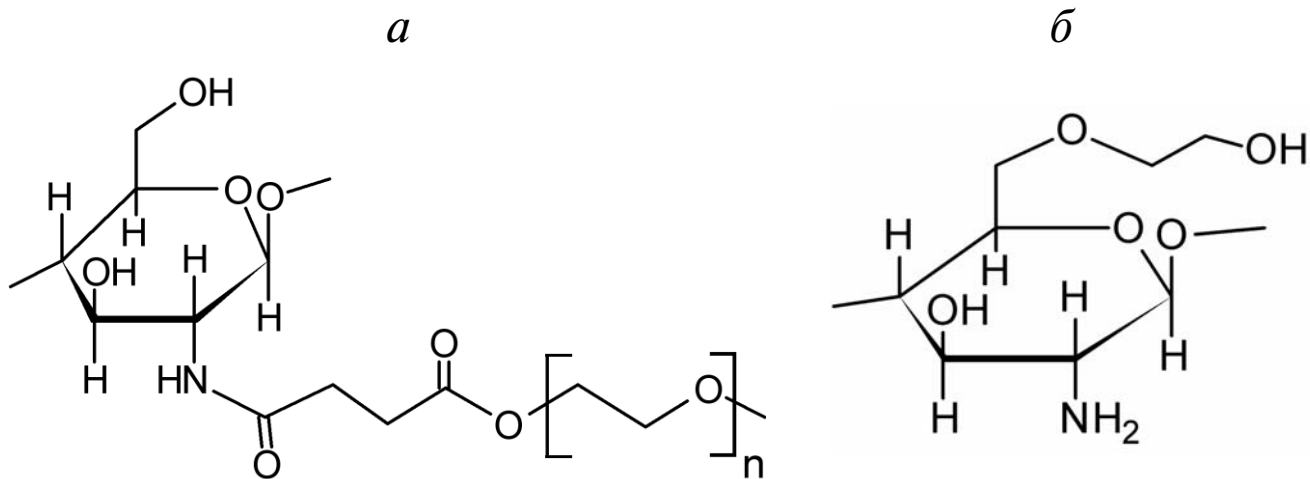


Рис. 2. Мономерное звено ПЭГ-хитозана (а) и гликоль-хитозана (б)

ство цепей ПЭГ, приходящихся на цепь хитозана (рис. 2, а), и гликоль-хитозан (рис. 2, б).

Анализ состава полученных конъюгатов проводили в несколько этапов: 1) разделение методом ВЭЖХ в режиме геля-фильтрации, 2) определение каталитической активности и 3) анализ состава фракций методом ИК-спектроскопии.

Разделение методом ВЭЖХ в режиме геля-фильтрации. Характерная хроматограмма реакционной смеси, полученной в случае синтеза конъюгата EwA с ПЭГ-хитозаном (рис. 3), содержит фракцию со временем удерживания (t_{R1}) меньшим, чем у нативного фермента (фракция 1), а также ряд фракций с большим t_R (фракции 2–4). Активность каждой из фракций определяли методом КД-спектроскопии. Установлено, что ка-

талитическая активность наблюдается только для фракции 1.

Состав каждой фракции анализировали методом ИК-спектроскопии. На рис. 4 представлены ИК-спектры конъюгата EwA с ПЭГ-хитозаном (1) и нативного фермента (2). Спектр нативного фермента содержит пики в области Амид 1 (1600–1700 cm^{-1}) и Амид 2 (1500–1600 cm^{-1}), характеристические для белковых препаратов. В результате образования конъюгата фермента с ПЭГ-хитозаном в ИК-спектре наблюдается появление пиков при 1100 и 950 cm^{-1} , которые соответствуют колебаниям связей C–O–C в цепях ПЭГ и колебаниям связей C–O–C, C–N и C–C в пиранозном цикле хитозана [16, 17]. Также значительно увеличивается интенсивность по-

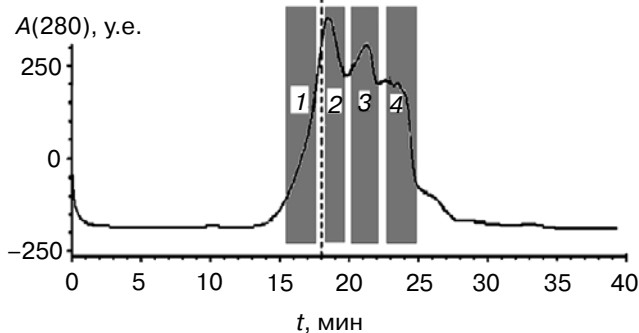


Рис. 3. Хроматограмма образца конъюгата EwA с ПЭГ-хитозаном (15 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,5), 1–4 – номера фракций. Пунктиром показано время удерживания (t_R) нативного фермента

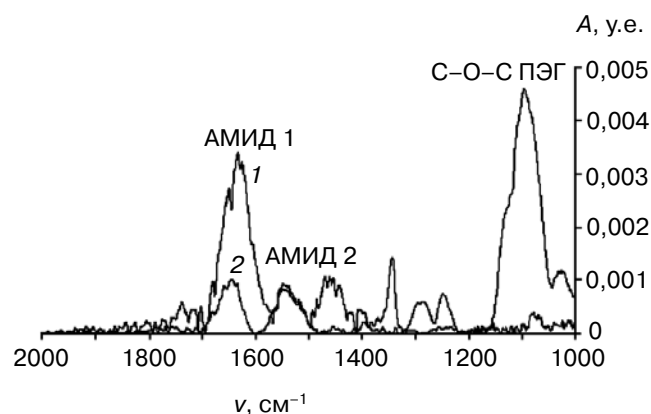


Рис. 4. ИК-спектр конъюгата EwA и ПЭГ-хитозана (1) и нативного фермента (2). Экспериментальные условия: 15 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 7,5), 25°, концентрация фермента 0,2 мг/мл

лосы Амид 1 за счет вклада ацилированных групп хитозана. В области 1430–1470 см⁻¹ появляются полосы, обусловленные колебанием СН₂- и ОН-групп в хитозане, отсутствовавшие в спектре нативного фермента.

Полученные данные позволяют утверждать, что произошла модификация фермента ПЭГ-хитозаном. В табл. 1 суммированы результаты анализа фракций, полученных при хроматографии реакционной смеси после синтеза конъюгата EwA с ПЭГ-хитозаном в сравнении с контрольными образцами нативного фермента, ПЭГ-хитозана и активированного ПЭГ. Аналогичные результаты были получены и при анализе других синтезированных в работе конъюгатов аспарагиназы с производными хитозана.

Для определения количественного состава синтезированных в работе конъюгатов анализировали соотношения интенсивности основных полос поглощения в ИК-спектрах конъюгата по сравнению с нативным ферментом. Так, степень ПЭГилирования хитозана в сополимерах устанавливали по соотношению интенсивностей пиков при 1100 и 950 см⁻¹ в спектре ПЭГ-хитозана. Зная степень ПЭГилирования сополимера по интенсивности полосы при 1100 см⁻¹ в спектре конъюгата, определяли содержание ПЭГ-хитозана в образце. Используя калибровочные зависимости интенсивности полосы Амид 1 от концентрации фермента и ПЭГ-хитозана, определяли количество цепей сополимера, приходящихся на одну белковую глобулу. Результаты

Таблица 1. Состав и каталитическая активность фракций, полученных при хроматографии методом ВЭЖХ в режиме гелевой фильтрации реакционной смеси после синтеза конъюгата EwA с ПЭГ-хитозаном

Фракция	Время удерживания образцов t_R , мин	Состав	Каталитическая активность	Контрольные образцы	Время удерживания образцов t_R , мин
1	16	EwA-ПЭГ-хитозан	+	EwA	18
2	19	ПЭГ-хитозан-1*	–	ПЭГ-хитозан-1*	19
3	21	ПЭГ-хитозан-2*	–	ПЭГ-хитозан-2*	22
4	24	ПЭГ	–	ПЭГ	23

* ПЭГ-хитозан-1 содержит 40 цепей ПЭГ на цепь сополимера, а ПЭГ-хитозан-2 – 14 цепей ПЭГ.

Таблица 2. Состав синтезированных конъюгатов и их удельные активности

Тип конъюгата	Состав конъюгата	Удельная активность, МЕ/мг
Нативный фермент	–	500 ± 20
	EwA–хитозан (5 кДа)	2940 ± 20
Конъюгаты с хитозаном	EwA–хитозан (15 кДа)	1280 ± 20
	EwA–ПЭГ-хитозан (5 кДа), $n = 2$	1460 ± 20
	EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n = 2$	1670 ± 20
Конъюгаты с ПЭГ-хитозаном	EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n = 8$	1640 ± 20
	EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n = 20$	1950 ± 20
	EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n = 40$	163 ± 20
Полиэлектролитный комплекс с гликоль-хитозаном	EwA–гликоль-хитозан (72 кДа)	260 ± 20
Конъюгат с гликоль-хитозаном	EwA–гликоль-хитозан (72 кДа)	248 ± 17

Примечание. n – Количество цепей ПЭГ, приходящихся на молекулу хитозана. Экспериментальные условия: 15 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,5), 37°.

анализа состава полученных в настоящей работе конъюгатов и их каталитических характеристик представлены в табл. 2.

Из приведенных данных следует, что удельные активности конъюгатов зависят от массы хитозана, типа связывания полимера с ферментом (ковалентно – нековалентно) и наличия и природы заместителя. Так, конъюгаты с ПЭГ-хитозаном (5 и 15 кДа) характеризуются более высокой каталитической активностью (в несколько раз) по сравнению с нативным ферментом, в то время как конъюгат с гликоль-хитозаном (70–90 кДа) обладает меньшей активностью, чем нативный фермент (табл. 2). По-видимому, это связано с ростом величины константы Михаэлиса, вызванным затруднением доступа субстрата к активному центру длинными цепями высокомолекулярного гликоль-хитозана.

Наиболее яркий эффект на каталитическую активность фермента оказывает степень ПЭГи-лирования хитозана. На рис. 5 представлена зависимость удельной активности конъюгата EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа) от степени ПЭГи-лирования. Из рисунка следует, что активность конъюгатов EwA–ПЭГ-хитозан имеет зависимость с оптимумом, который достигается при отношении ПЭГ/хитозан = 10–20. При этом активность наиболее активного конъюгата более чем в 3 раза превышает удельную активность нативного фермента. Дальнейшее увеличение степени ПЭГи-лирования ведет к снижению активности конъюгатов, что, по-видимому, связано с ростом константы Михаэлиса, обусловленным затруднением доступа субстрата к активному

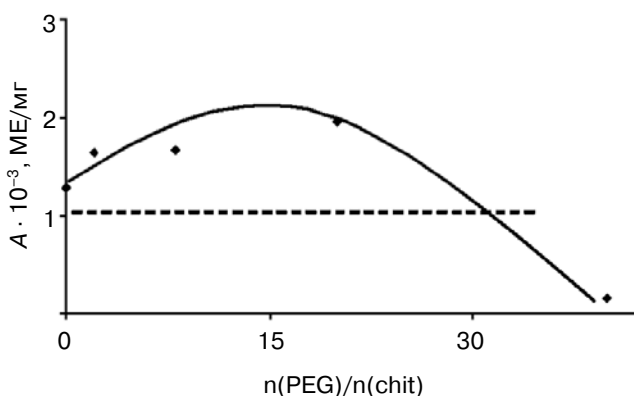


Рис. 5. Зависимость удельной активности конъюгатов EwA–ПЭГ-хитозан от степени ПЭГи-лирования хитозана. Пунктирная линия – уровень активности нативного фермента. Экспериментальные условия: 15 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,5), 37°

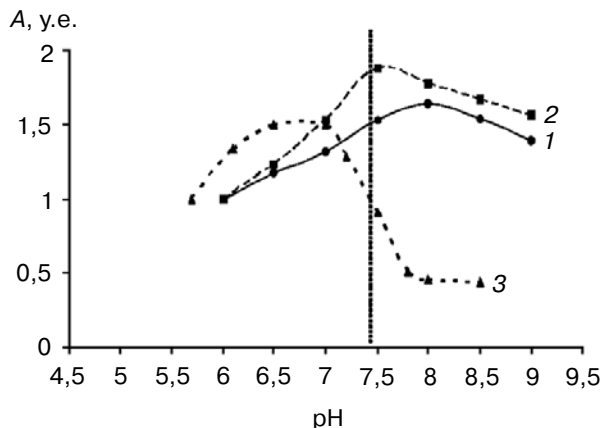


Рис. 6. рН-Зависимость относительной активности нативного фермента (кривая 1) и конъюгатов EwA–ПЭГ-хитозан с n(PEG)/n(chit) = 40 (кривая 2) и n(PEG)/n(chit) = 14 (кривая 3)

центру в случае высокоПЭГи-лированных сополимеров.

Одной из причин изменения активности конъюгата по сравнению с нативным ферментом может являться смещение рН-оптимума активности фермента в сторону области физиологических значений рН. Чтобы проверить это предположение, для конъюгатов аспарагиназы с производными хитозана были определены профили рН-зависимости активности фермента (рис. 6) в сравнении с нативным ферментом. Обнаружено, что образование конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозаном приводит к сдвигу рН-оптимума в сторону более низких значений рН. Причем величина сдвига рН-оптимума зависит от количества свободных аминокрупп в составе хитозана (т.е. уменьшается при увеличении степени ПЭГи-лирования хитозана). Таким образом, одной из основных причин повышения активности конъюгатов по сравнению с нативным ферментом является смещение рН-оптимума активности фермента в область физиологических значений рН.

Термостабильность конъюгатов аспарагиназы с производными ПЭГ-хитозана. Известно, что многоточечное электростатическое взаимодействие противоположно заряженных групп полиэлектролитов и фермента приводит к закреплению каталитически активной конформации белка и препятствует его агрегации [11]. Можно ожидать, что образование конъюгатов фермента с производными хитозана будет приводить к повышению устойчивости фермента.

Кривые термоинактивации конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозаном, гликоль-хитозаном и поли-

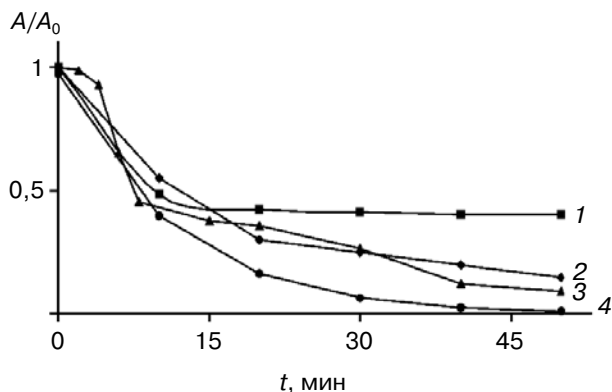


Рис. 7. Кривые термоинактивации конъюгата EwA–гликоль-хитозан (кривая 1), нековалентного комплекса EwA и гликоль-хитозана (кривая 2), конъюгата EwA–ПЭГ-хитозан (5 кДа) (кривая 3) в сравнении с нативным ферментом (кривая 4) в координатах остаточная активность – время. Экспериментальные условия: 15 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 45°

электролитного комплекса с гликоль-хитозаном в сравнении с нативным ферментом представлены на рис. 7. Из рисунка следует, что через 50 мин инкубации нативный белок полностью теряет активность, в то время как конъюгат с гликоль-хитозаном сохраняет более 40% активности (рис. 7). Значения параметров термоинактивации изученных образцов аспарагиназы в сравнении с ПЭГилированной аспарагиназой [7] суммированы в табл. 3.

Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что связывание фермента с ПЭГ-хитозаном и гликоль-хитозаном значительно увеличивает его устойчивость к термоинактивации. Особенно следует отметить высокий уровень остаточной активности конъюгата с гликоль-хитозаном, превышающий таковой для препаратов ПЭГ-аспарагиназы [7]. Это качество

Таблица 3. Значения констант термоинактивации (k_{in} , мин⁻¹) и остаточных активностей (A/A_0) для нативной аспарагиназы, конъюгатов аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном и гликоль-хитозаном, а также для полиэлектролитного комплекса (ПЭК) фермента с гликоль-хитозаном, полученных из анализа термоинактивационных кривых в сравнении с ПЭГ-аспарагиназой (EwA–ПЭГ)

Препарат	k_{in} , мин ⁻¹	A/A_0 после 50 мин инкубации, %
Нативный фермент	$0,10 \pm 0,01$	0
EwA–ПЭГ-хитозан (5 кДа)	$0,05 \pm 0,01$	10
EwA–гликоль-хитозан (ПЭК)	$0,06 \pm 0,01$	18
EwA–гликоль-хитозан (конъюгат)	$0,05 \pm 0,01$	40
EwA–ПЭГ [7]	$0,04 \pm 0,01$	10

делает конъюгаты аспарагиназы с производными хитозана перспективной основой для создания стабилизированного ферментного препарата.

Таким образом, продемонстрирована перспективность применения сополимеров на основе хитозана для получения препаратов аспарагиназы с улучшенными биофармацевтическими свойствами. Полученные результаты могут быть использованы для создания высокоэффективных препаратов на основе других терапевтически значимых ферментов, в особенности обладающих значениями рН-оптимума, отличающимися от физиологического.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-04-00325а) и Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ravindranath, Y., Abella, E., Krischer, J.P., Wiley, J., Inoue, S., Harris, M., Chauvenet, A., Alvarado, C.S., Dubowy, R., and Ritchey, A.K. (1992) Acute myeloid leukemia (AML) in Down's syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498, *Blood*, **80**, 2210–2214.
- Pui, C.H., and Evans, W.E. (2006) Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **354**, 166–178.
- Redaelli, A., Laskin, B.L., Stephens, J.M., Botteman, M.F., and Pashos, C.L. (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL), *Eur. J. Cancer Care*, **14**, 53–62.
- Billett, A.L., Carls, A., Gelber, R.D., and Sallan, S.E. (1992) Allergic reactions to *Erwinia* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to *Escherichia coli* asparaginase, *Cancer*, **70**, 201–206.
- Uren, J.R., and Handschumacher, R.E. (1977) Enzyme therapy, in *Cancer: a comprehensive treatise* (Becker, F.F., ed.), Plenum Press, N.Y., **5**, 487–557.
- Papageorgiou, A.C., Posypanova, G.A., Andersson, C.S., Sokolov, N.N., and Krasotkina, J. (2008) Structural and

- functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase, *FEBS J.*, **17**, 4306–4316.
7. Кучумова А.В., Красоткина Ю.В., Хасигов П.З., Соколов Н.Н. (2007) Пегилирование рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora* полиэтиленгликолем 5000, *Биомед. химия*, **53**, 107–111.
 8. Mozhaev, V.V., Kudryashova, E.V., Efremova, N.V., and Topchieva, I.N. (1996) Stability of chymotrypsin conjugated with PEGs and proxanols at high temperature and in water-cosolvent mixtures, *Biotechnol. Techniques*, **10**, 849–854.
 9. Soares, A.L., Guimaraes, G.M., Polakiewicz, B., de Moraes Pitombo, R.N., and Abrahao-Neto, J. (2002) Effects of polyethylene glycol attachment on physico-chemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase, *Int. J. Pharm.*, **237**, 163–170.
 10. Dinndorf, P.A., Gootenberg, J., Cohen, M.H., Keegan, P., and Pazdur, R. (2007) FDA drug approval summary: pegaspargase (Oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), *Oncologist*, **12**, 991–998.
 11. Кудряшова Е.В., Зоров И.Н., Васильева И.В., Синицын А.П., Левашов А.В. (2009) Стабилизация щелочной протеиназы и целлюлаз комплексобразованием с хитозаном, *Биоорганич. химия*, **35**, 1–8.
 12. Lin, W.J., and Chen, M.H. (2007) Synthesis of multifunctional chitosan with galactose as a targeting ligand for glycoprotein receptor, *Carbohydr. Polymers*, **67**, 474–480.
 13. 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., Скрыбин К.Г., Арчаков А.И. (2005) Разработка противоопухолевого препарата рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, *Мол. медицина*, **1**, 45–53.
 14. 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) Выделение, очистка и некоторые свойства рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, экспрессированной в клетках *E. coli*, *Биомед. химия*, **49**, 502–507.
 15. 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. Способ получения субстанции рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora*. Патент на изобретение РФ № 2441914, 2010.
 16. Кудряшова Е.В., Суховерков К.В., Соколов Н.Н. (2014) Применение сополимеров разветвленной архитектуры на основе ПЭГ-хитозана для регуляции каталитических свойств ферментных препаратов медицинского назначения на примере нового высокоэффективного рекомбинантного препарата L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora*, *Биомед. химия*, **60**, 16–27.
 17. Kudryashova, E.V., Suhoverkov, K.V., and Sokolov, N.N. (2014) Application of PEG-chitosan copolymers for regulation of catalytic properties of enzyme preparations for medical application using recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase as an example, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomed. Chem.*, **8**, 252–259.

**PEG-CHITOSAN AND GLYCOL-CHITOSAN
FOR IMPROVEMENT OF BIOPHARMACEUTICAL
PROPERTIES OF RECOMBINANT L-ASPARAGINASE
FROM *Erwinia carotovora***

K. V. Suhoverkov, E. V. Kudryashova*

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Chemical faculty,
Moscow 119991, Russia; E-mail: helena_koudriachova@hotmail.com*

Received June 16, 2014
Revision received July 26, 2014

Structure–function relationship of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* (EwA) was studied upon conjugation with a variety of branched copolymers, PEG-chitosan and glycol-chitosan. The compositions of such conjugates were optimized for maximal catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) at physiological conditions, yielding an improvement with the factor of 3–6 in comparison with the native enzyme. This effect is mainly attributed to the shift of otherwise unfavorable pH activity profile towards physiological values. The thermostability of EwA conjugates was also considerably improved. Chito-PEGylation, similarly to PEGylation, can be expected to improve pharmacokinetic properties and reduce immunogenicity of this medically relevant enzyme. Therefore, chitoPEGylation can be suggested as a perspective approach for the development of improved forms of therapeutic enzymes, especially when their pH optima are substantially different from physiological pH. It is worth mentioning that a new versatile approach based on IR spectroscopy has been developed to determine PEG/Chitosan copolymer composition, as well as Copolymer/Enzyme ratio in conjugates. A single IR spectrophotometric measurement was shown to be successful in replacing laborious and unreliable measurements based on free amino group titration with TNBS or OPA.

Key words: recombinant L-asparaginase, branched co-polymers, PEG-chitosan, activity, thermostability, FTIR, HPLC, pH-optima