

Кучумова Анастасия Владимировна

ПЕГИЛИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ
L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERWINIA CAROTOVORA* С ЦЕЛЬЮ
УСИЛЕНИЯ ЕЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СВОЙСТВ

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена в ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

Научные руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Соколов Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Ребров Леонид Борисович

доктор биологических наук

Иванов Юрий Дмитриевич

Ведущая организация: Российский университет дружбы народов

Защита диссертации состоится « 29 » марта 2007 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, г. Москва, Погодинская ул., д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН

Автореферат разослан « 26 » февраля 2007 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Былинкина В.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Биологические катализаторы, каковыми являются ферменты, обладают чрезвычайно высокой специфичностью и мощным каталитическим воздействием на различные стороны метаболизма в организме. Поэтому они представляют собой уникальные лекарственные средства, используемые в медицине для лечения заболеваний различной этиологии (Holcenberg J., 1982; Goldberg D., 1992).

L-аспарагиназа (L-аспарагинамидогидролаза КФ 3.5.1.1), являющаяся представителем ферментов класса треониновых амидогидролаз, катализирует превращение L-аспарагина до L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Бактериальные аспарагиназы более 30 лет применяются в онкологической практике при комбинированной химиотерапии различных видов лейкозов, меланом и миелом (Perel et al., 2002). Механизм противоопухолевого действия аспарагиназы заключается в расщеплении аминокислоты аспарагин, находящейся во внеклеточном пространстве. Для опухолевых лимфобластов аспарагин является незаменимой аминокислотой, без поступления которой в клетку извне нарушается синтез белков и клетка становится неспособной к дальнейшему делению. Таким образом, реализация цитотоксичности аспарагиназы не подразумевает контакта или проникновения активного вещества в опухолевую клетку, что принципиально отличает этот фермент по механизму действия от других цитостатиков (Тимаков и др., 2000). Сниженная или полностью отсутствующая активность аспарагинсинтетазы – фермента, синтезирующего L-аспарагин, является отличительной чертой не только лейкемических лимфобластов, но и миелобластов, и целого ряда клеток других опухолей. Большинство здоровых, в том числе гемопоэтических, клеток способно синтезировать собственный аспарагин. Это определяет вторую, крайне важную характеристику фермента, а именно минимальное миелотоксическое действие.

Целый ряд аспарагиназ из различных бактериальных штаммов обладает противоопухолевым действием. Однако использование препаратов аспарагиназы в противоопухолевой терапии ограничено различными побочными эффектами, поэтому только два наименее токсичных фермента, а именно L-аспарагиназы из *Esherichia coli*

(EcA2) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA), нашли применение в онкотерапии (Duval et al., 2002). Причем, наименее токсичными признаны препараты, полученные из *Erwinia chrysanthemi*, что указывает на важность исследования аспарагиназ рода *Erwinia*. Тем не менее, даже аспарагиназы штаммов *Erwinia* вызывают развитие иммунологической гиперчувствительности к L-аспарагиназе, проявляющееся в диапазоне от слабых аллергических реакций до анафилактического шока (Muller et al., 1998). Помимо этого, эффективность применения аспарагиназ в противоопухолевой терапии ограничена довольно низкой стабильностью фермента в физиологических условиях.

Таким образом, представляется актуальным получение модифицированных форм L-аспарагиназ штаммов *Erwinia* устойчивых к протеолитической деградации в крови, обладающих низкой иммунологической активностью при сохранении высокой ферментативной активности.

В настоящее время существует ряд различных методов модификации терапевтически значимых ферментов. Одним из наиболее эффективных является химическая модификация белка полиэтиленгликолем (ПЭГ), т.н. пегилирование (Veronese et al., 2005). Она заключается в физико-химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы белка с ПЭГ. Применение этого метода позволяет значительно повысить терапевтическую эффективность фармакологических препаратов пептидной структуры.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в получении модифицированной полиэтиленгликолем рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, обладающей повышенной стабильностью и пониженной иммуногенностью.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. модификация полиэтиленгликолем L-аспарагиназы *Erw. carotovora* и оптимизация процесса пегилирования;
2. детальная характеристика физико-химических свойств пегилированной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* (рI, каталитические параметры, термодинамическая стабильность);
3. определение цитотоксичности пегилированной аспарагиназы на чувствительных к ней клетках лейкоза человека;

4. оценка иммуногенности модифицированной полиэтиленгликолем аспарагиназы *Erw. carotovora*.

Научная новизна работы

Впервые в качестве объекта для получения пегилированной формы аспарагиназы использован генно-инженерный фермент *Erw. carotovora*, на основе которого в настоящее время в лаборатории медицинской биотехнологии ГУ НИИ БМХ РАМН проводятся работы по созданию отечественного лекарственного препарата рекомбинантной аспарагиназы.

Впервые разработана и оптимизирована методика модификации полиэтиленгликолем рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora*. Получены экспериментальные данные для пегилированной аспарагиназы о ее физико-химических и каталитических свойствах, иммуногенности и цитотоксическом действии на опухолевые клетки различных линий.

Показано, что модифицированная аспарагиназа оказывает более выраженное цитотоксическое действие на опухолевые клетки лимфобластной T-клеточной лимфомы и лимфомы Беркитта по сравнению с нативным ферментом. Выявлено возрастание устойчивости ПЭГ-аспарагиназы к протеолизу и повышение термостабильности по сравнению с исходным белком. Установлено, что пегилированная форма рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* обладает пониженной иммуногенностью.

Практическая значимость исследования

В настоящее время в клинической практике используется лишь единственный пегилированный препарат бактериальной аспарагиназы – «Онкоспар», получаемый на основе фермента *E. coli*. Наличие нескольких препаратов аспарагиназ со сниженной иммуногенностью позволит проводить заместительную терапию различных видов лейкозов у пациентов, в особенности у детей, обладающих повышенной аллергенностью к существующим препаратам бактериальных аспарагиназ. В этом отношении не вызывает сомнения высокая практическая значимость получения пегилированной формы аспарагиназы *Erw. carotovora*.

Результаты данной работы могут быть использованы в качестве основы для создания нового лекарственного препарата пегилированной рекомбинантной

аспарагиназы *Erw. carotovora* для лечения ряда форм лейкозов, и в первую очередь острого лимфобластного лейкоза.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были доложены на следующих конференциях: II научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии» (Анапа, 2005), «Фундаментальные науки – биотехнологии и медицине» (Новосибирск, 2006), Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярные основы и клинические проблемы резистентности к лекарственным средствам» (Киев, 2006). По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 5 тезисов докладов. Апробация диссертации состоялась на межлабораторном семинаре ГУ НИИ БМХ РАМН 21 декабря 2006 года.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 122 источника. Работа изложена на страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование штамма-продуцента и экспрессия фермента.

В работе был использован рекомбинантный штамм *E. coli* BL21(DE3)/pRASYC177_LANS, сконструированный ранее сотрудниками лаборатории медицинской биотехнологии совместно с М.А.Эльдаровым (Центр «Биоинженерия», К.В. Сидорук и В.Г.Богушем (ГосНИИГенетика). В 200 мл LB-среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, вносили 3 мл ночной культуры и выращивали при 37°C и перемешивании 150-180 об/мин до оптической плотности $OD_{600}=1,5-2,0$. Затем в среду добавляли индуктор синтеза L-аспарагиназы ИПТГ в конечной концентрации 0,1 мМ и клетки инкубировали в течение 16-20 часов при тех же условиях. Клетки собирали центрифугированием (15 мин; 5000 об/мин) и хранили при -20°C.

Очистка и выделение L-аспарагиназы

Ультразвуковая дезинтеграция клеток. Все стадии очистки проводили при 4°C. 10-12 г биомассы *E. coli* суспендировали в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 5,5 (буфер А) до общего объема смеси 85 мл. Клетки разрушали ультразвуком на дезинте-

граторе УЗДН-2Т (Россия) в течение 5 минут при режиме: 30 с озвучивания, 30 с перерыв. Разрушение клеток проводили на ледяной бане, поддерживая температуру +2-+4°C. После этого рН суспензии доводили до значения 5,5 с помощью 0,1 М HCl и оставляли при 4°C и непрерывном перемешивании на 30 мин для преципитации части балластных белков.

Хроматография на колонке с SP-Сефарозой. Растворимую фракцию клеточного экстракта получали 30 минутным центрифугированием при 18000 об/мин (34×10^3 g) и наносили на колонку с SP-Сефарозой FF (2.5 см x 10 см), уравновешенную буфером А. После нанесения белка SP-Сефарозу последовательно промывали колоночным буфером с рН 5,5 до исчезновения следов белка в элюате. Скорость нанесения образца и промывки колонки составляла соответственно 1 и 2 мл/мин. Белок элюировали линейным градиентом KCl в интервале концентраций 0-0,8 М. Также в ряде случаев элюцию проводили 100 мл буфера А с рН 7,0, при скорости потока 1 мл/мин. Фракции, содержащие L-аспарагиназу (0,3–0,35 М KCl), объединяли.

Концентрирование и обессоливание фермента. Объединенные фракции с SP-Сефарозы помещали в ячейку-концентратор Amicon объемом 12 мл, содержащую фильтр Millipore (Ultrafiltration membrane NMWL 30000) и центрифугировали (Beckman, JA-25,5 4000 об/мин). Обессоливание белка проводили ультрафильтрацией на ячейке Amicon, либо с помощью гель-фильтрации на колонках PD10 с Сефадекс G-25.

Лиофилизация препарата. Сконцентрированный материал разливали по 1 мл в биовials объемом 4 мл, замораживали при -80°C и лиофилизировали в течение ночи. Фермент хранили при -20°C.

Определение концентрации белка.

Белок определяли модифицированным методом Лоури (Hartree E., 1991), а также через коэффициент экстинкции $\epsilon_{0,1\%_{280}}=0,56$ (expasy.org). Концентрацию пегилированного белка определяли биуретовым методом (Элиот Д. и др., 1981), измеряя оптическую плотность растворов в 96-ти луночных планшетах при длине волны 540 нм на многоканальном спектрофотометре «Multiscan EX». В качестве стандарта использовали раствор нативной аспарагиназы в интервале концентраций 1-10 мг.

Электрофорез белков в денатурирующих условиях осуществляли в соответствии с методикой (Laemmli, 1970), аспарагиназную активность определяли по мето-

ду Несслера (Wriston J., 1973), изоэлектрическое фокусирование проводили, как описано (Остерман М., 1983).

Определение кинетических параметров аспарагиназы.

Скорости гидролиза L-аспарагина и L-глутамината рекомбинантным и модифицированным ферментом определяли спектрофотометрически по убыванию поглощения амидной связи при 215 нм ($\epsilon_{215}=102,5$) с помощью спектрофотометра «Hewlett Packard» (Howard et al., 1972). Для этого 27-1350 мкМ фермента добавляли к 2 мл 12,5 мМ боратного буфера, содержащего субстраты в концентрации 30-3600 мкМ. Реакцию проводили при 37°C.

Модификация аспарагиназы метоксиполиэтиленгликоль-п-нитрофенилкарбонатом.

Метоксиполиэтиленгликоль-п-нитрофенилкарбонат с молекулярной массой 5000 (mPEG-pNP) любезно предоставлен А.Ю. Суrowым (Институт Биоорганической химии, РАН). Лиофилизированный препарат аспарагиназы (10 мг) растворяли в 4 мл 100 мМ боратного буфера, pH 9,0-9,5 и смешивали в различном молярном соотношении с mPEG-pNP. Реакционную смесь инкубировали при непрерывном перемешивании от 1 до 24 часов. По окончании реакции полученный продукт отделяли от не прореагировавшего mPEG-pNP и побочного продукта гель-фильтрацией на колонке PD10 с Сефадекс G-25, уравновешенной 20 мМ фосфатным буфером, pH 7,0. Фракции, содержащие L-аспарагиназу, объединяли и определяли суммарную активность фермента. Полученный препарат фермента хранили при -20°C.

Определение цитотоксической активности аспарагиназы *in vitro**

В опытах использовали чувствительные к аспарагиназе клеточные линии K-562 (хроническая миелогенная лейкемия), MOLT-4 (лимфобластная T-клеточная лимфома), Raji (лимфома Беркитта). Культивирование проводили в течение 72 часов при 37°C в CO₂ инкубаторе. Для культивирования клеток использовали 96-ти (48-ми) луночные планшеты (фирм «Nunc» и «Costar»). В каждую лунку помещали 0,1 мл (0,3 мл) среды и достигшие логарифмической фазы роста клетки в количестве 40000 клеток/лунку MOLT-4 и 50000 клеток/лунку (для линий K-562 и Raji). Планшеты, содержащие

* Работа проводилась совместно с к.б.н. Посыпановой Г.А. (ММА им. Сеченова) и д.б.н. Абакумовой О.Ю. (ГУ НИИ БМХ РАМН)

клетки, преинкубировали в течение 24 часов перед добавлением препаратов аспарагиназы. Выживаемость опухолевых клеток, инкубировавшихся с различными концентрациями препаратов аспарагиназы, определяли в МТТ-тесте (Hubeek et al., 2006). После 72 часов инкубации к клеткам добавляли МТТ реактив («Sigma») и инкубировали клетки еще 4 часа. После этого, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в изопропаноле и измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм. В отрицательном контроле присутствовала только культуральная среда. Зависимость ингибирования роста клеток от концентрации белка выражали в % и рассчитывали следующим образом:

$$\text{Выживаемость \%} = \frac{OD_{570}(\text{клетки, инкубируемые с ферментом})}{OD_{570}(\text{контрольные клетки})} \times 100$$

Для характеристики цитотоксического эффекта использовали значение LC_{50} – концентрация препарата, приводящая к гибели 50% клеток.

Определение иммуногенности аспарагиназы.

Получение специфических поликлональных антител. В эксперименте использовали беспородных белых мышей-самцов с массой тела 19-22 г. Антиген вводили с помощью внутрибрюшинных инъекций в количестве 25 мкг в 0,2-0,3 мл физиологического раствора. Мышей иммунизировали ежедневно в течение 7-10 суток. В эксперименте было 3 группы животных: по 5 мышей на нативную и модифицированную аспарагиназы, и 3 мыши в контрольной группе. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Непосредственно перед введением препарата, лиофилизированные нативную и модифицированную аспарагиназы разводили стерильным физиологическим раствором до необходимой концентрации. На 10-е сутки мышей декапитировали и получали сыворотки периферической крови.

Определение уровня выработки антител методом прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). В лунки планшетов высокой сорбционной емкости («Nunc», марки «Polysorp»), наносили по 100 мкл антигена в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,6, в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали в течение ночи. Жидкость из лунок стряхивали и вносили по 100 мкл блокирующего раствора (50%-ное молоко 0,5%-ной жирности в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (PBS)), и инкубировали 1 час при перемешивании, при комнатной температуре. Затем лунки промывали три раза по 200 мкл буфером для промывки – 0,01 М фосфатно-

солевой буфер pH 7,4, содержащий 0,05% Твин 20 (PBST). Далее, в ряды лунок вносили по 100 мкл индивидуальной антисыворотки в серии из восьми последовательных разведений в два раза. Начальное разведение антисывороток варьировало от 1:2 до 1:4 в зависимости от титра специфических антител. Оптимальное начальное разведение (для достижения конечной точки титрования) определяли по результатам предварительного эксперимента, проводимого в тех же условиях, начиная с разведения 1:2. Инкубацию продолжали 1,5 часа при комнатной температуре. После этого планшеты встряхивали и промывали четырежды PBST. В каждую лунку вносили по 100 мкл препарата меченых пероксидазой хрена антимышиных антител козы («Stressgen») в разведении 1:2000 в PBS с 50%-ным обезжиренным молоком и 0,05% Tween 20. Планшеты инкубировали 1 час при перемешивании при комнатной температуре. Отмывку от несвязавшихся конъюгатов пероксидазы с антителами проводили PBST шесть раз. Затем для развития цветной реакции в лунки планшетов вносили 100 мкл раствора субстрата (0,5 мг/мл ABTS («Sigma») и 0,1% H₂O₂ в 0,1 М цитратном буфере, pH 4,0; H₂O₂ добавляли непосредственно перед инкубацией) и инкубировали 45 мин в темноте при встряхивании, при 37°C. Реакцию останавливали внесением в лунки 100 мкл 1% раствора ДСН. Результаты учитывали, измеряя оптическую плотность при длине волны 405 нм на многоканальном спектрофотометре «Multiscan» EX.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программных продуктов «OriginLab Origin 7.0» и «Microsoft Excel 2003». Достоверность полученных результатов определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение препарата рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*.

На начальном этапе работы необходимо было получить препарат нативной аспарагиназы в количестве достаточном для проведения последующей модификации фермента полиэтиленгликолем и определения стабильности и цитотоксичности препаратов пегилированного белка. Для получения бесклеточного экстракта, использовали ультразвуковую обработку. Результаты очистки фермента представлены в табл. 1. Аспарагиназная активность в бесклеточном экстракте составляла 29,8 МЕ/мг, что соответствует 7-8% активного фермента от общего количества белка. При последующем центрифугировании, вероятно, вследствие адсорбции L-аспарагиназы осадком

разрушенных клеток, терялось 15-20% ферментативной активности, однако, на этой стадии происходило и удаление почти 50% балластных белков. Таким образом, выход фермента был достаточно высоким (более 80%). Нанесение растворимой фракции бесклеточного субстрата на SP-Сефарозу при pH 5,5 позволило избавиться от основной массы балластных белков. Значение pI рекомбинантной аспарагиназы, равно 8,5, что соответствует pI фермента дикого штамма *Erw. carotovora* (8,5-8,7 (Соколов и др., 2000)), поэтому более 95% аспарагиназы *Erw. carotovora*, нанесенной на сильный катионообменник SP-Сефарозу при pH 5,5, связывается с сорбентом, а большинство белков *E. coli*, имеющих pI в кислой области pH, обнаруживается в элюате (рис.1, треки 2 и 3). После промывки сорбента низкосолевым фосфатным буфером с pH 5,5 аспарагиназу элюировали линейным градиентом KCl. Хроматографическая очистка позволила получить фермент с удельной активностью 390 ME/мг, что в 13,1 раз превышает значение исходной активности.

Таблица 1. Очистка рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*

Этап очистки	Общий белок (мг)	Активность аспарагиназы		Выход, (%)	Степень очистки (раз)
		Общая, (ME)	Удельная (ME/мг)		
Бесклеточный экстракт	2432	72490	29,8	100	1
Растворимая фракция бесклеточного экстракта	897	59080	65,9	81,5	2,2
Хроматография на SP- Сефарозе	139	52150	375,2	71,9	12,6
Обессоливание и концентрирование	130	50700	390	69,9	13,1

Погрешность измерений составляет не более 20%

На заключительном этапе выделения препарат L-аспарагиназы необходимо было обессолить и сконцентрировать. Для концентрирования белка идеально подходит метод с использованием ультрафильтрационных мембран. При его применении можно не только успешно проводить процедуру концентрирования аспарагиназы, но и одновременно освобождаться от низкомолекулярных примесных белков. После концентрирования объединенных фракций фермента, аспарагиназная активность практически не изменялась. Проблема обессоливания и одновременно смены буфера для лиофилизации была успешно решена путем гель-фильтрации концентрированно-

го образца на колонках PD10 с Сефадекс G-25. Электрофоретическая картина образцов, после гель-фильтрации мало отличалась от таковой после ионообменной хроматографии. Электрофоретический анализ очищенного препарата аспарагиназы в 12,5% полиакриламидном геле имеет один главный компонент с молекулярной массой 34 кДа (рис 1, треки 4-6), что свидетельствует о более чем 90%-ной гомогенности выделенного фермента. Также наблюдаются минорные компоненты с Mr 15 и 30 кДа (обозначены стрелками на рис.1), которые присутствуют и в препарате аспарагиназы *Erwinia chrysanthemi* («Sigma») (рис 1, трек 7).

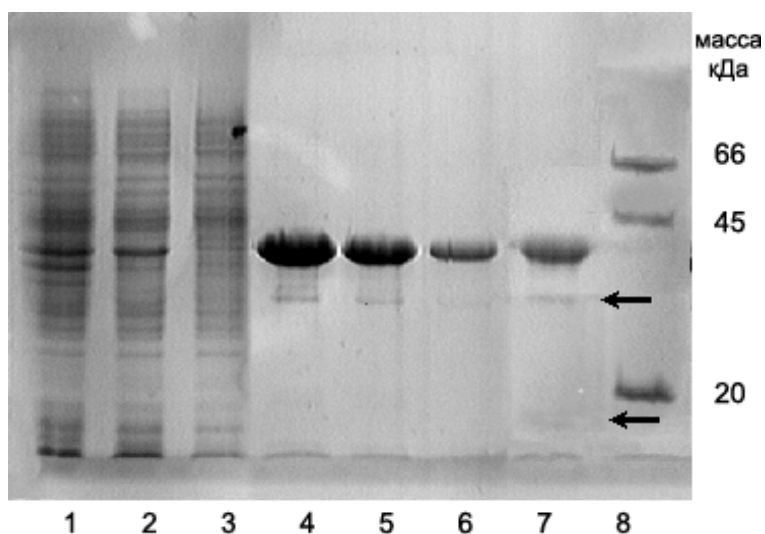


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 12,5% ПААГ/ДСН препаратов L-аспарагиназы на разных этапах очистки. 1 – бесклеточный экстракт; 2 – растворимая фракция бесклеточного экстракта; 3 – проскок; 4, 5, 6 – очищенные препараты аспарагиназы соответственно 20 мкг, 10 мкг, 3 мкг; 7 – L-аспарагиназа *Erw. chrysanthemi* 5 мкг; 8 – маркер молекулярного веса.

Ингибиторы протеаз в процессе выделения не использовали, так как они являются высокотоксичными соединениями и их присутствие недопустимо в препарате, предназначенном для терапевтического применения. Лиофилизацию белка проводили без каких-либо добавок и через 6 месяцев хранения при -20°C препарат сохранял 85% исходной активности. Причиной такой стабильности фермента, вероятно, является его высокая степень очистки.

Получение пегилированной рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* и оптимизация процесса модификации.

Согласно литературным данным (Roberts et al., 2002) процесс конъюгирования белка с mPEG-pNP зависит от множества условий протекания реакции, таких как pH и ионная сила реакционного буфера, молярное соотношение белок/mPEG-pNP, температура и время инкубации, интенсивность перемешивания реакционной смеси и т.д. Тем не менее, за исключением работы (Xiong et al., 2005), систематизированные данные по оптимизации пегилирования белков практически отсутствуют. Известно, что реакция связывания mPEG-pNP с протеином протекает при pH 8,3-9,5. В связи с относительно низкой реакционной способностью mPEG-pNP выбор pH был остановлен на значении 9,5. В щелочном диапазоне pH депротонированные ε-аминогруппы лизиновых остатков фермента ковалентно связываются с карбонатной группой активированного мПЭГ с образованием конъюгата мПЭГ-фермент.

На начальном этапе исследования было проведено три реакции, отличавшиеся количеством активированного мПЭГ производного. Для этого к раствору аспарагиназы добавляли mPEG-pNP в 1,5, 3,0 и 4,5 – кратных молярных избытках и проводили реакцию в течение 24 часов при 22°C. С целью качественного определения степени пегилирования выполняли электрофоретический анализ образцов реакционной смеси в 10% ПААГ/ДСН.

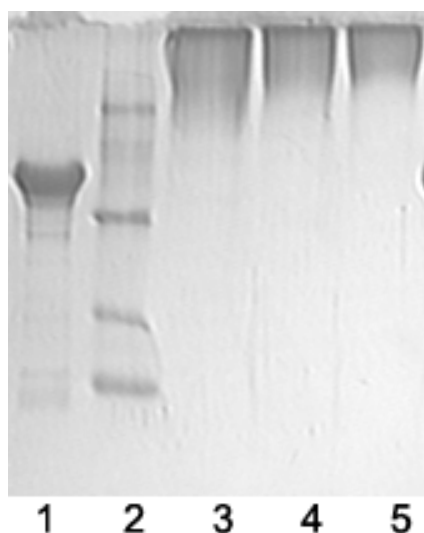


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 10% ПААГ/ДСН препарата ECAR_LANS, инкубированного в течение 24 часов с mPEG-pNP. 1 – нативная ECAR_LANS; 2 – маркер молекулярного веса 14, 20, 30, 45, 90 кДа; 3-5 конъюгаты mPEG-pNP/ECAR_LANS в молярном соотношении соответственно 1,5:1, 3:1 и 4,5:1.

Результаты электрофореза, представленного на рис.2, свидетельствуют об эффективной модификации препарата аспарагиназы с помощью mPEG-pNP. Даже при 1,5-кратном молярном соотношении mPEG-pNP/ECAR_LANS наблюдается полная модификация рекомбинантной аспарагиназы (рис. 2, трек 3), что подтверждается отсутствием на электрофореграмме полосы, соответствующей ECAR_LANS. Как видно из рис.3, А, наблюдается прямая зависимость активности пегилированного белка от количества модифицирующего реагента. Так при молярном соотношении mPEG-pNP/ECAR-LANS 4,5/1 сохраняется почти 60% удельной активности аспарагиназы. Это, по-видимому, обусловлено стабилизацией тетрамерной структуры конъюгированного фермента, которая быстрее достигается при использовании высоких концентраций ПЭГ.

В процессе эксперимента также было установлено, что помимо прямой зависимости от соотношения количеств реагирующих веществ активность фермента находится в обратной зависимости от продолжительности инкубации с ПЭГ. Как видно из рис.3, Б, даже в молярном соотношении mPEG-pNP/ECAR_LANS 4,5/1 при увеличении времени инкубации активность аспарагиназы снижается.

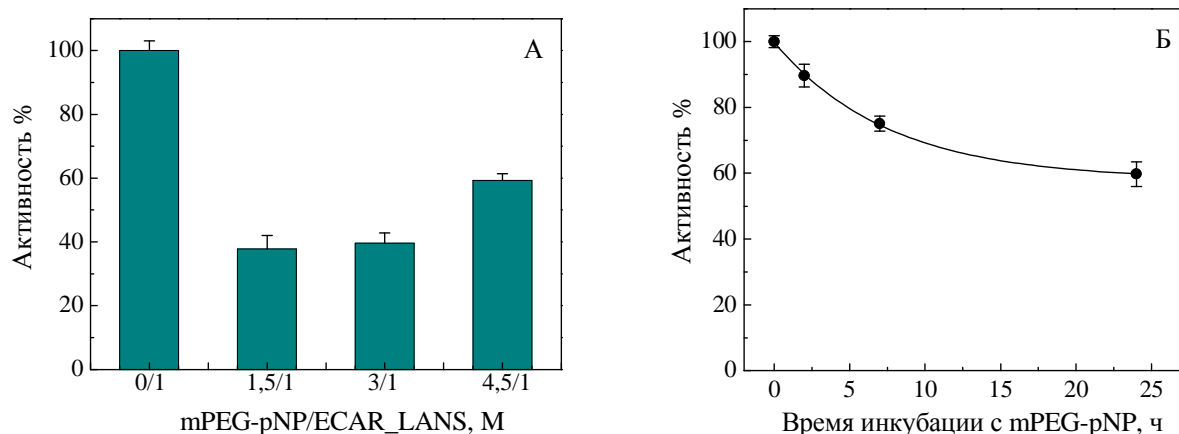


Рис. 3. Зависимость активности пегилированной аспарагиназы от (А) молярного соотношения mPEG-pNP/ECAR_LANS и (Б) времени инкубации.

Чтобы повысить эффективность пегилирования, представлялось важным выяснить причину снижения активности фермента с увеличением времени реакции. Для этого исследовали, является ли деградация аспарагиназы результатом жестких условий реакции модификации, или сама по себе ECAR_LANS представляет собой менее стабильный белок по сравнению с коммерческими препаратами аспарагиназ.

Было проведено сравнение результатов пегилирования препарата ECAR_LANS и применяемой в клинической практике коммерческой L-аспарагиназы *Escherichia coli* (ЕсА; «Medac» Германия). К растворам аспарагиназ добавляли mPEG-pNP в 4,5 кратном молярном избытке. Реакцию пегилирования проводили в боратном буфере со сниженным значением рН равным 9,0, как при 22°C, так и 4°C, варьируя при этом время инкубации. Параллельно определяли активность аспарагиназы и аликвоты реакционной смеси наносили на 12% ПААГ/ДСН. В качестве контроля служили пробы ECAR_LANS и Medac, инкубировавшиеся в тех же условиях, но в отсутствии mPEG-pNP. Как видно из рис. 4, через 4 часа инкубации при комнатной температуре степень пегилирования обеих аспарагиназ достаточно высока и весь белок модифицирован (рис. 4, треки 6 и 7).

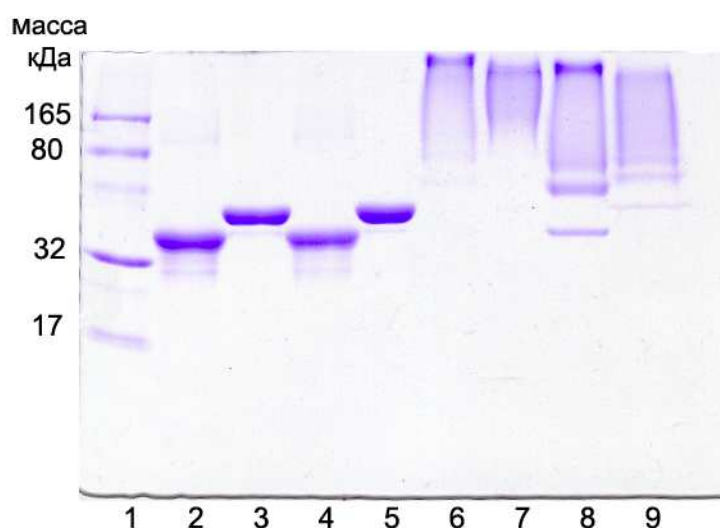


Рис. 4. Электрофореграмма аспарагиназ ECAR_LANS и Medac в 12% ПААГ/ДСН после 4 часов инкубации с mPEG-pNP. 1 – маркер молекулярного веса («Bio-Rad»); 2,4 и 3,5 – соответственно, нативные Medac и ECAR_LANS, инкубация при 22°C и 4°C; 6,7 – соответственно, пегилированные Medac и ECAR_LANS, инкубация при 22°C; 8,9 – соответственно, пегилированные Medac и ECAR_LANS, инкубация при 4°C.

При этом у пегилированных ECAR_LANS и Medac активность сохраняется практически в равной степени 78,8% и 82,9%, соответственно. Для реакционных проб, инкубировавшихся при 4°C, модификация проходит не так эффективно, и в смеси присутствуют следы нативного белка (рис. 4, треки 8 и 9). В течение 16 часов при 4°C происходила полная модификация аспарагиназ и электрофоретическая картина в ПААГ/ДСН в последующие 8 часов не изменялась. Энзиматическая активность в контрольных и опытных образцах снижалась примерно в одинаковой степени и ее значения не отличались.

Таким образом, было установлено, что ECAR_LANS не является менее стабильным ферментом по сравнению с препаратом коммерческой аспарагиназы. Кроме того, было выявлено, что время реакции можно сократить до 4 часов, получая при этом PEG-ECAR_LANS с 78,8% активности.

Резюмируя рассмотренные выше данные, следует отметить, что оптимальными условиями пегилирования рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, позволяющими получить полностью модифицированный фермент с 80% исходной активности являются: инкубация при 22°C в течение 4-х часов в реакционном буфере с pH 9,0.

Физико-химическая и кинетическая характеристика модифицированной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*.

В результате исследования определен ряд физико-химических свойств пегилированного и нативного фермента и проведен сравнительный анализ полученных данных. При изоэлектрофокусировании пегилированной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* на колонке с амфолинами («Pharmacia») в интервале pH 4-10 и 7-9 было установлено, что изоэлектрическая точка белка сдвигается в область кислых значений pH по сравнению с pI нативного фермента равной 8,5 и находится в диапазоне значений pH $7,9 \pm 0,05$. Уменьшение изоэлектрической точки может объясняться блокированием полиэтиленгликолем ϵ -аминогрупп остатков лизина белковой молекулы аспарагиназы. В литературе упоминается о подобном изменении pI, например, при модификации антагониста рецептора интерлейкина-1 человека с использованием полиэтиленгликоля и метода активированных эфиров для образования ковалентной связи (Мартюшин и др., 2000).

Установлено, что оптимум pH гидролиза L-аспарагина для пегилированного и нативного фермента практически не отличается и находится в интервале значений pH от 7,5 до 9,0, что согласуется с известными из литературы данными на примере химически модифицированной аспарагиназы *E. coli*. Оптимум температуры для ECAR_LANS лежит в диапазоне 37-55°C, а для PEG-ECAR_LANS этот диапазон несколько шире и составляет 37-60°C.

Кинетические параметры модифицированной аспарагиназы представлены в табл. 2, и сопоставлены с соответствующими характеристиками ECAR_LANS.

Таблица 2. Кинетические свойства ПЭГ-аспарагиназы.

Белок	L-аспарагин		L-глутамин	
	K_m , мкМ	V_{max} , МЕ/мг	K_m , мкМ	V_{max} , МЕ/мг
PEG-ECAR_LANS	108±14	377±11	1456±115	11±0,3
ECAR_LANS	106±18	467±18	1453±146	14±0,7

Расчитанные значения K_m пегелированного и нативного фермента для L-аспарагина и L-глутамин практически не отличаются. Однако при этом отмечается понижение значения константы V_{max} модифицированной аспарагиназы.

При пегелировании белковой молекулы для сохранения ее каталитической активности важно, чтобы аминокислоты, входящие в состав активного центра фермента, не участвовали в ковалентном связывании с ПЭГ (Roberts et al., 2002).

В мономере аспарагиназы *Erw. carotovora* из 20 аминокислотных остатков лизина 14 расположены на поверхности и открыты для пегелирования, один остаток – Lys 30 находится в непосредственной близости от активного центра фермента (рис. 5).

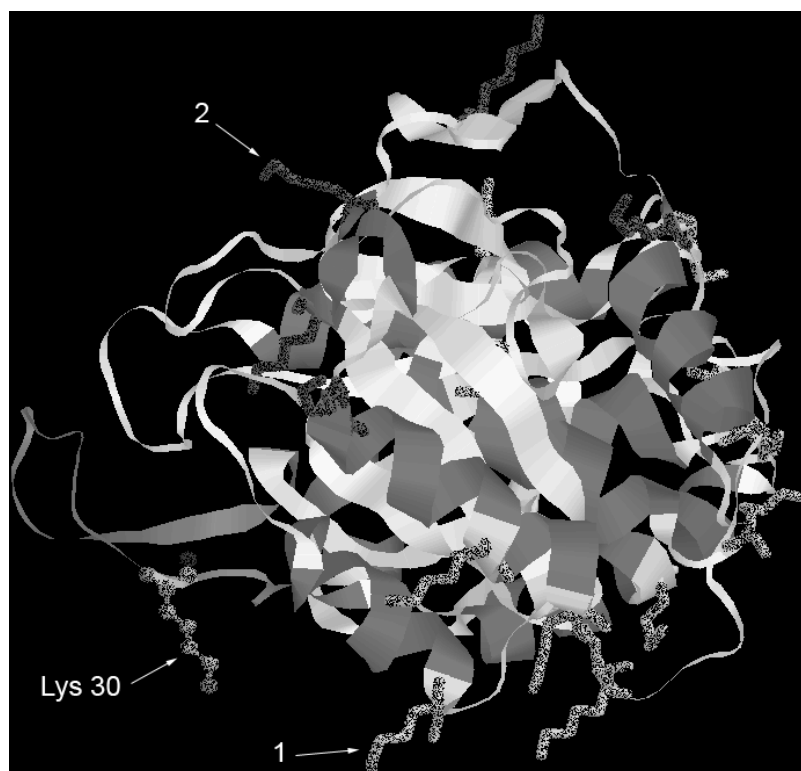


Рис. 5. Мономер рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*. 1 – остатки лизина, расположенные на поверхности фермента; 2 – остатки лизина, расположенные в области контакта субъединиц фермента.

Однако, вследствие того, что каталитический сайт ECAR_LANS стерически ограничен размером молекулы глутамин, даже при связывании Lys30 с ПЭГ можно исключить влияние полимера на связывание белка с субстратом. Оставшиеся 5 остатков ли-

зина расположены в области контакта субъединиц аспарагиназы. Это означает, что при олигомеризации они окажутся внутри тетрамера. При пегилировании ϵ -аминогрупп данных лизиновых остатков фермент не способен образовывать тетрамерную структуру. Вероятно, этим и можно объяснить уменьшение величины V_{\max} для PEG-ECAR_LANS.

Важной характеристикой аспарагиназы с точки зрения ее токсичности для организма, является отношение L-глутаминазной активности к L-аспарагиназной. В результате эксперимента по оценке активности аспарагиназы в отношении L-глутамината не выявлено значительных различий в субстратной специфичности нативной и модифицированной аспарагиназ. Отношение глутаминазной активности к аспарагиназной для пегилированного фермента составляет 2-3%. Полученные данные коррелируют с результатами Monfardini с соавт. (1995) также не обнаружившими существенных различий в субстратной специфичности, значениях K_m и V_{\max} между нативной и модифицированной ПЭГ аспарагиназой из дикого штамма *Erw. carotovora*.

Стабильность модифицированного фермента.

Известно, что пегилирование белков приводит к повышению их устойчивости к воздействию денатурирующих агентов и биостабильности в организме за счет микроокружения создаваемого молекулами ПЭГ. Поэтому представляло интерес исследовать устойчивость пегилированной аспарагиназы *Erw. carotovora* к воздействию различных денатурирующих факторов.

Термодинамическую стабильность аспарагиназы оценивали по изменению ферментативной активности в условиях повышенной и пониженной температур. В первом случае для постановки опыта была выбрана середина температурного оптимума ферментов, равная 45°C. Через 1 час инкубации активность нативного белка составила 30,7%, в то время как пегилированная аспарагиназа сохранила более 40% активности (рис. 6, А). Более значительная разница между двумя формами фермента выявилась в результате определения стабильности аспарагиназ при циклах замораживания – оттаивания. Активность нативной аспарагиназы снижалась быстрее, по сравнению с пегилированным белком. После 50-го цикла ECAR_LANS сохранила 53% активности от исходного значения, а PEG-ECAR_LANS – более 70% (рис. 6, Б).

Таким образом, результаты опытов, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что полученный пегилированный белок обладает повышенной термодинамиче-

ской стабильностью благодаря стерической защите, создаваемой высоко гидрофильными цепями полимера.

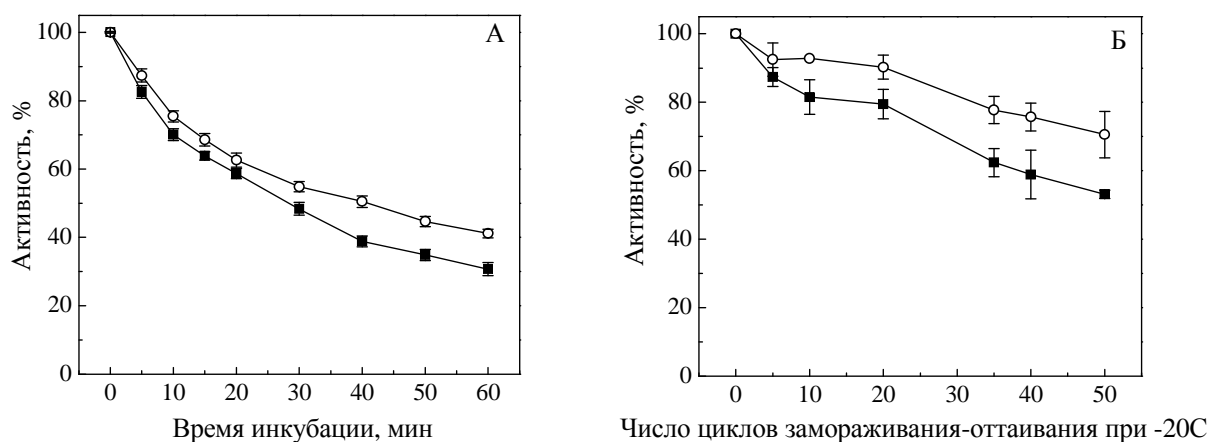


Рис. 6. Зависимость активности нативной (■) и пегелированной (○) аспарагиназы от (А) времени инкубации при 45°C и (Б) числа циклов замораживания-оттаивания. (А) Аспарагиназу (0,5-0,75 мг/мл) в 0,02М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,0) инкубировали при 45°C, отбирали пробы, охлаждали до комнатной температуры и измеряли ферментативную активность. (Б) Аспарагиназу (1 мг/мл) замораживали при -20°C, затем оттаивали при 37°C, отбирали пробы и измеряли активность.

Устойчивость фермента к протеолитической деградации определяли по изменению активности аспарагиназы при инкубации с трипсином. Нативная аспарагиназа теряет половину своей активности уже через 12,5 минут инкубации (рис 7, А). В тех же условиях эксперимента пегелированный белок сохраняет более 80% своей активности. Через 1 час активность ECAR_LANS составила около 13%, а PEG-ECAR_LANS – 34,8%.

Известно, что каталитическое действие трипсина отличается высокой специфичностью: он гидролизует пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина (Ленинджер А., 1985). Следовательно, высокая устойчивость модифицированной аспарагиназы к трипсину возможна благодаря ковалентному связыванию молекул ПЭГа с ε-аминогруппами лизина, являющимися сайтами расщепления трипсином. Таким образом, можно предположить, что пегелированная аспарагиназа будет более устойчива по сравнению с нативным ферментом и к протеолитической деградации под действием трипсиноподобных протеаз плазмы. Чтобы это проверить, было исследовано изменение активности белка при его инкубации в присутствии плазмы крови человека. Как следует из (рис. 7, Б) через 48 часов инкуба-

ции PEG-ECAR_LANS сохраняет в 3 раза более высокую активность по сравнению с исходным ферментом. Такое существенное различие в устойчивости к протеолизу между двумя формами аспарагиназы доказывает стабилизирующий белок эффект пегилирования. Вследствие этого, модифицированная аспарагиназа будет способна к более длительной циркуляции в кровяном русле человека, другими словами будет обладать большим временем полужизни.

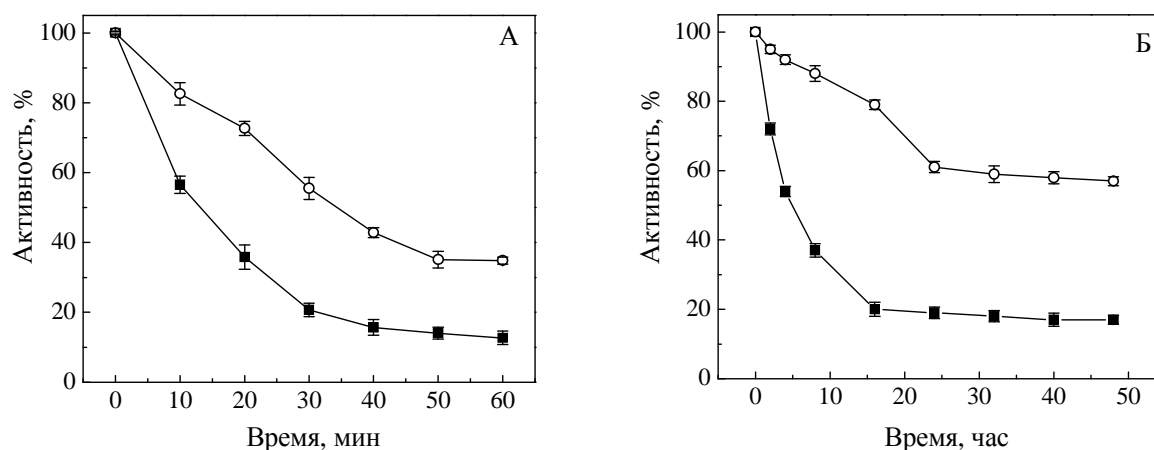


Рис. 7. Протеолитическая стабильность нативной (■) и пегилированной (○) аспарагиназы при инкубации с (А) трипсином и (Б) плазмой крови человека. (А) Аспарагиназу (150 мкг) инкубировали с трипсином (20 мкг) в 0,02 М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,4) при 37°С; добавляли 10-кратное количество STI-ингибитора и определяли ферментативную активность. (Б) Аспарагиназу (50 мкг) инкубировали в 400 мкл раствора, содержащего 200 мкл плазмы и равное количество фосфатно-солевого буфера (рН 7,4); отбирали пробы и измеряли активность.

Таким образом, результаты опытов, представленные на рис.7, указывают на то, что пегилированная аспарагиназа *Erw. carotovora* обладает повышенной протеолитической стабильностью по сравнению с нативным ферментом. Учитывая перспективу клинического применения препарата ПЭГ-аспарагиназы *Erw. carotovora*, это повысит его терапевтическую эффективность.

Оценка цитотоксической активности ПЭГ-аспарагиназы *in vitro*.

Увеличение стабильности пегилированной аспарагиназы позволяет предположить усиление ее цитотоксических свойств. Противоопухолевую активность *in vitro* определяли на нескольких клеточных линиях, чувствительных к аспарагиназе.

В ходе экспериментов было установлено, что максимальная антипролиферативная активность аспарагиназы *Erw. carotovora* проявляется на клеточных линиях MOLT-4 и Raji. При концентрации фермента 2 МЕ/мл выживаемость опухолевых

клеток линии Raji составила не более 7%, а для клеток линии MOLT-4 выживаемость была практически нулевой.

Как видно из рис. 8, пегилированная аспарагиназа обладает более выраженной противоопухолевой активностью, по сравнению с исходным белком. Значение LC_{50} для клеток Raji составило 0,4 МЕ/мл и 0,3 МЕ/мл для нативного и модифицированного фермента, соответственно. Для клеток MOLT-4 величина LC_{50} оказалась равной 1,1 МЕ/мл для ECAR_LANS и 0,8 МЕ/мл для PEG-ECAR_LANS. Другими словами, значение LC_{50} пегилированной аспарагиназы для этих клеточных линий примерно на треть ниже по сравнению с LC_{50} исходного фермента.

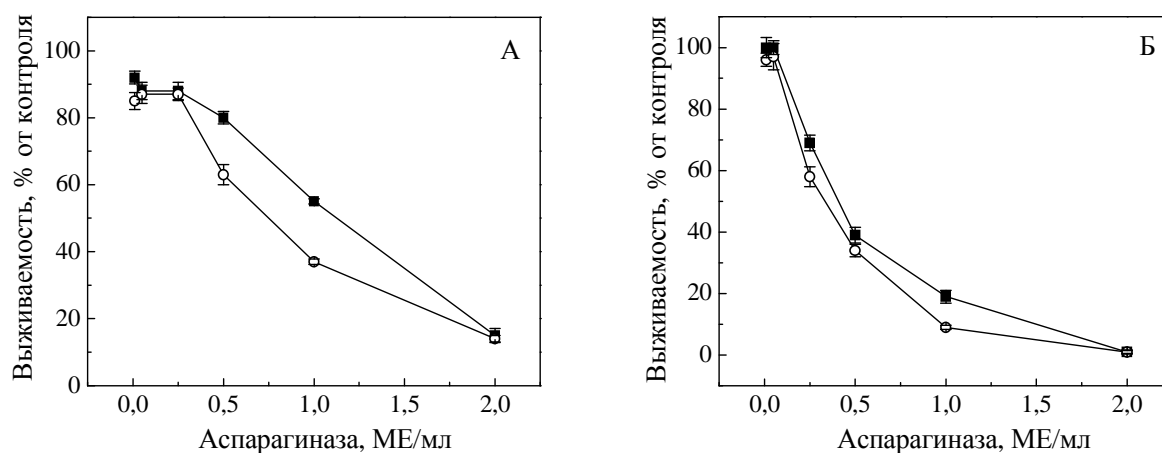


Рис. 8. Цитотоксическая активность нативной (■) и пегилированной (○) аспарагиназы для лимфобластной Т-клеточной лимфомы MOLT-4 (А) и лимфомы Беркитта Raji (Б).

Таким образом, пегилирование аспарагиназы привело к повышению цитотоксической активности фермента, что можно объяснить повышением ее стабильности по отношению к действию клеточных протеаз.

Следует отметить, что полученный модифицированный белок, также как и нативный, не является токсичным для нормальных клеток. В опытах на эмбриональных фибробластах человека показано, что рост клеток в присутствии аспарагиназы практически не изменяется, выживаемость клеток не менее 90-95%.

Характеристика иммуногенности пегилированной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*.

На заключительном этапе работы был проведен сравнительный анализ иммуногенности препаратов исходной и модифицированной аспарагиназ *Erw. carotovora*. С помощью прямого твердофазного ИФА определяли титр антител в

сыворотках, полученных в результате иммунизации мышей нативной и пегелированной аспарагиназой.

За титр принимали точку перегиба кривой, полученной аппроксимацией данных нескольких независимых экспериментов полиномом 5-й степени. Установлено, что титры антисывороток составляют 128 – для ECAR_LANS и 16 – для PEG-ECAR_LANS (рис. 9).

Таким образом, пегелирование аспарагиназы приводит к восьмикратному снижению антителообразования. Подобный эффект модификации на выработку антител описан во многих работах (Kamisaki et al., 1981; Kawamura et al., 1985).

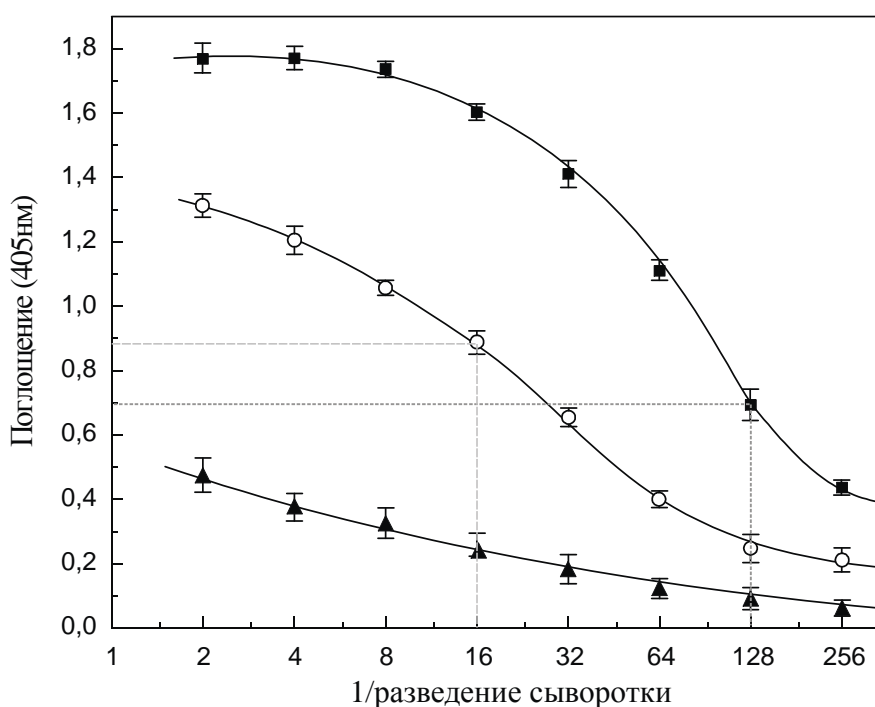


Рис. 9. Сравнительная оценка иммуногенности нативной (■) и пегелированной (○) аспарагиназы. ▲ -отрицательный контроль

Можно сделать вывод о том, что применение пегелированной формы рекомбинантной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* аспарагиназы будет более предпочтительно в связи с ее в значительной степени уменьшенной иммуногенностью.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получена модифицированная полиэтиленгликолем рекомбинантная аспарагиназа *Erw. carotovora*. Разработанный метод пегилирования с использованием в качестве модифицирующего реагента метоксиполиэтиленгликоль-*n*-нитрофенилкарбоната с молекулярной массой 5000 позволяет сохранить около 80% активности модифицированного фермента.
2. Установлено, что пегилированная аспарагиназа обладает более высокой стабильностью к протеолизу под действием трипсина и трипсиноподобных протеаз плазмы крови, а также к воздействию температуры по сравнению с нативным ферментом.
3. В опытах *in vitro* показано, что модифицированная рекомбинантная аспарагиназа *Erw. carotovora* проявляет более высокую противоопухолевую активность в отношении клеток линий MOLT-4 и Raji, по сравнению с нативным ферментом. Значение LC_{50} пегилированной аспарагиназы для этих клеточных линий примерно на треть ниже LC_{50} немодифицированного фермента.
4. В опытах на лабораторных животных установлено, что препарат пегилированной аспарагиназы приводит к восьмикратному снижению антителиобразования по сравнению с нативным ферментом и, таким образом, обладает пониженной иммуногенностью.
5. Полученные в ходе изучения пегилированной рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora* результаты – повышение устойчивости к протеолизу и температурному воздействию, снижение иммуногенности и высокая противоопухолевая активность позволяют рассматривать модифицированный фермент в качестве перспективной основы для создания лекарственного препарата, более эффективного по сравнению с нативной аспарагиназой.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Linnea E. K. Wikman, Julya Krasotkina, Anastasia Kuchumova, Nikolay N. Sokolov and Anastassios C. Papageorgiou. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. // *Acta Crystallographica*. – 2005. – Vol. 61(Pt 4). – P. 407-409.
2. А.В. Кучумова, Ю.В. Красоткина, П.З. Хасигов, Н.Н. Соколов. Пегилирование рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora* полиэтиленгликолем 5000. // *Биомедицинская химия*. – 2007. – Т. 53(1). – С. 107-111.
3. Ю.В. Красоткина, О.Ю. Абакумова, О.В. Подобед, С.М. Медников, А.В. Кучумова, Н.Н. Соколов. Цитостатическая активность рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*. // Сборник докладов II научно – практической конференции «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии». – Анапа. – 2005. – С. 2.
4. Ю.В. Красоткина, О.Ю. Абакумова, О.В. Подобед, С.М. Медников, А.В. Кучумова, Н.Н. Соколов. Влияние стабильности бактериальной аспарагиназы *Erwinia carotovora* на ее противоопухолевую активность *in vitro*. // Сборник докладов II научно – практической конференции «Актуальные проблемы медицинской биотехнологии». – Анапа. – 2005. – С. 3.
5. А.В. Кучумова, Ю.В. Красоткина, Н.Н. Соколов. Пегилирование аспарагиназы *Erwinia carotovora* повышает стабильность фермента. // Сборник трудов международной конференции «Фундаментальные науки – биотехнологии и медицине». – Новосибирск. – 2006. – С. 21.
6. Ю.В. Красоткина, А.В. Кучумова, Н.Н. Соколов. Цитотоксическая активность аспарагиназы зависит от ее глутаминазной специфичности. Материалы Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярные основы и клинические проблемы резистентности к лекарственным средствам». – Киев. – 2006. – С. 31.

7. Ю.В. Красоткина, А.В. Кучумова, Н.Н. Соколов. Моделирование каталитических свойств рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* с целью создания эффективного противолейкозного препарата. Сборник трудов 4-го съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова.– Пушино. – 2006. – С. 23.

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

Список сокращений

ДСН – додецилсульфат натрия

ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

мПЭГ – монометилловый эфир полиэтиленгликоля

МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид

ПААГ/ДСН – полиакриламидный гель с добавлением додецилсульфата натрия

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ABTS – 2,2-азино-бис-[3-этилбензотиазол-6-сульфонат]-аммония

ECAR_LANS – рекомбинантная L-аспарагиназа *Erw. carotovora*

Medac – коммерческий препарат L-аспарагиназы *E. coli*

mPEG-rNP – метоксиполиэтиленгликоль-п-нитрофенилкарбонат

PEG-ECAR_LANS – модифицированная полиэтиленгликолем рекомбинантная L-аспарагиназа *Erw. carotovora*

pI – изоэлектрическая точка