

УДК 577.151.62

## СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ-АНТИОКСИДАНТОВ В КОМПЛЕКСАХ И КОНЬЮГАТАХ С БЛОКСОПОЛИМЕРАМИ: ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

С.В. Угланова<sup>1</sup>, М.В. Попов<sup>2</sup>, В.С. Курова<sup>1</sup>, Е.В. Батракова<sup>3</sup>, Д. Манихам<sup>3</sup>,  
А.В. Кабанов<sup>3</sup>, Н.Л. Клячко<sup>2</sup>

(Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия; <sup>2</sup>кафедра химической энзимологии химического факультета, Москва, Россия, e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru; <sup>3</sup>Медицинский центр Университета Небраска (UNMC), Омаха, Небраска, США)

Приготовлены наноразмерные частицы радиуса  $16 \pm 2$  нм на основе комплексов и конъюгатов высокоактивных супероксиддисмутазы и каталазы с полиэлектролитом блоксополимером полиэтиленимин-полиэтиленгликоль, а также биферментные системы на их основе. Методом времяпролетной масс-спектрометрии доказано наложение химических сшивок с образованием наночастиц, включающих в себя молекулы фермента и блоксополимера. Выявлено существенное (до четырех раз) повышение стабильности ферментов в составе наночастиц в условиях протеолиза под действием химотрипсина и трипсина в течение 3 ч при 37°C. Содержащие ферменты-антиоксиданты наночастицы представляются перспективными для преодоления гематоэнцефалического барьера и доставки лекарственных веществ в центральную нервную систему.

**Ключевые слова:** антиоксидантные ферменты, биферментная система супероксиддисмутазы и каталазы, наночастицы, нейродегенеративные заболевания, полиэлектролиты, стабилизация ферментов.

### Введение

Нейропатология такого распространенного заболевания, как болезнь Паркинсона, сопровождается активацией клеток микроглии, что приводит к выбросу токсичных агентов, в том числе активных форм кислорода (АФК), повреждающих нейроны [1]. Негативное воздействие АФК на клетки обусловлено тем, что при поражении нервных тканей значительно снижается количество антиоксидантных ферментов, поэтому их введение может способствовать уменьшению токсичного воздействия АФК [2]. Важнейший элемент защиты клеток от АФК – фермент супероксиддисмутазы (СОД), катализирующий дисмутацию супероксидного радикала в кислород и пероксид водорода [3]. В защите организма от АФК участвуют также пероксидазы и каталаза. Каталаза катализирует процесс окисления пероксида до воды и молекулярного кислорода. Это один из наиболее эффективных компонентов клетки, устраняющих последствия токсичного воздействия пероксида водорода [4]. Использование антиоксидантных ферментов в лечении многих заболеваний, в том числе нейродегенеративных, весьма перспективно.

Однако на практике необходимо использовать не нативные ферменты, а их модифицированные формы с целью улучшения таких свойств, как стабильность, устойчивость к протеолизу и т.д. Кроме того, в случае использования препаратов при терапии заболеваний центральной нервной системы возникает проблема преодоления частицами лекарства гематоэнцефалического барьера. В данной работе предложено использовать комплексы и конъюгаты СОД и каталазы с полиэлектролитами, а также биферментные системы с последовательно работающими ферментами. Ранее на *in vitro* модели болезни Паркинсона была показана эффективность использования комплексов каталазы с полиэлектролитами для снижения токсичного действия АФК на нервные клетки [5–7]. Подобные блок-сополимеры использовали для получения комплексов каталазы [6], а также в качестве носителя для доставки олигонуклеотидов [8, 9]. Известно, что сам по себе полиэтиленимин – токсичное вещество, и этот факт мог бы привести к ограничению применения полученных наночастиц в медицинских целях. Однако в

конъюгатах он сшит с аминокруппами белков, кроме того, предполагаемые наночастицы покрыты «хвостами» из блоков полиэтиленгликоля, нивелирующими возможное токсичное действие полиэтиленimina. В литературе практически нет сведений о методах получения таких частиц и об их свойствах. Задача, стоящая перед нами заключалась в том, чтобы подобрать оптимальные реагенты и условия получения наночастиц антиоксидантных ферментов СОД и каталазы, а также характеризовать физико-химические свойства этих систем.

## Материалы и методы

### Используемые химические реактивы

В работе мы использовали натрий-фосфатный буфер (10 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 145 мМ  $\text{NaCl}$ ; рН 7,4) (НФБ) и калий-фосфатный буфер (50 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; рН 7,4) (КФБ). Бифункциональные сшивающие реагенты: 25%-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) («Fluka», США) и бис(сульфосукциминидил) суберат натрия ( $\text{BS}^3$ ) («Sigma», США), боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) и цианборгидрид натрия ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) («Sigma», США). Коммерческий препарат полиэтиленимин-полиэтиленгликоль (ПЭИ-ПЭГ) фирмы «Alamanda Polymers» (США) с молекулярной массой 12 кДа. Блок полиэтиленгликоля – линейный, регулярный; блок полиэтиленimina – разветвленный. На одну молекулу приходится 48 первичных аминокрупп. Супероксиддисмутаза («Рексод», Россия), лиофилизированный препарат, человеческий рекомбинантный. Каталаза из бычьей печени («Sigma», США).

### Получение комплексов ферментов с полиэлектролитом

При получении комплексов каталазы и СОД с ПЭИ-ПЭГ навеску фермента (1–8 мг) растворяли в 0,5 или 1 мл НФБ или КФБ, затем добавляли при комнатной температуре рассчитанные навески ПЭИ-ПЭГ (1–10 мг). В результате получали комплексы каталазы и СОД с ПЭИ-ПЭГ (соотношение по зарядам белок:полимер составляло 1:1). Отношения рассчитывали по количеству зарядов на молекулах белка и полимера при рН 7,4.

### Ковалентное связывание ферментов с полиэлектролитом

Для сшивания комплексов каталазы или СОД с ПЭИ-ПЭГ по аминокруппам с помощью  $\text{BS}^3$  к 1 мл

раствора комплексов (НФБ или КФБ) добавляли 6 мг реагента и инкубировали реакционную смесь в течение 20 ч при 4°C. При сшивании глутаровым альдегидом (ГА) комплексов каталазы и СОД с ПЭИ-ПЭГ к раствору комплексов добавляли 1000-кратный избыток ГА (3–6 мкл 25%-го раствора). При использовании боргидрида натрия в качестве восстанавливающего агента реакционную смесь инкубировали в течение 18–24 ч при 4°C, затем добавляли 0,5–1,0 мг боргидрида натрия  $\text{NaBH}_4$  и выдерживали в течение 10–20 мин при комнатной температуре. В случае использования цианборгидрида в качестве восстанавливающего агента иминных связей через 10–15 мин после введения ГА добавляли 1 мг реагента  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , перемешивали и инкубировали реакционную смесь в течение 20 ч при 4°C. Реакцию останавливали гель-фильтрацией полученных растворов на Sephadex G-25 (колонки NAP «GE Healthcare», США).

По отработанной методике получения наночастиц, содержащих каталазу, мы также получили и охарактеризовали биферментные конъюгаты каталаза–СОД, где концентрация СОД составляла  $2,5 \times 10^{-4}$  М, каталазы –  $8 \times 10^{-6}$  М. Соотношение белок:полимер, рассчитанное по суммарному отрицательному заряду на каталазе и СОД, составляло 1:1. Образцы были приготовлены в НФБ при рН 7,4. Для их конъюгирования использовали ГА и боргидрид натрия в качестве восстановителя.

### Определение каталитической активности каталазы

За активностью немодифицированной каталазы и фермента в составе конъюгатов следили по разложению пероксида водорода. В типичном эксперименте в кварцевую кювету вносили 1 мл НФБ (рН 7,4); 10 мкл 0,735 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  и 2–6 мкл  $2 \times 10^{-9}$ – $2 \times 10^{-8}$  М раствора каталазы, изменение поглощения субстрата регистрировали спектрофотометрически (длина волны 240 нм,  $T = 25^\circ\text{C}$ ).

### Определение активности трипсина

За активностью трипсина следили по реакции гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина (БАЭЭ). Реакцию проводили в НФБ с рН 7,4 в кювете на 1 мл, концентрация субстрата составляла  $10^{-4}$  М, концентрация трипсина –  $10^{-7}$  М. Кинетические измерения гидролиза БАЭЭ проводили при длине волны 255 нм. Активность фермента рассчитывали по скорости изменения оптической плотности.

тывали по тангенсу угла наклона линейной части кривой накопления продукта.

### **Определение активности $\alpha$ -химотрипсина**

Каталитическую активность  $\alpha$ -химотрипсина определяли по начальной скорости гидролиза специфического субстрата – *n*-нитроанилида *N*-бензоил-L-тирозина. Реакцию гидролиза проводили в НФБ с pH 7,4, концентрация субстрата составляла  $10^{-6}$  М, концентрация фермента –  $10^{-7}$  М. За кинетикой реакции следили по изменению оптической плотности при длине волны поглощения продукта 380 нм.

### **Определение активности супероксиддисмутазы**

Каталитическую активность СОД в немодифицированном состоянии и в составе конъюгатов характеризовали по ингибированию ею реакции восстановления тетразолиевого нитросинего (НСТ) до формазана супероксидными радикалами [10]. Супероксидные радикалы в системе генерировались фотохимическим способом – действием ультрафиолетового облучения на рибофлавин. Реакционная смесь содержала 1,45 мл буфера (50 мМ  $K_2HPO_4$ ; 0,1 мМ ЭДТА; 0,25% Triton X-100; pH 7,8), 50 мкл раствора рибофлавина (60 мкМ), 7 мкл раствора НСТ (12 мМ) и аликвоту СОД. Реакционную смесь инкубировали 3 мин под ультрафиолетовым облучением (мощность лампы 50 Вт, расстояние от источника облучения до реакционной смеси 30 см), регистрировали величину оптической плотности при длине волны 405 нм (отвечает максимуму поглощения продукта окисления НСТ). Рассчитывали отношение значений оптической плотности в пробах, содержащих СОД, к контрольным (без фермента) и строили график зависимости степени ингибирования от концентрации СОД. Разведение препарата, вызывающее ингибирование реакции восстановления НСТ на 50%, принимали за единицу (ЕД) активности фермента.

В работе также использовали альтернативный метод независимого определения специфической ферментативной активности СОД по ингибированию супероксиддисмутазой реакции окисления люминола. Для определения степени ингибирования реакции измерения проводили при трех значениях концентрации СОД в диапазоне от  $5,5 \times 10^{-8}$  до  $2 \times 10^{-10}$  М. Люминол использовали в концентрации  $3,32 \times 10^{-4}$  М в 50 мМ бикарбонатном буферном растворе (pH 10,2) в присутствии ксантина ( $7,7 \times 10^{-5}$  М), концентрация Трилона Б составляла  $1 \times 10^{-4}$  М. Реакцию

инициировали добавлением раствора ксантиноксидазы ( $1 \times 10^{-3}$  М). Хемилюминесцентный анализ проводили на люминометре «Femtomaster FB12» («Zylux corporation», США). Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в контрольных и опытных пробах в течение 1 мин. По разности тангенсов угла наклона начального участка кинетических кривых контрольных и опытных образцов или по разности сумм хемилюминесцентного сигнала в соответствующих образцах определяли величину процента ингибирования реакции. За единицу активности принимали такое количество фермента в 1 мл реакционной смеси, которое вызывает ингибирование реакции окисления люминола на 50% в течение 1 мин при pH 10,2 и температуре (22–23)°С.

### **Гельэлектрофорез в денатурирующих условиях**

Электрофорез проводили в 7%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэмли [11]. Для визуализации полос белка гель на 20–30 мин помещали в раствор для окрашивания (Кумаси R-250).

### **Определение размеров наночастиц**

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на установке «ALV-CGS-5022F» (Германия). Перед проведением измерений растворы анализируемых образцов фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) «Corning», Германия. Определяли средний гидродинамический радиус частиц и оценивали полидисперсность системы.

### **Измерение устойчивости к протеолизу**

Для каждого эксперимента готовили раствор ферментов объемом 10 мл в НФБ (pH 7,4), содержащий протеазу (трипсин или  $\alpha$ -химотрипсин в концентрации  $10^{-6}$  М) и изучаемый фермент, как немодифицированный, так и в составе конъюгата. Сразу после смешивания реагентов определяли активность протеазы и исследуемого фермента, затем измеряли активность после трехчасовой инкубации растворов ферментов при 37°С в термостатируемом шкафу. Находили отношение этих значений активности, затем рассчитывали остаточную активность.

### **Результаты и их обсуждение**

В качестве носителя для образования комплексов с каталазой и СОД и последующей их ковалентной

сшивки мы выбрали блок-сополимер полиэтилена с полиэтиленгликолем (ПЭИ-ПЭГ). Значение pH 7,4 соответствует оптимуму активности каталазы и супероксиддисмутазы. При данном значении pH молекулы фермента заряжены отрицательно, а полимер – положительно. В качестве сшивающего реагента были выбраны бифункциональные сшивающие реагенты – бис(сульфосукцинимидил) суберат ( $BS^3$ ) и глутаровый диальдегид (ГА). Последний при нейтральных и слабощелочных условиях реагирует с аминогруппами, образуя азометиновые связи (шиффовы основания). Реакция образования оснований Шиффа обратимая, поэтому азометиновые связи восстанавливаются. В данной работе в качестве восстановителя мы использовали боргидрид натрия и цианборгидрид натрия. Как видно из данных электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 1), образования конъюгатов в присутствии цианборгидрида натрия не происходит, использование других реагентов приводит к получению полос более высокой молекулярной массы, чем для немодифицированного фермента (молекулярная масса мономера 60 кДа). Кроме того, в присутствии цианборгидрида натрия наблюдается существенное снижение активности ферментов. Поэтому в дальнейших экспериментах были использованы  $BS^3$  и ГА- $NaBH_4$ . Как видно на рис. 1, при использовании  $BS^3$  образуются две фракции частиц, а молекулярная масса образцов 3 и

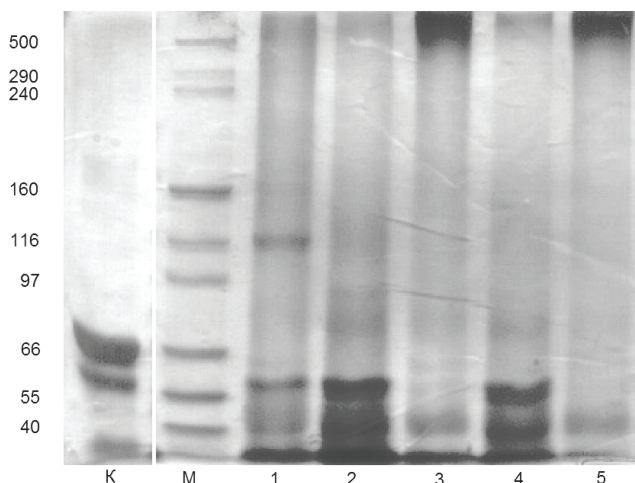


Рис. 1. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле полученных конъюгатов каталазы с ПЭИ-ПЭГ: 1 – каталаза (4 мг/мл)-ПЭИ-ПЭГ(1:1)-ГА- $NaBH_4$ , 2 – каталаза (4 мг/мл)-ПЭИ-ПЭГ(1:1)-ГА- $NaBH_3CN$ , 3 – каталаза (2 мг/мл)-ПЭИ-ПЭГ(1:1)-ГА- $NaBH_4$ , 4 – каталаза (2 мг/мл)-ПЭИ-ПЭГ(1:1)-ГА- $NaBH_3CN$ , 5 – каталаза (4 мг/мл)-ПЭИ-ПЭГ(1:1)- $BS^3$ , K – немодифицированная каталаза, M – маркеры

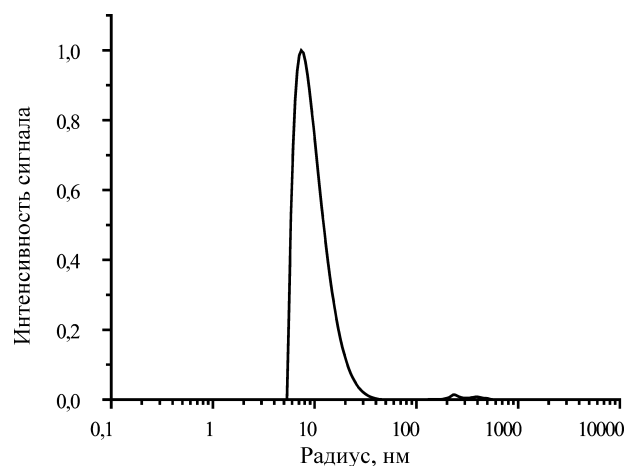


Рис. 2. Распределение частиц по размерам в системе каталаза-СОД-ПЭИ-ПЭГ-ГА- $NaBH_4$ , (НФБ pH 7,4),  $\theta = 90^\circ$

5, полученных при сшивании с помощью ГА- $NaBH_4$ , находится в области 500 кДа. Это говорит о том, что конъюгаты в своем составе могут содержать две молекулы фермента. Изучение свойств комплексов и конъюгатов, приготовленных в разных буферных системах (НФБ, КФБ) при pH 7,4, не выявило влияния катиона и ионной силы в исследуемом диапазоне на параметры получаемых агрегатов каталаза-СОД-ПЭИ-ПЭГ.

Схему получения наночастиц, содержащих каталазу и супероксиддисмутазу, можно представить следующим образом: образование комплексов фермент-полиэлектролит в водном растворе за счет электростатических взаимодействий, а затем последующая их ковалентная сшивка. Можно предположить, что при таком способе получения конъюгатов каждая молекула фермента окружена «шубой» из молекул полиэлектролита, которые удерживаются за счет электростатических взаимодействий. Таким образом, получаемые наночастицы содержат молекулы активного вещества (фермента), окруженные оболочкой из химически инертного полимера, который «защищает» фермент от действия протеаз и других возможных негативных факторов.

Важные параметры полученных частиц – размер и полидисперсность, они косвенно характеризуют эффективность сшивки конъюгатов. Размеры частиц определяли методом динамического светорассеяния. Как видно на рис. 2, в полученном полиферментном образце СОД-каталаза-ПЭИ-ПЭГ наблюдается узкое распределение полученных частиц по размерам, и средний радиус составляет 16–18 нм, что в три раза превышает размеры молекул сво-

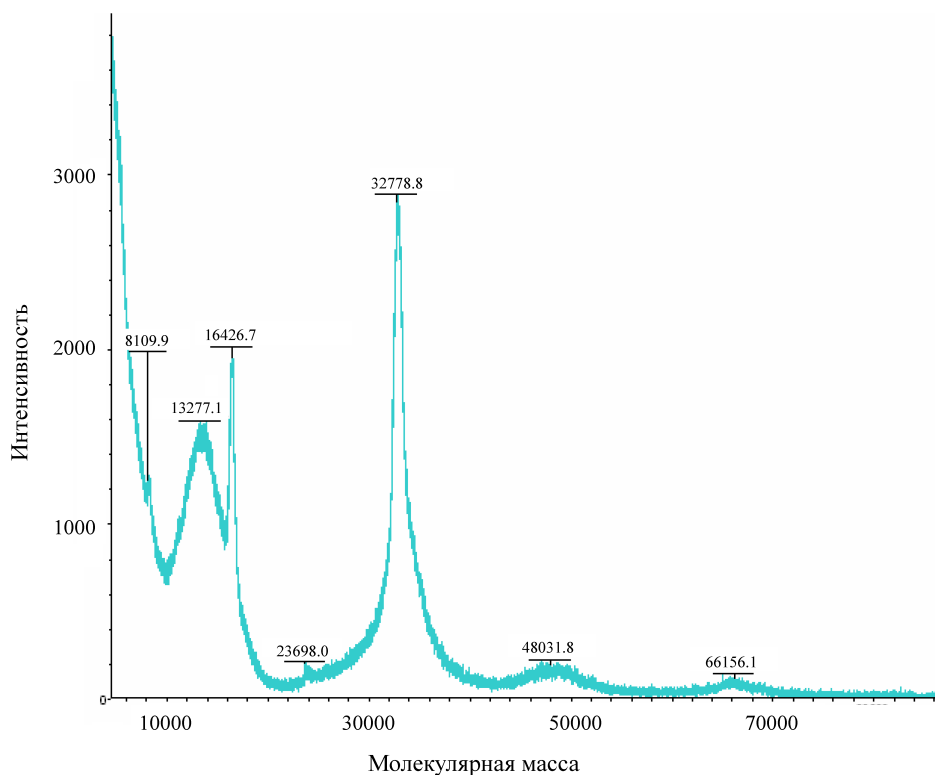


Рис. 3. Результаты времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией из матрицы MALDI-TOF для конъюгатов состава СОД–ПЭИ–ПЭГ, полученным при сшивании с помощью BS<sup>3</sup>

бодной каталазы и в шесть раз размеры СОД. Размеры других полученных наночастиц приведены в таблице.

Следует отметить, что данных по гельэлектрофорезу и определению гидродинамического радиуса недостаточно для того, чтобы делать однозначные выводы о получении наночастиц, содержащих белки, связанные с полиэлектролитом ПЭИ–ПЭГ. Полученные образцы конъюгатов мы исследовали с по-

мощью времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией из матрицы MALDI-TOF. На рис. 3, где представлены предварительные данные по препарату СОД–ПЭИ–ПЭГ–BS<sup>3</sup>, видно, что имеются фракции с молекулярными массами, отличными от молекулярных масс мономера и димера исходной СОД (15712 и 31424 Да соответственно). Для идентификации природы конъюгатов и фрагментов, с которыми связывается линкер, был проведен гидролиз

**Средний радиус конъюгатов каталаза–СОД–ПЭИ–ПЭГ и молекул немодифицированных ферментов**

| Состав конъюгатов                        | Соотношение белок:полимер по зарядам | Сшивающий агент      | Средний гидродинамический радиус (Rh), нм |
|--|--------------------------------------|----------------------|---|
| Каталаза (2 мг/мл)–ПЭИ–ПЭГ               | 1:1                                  | ГА/NaBH <sub>4</sub> | 16±2                                      |
| Каталаза (2 мг/мл)–ПЭИ–ПЭГ               | 1:1                                  | BS <sup>3</sup>      | 5±1                                       |
|  |                                      |                      | 14±2                                      |
| СОД (8 мг/мл)–ПЭИ–ПЭГ                    | 1:1                                  | ГА/NaBH <sub>4</sub> | 16±2                                      |
| Каталаза (2 мг/мл)–СОД (8 мг/мл)/ПЭИ–ПЭГ | 1:1                                  | ГА/NaBH <sub>4</sub> | 17±2                                      |
| Каталаза (6–8 мг/мл)–ПЭИ–ПЭГ             | 1:1                                  | ГА/NaBH <sub>4</sub> | 17±2                                      |
| Немодифицированная каталаза              | –                                    | –                    | 5±1                                       |
| Немодифицированная СОД                   | –                                    | –                    | 2±1                                       |

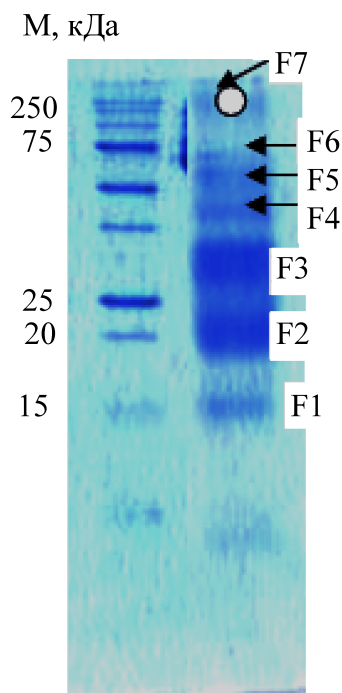


Рис. 4. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле полученных образцов конъюгатов СОД–ПЭИ–ПЭГ(1:1 по рядам) /BS<sup>3</sup>, F1–F7 – фракции пептид–линкер–полимер разного состава

всех фракций белка трипсином в геле. По результатам электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 4) установлено, что препарат модифицированной СОД представляет собой смесь фракций с молекулярной массой от 15 до 250 кДа. В спектрах трипсиновых гидролизатов F1 не обнаружено ни одного значения массы, характеризующего фрагменты нативной СОД, в то время как в пептидных спектрах гидролизованной трипсином в геле СОД присутствуют почти все ожидаемые значения (данные не приведены).

Самой легкой фракции F1 соответствует пик с  $m/z = 16427$  Да, что превышает массу интактного белка (15712 Да) на 715 Да. Фракции F2 в спектре MALDI-TOF соответствует пик с массой 23700 Да. Судя по молекулярной массе, данная фракция может содержать конъюгат мономера SOD (15 кДа) и остатка полиимида ПЭИ–ПЭГ (8 кДа). Фракции F3 (~30 кДа) в спектре MALDI-TOF соответствует пик с массой 32788 Да. Она может содержать как димер СОД, так и мономер фермента, связанный с двумя цепями ПЭИ–ПЭГ. Фракции F4–F7 не отражены на масс-спектрах, что можно объяснить их плохой ионизацией вследствие экранирования остат-

ками полиэтиленгликоля. Их массы, определенные по длине пробега в геле, близки как массам конъюгатов СОД с несколькими цепями ПЭИ–ПЭГ, так и массам олигомеров самого фермента.

В спектрах гидролизата F3 найдены пики, соответствующие массам, характерным для конъюгатов пептид–линкер–пептид. Обнаружено несколько пиков, соответствующих массам, характерным для конъюгатов пептид–BS<sup>3</sup> с гидролизованным линкером.

При получении ковалентно-сшитых наночастиц, содержащих ферменты, важно сохранить функции препаратов после химической модификации. В ходе работы мы проводили оценку остаточной активности каталазы в комплексах каталаза–ПЭИ–ПЭГ и в соответствующих конъюгатах, а также активности каталазы и СОД в биферментных конъюгатах. Установлено, что образование нековалентных комплексов каталазы и СОД с ПЭИ–ПЭГ по описанной выше методике никак не влияет на активность фермента – каталаза в них сохраняет 100%-ю каталитическую активность. В образцах конъюгатов, сшитых агентом BS<sup>3</sup>, активность фермента сохраняется практически полностью, однако по результатам проведенного SDS-гельэлектрофореза можно заключить, что не весь фермент оказался сшитым, и в системе присутствуют частицы различного состава, поэтому нельзя однозначно судить об активности каталазы в конъюгате. При использовании ГА в качестве сшивающего реагента и NaBH<sub>4</sub> в качестве восстанавливающего агента остаточная активность каталазы в наночастицах составляет около 80%. По отработанной методике получения наночастиц, содержащих каталазу, были получены и охарактеризованы наночастицы, содержащие СОД, и биферментные конъюгаты каталаза–СОД. По данным определения остаточной активности ферментов в полученных конъюгатах с полиэлектролитом ПЭИ–ПЭГ при использовании ГА в качестве сшивающего реагента и NaBH<sub>4</sub> в качестве восстанавливающего агента, СОД при модификации сохраняет 89% активности от исходной. В составе биферментного конъюгата СОД сохраняет 70% активности, а каталаза – 65%. Таким образом, в обоих конъюгатах удается сохранить активность ферментов на высоком уровне. Приведенные на рис. 5 зависимости показывают, что присутствие СОД в разных концентрациях не влияет на определение активности каталазы (скорость катализируемой реакции линейно зависит от концентрации каталазы в диапазоне используемых концентраций фермента). Это также

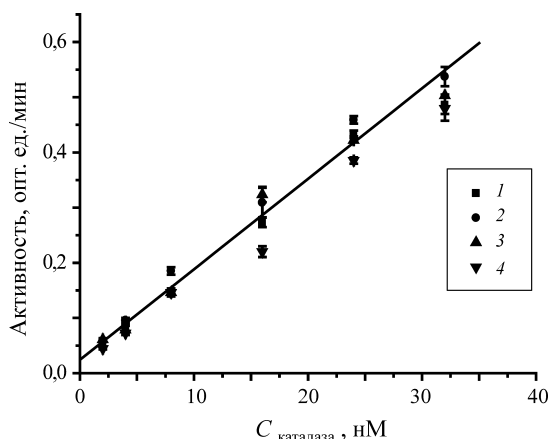


Рис. 5. Зависимость каталитической активности каталазы от ее концентрации в присутствии различных концентраций СОД: 1 –  $6,25 \cdot 10^{-8}$  М, 2 –  $3,13 \cdot 10^{-7}$  М, 3 –  $1,25 \cdot 10^{-6}$  М и 4 – в отсутствие СОД (НФБ; рН 7,4; 25°C; 240 нм)

справедливо для определения активности СОД в присутствии каталазы хемилюминесцентным методом и по ингибированию ею реакции восстановления НСТ.

Важной характеристикой белков при их использовании в качестве лекарственных средств является стабильность по отношению к протеазам организма. В работе проведено сравнение остаточной активности СОД и каталазы в водном растворе и в составе наночастиц при инкубировании в течение 3 ч при 37°C в присутствии модельных фермен-

тов-протеаз,  $\alpha$ -химотрипсина (рис. 6) и трипсина (рис. 7) с разной субстратной специфичностью. Как видно, включение каталазы в состав наночастиц приводит к существенной (в четыре раза при использовании трипсина) стабилизации фермента. Следует отметить, что ферменты-протеазы также оставались активными в течение всего времени проведения эксперимента; после 3 ч инкубирования при 37°C остаточная активность составляла 71 и 53% для  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина соответственно. Аналогичное повышение стабильности к действию протеаз наблюдалось для СОД и биферментной системы СОД–каталаза в составе наночастиц ПЭИ–ПЭГ.

### Выводы

Получены наночастицы, содержащие каталазу и супероксиддисмутазу, а также биферментные системы с полиэлектролитом ПЭИ–ПЭГ. Оптимизированы условия (природа сшивающего агента, исходная концентрация фермента, соотношение белок:полимер, буферная смесь) получения наночастиц на основе каталазы и биферментной системы каталаза–супероксиддисмутазы. При использовании  $\text{GA-NaBH}_4$  были получены частицы с радиусом  $16 \pm 2$  нм с узким распределением частиц по размерам. Показано, что каталаза и супероксиддисмутазы в наночастицах практически полностью сохраняют каталитическую активность и обладают бо-

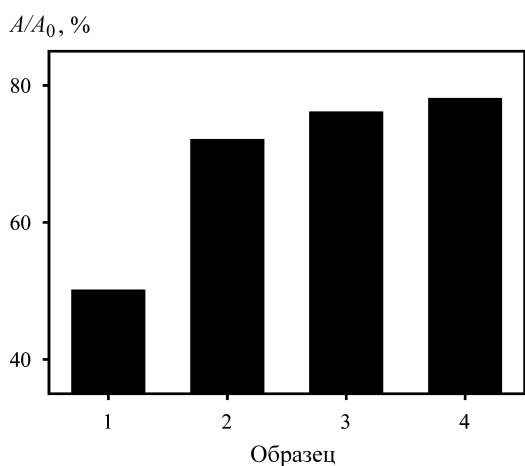


Рис. 6. Остаточная активность каталазы в наночастицах с ПЭИ–ПЭГ после 3 ч инкубации при 37°C в присутствии  $\alpha$ -химотрипсина (концентрации каталазы  $10^{-8}$  М,  $\alpha$ -химотрипсина –  $10^{-6}$  М; рН 7,4): 1 – немодифицированная каталаза, 2 – каталаза ( $2,4 \cdot 10^{-5}$  М)/НФБ/ПЭИ–ПЭГ/ГА/NaBH<sub>4</sub>, 3 – каталаза ( $2,4 \cdot 10^{-5}$  М)/КФБ/ПЭИ–ПЭГ/ГА/NaBH<sub>4</sub>, 4 – каталаза ( $3,2 \cdot 10^{-5}$  М)/КФБ/ПЭИ–ПЭГ/ГА/NaBH<sub>4</sub>

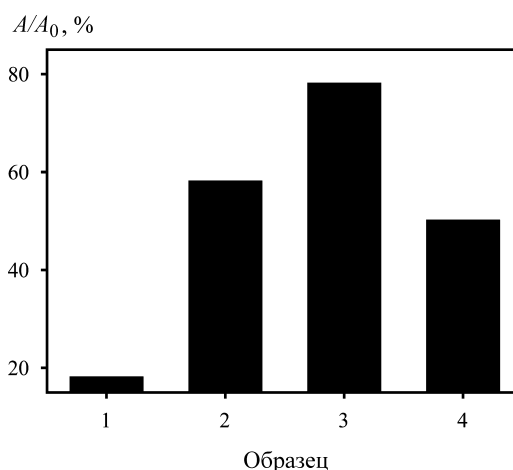


Рис. 7. Остаточная активность каталазы в наночастицах с ПЭИ–ПЭГ после 3 ч инкубации при 37°C в присутствии трипсина (концентрации каталазы  $10^{-8}$  М, трипсина –  $10^{-6}$  М; рН 7,4): 1 – немодифицированная каталаза, 2 – каталаза ( $2,4 \cdot 10^{-5}$  М)/НФБ/ ПЭИ–ПЭГ/ГА/NaBH<sub>4</sub>, 3 – каталаза ( $2,4 \cdot 10^{-5}$  М)/КФБ/ПЭИ–ПЭГ/ ГА/ NaBH<sub>4</sub>, 4 – каталаза ( $3,2 \cdot 10^{-5}$  М)/ КФБ/ ПЭИ–ПЭГ/ ГА/NaBH<sub>4</sub>

лее высокой устойчивостью к протеолизу по сравнению с немодифицированными препаратами фермента. Полученные системы предполагается в

дальнейшем использовать для преодоления гематоэнцефалического барьера и доставки ферментов-антиоксидантов в центральную нервную систему.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun A.Y., Yong-Mei Chen // J. Biomed. Sci. 1998. **5**. P. 401.
2. Abraham S., Soundararajan C.C., Vivekanadhan S., Behari M. // Indian J. Med. Res. 2005. **121**. P. 111.
3. McCord J.M., Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1969. **244**. P. 6049.
4. Zamocky M. // Eur. J. Biochem. 2004. **271**. P. 3297.
5. Gozalez-Polo R.A. // Cell. Biol. Int. 2004. **28**. P. 373.
6. Batrakova E.V., Li S., Reynolds A.D., Mosley R.L., Bronich T.K., Kabanov A.V., Gendelman H.E. // Bioconjugate Chem. 2007. **18**. P. 1498.
7. Beckman J.S., Minor R.L., White C.W., Repine J.E., Rosen G.M., Freeman B.A. // J. Biol. Chem. 1988. **263**. P. 6884.
8. Vinogradov S.V., Bronich T.K., Kabanov A.V. // Bioconjugate Chem. 1998. **9**. P. 805.
9. Sirsi S.R., Williams J., Lutz G.J. // Human Gene Therapy. 2005. **16**. P. 1.
10. Janknegt P., Rijstenbil J. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2007. **87**. P. 218.
11. Laemmli U.K. // Nature. 1970. **227**. P. 680.
12. Reddy M.K., Labhasetwar V. // FASEB J. 2009. **23**. P. 1384.
13. Simone E.A., Dziubla T.D., Arguiri E., Vardon V.V., Shuvaev V.V., Christofidou-Solomidou M., Muzykantov V.R. // Pharm. Res. 2009. **26**. P. 250.

Поступила в редакцию 20.01.10

### STABILIZATION OF ENZYMES-ANTIOXIDANTS BY COMPLEX- AND CONJUGATE FORMATION WITH BLOCK-COPOLYMERS: PROSPECTS TO CNS TREATMENT

S.V. Uglanova, M.V. Popov, V.S. Kurova, E.V. Batrakova, D. Manickam, A.V. Kabanov, N.L. Klyachko

(N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia; Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; Center for Drug Delivery and Nanomedicine, University of Nebraska Medical Center (UNMC), Omaha, Nebraska, USA)

**Nano-sized particles with radius of  $16 \pm 2$  nm based on complexes and conjugates of highly active superoxide dismutase and catalase with polyelectrolyte block copolymer poly(ethyleneimine)-poly(ethylene glycol) and similar bienzyme systems were obtained. Mass-spectrometry was used to confirm cross-linking of enzyme and block copolymer molecules in nanoparticles formed. Significant increase of SOD and catalase stability (up to 4 times) towards proteolytic degradation under chymotrypsin and trypsin action for 3 h at 37C was revealed when enzyme-containing nanoparticles were used for experiment. Antioxidant enzymes-containing polyelectrolyte nanoparticles are seemed to be prospect for BBB penetration and CNS drug delivery.**

**Key words:** antioxidant enzymes, superoxide dismutase and catalase bienzyme system, nanoparticles, neurodegenerative diseases, polyelectrolyte, enzyme stabilization.

**Сведения об авторах:** Углонова Светлана Вадимовна – аспирантка Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (suglanova@gmail.com); Попов Михаил Викторович – студент химического факультета МГУ; Курова Виктория Сергеевна – ст. науч. сотр. Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, канд. хим. наук; Батракова Елена Викторовна – профессор-исследователь Медицинского центра Университета Небраски (UNMC), канд. хим. наук; Д. Манихам – профессор Медицинского центра Университета Небраски (UNMC); Кabanov Александр Викторович – профессор Медицинского центра Университета Небраска (UNMC), докт. хим. наук; Клячко Наталья Львовна – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета (klyachko@enzyme.chem.msu.ru).