

УДК 547.9:577.15

УВЕЛИЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* ПРИ ОБРАЗОВАНИИ КОНЬЮГАТОВ С СОПОЛИМЕРАМИ ПЭГ-ХИТОЗАНА

К.В. Суховерков¹, О.Ю. Абакумова², О.В. Подобед², Н.Н. Соколов²,
Е.В. Кудряшова¹

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича; e-mail: helena_koudriachova@hotmail.com)

Разработан метод хитопэгилирования – новый подход к регуляции каталитических свойств ферментов, основанный на образовании ковалентных конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами хитозана. Эффективность этого метода продемонстрирована на примере нового рекомбинантного препарата L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* (EwA). Проведена оптимизация молекулярной архитектуры и состава конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозанами. Показано, что решающим фактором, влияющим на активность конъюгатов EwA являются молекулярная масса хитозана и его степень пэгилирования. Установлено, что конъюгирование EwA с ПЭГ-хитозаном увеличивает ее цитостатическую активность в отношении клеток хронического миелоидного лейкоза человека K562, клеток лимфомы Беркитта Raji и клеток T-клеточного острого лимфобластного лейкоза человека Jurkat по сравнению с нативным ферментом. Полученные данные открывают пути для синтеза L-аспарагиназных препаратов с улучшенными биокаталитическими свойствами.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, ПЭГ-хитозаны, конъюгаты, цитотоксическая активность.

Принятые сокращения: EwA – L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*.

L-Аспарагиназа относится к классу треониновых амидогидролаз и катализирует реакцию гидролиза аспарагина до аспарагиновой кислоты с выделением аммиака. Для опухолевых лимфобластов L-аспарагин является незаменимой аминокислотой, без поступления которой нарушается синтез белков, и клетка становится неспособной к дальнейшему делению. Сниженная или полностью отсутствующая активность L-аспарагинсинтазы, синтезирующей L-аспарагин, является отличительной чертой лейкемических 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]. 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].

В связи с этим становится актуальной разработка новых высокоэффективных аспарагиназных препаратов пролонгированного действия, обладающих низкой иммунологической активностью. Для решения данной задачи нами предложен новый подход к регуляции каталитических свойств ферментов, основанный на образовании ковалентных конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами хитозана (хитопэгилирование) [6–7]. Эффективность подхода была исследована на примере рекомбинантного препарата L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* (EwA). Данный препарат иммунологически отличается от используемых в медицинской практике препаратов L-аспарагиназы из *E. coli*, что определяет перспективы его использования в качестве альтернативы при развитии гиперчувствительности к первичному препарату.

Цель данной работы – исследование влияния молекулярной архитектуры и состава конъюгатов EwA с ПЭГ-хитозанами на цитостатическую активность фермента в отношении различных видов опухолевых клеток (клеток хронического миелоидного лейкоза K562 и клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat), которые обладают не до конца сниженной L-аспарагинсинтазной активностью и соответственно имеют некоторую резистентность к L-аспарагиназам [8–9], а также клеток лимфомы Беркитта (линия Raji) не лейкозного происхождения, для которых L-аспарагин является полностью незаменимой аминокислотой [8–9]. Полученные в работе данные об активности полученных конъюгатов в отношении различных клеточных культур могут пролить свет на механизм цитостатического действия L-аспарагиназных препаратов.

Материалы и методы

Синтез ПЭГ-хитозанов и конъюгатов L-аспарагиназы с хитозаном и его производными проводили по методике, разработанной ранее [10].

Определение каталитических параметров препаратов L-аспарагиназы. Удельную активность препаратов EwA определяли методом КД-спектроскопии по методике, разработанной ранее [11, 12]. Для определения константы Михаэлиса (K_M) применяли метод рН-статирования [6].

Определение устойчивости препаратов L-аспарагиназы в питательной среде. Для исследования устойчивости L-аспарагиназных препаратов в условиях, моделирующих исследования цитостатической активности L-аспарагиназных препаратов, готовили растворы фермента или его конъюгата в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5). Полученные растворы добавляли к аликвотам питательной среды (RPMI-1640 + 10% ЭТС) до уровня содержания фермента 10 МЕ/мл. Аликвоты инкубировали при 37°C в течение 3–5 сут. Периодически отбирали пробы для измерения активности фермента. Активность L-аспарагиназы определяли методом КД-спектроскопии при 37°C.

Определение цитостатической активности препаратов L-аспарагиназы проводили согласно методике, описанной в работе [13]. Клетки пассировали в 96-луночные планшеты в 100 мкл среды с плотностью 2500 клеток на 1 лунку для MCF-7 и 5000 клеток на 1 лунку для клеток всех лейкозов. Клетки преинкубировали в планшетах («Costar», США) в течение 24 ч. К клеткам добавляли препараты L-аспарагиназы в диапазоне концентраций

0,05–10 МЕ/мл в четырех повторах. Через 72 ч эксперимент останавливали. Количество выживших метаболически активных клеток определяли, используя МТТ-тест.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации биокаталитических свойств L-аспарагиназы синтезированы конъюгаты EwA с хитозаном и его производными. Синтез конъюгатов осуществлялся по реакции восстановительного аминирования между восстанавливающим концом хитозана и аминогруппами L-аспарагиназы [6–7]. Исследовали активность конъюгатов L-аспарагиназы в зависимости от молекулярной массы хитозана и степени его пэггилирования: молекулярную массу хитозанов варьировали в пределах 3–160 кДа; степень пэггилирования хитозана варьировали в пределах 0–40 цепей ПЭГ на цепь хитозана. Состав исследованных в работе конъюгатов приведен в табл. 1.

Активность конъюгатов определяли методом КД-спектроскопии, разработанным нами ранее [12]. Обнаружено, что связывание L-аспарагиназы с хитозаном, имеющим молекулярную массу 5–15 кДа, приводит к увеличению активности фермента в 2–3 раза. Дальнейшее увеличение молекулярной массы применяемого полимера приводит к уменьшению активности фермента, что может быть связано как со стерическими затруднениями для диффузии продукта к активному центру фермента, так и с влиянием длинноцепочечного поликатиона на конформацию фермента.

Наиболее сильное воздействие на каталитическую активность фермента оказывает степень пэггилирования хитозана (табл. 1). На рис. 1 представлена зависимость удельной активности конъюгата EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа) от степени пэггилирования. Из рис. 1 следует, что активность конъюгатов EwA–ПЭГ-хитозан имеет зависимость с оптимумом, который достигается при отношении ПЭГ:хитозан = 10:20. При этом активность конъюгата в 3–4 раза превышает удельную активность нативного фермента. Дальнейшее увеличение степени пэггилирования ведет к снижению активности конъюгатов (рис. 1). Ранее нами было показано, что одной из основных причин повышения активности конъюгатов является смещение рН-оптимума активности фермента от рН 8,8 в область физиологических значений рН [12].

При разработке новых лекарственных форм ферментных препаратов с применением разветвленных полимеров важно знать, как влияет модификация фермента на K_M , поскольку L-аспарагиназные препараты предназначены для

Т а б л и ц а 1

Состав и активность синтезированных конъюгатов EwA и производных хитозана

Состав конъюгата	$n(\text{хит})/n(\text{фермент})$	Удельная активность, МЕ/мг
Нативный фермент	–	500 (± 20)
EwA-хитозан (5 кДа)	5	1620 (± 50)
EwA-хитозан (15 кДа)	5	1300 (± 50)
EwA-гликоль-хитозан (ПЭК) (72 кДа)	3	260 (± 20)
EwA-гликоль-хитозан (72 кДа)	3	250 (± 20)
EwA-хитозан (160 кДа)	5	46 (± 7)
EwA-ПЭГ-хитозан (3 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 1,6$	5	1040 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (3 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 2,1$	5	1180 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (5 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 1,5$	5	1460 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (5 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 2,6$	5	1300 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 2$	4	1670 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 8$	4	1640 (± 50)
EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 20$	4	1950 (± 80)
EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), $n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит}) = 40$	4	160 (± 20)

применения в условиях, которые не обеспечивают субстратного насыщения. Определение K_M для конъюгатов EwA в сравнении с нативным ферментом проводили методом рН-статирования. Данный метод позволяет с высокой точностью определять скорость гидролиза L-аспарагина при его концентрациях в диапазоне 0,1–0,5 мМ, что обуславлива-

ет применимость метода для определения величины K_M [6].

Установлено, что образование конъюгатов EwA с хитозаном и его производными практически не влияет на величину K_M как в случае конъюгатов с низкомолекулярными ПЭГ-хитозанами (3–15 кДа), более активными чем нативный

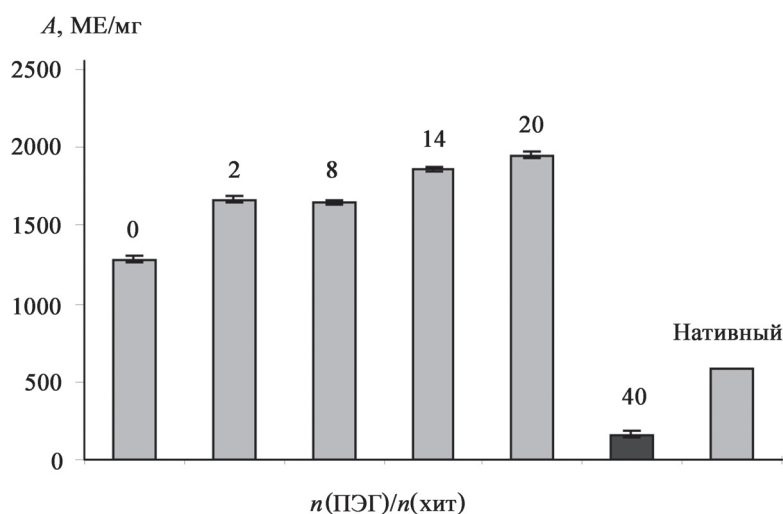


Рис. 1. Влияние степени пегилирования на удельную активность конъюгатов EwA и ПЭГ-хитозанов (15 кДа)

Т а б л и ц а 2

Влияние состава конъюгата на константу Михаэлиса L-аспарагиназы

Конъюгат	K_M , мМ	A , МЕ/мг
ЕwА	0,29 ($\pm 0,05$)	470 (± 30)
ЕwА-ПЭГ-хит (3 кДа)	0,16 ($\pm 0,05$)	980 (± 30)
ЕwА-ПЭГ-хит (15 кДа)	0,16 ($\pm 0,05$)	980 (± 30)
ЕwА-хит (160 кДа)	0,19 ($\pm 0,05$)	62 (± 30)

фермент, так и в случае конъюгатов с высокомолекулярным хитозаном (160 кДа), менее активным чем нативный фермент (табл. 2). Это означает, что снижение активности фермента, наблюдаемое при образовании конъюгатов с высокомолекулярными хитозанами, не связаны с ограничением доступности субстрата к активному центру фермента. Полученные данные указывают на то, что хитопэгилированные препараты можно успешно применять для удаления L-аспарагина в физиологических условиях.

При разработке модифицированных форм L-аспарагиназных препаратов необходимо учитывать степень их взаимодействия с белками плазмы крови в сравнении с нативным препаратом. Более интенсивное взаимодействие может привести к агрегации и потере активности фермента. Поэтому в работе было исследовано изменение активности конъюгатов при их инкубировании в условиях повышенного содержания белка, соответствующих физиологическим. На рис. 2 приведена зависимость относительной активности препаратов от времени их инкубации в питательной среде при 37°C.

Из рис. 2 следует, что тенденции изменения активности для конъюгата и нативного фермента

практически совпадают. Активность нативного фермента постепенно снижается при инкубации в течение суток, а через 48 ч падает до 80%. Активность конъюгата также остается на уровне 70–80% после 48 ч инкубации. Приведенные данные свидетельствуют о том, что в условиях, моделирующих эксперимент, оба препарата устойчивы по цитостатической активности фермента и сохраняют высокий уровень этого показателя в течение 48 ч.

Цитотоксическая активность конъюгатов ЕwА с хитозаном и его производными.

Для изучения цитотоксической активности конъюгатов ЕwА с хитозаном и его производными мы выбрали несколько линий раковых клеток, различающихся чувствительностью к аспарагиназным препаратам. Лейкозные клетки, относящиеся к линиям K562 и Jurkat, отличаются не до конца сниженной активностью L-аспарагинсинтазы [8–9] и могут проявлять устойчивость к препаратам на ее основе. Клетки лимфомы Беркитта (линия Raji) отличаются пониженной L-аспарагинсинтетазной активностью по сравнению с использованными лейкозными клетками, что делает их более восприимчивыми к действию L-аспарагиназы.

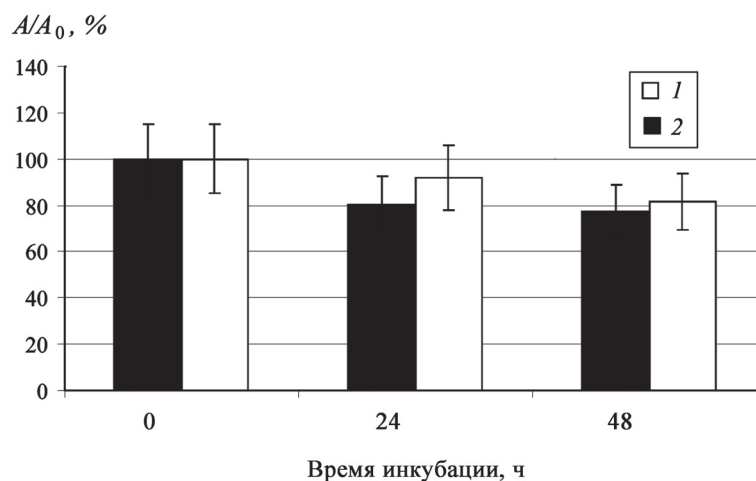


Рис. 2. Зависимость относительной активности ЕwА (1) и ЕwА-ПЭГ-хит (2) от времени инкубации в питательной среде при 37°C

Таблица 3

Состав и строение конъюгатов EwA, использованных для исследования цитостатической активности

Тип конъюгата	$n(\text{ПЭГ})/n(\text{хит})$	A , МЕ/мг
EwA-хит (3 кДа)	2,6–3,2	1400–1600 (± 60)
EwA-ПЭГ-хит (3 кДа)	2,1–2,6	1040–1200 (± 60)
EwA-ПЭГ-хит (5 кДа)	–	1300–1500 (± 60)
EwA-гликоль-хитозан	–	250 (± 20)
EwA-гликоль-хитозан (ПЭК)	–	260 (± 20)

Для изучения влияния конъюгирования на цитостатическую активность EwA использовали конъюгаты с разными молекулярной массой, архитектурой и составом (табл. 3).

На рис. 3, А приведена зависимость роста (за 72 ч) опухолевых клеток линии K562 от состава препарата и его дозировки. Приведенные данные показывают, что нативный фермент практически не активен в отношении K562. Конъюгат EwA с

хитозаном (3 кДа) демонстрирует незначительную цитостатическую активность. В то же время, конъюгат EwA с пэгиллированным хитозаном (3 кДа) демонстрирует существенную цитостатическую активность. Доза препарата в 5 МЕ/мл снижает рост клеток до 40% от контрольного. Это является хорошим результатом для препарата, применяемого в составе комплексной терапии с другими цитостатиками (азасерином, вин-

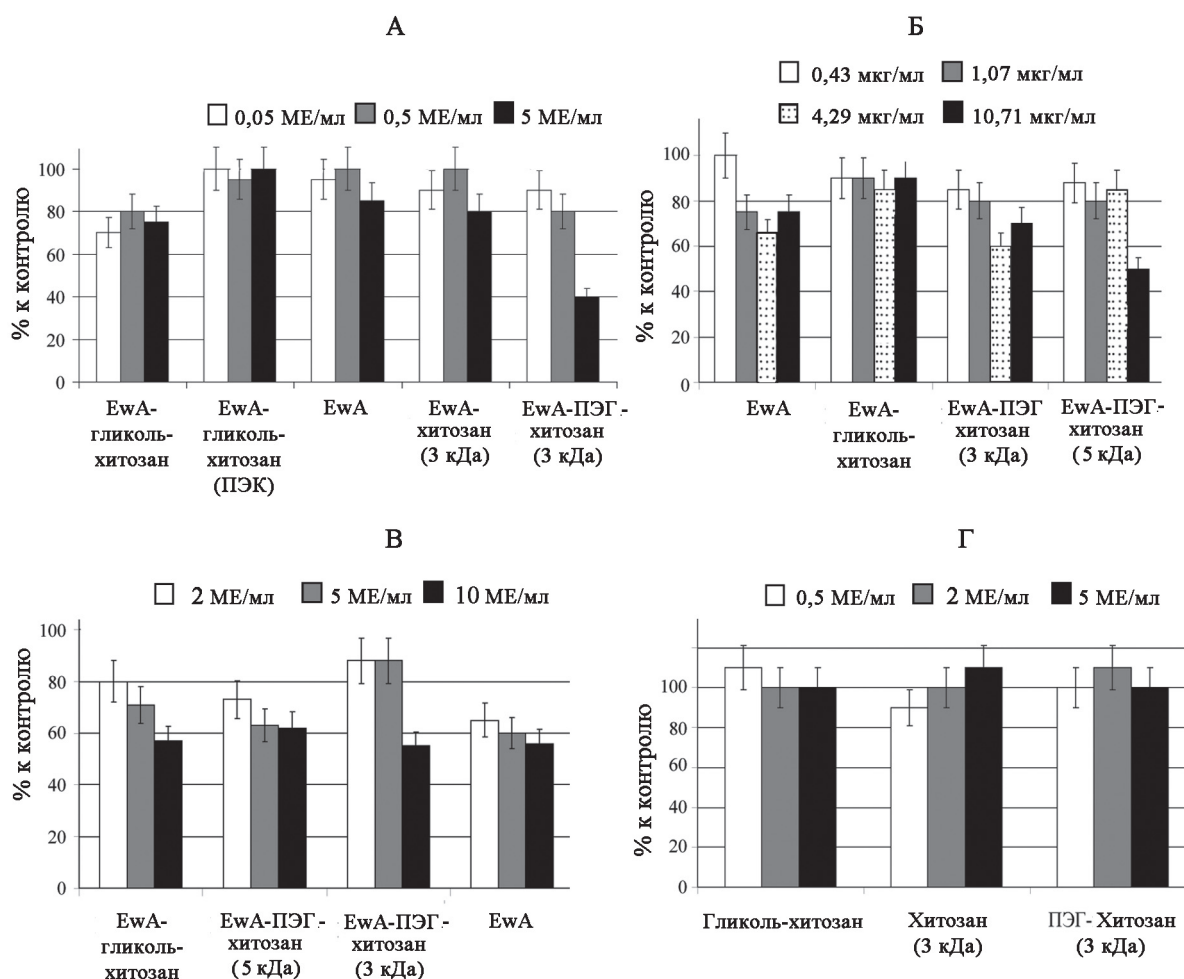


Рис. 3. Диаграмма зависимости роста клеток K562 (А), Jurkat (Б), Raji (В) в течение 72 ч от дозы конъюгатов EwA; диаграмма зависимости роста K562 в течение 72 ч от дозы хитозанов (Г), количество хитозана эквивалентно соответствующей дозе фермента в конъюгатах EwA-гликоль-хитозан, EwA-хит (3 кДа) и EwA-ПЭГ-хит (3 кДа), представленных в табл 3

кристином, метотрексатом). Полученные данные свидетельствуют о важности использования пэгиллированных полимеров для получения конъюгатов с высокой цитостатической активностью.

Иная картина наблюдалась в отношении опухолевых клеток острого лимфобластного лейкоза Jurkat (рис. 3, Б). Нативный фермент активен в отношении клеток Jurkat, снижая рост клеток до 70–80% по сравнению с контролем. Конъюгаты EwA-ПЭГ-хит (ММ 3 кДа) и EwA-ПЭГ-хит (ММ 5 кДа) демонстрирует более высокую цитостатическую активность (рис. 4, Б): наблюдается максимальное снижение роста клеток (соответственно до 50 и 60% от контроля). Конъюгат EwA-гликоль-хитозан практически не активен, что свидетельствует о критическом влиянии молекулярной архитектуры L-аспарагиназного препарата на его активность в отношении клеток, обладающих механизмами резистентности к действию L-аспарагиназа.

Влияние хитопэгиллирования на активность L-аспарагиназа в отношении клеток не лейкозного происхождения было исследовано с использованием клеток лимфомы Беркитта. На рис. 3, В представлены данные по зависимости роста опухолевых клеток Raji от дозы различных препаратов L-аспарагиназы. Приведенные данные свидетельствуют, что как нативный фермент, так и исследованные конъюгаты значительно замедляют рост опухолевых клеток Raji. При этом для всех препаратов наблюдается выраженная дозовая зависимость. Максимальное снижение роста клеток Raji достигает 50–55% как для нативного фермента, так и для конъюгатов с ПЭГ-хитозанами и гликоль-хитозаном. Это означает, что в случае клеток с повышенной чувствительностью к L-аспарагиназам структу-

ра конъюгата не является решающим фактором, определяющим его цитостатическую активность. В то же время в случае клеток, резистентных к L-аспарагиназам, строение конъюгата ключевым образом влияет на его цитостатическую активность. Наибольшей цитостатической активностью в отношении всех исследованных опухолевых клеток обладают конъюгаты с пэгиллированными хитозанами (ММ 3–5 кДа).

Необходимо отметить, что удельная активность фермента в конъюгатах в 3–5 раз выше, т.е. при той же дозе (в МЕ) в препарате содержится в 3–5 раз меньше белка, чем в случае нативного фермента, что может позволить значительно снизить иммуногенность препарата при создании новых лекарственных форм.

Следует отметить, что сами хитозаны и ПЭГ-хитозаны практически не оказывают влияния на рост исследованных клеток, как было продемонстрировано в контрольном эксперименте в отсутствие фермента (рис. 3, Г). Это означает, что цитостатическая активность конъюгатов EwA связана именно с активностью L-аспарагиназы.

Таким образом, разработан новый подход к регуляции биокаталитических свойств используемых в медицинской практике ферментов – хитопэгиллирование. Метод основан на образовании ковалентных конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами хитозана. Результаты, полученные при изучении противоопухолевой активности конъюгатов L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, свидетельствуют, что хитопэгиллирование является перспективным подходом, позволяющим улучшить биофармацевтические свойства L-аспарагиназы и расширить спектр действия фермента.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ravindranath Y., Abella E., Krischer J.P., Wiley J., Inoue S., Harris M., Chauvenet A., Alvarado C.S., Dubowy R., Ritchey A.K., Land V., Steuber C.P., Weinstein H. // *Blood*. 1992. Vol. 80. N 9. P. 2210.
2. Pui C.H., Evans W.E. // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 354. P. 166.
3. Redaelli A., Laskin B.L., Stephens J.M., Botteman M.F., Pashos C.L. // *Eur. J. Cancer. Care*. 2005. Vol. 14. N 1. P. 53.
4. Sokolov N.N., Eldarov M.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Abakumova O.Yu., Podobed O.V., MelikNubarov N.S., Kudryashova E.V., Grishin D.V., Archakov A.I. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2015. Vol. 9. N 4. P. 325.
5. Uren J.R., Ragin R.C. // *Cancer Res.* 1979. Vol. 39. P. 1927.
6. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V., Sokolov N.N. // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2014. Vol. 8. N 3. P. 252.
7. Sukhoverkov K.V., Kudryashova E.V. // *Biochem.* 2015. Vol. 80. N 1. P. 113.

8. Chan W.K., Lorenzi P.L., Anishkin A., Purwaha P., Rogers D.M., Sukharev S., Rempe S.B., Weinstein J.N. // *Blood*. 2014. Vol. 123. N 23. P. 3596.
9. Smallwood T.L., Small G.W., Suter S.E., Richards K.L. // *Leuk. Lymphoma*. 2014. Vol. 55. N 6. P. 1357.
10. Суховерков К.В., Кудряшова Е.В. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 1. С. 142.
11. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. P. 1 (<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-015-9222-0>)
12. Кудряшова Е.В., Суховерков К.В., Соколов Н.Н. // *Биомедицинская химия*. 2015. Т. 61. № 4 С. 16.
13. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Каралкин П.А., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. // *Биомедицинская химия*. 2013. Т. 59. № 5. С. 498

Поступила в редакцию 01.12.15

FORMATION OF CONJUGATES WITH A PEG-CHITOSAN IMPROVES BIOCATALYTICAL EFFICIENCY AND ANTITUMOR ACTIVITY OF L-ASPARAGINASE FROM *ERWINIA CAROTOVORA*

K.V. Sukhoverkov¹, N.N. Sokolov², O.J. Abakumova², O.V. Podobed², E.V. Kudryashova

¹Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; ²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry)

Conjugation with new branched co-polymers, PEG-chitosan, was suggested to improve therapeutic properties of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* (EwA). Composition of EwA conjugates with PEG-chitosan co-polymers was optimized for maximal catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) at physiological conditions, yielding an improvement by the factor of 4–6 in comparison with native enzyme. This effect is mainly attributed to the shift of unfavorable pH activity profile towards physiological values. Catalytic activity of EwA-PEG-chitosan conjugates with L-glutamine, which is known to be responsible for side effects, appears 4–5 times lower as compared to the native enzyme. The thermostability and proteolytic stability of EwA conjugates has also been considerably improved (by the factor of two). In cell assays EwA-PEG-chitosan conjugates demonstrate 20–40% increased cytostatic activity against human myeloid leukemia K562 cells and human breast adenocarcinoma cells MCF7, while the activity against Burkitt lymphoma Raji cells and human acute lymphoid-leukemia Jurkat cells is generally at the same level with native enzyme added in the same IU dose. Taking into account the higher IU/mg activity of the conjugates, the same therapeutic effect is achieved with 4–6 times lower amount of enzyme (in mg) compared to native EwA, suggesting reduced immunogenicity in the case of conjugates. Therefore, ChitoPEGylation is suggested as a perspective approach for the development of improved forms of therapeutic enzymes, especially when their pH-optima is substantially different from physiological pH.

Key words: L-Asparaginase, PEG-chitosan, branched copolymers, catalytic activity, thermostability, antitumor activity.

Сведения об авторах: Суховерков Кирилл Владимирович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (suhowerkov@yandex.ru); Абакумова Ольга Юрьевна – вед. науч. сотр. ИБМХ имени В.Н. Ореховича, докт. биол. наук (olabakumova@yandex.ru); Подобед Ольга Владимировна – ст. науч. сотр. ИБМХ им. В.Н. Ореховича, канд. биол. наук (ovpodobed@gmail.com); Соколов Николай Николаевич – проф. ИБМХ им. В.Н. Ореховича РАМН, докт. биол. наук (sokolov2144@yandex.ru); Кудряшова Елена Вадимовна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com).