

УДК 547.9:577.15

РЕГУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* ПУТЕМ ЕЕ КОНЬЮГИРОВАНИЯ С ПЭГ-ХИТОЗАНОМ

М.А. Малахова¹, М.В. Покровская², С.С. Александрова², Н.Н. Соколов²,
Е.В. Кудряшова^{1*}

(¹ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН; *e-mail: helena_koudriachova@hotmail.com)

Предложен новый подход для регуляции каталитических свойств медицински значимого фермента L-аспарагиназы, основанный на образовании конъюгатов с ПЭГ-хитозаном (хитоПЭГилирование). Эффективность данного подхода продемонстрирована на примере рекомбинантной L-аспарагиназы из *Rhodospirillum rubrum* (RrA). Данный препарат иммунологически отличается от используемых в медицине препаратов L-аспарагиназы *E. coli*, что определяет перспективы его использования в качестве альтернативы при развитии гиперчувствительности. Преимущество RrA состоит в низкой активности по L-глутамину, что существенно снижает вероятность возникновения побочных эффектов. Разработана методика синтеза конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном разной степени модификации. Установлено, что конъюгирование RrA с ПЭГ-хитозаном увеличивает удельную активность фермента по сравнению с нативным ферментом. Активность изменяется от 56 МЕ/мг (для нативного фермента) до 61–72 МЕ/мг (для конъюгатов) в зависимости от степени ПЭГилирования хитозана. Вторичная структура конъюгатов *Rhodospirillum rubrum* с ПЭГ-хитозаном исследована методами КД- и ИК-спектроскопии. Обнаружено, что при образовании конъюгатов с ПЭГ-хитозаном структура фермента претерпевает лишь незначительные изменения: содержание α -спиралей изменяется от 36% (для нативного фермента) до 30–33% (для конъюгатов). Содержание β -структур изменяется от 15% (для нативного фермента) до 18% (для конъюгата). Полученные данные открывают пути для синтеза препаратов L-аспарагиназы с улучшенными биокаталитическими свойствами.

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

Принятые в статье сокращения: RrA – L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

L-Аспарагиназа относится к классу треониновых амидогидролаз (К.Ф. 3.5.1.1.) и катализирует реакцию гидролиза L-аспарагина до L-аспарагиновой кислоты с выделением аммиака. Для опухолевых лимфобластов L-аспарагин служит незаменимой аминокислотой, без поступления которой нарушается синтез белков и клетка становится неспособной к дальнейшему делению. В сниженной или полностью отсутствующей активности L-аспарагинсинтетазы, синтезирующей L-аспарагин, заключается особенность 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 [1–5].

Так, L-аспарагиназы из *E. coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используют в стандартной терапии острого лимфобластного лейкоза. EcA применяют также при лечении других видов опухолей, таких как лимфогранулематоз, множественная миелома и др. [6–10]. Однако опыт клинического применения EcA позволил выявить побочные эффекты, ограничивающие использование этого препарата [4–6]. Одна группа побочных эффектов (гепатотоксичность, нарушение свертываемости крови и нейротоксичность) связаны с L-глутаминазной активностью. Дезаминирование L-глутаминина в плазме крови лишает нормальные клетки возможности внутриклеточного синтеза L-аспарагина и приводит к накоплению L-глутаминовой кислоты, вызывающей токсические эффекты.

Другая группа побочных эффектов обусловлена иммуногенностью белковых препаратов и напрямую связана с длиной аминокислотной последовательности фермента. Это определяет актуальность разработки новых высокоэффективных L-аспарагиназных препаратов короткоцепочечных L-аспарагиназ с низкой L-глутаминазной активностью. Среди перспективных для изучения ферментов можно выделить L-аспарагиназу *Rh. rubrum* (RrA), которая отличается в два раза более короткой аминокислотной последовательностью (172 аминокислотных остатка) и низкой гомологией с EsA и ErA [11–12]. Важное преимущество данного фермента состоит в его низкой L-глутаминазной активности (~0,1% относительно L-аспарагиновой активности). Однако pH-оптимум RrA находится в щелочной области (pH 9,2), а кроме того, фермент имеет относительно низкую стабильность по сравнению с другими препаратами L-аспарагиназ. В связи с вышесказанным для разработки высокоэффективного лекарственного средства на основе RrA представляется перспективным применение разработанного нами метода хитоПЭГилирования, который основан на образовании ковалентных конъюгатов фермента с разветвленными сополимерами хитозана [13–16]. Образование конъюгатов с ПЭГ-хитозаном позволяет сдвигать pH-оптимум активности фермента в сторону кислых значений pH до 1,5 ед., а также существенно повышает термостабильность фермента в результате многоочечного электростатического взаимодействия поликатиона с ферментом. Варьирование состава конъюгатов L-аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном позволяет оптимизировать каталитические свойства фермента за счет изменения поверхностного заряда, молекулярной массы, степени разветвления полимера и размера образующихся частиц.

Цель настоящей работы – синтез конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном и исследование влияния конъюгирования на каталитические параметры и структуру фермента.

Материалы и методы

Синтез ПЭГ-хитозанов и конъюгатов L-аспарагиназы RrA с производными хитозана проводили по методике, разработанной ранее [13–16]. Конъюгаты аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном синтезировали путем модификации аминогрупп L-аспарагиназы по реакции восстановительного аминирования. Для этого к раствору L-аспарагиназы (4 мг/мл в 15 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7,5) добавляли порциями при перемешивании раствор ПЭГ-хитозана в молярном отношении к ферменту от 4:1 до 10:1. По-

лученную смесь инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 40 мин при 16 °С. Далее к реакционной смеси добавляли цианборгидрид натрия (пятикратный молярный избыток по отношению к ферменту) и инкубировали еще 40 мин при непрерывном перемешивании. Для отделения полученного конъюгата от непрореагировавшего сополимера использовали диафильтрацию (фильтры «Amicon Ultra» с пропускной способностью меньше 100 кДа). Полученный препарат фермента хранили при –20 °С.

Определение каталитических параметров препаратов L-аспарагиназы. Удельную активность препарата RrA определяли методом КД-спектроскопии, согласно методике, разработанной ранее [14–16].

Измерение скорости гидролиза L-аспарагина проводили с помощью спектрометра кругового дихроизма (КД) «Jasco J-815» (Япония). В типичном эксперименте к раствору L-аспарагина в 15 мМ натрий-фосфатном буфере добавляли раствор препарата RrA в том же буфере так, чтобы в получаемой смеси содержалось 0,002–0,015 мг/мл фермента и 20 мМ L-аспарагина. Реакцию проводили при температуре 37 °С в кварцевой кювете ($l = 1$ мм). Далее регистрировали зависимость эллиптичности от времени при длине волны 210 нм.

Определение pH-зависимости активности L-аспарагиназы *Rh. Rubrum*. Для определения зависимости активности образцов RrA от pH готовили буферный раствор, содержащий по 5 мМ тетрабората натрия, лимонной кислоты и дигидрофосфата калия. В нем растворяли L-аспарагин в концентрации 20 мМ; pH полученной смеси доводили до значений 4–11 с помощью концентрированных растворов NaOH и уксусной кислоты. После этого в растворах с разным значением pH определяли L-аспарагиназную активность препаратов по стандартной КД-методике, описанной выше. Концентрация RrA в реакционной смеси составляла 0,04 мг/мл.

Определение структурных параметров препаратов L-аспарагиназы проводили методами инфракрасной (ИК) спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма (КД), согласно методикам, разработанным ранее [14–16]. КД-спектры препаратов L-аспарагиназы регистрировали с помощью КД-спектрометра «Jasco J-815» («Jasco», Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 195–220 нм при температуре 37 °С в кварцевой кювете ($l = 1$ мм). Спектры получали пятикратным сканированием с шагом 1 нм. Использовали

растворы фермента (0,2 мг/мл) в 15 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,5).

ИК-спектры регистрировали с помощью ИК-спектрометра Фурье «Bruker Tensor 27» (Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом. Оборудование было подключено к системе продувки сухим воздухом «Jun-Air». Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) «BioATR-II», с ZnSe-кристаллом («Bruker», Германия). В типичном эксперименте в ячейку НПВО вносили 5 мкл раствора L-аспарагиназы, содержащего 20–50 МЕ/мл фермента (что соответствует 0,04–0,1 мг/мл конъюгатов L-аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном). Спектры измеряли в интервале частот 950–4000 см⁻¹ со спектральным разрешением 2 см⁻¹ и при температуре 22 °С. Для каждого спектра проводили 100-кратное сканирование и усреднение. Результирующие спектры по необходимости спрямляли методом Савицкого–Голля до спектрального разрешения 2 см⁻¹. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации биокаталитических свойств L-аспарагиназы были синтезированы конъюгаты RrA с ПЭГ-хитозаном с разным содержанием ПЭГ в сополимере. Синтез конъюгатов проводили по реакции восстановительного аминирования между восстанавливающим концом хитозана и аминогруппами L-аспарагиназы [13–16]. Состав синтезированных конъюгатов анализировали методом ИК-спектроскопии. На рис. 1 представлены ИК-

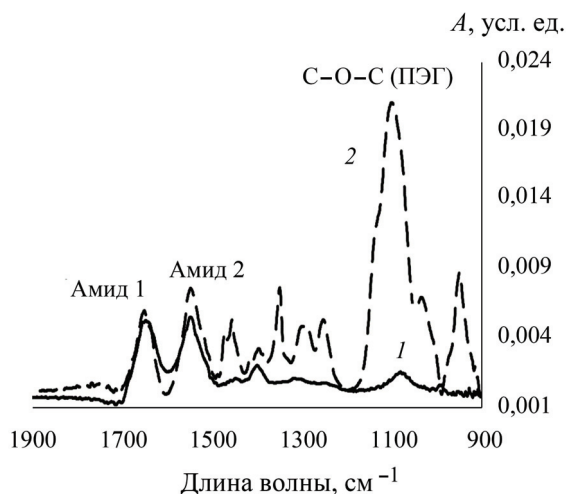


Рис. 1. ИК-спектры: 1 – нативный фермент RrA (1), 2 – конъюгат с ПЭГ-хитозаном (3 кДа, 4 цепи); натрий-фосфатный буфер, 15 мМ, 37 °С, рН 7,5

Т а б л и ц а 1

Состав конъюгатов L-аспарагиназы RrA с ПЭГ-хитозаном

Конъюгат	<i>n</i> (хитозан)/ <i>n</i> (RrA)
RrA-ПЭГ-хитозан (3 кДа, 4 цепи)	5
RrA-ПЭГ-хитозан (5 кДа, 6 цепей)	5
RrA-ПЭГ-хитозан (7 кДа, 8 цепей)	3
RrA-ПЭГ-хитозан (7 кДа, 16 цепей)	2

спектры конъюгата фермента с ПЭГ-хитозаном (1) и нативного фермента (2). Спектр нативного фермента содержит пики в области амид 1 (1600–1700 см⁻¹) и амид 2 (1500–1600 см⁻¹), что характерно для белковых препаратов. В результате образования конъюгата фермента с ПЭГ-хитозаном в ИК-спектре наблюдается появление пиков при 1100 и 950 см⁻¹, которые соответствуют валентным колебаниям связей С–О–С в цепях ПЭГ и колебаниям связей С–О–С, С–N и С–С в пиранозном цикле хитозана [13–16]. В области 1430–1470 см⁻¹ появляются полосы, обусловленные колебаниями СН₂- и ОН-групп в хитозане, которые отсутствовали в спектре нативного фермента.

Полученные данные позволяют утверждать, что произошла модификация фермента ПЭГ-хитозаном. 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 на основании анализа интенсивности полос при 1100 и 950 см⁻¹ в спектре ПЭГ-хитозана [13–16]. Зная степень ПЭГилирования сополимера, по интенсивности характеристической полосы ПЭГ при 1100 см⁻¹ в ИК-спектре конъюгата определяли содержание ПЭГ-хитозана в образце. Используя калибровочные зависимости интенсивности полосы амид 1 от концентрации фермента, устанавливали число цепей сополимера, приходящихся на одну белковую глобулу. Состав исследованных в работе конъюгатов приведен в табл. 1.

Определение каталитических параметров конъюгатов L-аспарагиназы RrA с ПЭГ-хитозаном. Для получения конъюгатов RrA с сополимерами, обладающими оптимальными биофармацевтическими свойствами, было иссле-

довано влияние состава конъюгатов на каталитическую активность фермента: молекулярную массу хитозанов варьировали в пределах 3–7 кДа; степень пэгирования варьировали в пределах 4–16 цепей ПЭГ на цепь хитозана (табл. 1). Определение удельной активности L-аспарагиназы проводили методом КД-спектроскопии по методике, разработанной ранее [15–16]. Метод основан на увеличении эллиптичности раствора в дальней УФ-области при длине волны 210 нм в результате ферментативного гидролиза аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. На рис. 2 представлены типичные кинетические кривые гидролиза L-аспарагина для нативной RrA и ее конъюгата с ПЭГ-хитозаном при одинаковой концентрации фермента, где активность конъюгата выше по сравнению с активностью нативного фермента.

С использованием таких зависимостей были получены значения активности для всех исследуемых образцов (табл. 2). Из приведенных данных следует, что конъюгаты с ПЭГ-хитозаном, имеющие удельную активность 3 и 7 кДа, характеризуются более высокой каталитической активностью (на 20–30%) по сравнению с нативным ферментом.

Влияние образования конъюгатов с ПЭГ-хитозаном на зависимость активности L-аспарагиназы от pH. Одной из причин изменения активности конъюгата при физиологических значениях pH по сравнению с нативным ферментом может быть смещение pH-оптимума активности фермента в область физиологических значений pH. Отметим, что pH-оптимум RrA находится в щелочной области (pH 9,2). Соответственно, уровень активности фермента при pH 7,5 (физиологическое значение) не является

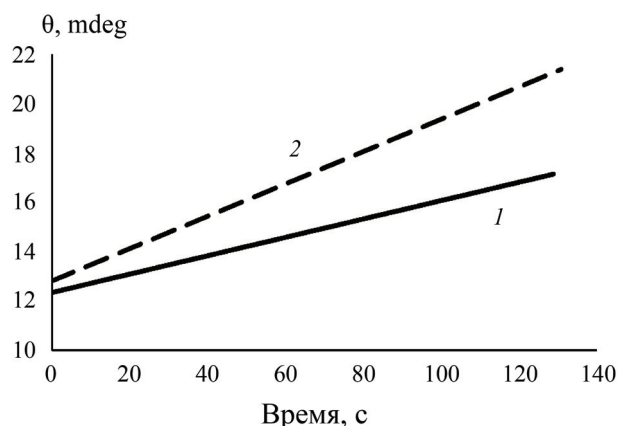


Рис. 2. Кинетические кривые ферментативного гидролиза L-аспарагина под действием нативной RrA (1) и ее конъюгата с ПЭГ-хитозаном (3 кДа, 4 цепи ПЭГ) (2); натрий-фосфатный буфер, 15 мМ, 37 °С, pH 7,5

Т а б л и ц а 2

Удельная активность L-аспарагиназы RrA и ее конъюгатов с ПЭГ-хитозаном

Фермент	Удельная активность, МЕ/мг
RrA-нативный	56±6
RrA-ПЭГ-хитозан (3 кДа, 4 цепи)	67±8
RrA-ПЭГ-хитозан (5 кДа, 6 цепей)	70±6
RrA-ПЭГ-хитозан (7 кДа, 8 цепей)	72±7
RrA-ПЭГ-хитозан (7 кДа, 16 цепей)	61±6

оптимальным [11]. Образование конъюгатов с производными хитозана за счет его поликатионных свойств может способствовать сдвигу pH-оптимума фермента в область более низких значений pH, как это было показано нами ранее для L-аспарагиназы из EwA [13–16]. В результате может быть достигнуто увеличение удельной каталитической активности RrA в требуемых условиях. Для проверки данной гипотезы изучены pH-зависимости активности конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном разного состава в сравнении с нативным ферментом.

Действительно, образование конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном приводит к сдвигу pH-оптимума в сторону более низких значений pH по сравнению с нативным ферментом (рис. 3). При этом, величина сдвига pH-оптимума зависит от числа свободных аминогрупп в составе хитозана, т.е. растет с увеличением степени полимеризации хитозана. Так, в случае RrA-PEG-chit (3 кДа, 4 цепи ПЭГ) pH-оптимум смещен в область более кислых значений примерно на одну единицу, по сравнению с нативным ферментом и составляет 7,5–8,0 ед. Для конъюгата L-аспарагиназы с ПЭГ-хитозаном большей длины цепи (7 кДа, 8 цепей ПЭГ) смещение pH-оптимума каталитической активности еще более выражено. Оптимум активности данного конъюгата лежит в области физиологических значений pH 7,5 (рис. 3).

Таким образом, одна из причин повышения активности конъюгатов по сравнению с нативным ферментом заключается в смещении pH-оптимума активности фермента в область физиологических значений pH. Другая причина возрастания каталитической активности фермента может состоять в

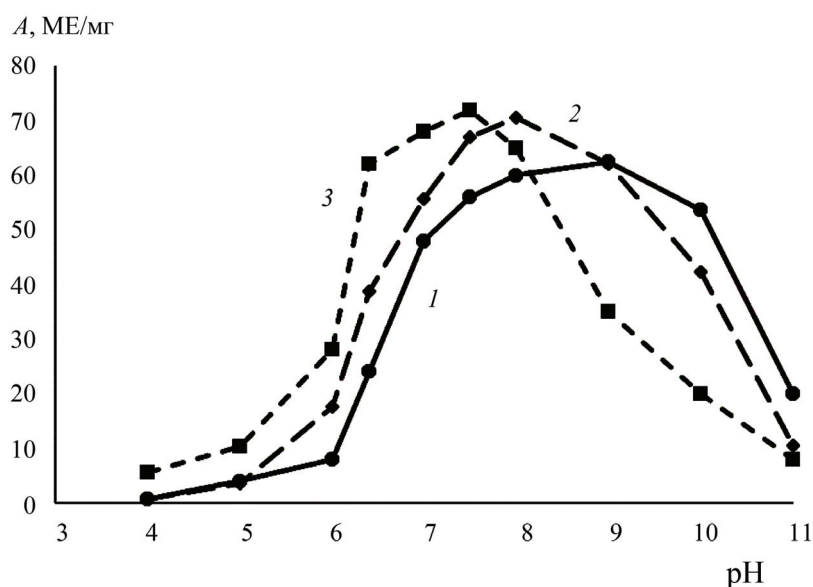


Рис. 3. Зависимость относительной активности от pH: 1 – RrA; 2 – RrA-PEG-chit (3 кДа, 4 цепи ПЭГ); 3 – RrA-PEG-хитозан (7кДа, 8 цепей ПЭГ); $T = 37^\circ\text{C}$, концентрация субстрата 20 мМ, 15 мМ цитратно-фосфатно-боратный буфер

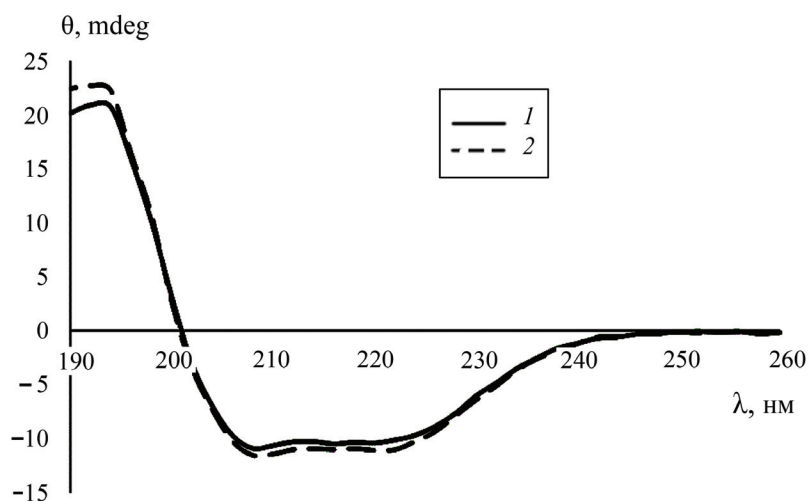


Рис. 4. КД-спектры L-аспарагиназы RrA (1) и ее конъюгата с ПЭГ-хитозаном (7 кДа, 8 цепей ПЭГ) (2); $[A] = 0,45 \text{ мг/мл}$, 15 мМ натрий-фосфатный буфер, 37°C , pH 7,5

изменении структуры фермента при образовании конъюгатов.

Исследование структурных характеристик конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном. Вторичная структура белковой части конъюгатов в сравнении с нативным ферментом была исследована методом КД-спектроскопии. На рис. 4 представлены спектры КД для конъюгата RrA-ПЭГ-хитозан и нативной RrA.

На рис. 4 показано, что спектры RrA и ее конъюгата с ПЭГ-хитозаном имеют сходные профили. Оба спектра содержат положительный максимум при длине волны 195 нм и отрицательные максимумы примерно одинаковой интенсивности при

длине волны 210 и 222 нм. Данный профиль соответствует структуре белка с высоким содержанием α -спиралей.

Содержание элементов вторичных структур в белковой части конъюгатов рассчитывали по спектральным данным с помощью программы CDNN. Ниже приведены результаты определения вторичной структуры конъюгатов по данным КД-спектроскопии (табл. 3).

Комплементарная информация по содержанию элементов вторичной структуры в RrA и в конъюгате RrA-ПЭГ-хитозан получена методом ИК-спектроскопии Фурье. Для каждого из исследуемых конъюгатов проводили анализ полосы амид I

Содержание вторичных структур белка в L-аспарагиназе RrA и ее конъюгатах с ПЭГ-хитозаном, определенных методом КД-спектроскопии

Состав конъюгата	α -спирали	β -листы параллельные	β -листы антипараллельные	β -повороты	Неупорядоченные участки
Нативная RrA	36 \pm 2%	7 \pm 2%	7 \pm 2%	16 \pm 2%	30 \pm 3%
RrA-ПЭГ-хитозан (3 кДа, 4 цепи)	30 \pm 3%	9 \pm 2%	10 \pm 1%	17 \pm 2%	33 \pm 3%
RrA-ПЭГ-хитозан (5 кДа, 6 цепей)	32 \pm 3%	9 \pm 2%	9 \pm 3%	17 \pm 3%	33 \pm 4%

(1600–1700 см^{-1}), которая наиболее чувствительна к вторичной структуре белка. Каждый из элементов вторичной структуры (α -спирали, β -структуры, β -повороты и неупорядоченные структуры) имеют свои характеристические полосы поглощения и коэффициенты молярного поглощения в области амид I [17].

ИК-спектры в большей степени чувствительны к изменениям в β -структуре. Отметим, что α -спирали и неупорядоченные структуры имеют близкие интервалы характеристических частот поглощения в области амид I ИК-спектра (1650–1660 и 1645–1652 см^{-1} соответственно), поэтому их количественный анализ затруднен; β -структуры имеют два характеристических пика в интервалах 1628–1635 и 1680–1694 см^{-1} , соответственно мажорный и минорный. Кроме того, в ИК-спектрах белков можно наблюдать два характеристических пика в области амид I при 1620–1624 и 1696–1700 см^{-1} , которые соответствуют антипараллельным β -слоям [18–19]. Пример анализа

полосы амид I для определения вторичной структуры в образцах RrA представлен на рис. 5. Количественный анализ данных, полученных методом ИК-спектроскопии (табл. 4), показал, что содержание вторичных структур в RrA мало изменилось при образовании конъюгатов. Из вышесказанного можно заключить, что увеличение активности конъюгатов RrA с ПЭГ-хитозаном не связано с изменением структуры белка.

Таким образом, продемонстрирована перспективность применения метода ХитоПЭГиления для получения препаратов L-аспарагиназы RrA с улучшенными биокаталитическими свойствами. ХитоПЭГиление основано на образовании конъюгатов ферментов с привитыми сополимерами разветвленной структуры на основе ионогенных хитозанов, модифицированных полиэтиленгликолем (ПЭГ). Преимущества предложенного подхода состоят в том, что физико-химические свойства полимера можно целенаправленно варьировать в чрезвычайно широком диа-

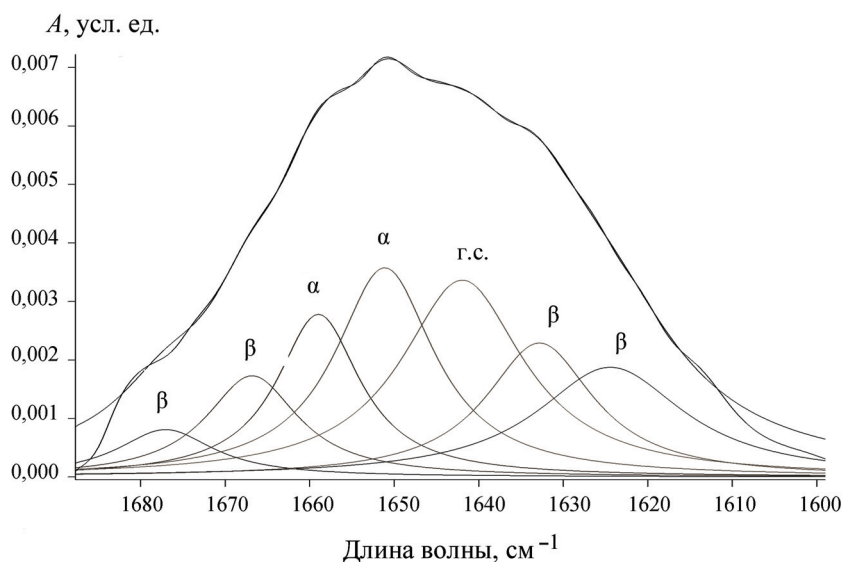


Рис. 5. ИК-спектр конъюгата RrA-ПЭГ-хитозан (7кДа, 8 цепей ПЭГ) в области Амид-I; [RrA] = 1 мг/мл, 15 мМ натрий-фосфатный буфер, 37 °С, pH 7,5

Т а б л и ц а 4

Содержание вторичных структур в RrA и конъюгатах RrA-ПЭГ-хитозан, определенных методом ИК-Фурье-спектроскопии

Состав конъюгата	α -спирали	β -листы параллельные	β -листы антипараллельные	β -повороты	Неупорядоченные участки
Нативная RrA	33 \pm 5%	20 \pm 5%	7 \pm 5%	16 \pm 5%	30 \pm 5%
RrA-ПЭГ-хитозан (3 кДа, 4 цепи)	30 \pm 5%	19 \pm 5%	6 \pm 5%	17 \pm 5%	33 \pm 5%

пазоне в зависимости от степени полимеризации полисахарида, а также степени ПЭГилирования. Это дает дополнительную «степень измерения», расширяющую возможности создания систем с заданными свойствами. Другое важное преимущество использования технологии ХитоПЭГилирования по сравнению с традиционным полиэтиленгликолем заключается в возможности целенаправленно изменять локальную ионную силу и значение pH вблизи активного центра фермента. Полиэлектrolитная природа сополимеров обуславливает многоточечное электростатическое взаимодействие с поверхностью белка, что способствует стабилизации всей конформации фермента и создает специфическое микроокружение вблизи активного центра фермента, которое можно контролировать, влияя на каталитические свойства последнего. Оптимизация свойств сополимера может позволить добиться значительной стабилизации фермента к протеолитической деградации и снижения иммуногенности за счет

экранирования молекулы фермента от внешней среды. Возможность сдвигать pH-оптимум и изменять микроокружение активного центра фермента позволяет увеличить уровень каталитической активности в требуемых условиях. Это особенно важно, когда pH-оптимум активности терапевтически значимого фермента существенно отличается от физиологического, как это наблюдается в случае L-аспарагиназы RrA (pH-оптимум составляет 9,2). Подход, основанный на ХитоПЭГилировании перспективен для создания высокоэффективных лекарственных препаратов пролонгированного действия нового поколения на основе рекомбинантной L-аспарагиназы RrA, а также на основе других терапевтически значимых ферментов. Полученные результаты могут быть использованы для создания высокоэффективных препаратов на основе других терапевтически значимых ферментов, в особенности тех ферментов, у которых значения pH-оптимума отличаются от физиологического.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Pui C.H., Evans W.E. // *N. Engl. J. Med.*, 2006. Vol. 354. P. 166.
- 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.
- Billett A.L., Carls A., Gelber R.D., Sallan S.E. // *Cancer*. 1992. Vol. 70. N 1. P. 201.
- Uren J.R., Ragin R.C. // *Cancer Res*. 1979. Vol. 39. P. 1927.
- Agrawal N.R., Bukowski R.M., Rybicki A., Kurtzberg J., Cohen J., Hussein M.A. // *Cancer*. 2003. Vol. 98. N 1. P. 94.
- Takahashi H., Koh K., Kato M., Kishimoto H., Oguma E., Hanada R. // *Int. J. Hematol*. 2012. Vol. 96. N 1. P. 136.
- Chan W.K., Lorenzi P.L., Anishkin A., Purwaha P., Rogers D.M., Sukharev S., Rempé S.B., Weinstein J.N. // *Blood*. 2014. Vol. 123. N 23. P. 3596.
- Narta U.K., Kanwar S.S., Azmi W. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2007. Vol. 61. N 3. P. 208.
- Perel Y., Auvrignon A. // *J. Clin. Oncol*. 2002. Vol. 20. N 12. P. 2774.
- Sokolov N.N., Eldarov M.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Melik-Nubarov N.S., Kudryashova E.V., Grishin D.V., Archakov A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. T. 9. № 4. С. 325.
- Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Анисимова Н.Ю., Андрианов Р.М., Трещалина Е.М., Пономарев Г.В., Соколов Н.Н. // *Биомедицинская химия*. 2013. Т. 59. № 2. С. 192.
- Sukhoverkov K.V., Sokolov N.N., Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Kudryashova E.V. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2016. T. 71. № 2. P. 122.

14. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V. // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2016. Т. 408. № 4. P. 1183.
15. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V., Sokolov N.N. // Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem. 2014. Vol. 8. N 3. P. 252.
16. Sukhoverkov K.V., Kudryashova E.V. // Biochemistry (Moscow). 2015. Т. 80. № 1. P. 113.
17. 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.
18. Кудряшова Е.В. Функционирование и структура белков на поверхностях раздела фаз. Новые методы исследования. 2013. «Palmarium Academic Publishing» AV Akademikerverlag GmbH & Co., KG. Germany. P. 1.
19. Vassilenko K.S., Uversky V.N. // Biochim Biophys Acta. 2002. Vol. 1594. P. 168.

Поступила в редакцию 09.02.18

REGULATION OF CATALYTIC ACTIVITY OF RECOMBINANT L-ASPARAGINASE FROM *RHODOSPIRILLUM RUBRUM* BY CONJUGATION WITH A PEG-CHITOSAN COPOLYMER

M.A. Malakhova¹, M.V. Pokrovskaya², S.S. Alexandrova², N.N. Sokolov², E.V. Kudryashova^{1*}

¹Department of Chemistry, Moscow State University; ²Orechovich Institute of Biomedical Chemistry; *e-mail: helena_koudriachova@hotmail.com

A new approach for improvement of biocatalytic properties of L-asparaginase is developed. The approach is based on modification of the enzyme by copolymers of polyethylene glycol (PEG) and chitosan (chitoPEGylation). One of the promising preparations of L-asparaginases is an enzyme from *Rhodospirillum rubrum* (RrA). This medicine is immunologically distinct from used preparations from L-asparaginase *E. coli*, which determines the prospects for its use as an alternative in the development of hypersensitivity. Advantage of RrA is its high antitumor activity, as well as low activity on L-glutamine, which significantly reduces the likelihood of side effects from the use of such a drug. In the present work, the synthesis of RrA conjugates with PEG-chitosan with various modification degrees was carried out. The composition of the resulting conjugates was analyzed by IR spectroscopy. The activity of RrA conjugates for L-asparagine and L-glutamine in comparison with the native enzyme was determined. It was demonstrated that chitoPEGylation improved catalytic activity of the enzyme. It was shown that the affinity for the main substrate (L-asparagine) in the conjugate is higher than for the native enzyme. It varies from 56 IU/mg for the native enzyme to 61–72 IU / mg for conjugates. The secondary structure of RrA conjugates with PEG-chitosan was studied by CD and IR spectroscopy. It was found that the structure of the enzyme undergoes only slight changes during the formation of conjugates with PEG-chitosan: the content of α -helices varies from 36% for native to 30–33% for conjugates, the content of β -sheets varies from 15% for the native enzyme to 18% for the conjugate. The results obtained determine the outlook for the use of RrA conjugates with PEG-chitosan for the development of highly effective new-generation L-asparaginase medicine with improved biopharmaceutical properties.

Key words: L-asparaginase, PEG-chitosan, conjugates, catalytic activity.

Сведения об авторах: Малахова Мария Алексеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (malakhova.mari@list.ru); Покровская Марина Владимировна – ст. науч. сотр. ИБМХ имени В.Н. Ореховича, канд. биол. наук (mbt12@yandex.ru); Александрова Светлана Серебеджановна – ст. науч. сотр. ИБМХ имени В.Н. Ореховича, канд. биол. наук (mbt12@yandex.ru); Соколов Николай Николаевич – профессор, руководитель лаборатории медицинской биотехнологии 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).