

УДК 577.112.6;577.112.3;577.15

## КОНЬЮГАТ ПОЛИАСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ГИСТИДИНОМ: ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КАК АНАЛОГА АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

© 2019 г. М. И. Камалов<sup>1</sup>, Г. Р. Садриева<sup>1</sup>, А. М. Павлюк<sup>1</sup>,  
Д. В. Салахиева<sup>1</sup>, Н. В. Петрова<sup>1</sup>, Т. И. Абдуллин<sup>1</sup>, \*, \*\*

<sup>1</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
Казань, 420008 Россия

\*e-mail: tabdulli@gmail.com

\*\*e-mail: timur.abdullin@kpfu.ru

Поступила в редакцию 31.10.2018 г.

После доработки 04.03.2019 г.

Принята к публикации 22.04.2019 г.

Полиаминокислоты – перспективная основа для создания биоактивных препаратов и переносчиков лекарственных средств. Методом жидкофазного синтеза получены и охарактеризованы в качестве потенциальных антиоксидантов полиаспарагиновые кислоты, а также их амидные конъюгаты с L-гистидином. Полиаспарагиновые (pAsp) кислоты не обладали радикал-связывающей и каталазной активностью в широком диапазоне концентраций. С использованием редокс-реакции генерации супероксид-аниона системой НАДН/метосульфат фенозин установлено, что конъюгаты с L-гистидином в концентрации  $\geq 100$  мкг/мл обладали супероксиддисмутазной (СОД) активностью, сходной с действием марганец-зависимой СОД-2. Показано, что L-гистидин в комбинации с ионами марганца и меди ускорял дисмутацию супероксид-аниона пропорционально концентрации аминокислоты, а конъюгаты с L-гистидином обладали СОД-подобной активностью без добавления кофактора. Конъюгаты с L-гистидином оказывали цитотоксическое действие по отношению к опухолевым клеткам линии РС-3 ( $IC_{50} \approx 0.8$  мг/мл, 72 ч) и модулировали жизнеспособность фибробластов кожи человека. Полученные результаты представляют интерес для создания терапевтических препаратов, имитирующих действие супероксиддисмутаз, а также синтетических аналогов других природных ферментов на основе производных pAsp.

**Ключевые слова:** синтетические пептиды, полиаспарагиновая кислота, биологически активные конъюгаты, гистидин, аналоги ферментов, супероксиддисмутазная активность

**DOI:** 10.1134/S0555109919050064

Полиаминокислоты (pAA) представляют интерес для создания биоактивных препаратов, систем доставки лекарств и биоматериалов. Они являются (со)полимерами, состоящими из одного или нескольких аминокислотных остатков и имеющими, как правило, нерегулярную (статистическую) первичную структуру [1]. Такие pAA, как поли( $\gamma$ -глутаминовая кислота) и поли( $\epsilon$ -лизин), могут секретироваться бактериями [2], однако, для получения их различных вариантов более широкое применение получили методы, основанные на химической полимеризации остатков аминокислот и их производных [3].

Важным преимуществом pAA по сравнению с химическими полимерными системами являются повышенная биосовместимость из-за биodeградируемости, малой токсичности (в том числе, продуктов деградации) и низкого уровня накоп-

ления в тканях [4]. Иммуногенные свойства гомополипептидов и сополимеров, содержащих менее 3 различных остатков аминокислот, выражены слабо, в отличие от полипептидов, состоящих из 4 и более различных мономерных единиц [5]. С учетом этой особенности был создан препарат глатирамера ацетат (Копаксон, “Teva”, Израиль), представляющий собой синтетический сополимер глутаминовой кислоты, лизина, аланина и тирозина (~6.4 кДа), близкий по составу к основному белку миеллина и предназначенный для лечения рассеянного склероза (за счет конкурентного связывания с аутоантителами к этому белку) [6].

Работы в области pAA посвящены созданию на их основе переносчиков низкомолекулярных лекарств и биопрепаратов *in vitro* и *in vivo* [1]. Разработаны системы доставки терапевтических биомолекул на основе плазмидной ДНК, ма-

лой интерферирующей РНК/микроРНК [7], а также белковых препаратов [5] с использованием катионных полипептидов, состоящих из остатков протеиногенных и непротеиногенных аминокислот. Примеры катионных рАА с доказанной способностью повышать биодоступность и терапевтическую эффективность биомакромолекул, включают полилизин и полиорнитин [8], полигистидин [9] и полиаргинин [10]. При этом полиаргинин проявляет активность, характерную для проникающих (в клетки) пептидов [10].

Катионные рАА электростатически взаимодействуют с анионными компонентами поверхности клеток бактерий и млекопитающих. Подобные взаимодействия могут быть использованы в антибактериальной терапии для направленного повреждения клеточной стенки бактерий [11], а также для повышения адгезии таких специализированных клеток млекопитающих, как нейроны, к поверхности биоматериалов и посуды для выращивания культур [12].

Наряду с катионными рАА, их такие анионные аналоги, как полиглутаминовые и полиаспарагиновые кислоты (**pAsp**), имеют различное биомедицинское применения. К синтезу и химической модификации последних используются разнообразные подходы, кроме того их получение относительно просто [4], что делает их весьма перспективной системой для создания функциональных полипептидов, с помощью которых можно решать медицинские и (био)технологические задачи. В частности, для получения эффективных трансфекционных агентов рAsp можно контролируемо катионизировать путем введения в полипептидный остов различных аминов [13]. Включение в состав рAsp дополнительных (био)химических групп позволяет модулировать их физико-химические свойства [14], а также придавать им биоадгезивную способность [15].

На основе рAsp разработаны лекарственные формы, содержащие ковалентно-связанные или инкапсулированные противоопухолевые антибиотики, обладающие улучшенными фармакокинетическими характеристиками [16, 17], а также стимул-чувствительные материалы в форме наноструктур и гидрогелей с рН-, термо- и редокс-чувствительными свойствами для пролонгированной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных средств [15, 18]. В результате модификации рAsp  $\gamma$ -аминомасляной кислотой получен биоактивный конъюгат, формирующий наночастицы и стимулирующий пролиферацию неонатальных фибробластов человека [19].

Перспективным и малоизученным подходом является создание на основе рAsp каталитически активных систем. Имеются свидетельства, что полипептиды на основе остатков алифатических аминокислот (лейцина, аланина, валина и др.)

катализируют асимметрическое эпоксирирование хальконоподобных соединений (реакция Жулиа-Колонна), что, предположительно, является одной из форм пребиотического катализа [20]. Модификация поли(L-лейцина) имидазольными группами позволила существенно повысить эффективность эпоксирирования  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов [21].

Наряду с остатком гистидина, остаток аспарагиновой кислоты наиболее часто встречается в составе активных центров ферментов. Можно предположить, что конъюгация рAsp с остатками аминокислот может служить основой создания каталитически активных систем, имитирующих свойства природных ферментов.

Цель работы – определение супероксиддисмутазной активности конъюгата рAsp с остатком гистидина и роль молекулярного окружения остатка гистидина в проявлении этой активности.

## МЕТОДИКА

В работе использовали L-аспарагиновую кислоту, L-гистидин, Fmoc-His(Trt)-OH, гексофторфосфат N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)урония (**HBTU**), триметилхлорсилан (**TMSCl**), дибутиламин (**DBA**), трифторуксусную и *o*-фосфорную кислоты (“Acros Organics”, США), триизопропилсилан (“NB TCI”, Япония) и смолу Ринка (“Biotage”, Швеция), а также метосульфат феназина (**PMS**) и никотинамидаденидинуклеотид (**НАДН**) (“Acros Organics”, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2H-тетразолиум, **MTS** (“Promega”, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (**MTT**), 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (**DPPH**), бычья супероксиддисмутазу 2 (**СОД-2**, КФ 1.15.1.1, 100 ед./мл) и каталазу печени (“Sigma-Aldrich”, США), молибдат аммония и пероксид водорода (“Реахим”, Россия), органические растворители (“Татхим-продукт”, Россия), реагенты и материалы для культивирования клеток (“ПанЭко”, Россия).

Полисукцинимиды синтезировали путем термической поликонденсации L-аспарагиновой кислоты (L-Asp) в присутствии *o*-фосфорной кислоты (2 : 1) в инертной атмосфере (N<sub>2</sub>) при 185°C. Реакцию проводили в течение 0.75, 1.5, 3 и 5 ч для получения полисукцинимидов (**pSI**) с различной молекулярной массой (**MM**). Продукты (pSI) растворяли в диметилформамиде (**DMFA**), осаждали добавлением воды, сушили и измельчали. Гидролизировали pSI в водном растворе с добавлением 1 M NaOH при перемешивании с последующим осаждением рAsp (натриевой соли) в метаноле. Выход рAsp составил 60–75%.

Среднечисловую MM различных pSI определяли методом вискозиметрии [13] с использова-

нием их растворов (10 мг/мл) в ДМФА с 0.1 М LiCl. Динамическую вязкость определяли на вискозиметре Штабингера SVM-3000 (“Anton Paar”, Австрия) с катящимся шариком при угле наклона 45°. Диаметры капилляра и шарика составляли 1.6 и 1.5 мм соответственно.

Метилловый эфир L-His синтезировали по стандартной методике [22]. В круглодонной колбе суспензировали L-His (10 ммоль) в метаноле и добавляли по дозам 20 ммоль TMSCl, смесь перемешивали в течение 24 ч. Продукт – дигидрохлорид метилового эфира L-His (**His-OMe**) – осаждали и промывали диэтиловым эфиром [22].

Структуру полученных веществ определяли методом ИК-Фурье спектроскопии в режиме неполного внутреннего отражения на спектрометре Frontier (“PerkinElmer”, США) в диапазоне 400–4000 см<sup>-1</sup> (разрешение 1 см<sup>-1</sup>, число сканов 10), а также <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии (400 МГц) на спектрометре AVANCE III 400 (“Bruker BioSpin”, США).

Для получения конъюгатов pAsp с L-His смешивали pSI (0.9 ммоль по сукцинимидным единицам) с His-OMe (0.09–0.54 ммоль) в ДМСО. Реакцию проводили в присутствии DBA в течение 48 ч при комнатной температуре (25°C), затем осаждали продукты этилацетатом, промывали метанолом и высушивали на ротационном испарителе. Далее продукты гидролизовали в щелочных условиях с образованием конъюгатов pAsp–His, которые выделяли аналогично pAsp. Выход pAsp–His составлял 50–76%.

Содержание L-His в конъюгатах определяли колориметрически с помощью реакции Паули [23]. Обработывали pAsp–His в течение 30 мин последовательно сульфаниловой кислотой (10 мг/мл), нитритом натрия (50 мг/мл), карбонатом натрия (75 мг/мл) и этанолом (20%). Оптическое поглощение раствора определяли на спектрофотометре Lambda 35 (“PerkinElmer”, США) при 498 нм. Степень модификации конъюгата pAsp–His рассчитывали по молярному соотношению мономерных единиц pAsp к присоединенным остаткам L-His.

Хроматографический анализ pAsp и pAsp–His проводили гель-фильтрацией на колонке Acclaim SEC-1000 (7 мкм, 1000 Å, 7.8 × 300 мм) на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (“Thermo Scientific”, США). Вещества элюировали 0.1 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> буфером, pH 7.0, в изократическом режиме при скорости потока 0.5 мл/мин и детектировали при 220 нм. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Chromeleon 6.80.

Трипептид L-His синтезировали методом твердофазного синтеза на микроволновом пептидном синтезаторе Initiator SP Wave (“Biotage”, США) согласно методике [24]. Использовали смолу Ринка и Fmoc-защищенный L-His. Для присоединения остатка аминокислоты использо-

вали 2.0 эквивалента Fmoc-His(Trt)-ОН (по отношению к смоле), 1.95 эквивалента активатора HBTU и 3 эквивалента диизопропилэтиламина в ДМФА. Депротекцию проводили в 20%-ном растворе пиперидина в ДМФА. Синтезированный трипептид в форме С-амида отщепляли от смолы в смеси 95% трифторуксусной кислоты, 2.5% воды и 2.5% триизопропилсилана в течение 2 ч и осаждали охлажденным диэтиловым эфиром. Осадок растворяли в воде и лиофильно высушивали.

В экспериментах *in vitro* использовали клетки аденокарциномы простаты человека (линия PC-3, ATCC), а также фибробласты кожи человека (HSF), выделенные как описано ранее [25]. Клетки культивировали в асептических условиях при 37°C в увлажненной воздушной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в питательной среде DMEM, содержавшей эмбриональную бычью сыворотку (10%), L-глутамин (2 мМ), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Для промывки и открепления клеток использовали сбалансированный солевой раствор Хэнкса и 0.25%-ный раствор трипсина с этилендиаминтетрауксусной кислотой соответственно.

Влияние pAsp–His на жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [25]. Конъюгат добавляли к клеткам двукратно на 1 и на 2 сут (с заменой питательной среды) в диапазоне концентраций от 1.0 до 2.0 мг/мл, общее время культивирования составило 72 ч. Жизнеспособные клетки детектировали с использованием 0.5 мг/мл индикатора МТТ. Продукт восстановления МТТ клетками растворяли в ДМСО и регистрировали на микропланшетном анализаторе Infinite M200 Pro (“TECAN”, Швейцария) при 555 нм. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали относительно контроля (необработанные клетки).

Радикал-связывающую активность pAsp и pAsp–His оценивали с помощью DPPH-теста, основанного на связывании хромогенного радикала DPPH, как было детализировано ранее [24]. Разложение пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) детектировали с помощью колориметрической реакции, основанной на образовании комплекса H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с молибдатом аммония [24]. Концентрацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли спектрофотометрически при 240 нм (ε = 43.6 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Вещества инкубировали с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 мМ) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли молибдат аммония (16.2 мМ). Оптическое поглощение раствора при 374 нм, пропорциональное содержанию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, детектировали на спектрофотометре Lambda 35 (“PerkinElmer”, США). В качестве положительного контроля использовали каталазу (1.64 ед./мл).

Супероксид-анион (СОА) генерировали в ФСБ, содержавшем 0.5 мМ НАДН и 0.17 мкМ

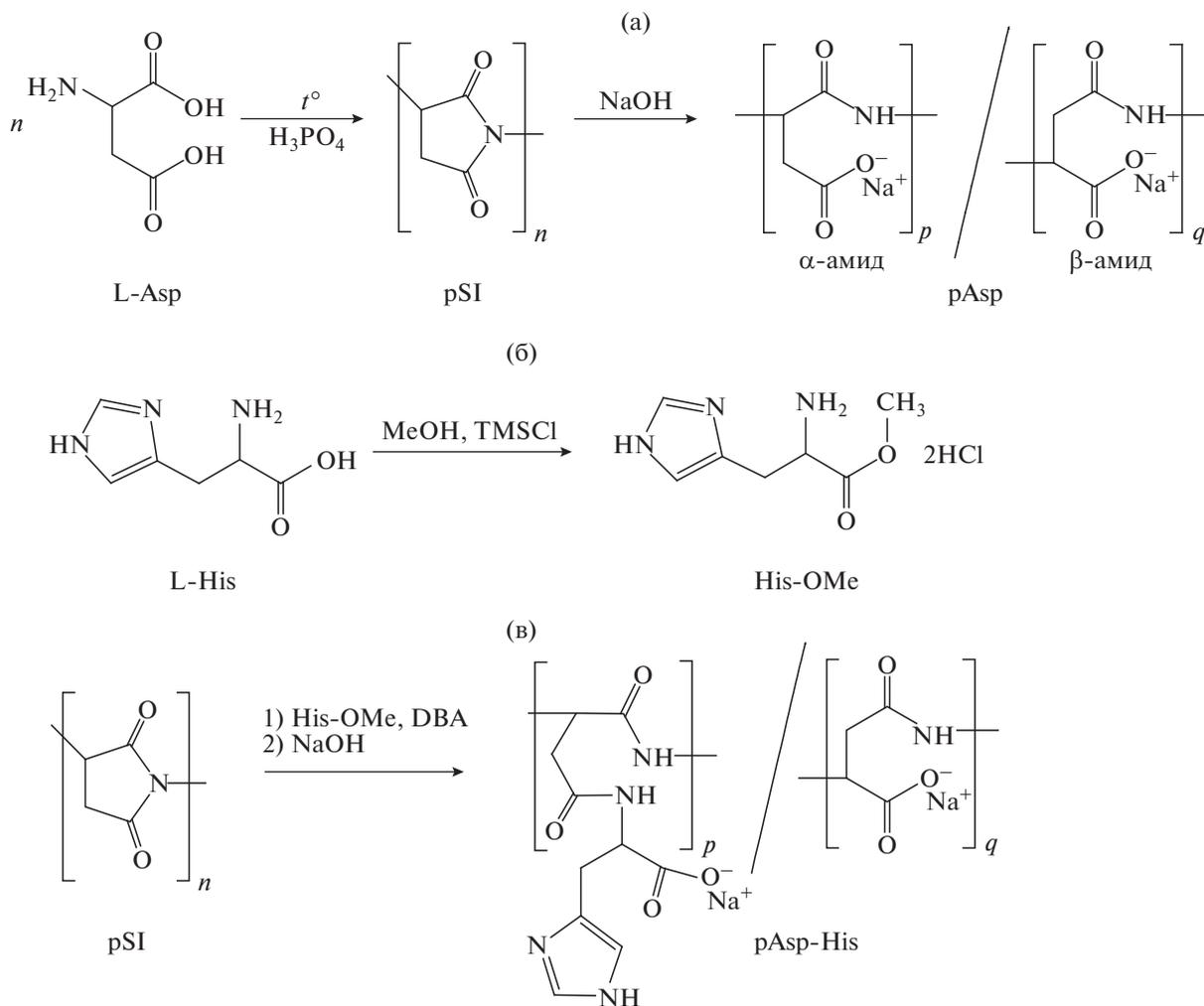


Рис. 1. Схемы получения полисукцинимида (pSI) и натриевой соли полиаспарагиновой кислоты (а), метилового эфира L-гистидина по реакции с триметилхлорсиланом (б) и конъюгата полиаспарагиновой кислоты с L-гистидином (в).

PMS, при 37°C. В качестве индикатора реакции использовали 2 мг/мл реагента MTS, восстанавливающегося с образованием окрашенного формазана, который детектировали при 490 нм. Оптический сигнал регистрировали в условиях максимальной скорости восстановления MTS. Анализ проводили в 96-луночном планшете на анализаторе Infinite M200 Pro ("TECAN", Швейцария). Для определения вклада СОА в восстановление индикатора в раствор вносили СОД-2 (10–100 ед./мл).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Синтез и характеристика полипептидов.** Для получения pAsp проводили термическую поликонденсацию L-Asp в атмосфере азота в присутствии кислотного катализатора ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Образующийся в реакции промежуточный продукт полисукцинимид (pSI) далее подвергали щелочному гидролизу с образованием pAsp (рис. 1а). Получен-

ная с помощью этого метода pAsp (натриевая соль) представляет собой статистический сополимер, состоящий из остатков различных изомеров Asp (L, D,  $\alpha$  и  $\beta$ ) [3].

По данным ИК-Фурье спектроскопии (рис. 2а) спектр pSI содержал характерную полосу при  $1704\text{ см}^{-1}$ , соответствующую  $\text{C}=\text{O}$  имидной группе, исчезающую после щелочного гидролиза. Спектр pAsp характеризовался наличием типичных для полипептидов полос при  $1600\text{ см}^{-1}$  (валентные колебания  $\text{C}=\text{O}$  амидной связи, амид I) и  $1520\text{ см}^{-1}$  (совместные деформационные колебания N–H и валентные колебания  $\text{C}-\text{N}$ , амид II) [14].

Варьирование условий и времени полимеризации позволяло получить pSI и pAsp с различной ММ. ММ полимеров оценивали методом вискозиметрии по характеристической вязкости pSI в ДМСО с использованием уравнения:  $[\eta] = KM^\alpha$ , где  $K = 1.32 \times 10^{-2}$ ,  $\alpha = 0.76$  для полисукцинимидов

[3]. Для различных pSI со временем полимеризации 0.75, 1.5, 3 и 5 ч средняя молекулярная масса составила 3, 4.1, 7.6 и 8.4 кДа (степень полимеризации ~30, 41, 77, 85) соответственно. Ожидаемые ММ различных pAsp составили 4.2, 5.7, 10.6 и 11.8 кДа. ИК-Фурье спектры изученных pSI (как и pAsp) были идентичны между собой (рис. 2а). Таким образом, повышение времени реакции не приводило к побочной модификации полимеров. Для дальнейшего изучения были выбраны pSI и pAsp с ММ 7.6 и 10.6 кДа соответственно, для которых степень полимеризации в условиях реакции выходила на предельные значения.

Для получения конъюгата pAsp с L-гистидином (L-His) аминокислоту предварительно модифицировали по стандартной реакции этерификации с триметилхлорсиланом (рис. 1б), характеризующейся мягкими условиями и незначительной рацемизацией [22]. Сшивку полученного продукта, метилового эфира L-His (His-OMe), с pSI проводили в ДМСО в присутствии DBA (рис. 1в). В результате аминолитического раскрытия сукцинимидных циклов с образованием амидной связи между боковой карбоксильной группой Asp и аминогруппой His-OMe. Для повышения степени модификации полисукцинимидного остова варьировали молярное отношение His-OMe и мономерных единиц pSI от 0.1 до 0.6. Для получения конъюгатов pAsp с гистидином (pAsp-His) выделенные конъюгаты pSI-His-OMe подвергали щелочному гидролизу для раскрытия не прореагировавших сукцинимидных циклов и удаления метильной группы с присоединенных остатков His-OMe.

Содержание L-His в конъюгатах определяли с помощью колориметрической реакции Паули с сульфаниловой кислотой, селективной к остаткам гистидина/тирозина в полипептидах [23], по калибровочному графику для гистидина. Обнаружено, что полученные конъюгаты pAsp-His характеризовались сходной степенью модификации  $1.4 \pm 0.5\%$ , которая почти не зависела от исходной концентрации His-OMe в реакционной смеси. Известно, что алифатические амины с первичными аминогруппами реагируют эквимольно с сукцинимидными единицами, образуя полностью замещенные полиаспартамиды [13]. В работе [19] эффективность модификации pAsp остатками алифатических аминокислот уменьшалась с 65 до 15% в ряду глицин, β-аланин, γ-аминомасляная кислота, α-аминокислоты, что отражало эффект пространственной доступности аминогруппы и размера молекулы. Можно предположить, что пониженная доступность α-аминогруппы L-His и большой размер этого аминокислотного остатка обуславливали низкую эффективность его присоединения к полисукцинимидному остову.

По результатам эксклюзионной ВЭЖХ в водном растворе конъюгат pAsp-His обладал значи-

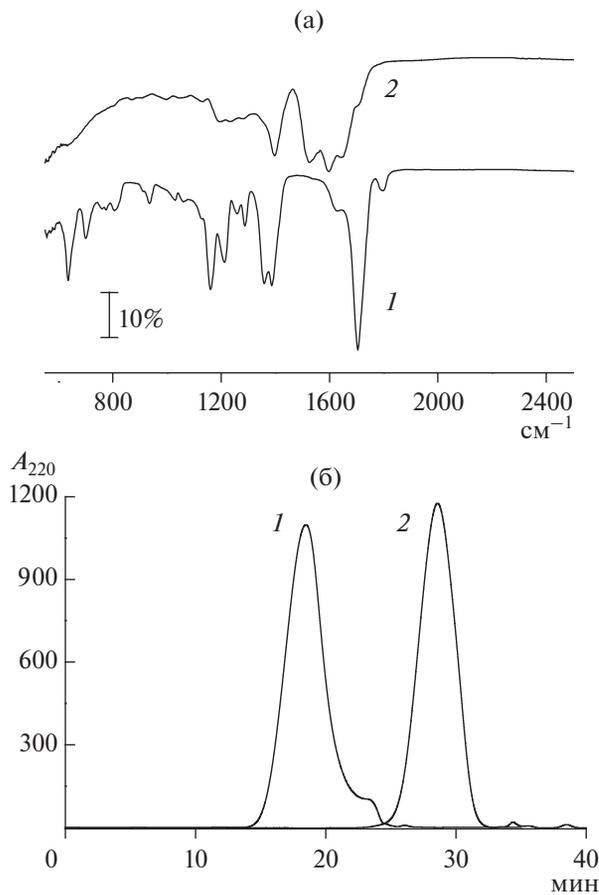


Рис. 2. Репрезентативные ИК-Фурье спектры (а) pSI (1) и pAsp (2) и эксклюзионные хроматограммы (б) конъюгата pAsp-His (2) и эквивалентной pAsp (10.6 кДа, 1). (Элюент 0.1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  буфер, pH 7.0, скорость потока 0.5 мл/мин).

тельно большим временем удерживания ( $t$ ), чем эквивалентная pAsp (рис. 2б). На основании зависимостей  $t$  и ММ различных pAsp установлено, что ММ pAsp-His составляла ~1.1 кДа, что свидетельствовало о частичном расщеплении полипептида в процессе модификации. Обнаружено, что, как pAsp-His, так и pAsp, подвергались постепенному гидролизу при инкубации в водных растворах (данные не показаны), поэтому для тестирования использовали свежеприготовленные растворы полимеров. Можно предположить, что расщепление синтезированных полипептидов, происходило вследствие автокаталитической реакции в водном растворе, механизм которой предполагается установить впоследствии.

**Антиоксидантная активность конъюгата pAsp-His и комплексов гистидина.** Принимая во внимание, что L-His и его производные входят в состав олигопептидов, выполняющих антиоксидантную функцию [26], было проведено сравнительное изучение способности конъюгата pAsp-His и

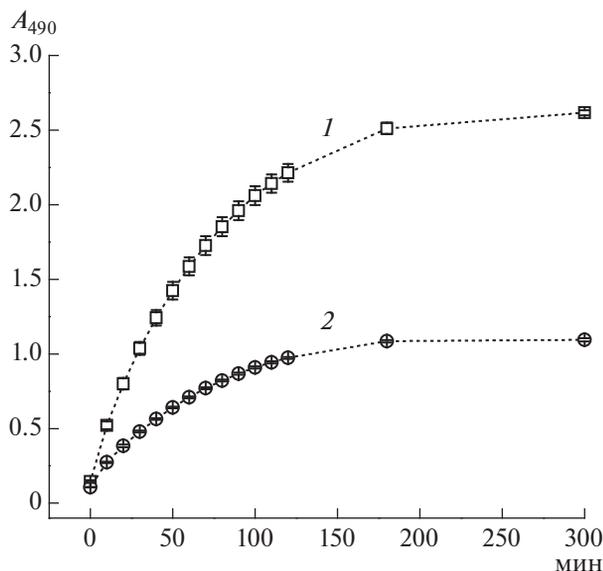


Рис. 3. Кинетика реакции восстановления MTS редокс-системой НАДН/PMS, сопровождающейся генерацией супероксид-аниона, без ингибиторов (1) и в присутствии СОД-2 (100 ед./мл, 2).

трипептида глутатиона инактивировать стабильный радикал DPPH и в качестве каталазы разлагать пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). Соответствующие тесты основаны на колориметрическом определении остаточной концентрации окрашенных индикаторов — DPPH-радикала [24] и молибденового комплекса с  $H_2O_2$  [24]. Установлено, что конъюгат pAsp-His, также как и не модифицированная pAsp не вызывали обесцвечивания раствора DPPH-радикала и не ускоряли разложение  $H_2O_2$  в широком (до 2 мг/мл) диапазоне концентраций (данные не показаны). Следовательно, изучаемые полипептиды в отличие от глутатиона ( $EC_{50} \approx 250 \mu M$  [24]) не проявляли выраженной радикал-связывающей способности, а также не обладали каталазной активностью.

Дополнительно изучено влияние конъюгата pAsp-His на образование радикала COA. Для генерации и детекции COA была оптимизирована редокс-реакция с участием НАДН, PMS и соли тетразолия, MTS. В этой реакции НАДН выступает донором электронов, которые передаются с помощью медиатора PMS на MTS с образованием окрашенного продукта его восстановления, формазана. Подобная реакция лежит в основе тестов на цитотоксичность с использованием тетразолиевых индикаторов, выявляющих восстановленные динуклеотиды НАД(Ф), содержание которых пропорционально количеству и метаболической активности клеток [25].

Как показано ранее [27], редокс-реакция ингибируется СОД, поскольку растворенный  $O_2$  вы-

ступает конкурентным акцептором электронов. Образующийся в результате его одноэлектронного восстановления COA, в свою очередь, реагирует с MTS или претерпевает дисмутацию с образованием  $H_2O_2$  и  $O_2$ . На рис. 3 показана типичная кинетическая кривая реакции восстановления MTS, которая частично ингибируется СОД-2 (пропорционально активности фермента в растворе).

Обнаружено, что конъюгат pAsp-His в концентрации  $\geq 100$  мкг/мл проявлял выраженную способность ингибировать восстановление MTS системой НАДН/PMS, сопоставимую с действием 100 ед./мл СОД-2 ( $\sim 20$  мкг/мл) (табл. 1). Исходные компоненты конъюгата (pAsp, L-His и их композиции) не влияли на протекание этой реакции даже в значительно более высоких концентрациях. В совокупности, полученные результаты свидетельствовали о том, что синтезированный конъюгат pAsp-His катализировал разложение COA вследствие СОД-подобной активности.

Следует отметить, что компоненты активных центров супероксиддисмутаза могут обладать супероксиддисмутазной активностью. Способность катализировать дисмутацию COA была, в частности, обнаружена в отсутствие пептидного компонента у солей марганца, а также комплексов гистидин-содержащих олигопептидов с медью и никелем [28]. Функция аминокислотных остатков активного центра СОД заключается, по-видимому, в усилении и регуляции каталитических свойств металлического кофактора (марганца, меди, никеля и железа) путем образования координационных связей с апоферментом [28].

В связи с этим было дополнительно изучено действие кофакторов  $Mn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$  на активность конъюгата pAsp-His и его компонентов (табл. 1 и 2). Эти ионы металлов ингибировали реакцию восстановления MTS пропорционально концентрации. Для обнаружения действия пептидных соединений была подобрана концентрация иона металла, вызывающая незначительное ингибирование (50 мкМ). Установлено, что добавление L-His, но не L-Asp, усиливало ингибирующий эффект  $Mn^{2+}$  пропорционально концентрации аминокислоты в миллимолярном диапазоне (табл. 2). Фактор ингибирования композиций  $Mn^{2+}$  с L-His (1 и 10 мМ) составил 1.3 и 5.8 раз соответственно.

Таким образом, полученные результаты показали, что входящий в активный центр многих ферментов остаток L-His оказался каталитически активным в супероксиддисмутазной реакции, усиливающим действием кофактора. Повышенные его концентрации, по-видимому, способствовали образованию координационного соединения с  $Mn^{2+}$ , который имитировал активный центр СОД-2. При этом синтетический трипептид L-His (ННН) в композиции с  $Mn^{2+}$  проявлял

**Таблица 1.** Влияние pAsp, pAsp–His и их комплексов с ионами металлов (50 мкМ) на сигнал восстановления MTS в условиях максимальной скорости реакции

№	Пептид	Ион металла	A <sub>490</sub>
1	pAsp, 200 мкг/мл	–	2.53 ± 0.01
2	pAsp, 200 мкг/мл	Mn <sup>+2</sup>	2.02 ± 0.04
3	pAsp, 200 мкг/мл	Cu <sup>+2</sup>	2.36 ± 0.01
4	pAsp–His, 100 мкг/мл	–	0.67 ± 0.01
5	pAsp–His, 100 мкг/мл	Mn <sup>+2</sup>	0.38 ± 0.01
6	pAsp–His, 100 мкг/мл	Cu <sup>+2</sup>	0.46 ± 0.01
7	Контроль (без эффекторов)		2.38 ± 0.02
8	Контроль (СОД-2)		0.73 ± 0.01

**Таблица 2.** Влияние гистидина, трипептида гистидина и их комплексов с ионами металлов (50 мкМ) на сигнал восстановления MTS в условиях максимальной скорости реакции

№	Пептид	Ион металла	A <sub>490</sub>
1	L-His, 10 мМ	–	2.39 ± 0.03
2	ННН, 200 мкг/мл	–	2.35 ± 0.02
3	L-His, 1 мМ	Mn <sup>+2</sup>	1.81 ± 0.06
4	L-His, 10 мМ	Mn <sup>+2</sup>	0.41 ± 0.03
5	ННН, 200 мкг/мл	Mn <sup>+2</sup>	0.15 ± 0.04
6	L-His, 10 мМ	Cu <sup>+2</sup>	2.26 ± 0.02
7	ННН, 200 мкг/мл	Cu <sup>+2</sup>	1.85 ± 0.38
8	Контроль (без эффекторов)		2.38 ± 0.02
9	Контроль (СОД-2)		0.73 ± 0.01

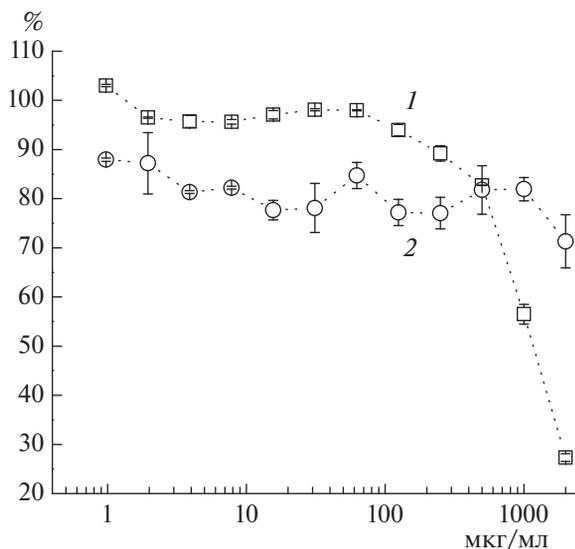
еще более высокую ингибирующую активность (15.9 раз) при концентрации 200 мкг/мл (~0.5 мМ), что можно объяснить эффектом пространственного сближения аминокислотных остатков в пептиде. Ионы меди заметно ингибировали изучаемую реакцию в 1.3 раза только в композиции с ННН (табл. 2).

Полученные результаты позволили раскрыть некоторые важные особенности проявления супероксиддисмутазной активности у соединений, содержащих остатки L-His. В отличие от L-His и его трипептида, действие конъюгата pAsp–His незначительно усиливалось ионами металлов (табл. 1), то есть для проявления активности pAsp–His не требовался ион металла в качестве кофактора. Можно предположить, что синтетическая pAsp создавала молекулярное окружение, способствующее в отсутствие редокс-активных металлов дисмутации СОА, катализируемой L-His. На возможность ускорения подобной реакции только пептидным компонентом указывает сохранение

остаточной супероксиддисмутазной активности у апофермента после удаления кофактора [28].

**Влияние конъюгата pAsp–His на жизнеспособность клеток.** Для выявления биоактивных свойств у конъюгата pAsp–His методом пролиферативного МТТ-теста изучено его влияние на жизнеспособность фибробластов кожи человека HSF и опухолевых клеток линии РС-3 (рис. 4). Обнаружено, что pAsp–His проявлял цитотоксический эффект по отношению к клеткам РС-3 (IC<sub>50</sub> = 782 ± 23 мкг/мл, 72 ч). При этом во всем изученном диапазоне концентраций конъюгат ингибировал жизнеспособность HSF сходным образом на 10–20% (рис. 4), что указывало на его модулирующее, а не цитотоксическое действие.

Известно, что опухолевые клетки обладают измененным метаболизмом, обуславливающим повышенное содержание АФК и чувствительность к веществам анти- и прооксидантного действия [29]. Можно предположить, что конъюгат pAsp–His смещал баланс в сторону образо-



**Рис. 4.** Зависимость жизнеспособности клеток (% от необработанных клеток, принятых за 100%) аденокарциномы простаты РС-3 (1) и фибробластов кожи человека (2) от концентрации конъюгата pAsp-His по данным МТТ-теста (72 ч).

вания из СОА более реакционноспособных АФК ( $H_2O_2$  и гидроксил-радикала), и поэтому оказывал более выраженное воздействие на опухолевые клетки, чем на условно нормальные HSF.

Полученные в работе результаты показали новые подходы к созданию каталитически активных производных pAsp и L-His, аналогов ферментов. Благодаря выявленной активности, конъюгат pAsp-His можно рассматривать в качестве прототипа макромолекулярного аналога СОД и возможной альтернативы рекомбинантным СОД [30] и их низкомолекулярным пептидомиметикам [31]. Эти препараты тестируются в качестве компонентов ряда терапевтических средств, обладающих цитопротекторным и противоопухолевым действием [30]. Преимущество предложенных аналогов СОД состоит в относительной простоте получения и модификации структуры, а также возможности их применения в отсутствие потенциально токсичных металлов переходной группы, участвующих в реакциях фентоновского окисления [24].

Таким образом, в работе получен и охарактеризован конъюгат полиаспарагиновой кислоты с L-гистидином. С использованием оптимизированного теста на супероксид-анион установлено, что разработанный конъюгат обладал активностью СОД, не требующей металлического кофактора. Показана роль молекулярного окружения остатка гистидина в проявлении этой активности. Выявлена повышенная цитотоксичность конъюгата к опухолевым клеткам по сравнению с нормальными фибробластами. Эти результаты могут

быть использованы для создания синтетических пептидных препаратов — аналогов природных супероксиддисмутаз.

Работа выполнена с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ.

Авторы благодарят сотрудника НИЛ “Реологические и термодимические исследования” КФУ И.Т. Ракипова за проведение вискозиметрических измерений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-34-00766), в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013–2020 гг.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lalatsa A., Schätzlein A.G., Mazza M., Le T.B.H., Uchegbu I.F. // *J. Control. Release*. 2012. V. 161. № 2. P. 523–536.
2. Kunioka M. // *Macromol. Biosci*. 2004. V. 4. № 3. P. 324–329.
3. Thombre S.M., Sarwade B.D. // *J. Macromol. Sci. A*. 2005. V. 42. № 9. P. 1299–1315.
4. Itaka K., Ishii T., Hasegawa Y., Kataoka K. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. № 13. P. 3707–3714.
5. Akagi T., Baba M., Akashi M. *Polymers in Nanomedicine* / Ed. S. Kunugi, T. Yamaoka. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 2012. P. 31–64.
6. Lalive P.H., Neuhaus O., Benkhoucha M., Burger D., Hohlfeld R., Zamvil S.S., Weber M.S. // *CNS Drugs*. 2011. V. 25. № 5. P. 401–414.
7. Hoyer J., Neundorff I. // *Acc. Chem. Res*. 2012. V. 45. № 7. P. 1048–1056.
8. Ramsay E., Gumbleton M. // *J. Drug. Target*. 2002. V. 10. № 1. P. 1–9.
9. Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J., Jaffres P.A. // *Brit. J. Pharmacol*. 2009. V. 157. № 2. P. 166–178.
10. Zhao Z.X., Gao S.Y., Wang J.C., Chen C.J., Zhao E.Y., Hou W.J., Feng Q., Gao L.Y., Liu X.Y., Zhang L.R. et al. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 28. P. 6793–6807.
11. Carvajal-Rondanelli P., Arostica M., Alvarez C.A., Ojeda C., Albericio F., Aguilar L.F., Marshall S.H., Guzman F. // *Amino Acids*. 2018. V. 50. № 5. P. 557–568.
12. Якунина Л.Д., Курбанов Р.А., Бондарь О.В., Абдуллин Т.И. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия (КТТИ)*. 2012. Т. VII. № 3. С. 173–176.
13. Salakhieva D., Shevchenko V., Németh C., Gyarmati B., Szilágyi A., Abdullin T. // *Int. J. Pharm*. 2017. V. 517. № 1. P. 234–246.
14. Németh C., Szabó D., Gyarmati B., Gerasimov A., Varfolomeev M., Abdullin T., László K., Szilágyi A. // *Eur. Polym. J*. 2017. V. 93. P. 805–814.
15. Lim S., Nguyen M.P., Choi Y., Kim J., Kim D. // *Bio-macromolecules*. 2017. V. 18. № 8. P. 2402–2409.

16. *Rivera-Rodríguez G.R., Alonso M.J., Torres D.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013. V. 85. № 3. P. 481–487.
17. *Lee M., Jeong J., Kim D.* // Biomacromolecules. 2015. V. 16. № 1. P. 136–144.
18. *Jang J., Cha C.* // Biomacromolecules. 2018. V. 19. № 2. P. 691–700.
19. *Kim J.-H., Son C.M., Jeon Y.S., Choe W.-S.* // J. Polym. Res. 2011. V. 18. № 5. P. 881–890.
20. *Carrea G., Colonna S., Kelly D.R., Lazcano A., Ottolina G., Roberts S.M.* // Trends Biotechnol. 2005. V. 23. № 10. P. 507–513.
21. *Qiu W., He L., Chen Q., Luo W., Yu Z., Yang F., Tang J.* // Tetrahedron Lett. 2009. V. 50. № 37. P. 5225–5227.
22. *Li J., Sha Y.* // Molecules. 2008. V. 13. № 5. P. 1111–1119.
23. B Laboratory Protocols in Applied Life Science / P.S. Bisen. Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014. 1826 p.
24. *Akhmadishina R.A., Garifullin R., Petrova N.V., Kamalov M.I., Abdullin T.I.* // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 115.
25. *Tsepaeva O.V., Nemtarev A.V., Abdullin T.I., Grigor'eva L.R., Kuznetsova E.V., Akhmadishina R.A., Ziganshina L.E., Cong H.H., Mironov V.F.* // J. Nat. Prod. 2017. V. 80. № 8. P. 2232–2239.
26. *Guiotto A, Calderan A, Ruzza P, Borin G.* // Curr. Med. Chem. 2005. V. 12. № 20. P. 2293–2315.
27. *Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S.* // Biotechnol. Annu. Rev. 2005. V. 11. P. 127–152.
28. *Barnese K., Gralla E.B., Valentine J.S., Cabelli D.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 18. P. 6892–6897.
29. *Liou G.-Y., Storz P.* // Free Radical Res. 2010. V. 44. № 5. P. 479–496.
30. *Carillon J., Rouanet J.M., Cristol J.P., Brion R.* // Pharm. Res. 2013. V. 30. № 11. P. 2718–2728.
31. *Salvemini D., Cuzzocrea S.* // Crit. Care Med. 2003. V. 31. № 1. P. S29–S38.

## Synthesis and Characterization of Polyaspartic Acid-Histidine Conjugate as an Analogue of Antioxidant Enzymes

**M. I. Kamalov<sup>a</sup>, G. R. Sadrieva<sup>a</sup>, A. M. Pavlyuk<sup>a</sup>, D. V. Salakhieva<sup>a</sup>, N. V. Petrova<sup>a</sup>, and T. I. Abdullin<sup>a,\*,\*\*</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, 420008 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: tabdulli@gmail.com*

<sup>\*\*</sup>*e-mail: timur.abdullin@kpfu.ru*

Received October 31, 2018; revised March 04, 2019; accepted April 22, 2019

Polyamino acids are versatile macromolecules with potential to be used as bioactive compounds and drug carriers. Polyaspartic acid (pAsp) and amide conjugate of pAsp with L-histidine (pAsp–His) were synthesized and their catalytic antioxidant properties were studied. pAsp–His did not exhibit the ability to decompose hydrogen peroxide. According to the redox reaction of generation of superoxide radical (SOR) by NADH/phenazine methosulfate, pAsp–His at a concentration of  $\geq 0.1$  mg/mL showed superoxide dismutase (SOD)-like activity similar to that of SOD-2 (100 U/mL). We showed that L-histidine in composition with manganese (II) and copper (II) ions catalyzed SOR dismutation in proportion to the amino acid concentration. SOD-like activity of pAsp–His was observed without addition of metal cofactors. The conjugate caused some cytotoxic effect towards cancer cells (PC-3 line,  $IC_{50} \approx 0.8$  мг/мл, 72 h) and modulated viability human skin fibroblasts. The results are of particular interest for the development of bioactive peptides, which mimic action of natural enzymes.

**Keywords:** synthetic peptides, polyaspartic acid, bioactive conjugates, histidine, enzyme analogues, superoxide dismutase