

Enzymes in oncohematology: relevant directions of experimental studies and prospects of clinical use

V.S. Pokrovskiy and Ye. M. Treshchalina

ABSTRACT

Recently, the field of development of the novel enzyme-based drugs showed remarkable advances. In addition to L-asparaginase which have been already used in oncohematology for more than 30 years, the two new enzymes, L-arginine deiminase and ranpirnase, underwent the several phases of clinical trials. Anticancer activity *in vivo* at the preclinical stage was shown for a number of enzymes: L-methionine-gamma-lyase, L-lysine-alpha-oxydase, and binase. This review discusses the enzymes which possess anticancer activity and prospects for their use in oncohematology.

Keywords: anticancer enzymes, L-asparaginase, L-methionine gamma-lyase, L-lysine alpha-oxydase, L-arginine deiminase, L-phenylalanine ammonia-lyase, ranpirnase.

Accepted November 12, 2013

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS
115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation

V.S. Pokrovskiy, PhD, Chief scientific worker, Laboratory of combined treatment of tumors

Ye. M. Treshchalina, DSci, Professor, Head of Laboratory of combined treatment of tumors

Correspondence should be sent to V.S. Pokrovskiy

115478, Kashirskoye shosse, d. 24, Moscow, Russian Federation
Tel.: +7 (499) 3241409, e-mail: vadimpokrovsky@gmail.com

Ферментные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения

В.С. Покровский, Е.М. Трещалина

РЕФЕРАТ

В последние годы в области разработки новых противоопухолевых препаратов на основе ферментов продемонстрированы существенные достижения. Помимо L-аспарагиназы, которая применяется в онкогематологии уже более 30 лет, два фермента — L-аргининдезимидаза и ранпирназа — прошли несколько этапов клинических исследований. Для целого ряда ферментов показана противоопухолевая активность на доклиническом этапе в экспериментах *in vivo*: L-метионин-гамма-лиаза, L-лизин-альфа-оксидаза, биназа. В настоящем обзоре представлены ферменты, продемонстрировавшие на различных этапах исследований противоопухолевую активность, и перспективы их использования в онкогематологии.

Ключевые слова:

противоопухолевые ферменты, L-аспарагиназа, L-метионин-гамма-лиаза, L-лизин-альфа-оксидаза, L-аргининдезимидаза, L-фенилаланин-аммиаклиаза, ранпирназа.

Принято в печать: 12 ноября 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря успехам биохимии и биотехнологии все более широкое применение в клинической медицине находят препараты с ферментативной активностью. Уже более 50 лет они используются для заместительной терапии при недостаточности поджелудочной железы, для ускорения заживления ран, в качестве тромболитических средств, а также для лечения злокачественных новообразований.

Первым бактериальным ферментом со специфическим действием на опухолевые клетки, нашедшим применение в клинической онкогематологии, стала L-аспарагиназа. В настоящее время с успехом используются для лечения больных острым лимфобластным лейкозом препараты нативной и иммобилизованной L-аспарагиназы из различных бак-

териальных источников (*Escherichia coli* и *Erwinia chrysanthemi*, пегилированная L-аспарагиназа *E. coli*). Помимо этого получены доказательства противоопухолевой активности и ряда других ферментов различного происхождения: пегилированной аргининдезимидазы, ранпирназы, L-метионин-гамма-лиазы и др. Таким образом, ряд белков с ферментативной активностью представляет большой интерес с точки зрения создания на их основе противоопухолевых препаратов, а исследования различных аспектов биохимических свойств и молекулярных механизмов действия кандидатов для клинического применения представляются актуальными.

В настоящем обзоре обобщены данные о противоопухолевых ферментах с доказанным противоопухолевым действием в отношении различных опухолей кроветворной и лимфоидной тканей.

ФЕРМЕНТЫ, РАЗРУШАЮЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Применение противоопухолевых ферментных препаратов, необратимо разрушающих определенные аминокислоты, основано на метаболической специфичности некоторых опухолевых клеток, характерная особенность которых заключается в отсутствии или низкой активности определенных синтетаз аминокислот. Среди представителей этого класса выделяются L-аспарагиназа, L-лизин-альфа-оксидаза, L-метионин-гамма-лиаза, L-аргининдезимидаза и др.

L-аспарагиназа (КФ 3.5.1.1)

История обнаружения противоопухолевых свойств L-аспарагиназы связана с именем J.G. Kidd, который в 1953 г. впервые обнаружил, что сыворотка морских свинок способна тормозить рост лимфомы Гарднера у мышей СЗН [1]. В 1961 г. J.D. Вгооте выделил из сыворотки морских свинок сам фермент и установил, что именно с ним связано ее противоопухолевое действие [2]. Впоследствии был доказан основной механизм противоопухолевого действия L-аспарагиназы, который заключается в остановке синтеза белка вследствие гидролиза аспарагина в плазме с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака (рис. 1). Наиболее чувствительными к аспарагиназе оказались лимфобласты, лишенные аспарагинсинтетазы и, соответственно, не способные, в отличие от здоровых клеток, к самостоятельному синтезу L-аспарагина.

В экспериментальных исследованиях 1970 г. была выявлена наиболее чувствительная опухоль мышей — лимфаденоз Фишера L5178Y. Эта модель стала сигнальной для первичной оценки противоопухолевого действия новых препаратов L-аспарагиназы *in vivo* [3]. Начиная с 70-х годов прошлого века и по настоящее время L-аспарагиназа *E. coli* (ЕсА) используется в составе схем комбинированной индукционной химиотерапии при острых лимфобластных лейкозах. В последние годы появились сообщения об ее эффективности при НК/Т-клеточных лимфомах, включая кожные [4–6].

Исследования последних лет направлены на уменьшение выявленных в ходе клинического применения недостатков существующих препаратов L-аспарагиназ: иммуногенности, отдельных побочных эффектов, а также предупреждение формирования лекарственной резистентности при повторном применении. С этой целью исследуют L-аспарагиназы из новых источников, а также модифицированные (конъюгированные с другими макромолекулами или мутантные) формы известных ферментов.

Минимизация L-глутаминазной активности L-аспарагиназ

Помимо расщепления L-аспарагина большинство L-аспарагиназ бактериального происхождения также способны к дезаминированию L-глутамина. При этом

многие авторы полагают, что именно с L-глутаминазой активностью связаны гепатотоксичность, нарушения свертываемости крови и нейротоксичность [7–10]. Это обусловлено тем, что в основном пути биосинтеза L-аспарагина в клетках млекопитающих (трансаминировании аспарагиновой кислоты аспарагинсинтетазой) донором амидной группы выступает L-глутамин [11]. Таким образом, снижение концентрации L-глутамина лишает нормальные клетки возможности избежать токсического действия фермента путем внутриклеточного синтеза L-аспарагина.

На культуре гепатоцитов крысы показано, что ЕсА вызывает угнетение синтеза белка, которое сопровождается пропорциональным снижением внутриклеточной концентрации L-глутамина [8]. В клинических исследованиях было установлено, что через 1 ч после внутривенного введения ЕсА больным острым лимфобластным лейкозом концентрация L-глутамина плазмы уменьшалась до 5 % от исходного значения. Это позволило ряду авторов предположить, что угнетение синтетической функции печени коррелирует с L-глутаминазой активностью [7]. Эту гипотезу подтверждают результаты доклинического изучения L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, лишенной L-глутаминазой активности, которая продемонстрировала, в отличие от ЕсА, отсутствие гепатотоксичности или иммуносупрессивного эффекта *in vivo* [12, 13]. Позднее было установлено, что ЕсА угнетает синтез белка в печени путем фосфорилирования трансляционного фактора eIF2 [10].

Существуют предположения, что нейротоксичность препаратов L-аспарагиназ, также как и гепатотоксичность, зависит от L-глутаминазой активности. Они основаны на том, что дезаминирование L-глутамина приводит к образованию L-глутаминовой кислоты, повышенная концентрация которой может оказывать угнетающее воздействие на ЦНС [14, 15]. Показано, что через 24 ч после введения ЕсА мышам концентрация глутаминовой кислоты в плазме может возрастать в 6 раз [16]. Эти предположения подтверждаются результатами I фазы клинического исследования фермента из *Acinetobacter*, обладающего высокой L-глутаминазой активностью: нейротоксичность аспарагиназы-глутаминазы *Acinetobacter* проявляется выраженным угнетением ЦНС вплоть до комы с летальным исходом и является дозолимитирующей [9]. В качестве альтернативной причины нейротоксичности L-аспарагиназ рассматривается повышение концентрации аммиака в плазме [15, 17]. Так, концентрация аммиака в сыворотке увеличивается в течение 1-го дня после введения ЕсА до уровня, в 7 раз превышающего исходный, после чего в течение 2 дней полностью нормализуется, что соответствует длительности циркуляции ЕсА [17, 18].

Попытки уменьшить L-глутаминазную активность препаратов L-аспарагиназ традиционно предпринима-

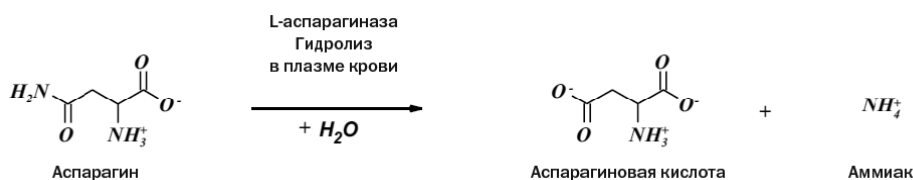


Рис. 1. Реакция ферментативного расщепления L-аспарагина

ются двумя путями. Первый из них предполагает поиск аспарагиназ с низкой L-глутаминазой активностью из других источников и детальное изучение их биохимических и биологических свойств. Например, практически отсутствует L-глутаминазная активность у L-аспарагиназ *Wolinella succinogenes* и *Helicobacter pylori* [13, 19, 20].

Второй подход — модификация уже изученных ферментов; замена аминокислотных остатков фермента, определяющих субстратную специфичность. В частности, к избирательному снижению L-глутаминазой активности ЕсА приводит замена Asp²⁴⁸ [21]. Путем направленного мутагенеза были получены гены, кодирующие ЕсА с различными заменами Asp²⁴⁸, которые в составе вектора рТ7-7 использовались при трансформации штамма *E. coli* CU1783. Из полученных рекомбинантных ферментов наиболее перспективным оказался белок с заменой Asp²⁴⁸Ala: константа скорости ферментативной реакции k_{cat} в отношении L-глутаминна по сравнению с природным ферментом снижалась с $3,3 \times 10^{-1}$ до $2,9 \times 10^{-3}$, снижение k_{cat} в отношении L-аспарагина было значительно менее выраженным [21].

Однако помимо увеличения токсичности L-глутаминазная активность ЕсА вносит существенный вклад в реализацию ее противоопухолевого действия. Так, существуют данные о том, что дезаминирование L-глутаминна дополнительно снижает концентрацию L-аспарагина в плазме и отчасти предопределяет эффективность лечения [22–24]. Это предположение подкрепляется исследованиями *in vitro*, показавшими, что целенаправленное угнетение активности глутаминсинтетазы повышает цитотоксический эффект ЕсА [25, 26].

Снижение иммуногенности L-аспарагиназ

Наиболее хорошо изучены следующие способы:

- химическая модификация молекулы белка;
- иммобилизация на водорастворимых полимерах;
- создание липосомальной лекарственной формы.

«Закрытие» поверхности белка затрудняет процесс распознавания антигена и презентации макрофагами его фрагментов Т-хелперам, что определяет снижение иммуногенности. В настоящее время существуют различные методы модификации белковых препаратов, одним из наиболее эффективных считается химическая модификация белка полиэтиленгликолем (ПЭГ). Так, пегилирование ЕсА существенно увеличивает продолжительность ее циркуляции в кровотоке: период полувыведения увеличивается с $1,24 \pm 0,17$ до $5,73 \pm 3,24$ дня [27, 28]. Однако при развитии аллергической реакции на нативную ЕсА период полувыведения как нативной, так и пегилированной L-аспарагиназы существенно сокращается, что объясняется идентичными антигенными свойствами указанных ферментов [29].

Пегилирование позволяет частично решить только одну проблему, связанную с применением L-аспарагиназы, — уменьшить интенсивность иммунного ответа. При этом на частоту развития и выраженность других побочных эффектов пегилирование не влияет [23]. Так, сравнительное исследование нативной и пегилированной ЕсА у детей с острым лимфобластным лейкозом показало, что при применении последней панкреатит развивается у 18% больных, что статистически значимо

выше, чем после введения нативной ЕсА [30]. Как нативная, так и пегилированная ЕсА *in vivo* вызывают иммуносупрессию [12].

Помимо ЕсА получена также пегилированная L-аспарагиназа *Erw. carotovora* (ЕгА) с использованием в качестве модифицирующего реагента метоксиполиэтиленгликоль-*p*-нитрофенилкарбоната с молекулярной массой 5000 Да [31]. Наряду с пониженной иммуногенностью пегилированная ЕгА более стабильна при протеолизе трипсином и трипсиноподобными протеазами плазмы, а также при воздействии повышенной температуры по сравнению с нативным ферментом. Кроме того, на культурах клеток лейкозов Molt-4 и Raji для модифицированной L-аспарагиназы показана более высокая цитостатическая активность, что, вероятно, объясняется ее более медленным разрушением [31].

Помимо пегилирования к снижению иммуногенности приводят инкапсулирование L-аспарагиназы в липосомы диаметром 158–180 нм [32], иммобилизация на гидрогеле ПЭГ-альбумина [33], инкапсулирование фермента в поли(лактид-ко-гликолид) наночастицы [34], химическая модификация L-аспарагиназы N₂O-карбоксиметилхитозаном в присутствии L-аспарагиновой кислоты [35]. Период полувыведения из плазмы макак-резус поли-DL-аланил-модифицированной L-аспарагиназы *Erw. carotovora* более чем в 100 раз больше, чем у нативного фермента [36]. Инкапсулирование в липосомы конъюгатов пальмитоил-L-аспарагиназы увеличивает период их полувыведения более чем в 8 раз [37]. Для уменьшения иммуногенности L-аспарагиназ и увеличения времени их циркуляции в крови путем «закрытия» поверхности белка от иммунокомпетентных клеток и протеолитических ферментов можно также использовать другие рекомбинантные белки, обладающие низкой токсичностью и иммуногенностью, например, различные белки шелка [38–40]. Среди изучаемых в настоящее время перспективных способов снижения иммуногенности можно отметить и инкапсуляцию фермента в эритроциты *in vitro* [41].

Другой возможный подход к снижению иммуногенности — эпитопное картирование антигенных детерминант L-аспарагиназ и получение мутантных ферментов со сниженной иммуногенностью. Так, показано, что для ЕгА основным антигенным эпитопом служит участок ²⁸²GIVPPDEELP²⁸⁷, а замена Pro²⁸⁵ на Thr²⁸⁵ снижает иммуногенность фермента в 8 раз [42].

Третьим возможным способом решения этой проблемы может быть последовательное применение L-аспарагиназ с различными антигенными свойствами. В частности, показано, что антитела к ЕсА не вызывают разрушение ЕгА, и это позволяет применять ее с эффектом у больных с исчерпанными возможностями [43–45]. Применение L-аспарагиназ, не инактивирующихся антителами к ЕсА и ЕгА, может оказаться эффективным при выработке иммунной резистентности к ЕсА и ЕгА после многократных курсов химиотерапии. Экспериментально доказано, что отличными от ЕсА иммуногенными свойствами обладают L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes* и *Helicobacter pylori* [19, 46].

Изучение L-аспарагиназ из других источников

Для понимания причин токсического действия и расширения показаний к применению препаратов

L-аспарагиназ ценную информацию может дать детальное сравнительное изучение ферментов различного происхождения и последующее сопоставление их биохимических свойств и биологических эффектов. Эффективность в отношении лейкозных клеток *in vitro* или *in vivo* была обнаружена у ряда бактериальных L-аспарагиназ II типа (периплазматических): *Wollinella succinogenes*, *Thermus thermophilus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Erwinia aroidea*, *Aspergillus terreus*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Yersinia pseudotuberculosis* [19, 20, 47–52]. В 2012 г. было установлено наличие противоопухолевой активности и у бактериальной L-аспарагиназы I типа (внутриклеточной) *Rhodospirillum rubrum*, которая продемонстрировала эффект на ряде культур клеток опухолей человека *in vitro* и на модели лимфаденоза Фишера *in vivo* [53]. Успешно проведены клинические исследования L-аспарагиназы *Erw. chrysanthemi*, которая в отличие от L-аспарагиназы *E. coli* не снижает уровень антитромбина, α_2 -антиплазмина и плазминогена в плазме и, следовательно, не повышает риск тромбообразования [54, 55].

Аналогичные данные получены *in vivo* для EгА [56]. В III фазе сравнительного изучения ЕсА и ЕгА у детей, больных острым лимфобластным лейкозом ($n = 702$), показано, что при одинаковых дозах ($10\ 000\ \text{МЕ}/\text{м}^2$ 2 раза в неделю в течение 4 нед.) нарушения свертываемости крови наблюдались значительно чаще при применении ЕсА (30,2 и 11,8 % соответственно; $p < 0,0001$), а выраженность и частота развития других побочных эффектов существенно не отличались [55]. При этом как непосредственная эффективность лечения (частота ремиссий), так и отдаленные результаты (риск рецидива, бессобытийная и общая выживаемость) при применении ЕгА были статистически значимо хуже [55]. По данным другого масштабного ($n = 758$), но не рандомизированного исследования, применение ЕгА также реже осложняется панкреатитом и нейротоксичностью [57].

В то же время ЕгА относится к L-аспарагиназам с относительно высокой L-глутаминазой активностью, которая достигает 10–15 % от L-аспарагиназной и значительно выше, чем L-глутаминазная активность ЕсА (составляет около 2 % от L-аспарагиназной) [54, 55, 58]. Этот факт позволяет усомниться в прямой зависимости выраженности токсического действия L-аспарагиназ от их L-глутаминазной активности и предположить наличие других факторов, влияющих на переносимость лечения. С другой стороны, меньшая токсичность, как и более низкая, чем у ЕсА, эффективность лечения, может быть связана с меньшим периодом полувыведения ЕгА из кровотока (0,65 дня для ЕгА и 1,24 дня для ЕсА) [28].

Таким образом, детальное изучение физико-химических свойств L-аспарагиназ и молекулярных механизмов нарушения внутриклеточных путей передачи сигнала может позволить выявить новые пути реализации токсического действия и возможности его снижения. Все это может служить основанием для разработки новых L-аспарагиназ в онкогематологии.

L-аргининдезими́наза (КФ 3.5.3.6)

Появление в середине 1940-х годов интереса к антипролиферативным свойствам L-аргиназы и L-аргининдезими́назы (ADI) — ферментов, катализирующих разрушение аргинина, было обусловлено обна-

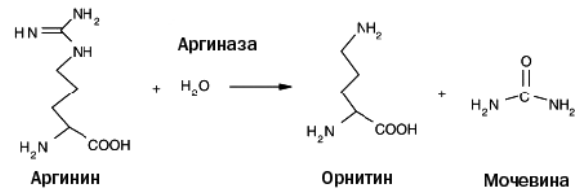


Рис. 2. Реакция ферментативного расщепления аргинина при участии L-аргиназы

ружением стимулирующего действия аргинина на митотическую активность клеток карциномы 63 мышей и его участие в синтезе креатинина у крыс с саркомой Йенсена [59, 60]. Кроме того, в работах начала 1970-х годов было показано, что аргинин необходим для выживания клеток лимфомы Беркитта и моделей лимфом у мышей [61, 62].

Исторически первой была изучена аргиназа (катализирует расщепление аргинина на орнитин и мочеви́ну) (рис. 2). Как и для L-аспарагиназ, была создана пегилированная рекомбинантная аргиназа, которая эффективно ингибировала рост гепатоцеллюлярного рака *in vitro* и *in vivo* [63]. Обе формы аргиназы, нативная и пегилированная, угнетали пролиферацию клеток лимфаденоза Фишера, но были неэффективны на этой модели *in vivo* [64]. Рекомбинантная пегилированная аргиназа продемонстрировала лишь способность модифицировать противоопухолевый эффект цитарабина на ксенографтах (экспериментальных онкологических моделях, при которых используются привитые мышам опухоли человека) Т-клеточного лейкоза человека [65]. В последние годы опубликованы данные о высокой цитотоксичности рекомбинантной аргиназы человеческого происхождения в отношении клеток рака простаты [66].

Преимущества ADI (катализирует расщепление аргинина до цитруллина и аммиака) по сравнению с аргиназой определяются отсутствием мочевины среди продуктов реакции и большей ферментативной активностью при физиологических значениях pH и температуры (рис. 3). Впервые ADI была выделена в 1970-е годы из клеток *Pseudomonas putida* [67]. Позднее аналогичный фермент был получен из *Mycoplasma arginini* и оказался эффективным *in vivo* на модели гепатомы МН134 и других опухолях животных [68]. Помимо противоопухолевого эффекта для рекомбинантной ADI *Mycoplasma arginini* в экспериментах на культуре эндотелиальных клеток и в опытах *in vivo* с матригелем показано антиангиогенное действие [69]. Характеризуется противоопухолевым эффектом также и рекомбинантная ADI из *Pseudomonas plecoglossicida* [70].

Пегилированная ADI *Mycoplasma hominis* ADI-SS PEG_{20 000} оказалась эффективной на различных моделях меланомы и гепатоцеллюлярного рака *in vitro* и *in vivo* [71]. На культурах опухолевых клеток лимфоидного происхождения ADI продемонстрировала существенно более высокий эффект по сравнению с миелоидными клетками [72]. На культуре клеток Т-лимфобластного лейкоза CCRF-CEM также показан синергизм действия пегилированной ADI с глюкокортикоидами [73].

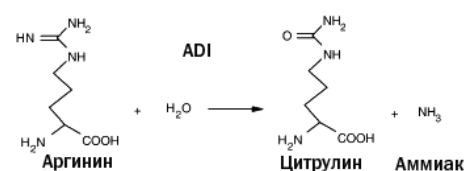


Рис. 3. Реакция ферментативного расщепления аргинина при участии L-аргининдезими́назы

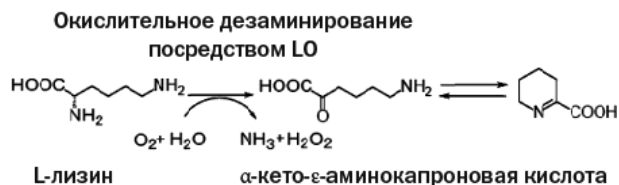


Рис. 5. Реакция ферментативного расщепления лизина при участии L-лизин-альфа-оксидазы

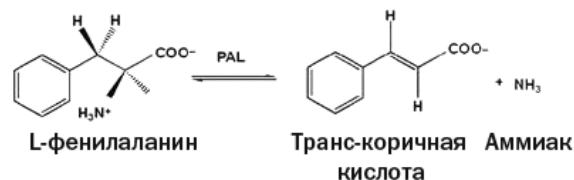


Рис. 6. Реакция ферментативного расщепления фенилаланина

увеличить в 20 раз период полувыведения фермента из плазмы и существенно снизить его иммуногенность [112]. Разработка новых лекарственных форм доставки с использованием катионных липосом, конъюгированных с анти-CAGE одноцепочечным фрагментом антител scFV, может повысить эффективность проникновения фермента внутрь клеток. Однако клиническое значение этого феномена пока остается неясным [113].

L-лизин-альфа-оксидаза (КФ 1.4.3.14)

L-лизин-альфа-оксидаза (LO) — дезаминаза незаменимой L-аминокислоты — L-лизина. Интенсивное изучение противоопухолевых свойств фермента началось в 1980–1984 гг. после выделения из клеток грибов *Trichoderma viride* Y244-2 (Япония) и *Trichoderma harzianum* Rifai (СССР) [114, 115]. Было известно, что LO подвергает окислительному дезаминированию L-лизин с образованием пероксида водорода и α-кето-ε-аминокапроновой кислоты (рис. 5). Соответственно механизм антипролиферативного действия объясняли уменьшением снабжения опухолевых клеток L-лизином, который служит составной частью гистоновых белков и участвует не только в формировании хроматина, но и в тонких механизмах передачи наследственной информации [53]. Позже было установлено, что цитотоксический эффект фермента также связан с накоплением пероксида водорода, повреждающего молекулы ДНК [115]. Кроме того, в культуре клеток лимфомы Беркитта (P3HRj) показано, что фермент блокирует переход клеток из фазы S в G₂/M клеточного цикла [116].

LO *Trichoderma harzianum* Rifai изучена на широкой панели опухолевых моделей *in vivo*. В отличие от L-аспарагиназы она обладает существенно более широким спектром противоопухолевой активности и проявляет эффективность в отношении гематологических (L1210, P388, La), а также ряда солидных опухолей [3]. В то же время на высокочувствительном к L-аспарагиназам лимфаденозе Фишера L5178Y LO оказалась совершенно неактивной. Токсикологическое изучение показало, что LO обладает большим терапевтическим диапазоном, что позволяет варьировать величину эффективной дозы в 10 раз без опасности токсичности [3]. Фермент имеет слабый аллергенный потенциал, практически не включает гуморальный иммунный ответ на белковые антигены и не меняет функциональную активность Т-лимфоцитов [3].

Для облегчения доставки LO к клеткам-мишеням были разработаны методы получения конъюгатов с антителами, в т. ч. с моноклональными IC0-80, к рецептору CD5 [53, 117, 118]. Связывание моноклональных антител с ферментом не изменило их специфичности в отношении рецептора CD5 на поверхности клеток Jurkat при незначительном снижении цитотоксичности химерного белка по сравнению с нативным ферментом [118].

L-фенилаланин-аммиак-лиаза (КФ 4.3.1.24)

L-фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL) катализируют превращение L-фенилаланина в транс-коричную кислоту и аммиак (рис. 6) [119]. PAL выделены из различных штаммов грибов и бактериальных источников и изучены прежде всего в качестве средств для заместительной терапии фенилкетонурии [120–123]. В экспериментальных онкогематологических исследованиях показана эффективность PAL в отношении лимфаденоза Фишера L5178Y *in vitro* и *in vivo*, где достигнуто излечение около 40 % мышей [124, 125]. Как и для других ферментов, разрушающих аминокислоты, считается, что механизм противоопухолевого действия PAL связан с уменьшением концентрации L-фенилаланина [126].

РИБОНУКЛЕАЗЫ

Антипролиферативные свойства рибонуклеаз панкреатического типа впервые были описаны в начале 1950-х годов, когда *in vitro* и *in vivo* был выявлен противоопухолевый эффект РНКазы А. В частности, панкреатическая РНКаза при внутрибрюшинном введении на 30–50 % увеличивала продолжительность жизни мышей с асцитной карциномой Эрлиха или саркомой Уокера 256 [127]. Антипролиферативное действие рибонуклеаз связывают с регуляцией РНК-зависимых механизмов клеточной пролиферации и апоптоза, а также их взаимодействием с Ca²⁺-активируемыми калиевыми каналами [128].

Ранпирназа (онконаза)

Изучение ранпирназы как противоопухолевого фермента началось во второй половине 1980-х годов с выделения из ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens* белка Р-30, обладающего цитостатической активностью *in vitro* [129]. Ранпирназа принадлежит к суперсемейству рибонуклеаз панкреатического типа, активных в отношении высокомолекулярной РНК [130]. Механизм антипролиферативного действия фермента объясняется разрушением фосфодиэфирных связей рибосомной РНК, которое приводит к угнетению синтеза белка опухолевыми клетками [131]. Ранпирназа угнетает синтез циклина D3 и стимулирует p27KIP1, p16INK_A и p21WAF1/CIP1, что препятствует фосфорилированию pRb в фазе G₀–G₁ и приводит к остановке клеточного цикла в сверхочной точке, контролируемой циклином D и циклинзависимыми киназами Cdk4/6 [132]. Существуют также данные о том, что фермент потенцирует действие фактора некроза опухолей α на опухолевые клетки и вызывает апоптоз [133].

В 1990 г. была установлена противоопухолевая активность ранпирназы *in vivo* на ксенографтах рака поджелудочной железы ASPC-1 и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) A549 у бестимусных мышей [134, 135]. В конце 1990-х годов были созданы рекомбинантные

штаммы *E. coli*, позволяющие существенно облегчить получение фермента [136, 137]. Среди опухолей кровяной и лимфоидной тканей к ранпирназе оказались чувствительны клетки промиелоцитарного лейкоза HL-60, лимфомы U937 и множественной миеломы RPMI-8228 [138].

В 2002 г. были опубликованы результаты II фазы клинического исследования ранпирназы у 105 пациентов с мезотелиомой плевры, практически нечувствительной к стандартной химиотерапии (в 77 % случаев был зарегистрирован объективный эффект, прогностически значимый для выживаемости). Положительные результаты были зарегистрированы также при раке молочной железы, почки и НМРЛ [139, 140]. В III фазе изучения показано, что эффективность ранпирназы в монорежиме при мезотелиоме плевры сопоставима со стандартом лечения доксорубицином, а их комбинация превосходит по эффективности результаты монокимиотерапии [141]. Применение ранпирназы не сопровождается гематологической, кардио- или гепатотоксичностью, а также мукозитами.

В последние годы опубликованы результаты изучения *in vitro* и *in vivo* конъюгата ранпирназы с иммунотоксином 2L-Rap-hLL1-γ4P, состоящего из двух молекул ранпирназы, конъюгированных с N-концом легкой цепи hLL1 антитела к CD74. Применение конъюгата у мышей с ксенографтами лимфомы Беркитта CD74⁺ Raji и Daudi продемонстрировало возможность излечения у большинства животных [142]. Многообещающие результаты были получены на тех же моделях для конъюгатов ранпирназы с моноклональными антителами к CD22. Так, продолжительность жизни мышей с диссеминированной лимфомой Daudi (после внутривенной трансплантации опухолевых клеток) увеличивалась в 1,3 раза (на 135 %) [143].

Амфиназа

Аналог ранпирназы, выделена из ооцитов *Rana pipiens*. Антипролиферативная активность фермента показана на культурах клеток лейкозов человека — промиелоцитарного HL60, Т-клеточного Jurkat и моноцитарного U937. В сравнении с ранпирназой при эквивалентных концентрациях амфиназа оказалась более активной [144].

Биназа

Биназа — секретлируемая микробная рибонуклеаза *Bacillus intermedius*, которая принадлежит к семейству рибонуклеаз N₁/T₁ и обладает эндонуклеазной активностью в отношении гидролиза РНК и динуклеозидфосфатов. Биназа оказывает цитотоксическое действие на фибробласты, трансформированные онкогенами *ras*, *fms*, *src*, *AML* и *AML/ETO* [128, 145]. На культуре клеток острого миелобластного лейкоза Kasumi-1 продемонстрирован выраженный проапоптотический эффект биназы, сопровождающийся усилением экспрессии целого ряда проапоптотических генов [146]. Возможным маркером прогноза чувствительности клеток гематологических опухолей к биназе может служить экспрессия онкогенов *KIT* и *AML1-ETO* [147].

две группы, различающиеся по особенностям механизма антипролиферативного действия:

1) ферменты, расщепляющие аминокислоты, необходимые для роста опухолевых клеток;

2) ферменты, разрушающие РНК опухолевых клеток.

Ферменты первой группы вызывают регрессию опухоли, препятствуя поступлению в опухолевые клетки питательных веществ извне. Это принципиально отличает их от большинства других современных противоопухолевых препаратов, которым для реализации эффектов необходим либо непосредственный контакт с мембранными белками, либо проникновение внутрь клетки. Рибонуклеазы, напротив, действуют непосредственно на внутриклеточно локализованные нуклеиновые кислоты, аналогично «классическим» цитостатическим средствам: антимаболитам, алкилирующим агентам, ингибиторам топоизомераз и др.

Анализ биохимических свойств и основных фармакологических эффектов позволил выявить ряд существенных преимуществ описанных выше противоопухолевых ферментов по сравнению с классическими цитостатическими препаратами. Очевидно, что ферменты с антипролиферативной активностью:

- обладают оригинальным механизмом действия и относительно высокой специфичностью по отношению к конкретному молекулярному субстрату;
- могут иметь биологические маркеры, позволяющие прогнозировать их клиническую эффективность (например, отсутствие аргининосукцинатсинтетазы в опухолевых клетках);
- не имеют традиционных для классических цитостатических препаратов лимитирующих побочных эффектов (например, выраженной миелосупрессии), что позволяет включать их в многокомпонентные схемы высокодозной комбинированной химиотерапии.

Помимо преимуществ описанных ферментных препаратов следует, однако, указать и ряд недостатков самих ферментов и технологий их получения. Во-первых, экзогенные ферменты являются чужеродными для человека белками и проявляют выраженные антигенные свойства, что предопределяет гуморальный ответ, обуславливает аллергенность, возможность развития анафилактических реакций и резистентности. Этот недостаток устраним, например, путем пегилирования, химической модификации белка или последовательного применения ферментов с разными антигенными свойствами либо полученных из различных источников. Во-вторых, ферментные препараты, как показала клиническая практика, характеризуются достаточно узким спектром противоопухолевой активности.

Онкогематологические заболевания исторически стали первыми злокачественными опухолями, при которых был показан эффект препарата с ферментативным механизмом действия. L-аспарагиназы до сих пор включаются в схемы комбинированной терапии острых лимфобластных лейкозов. При этом с учетом имеющихся данных перспективы расширения спектра показаний к применению L-аспарагиназы *E. coli* представляются ограниченными и включают лишь отдельные подтипы неходжкинских лимфом. Расширение сферы применения L-аспарагиназ в онкогематологии связано с разработкой

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ опубликованных данных позволяет объединить известные ферменты с доказанной противоопухолевой активностью *in vivo* или в клинических исследованиях в

Таблица 1. Противоопухолевые ферменты, продемонстрировавшие эффективность при опухолях кроветворной и лимфоидной тканей в экспериментальных или клинических исследованиях

Группа	Фермент	Источник	Уровень исследований	Показания к применению
Ферменты, расщепляющие аминокислоты	L-аспарагиназа	Бактериальный (<i>E. coli</i> , <i>Erw. chrysanthemi</i>)	Рутинное клиническое применение	Острый лимфобластный лейкоз
	Пегелированная L-аспарагиназа	Бактериальный (<i>E. coli</i>)	Рутинное клиническое применение	Острый лимфобластный лейкоз
	Пегелированная ADI	Бактериальный (<i>Mycoplasma arginini</i>)	Единичные клинические наблюдения	T-клеточные лимфомы и лимфолейкоз с метилированным <i>ASS1</i>
	MGL	Бактериальный (<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Citrobacter freundii</i> и др.)	Эксперименты <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> , I фаза клинических исследований	Перспективы применения пока неясны
	LO	Грибы (<i>Trichoderma spp.</i>)	Ограниченные исследования <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	Перспективы применения пока неясны
	PAL	Грибы (<i>Rhodosporidium spp.</i>)	Ограниченные исследования <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	Перспективы применения пока неясны
Рибонуклеазы	Ранпирназа и конъюгаты на ее основе	Земноводные (ооциты лягушки <i>Rana pipiens</i>)	Эксперименты <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> , клинические исследования при солидных опухолях	Неходжкинские лимфомы
	Амфиназа	Земноводные (ооциты лягушки <i>Rana pipiens</i>)	Ограниченные исследования <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	Перспективы применения пока неясны
	Биназа	Бактериальный (<i>Bacillus intermedius</i>)	Ограниченные исследования <i>in vitro</i>	Перспективы применения пока неясны

и внедрением в практику препаратов L-аспарагиназ с иными биологическими характеристиками, выделенными из других источников.

Другие ферменты, прошедшие ряд клинических исследований (ранпирназа и ADI), были изначально разработаны для лечения труднокурабельных солидных опухолей (мезотелиома плевры, гепатоцеллюлярный рак и меланома). Однако приведенные в обзоре экспериментальные данные позволяют прогнозировать чувствительность к ним и опухолей системы крови. Результаты единичных наблюдений использования пегелированной ADI в сочетании с наличием установленного предиктора эффективности терапии (метилирование *ASS1*) у пациентов с рефрактерной к терапии кожной T-клеточной лимфомой дают основания предполагать перспективность применения ADI при отдельных вариантах неходжкинских лимфом. Аналогично экспериментальные данные об эффективности конъюгатов ранпирназы с антителами к специфическим рецепторам на поверхности опухолевых клеток лимфоидного или миелоидного происхождения позволяют считать их перспективными агентами для таргетной терапии опухолей с гиперэкспрессией соответствующих антигенов. Таким образом, перспективность клинического применения новых препаратов рибонуклеаз в онкогематологии во многом определяется поиском путей повышения избирательности действия на опухолевые клетки и, прежде всего, разработкой соответствующих систем доставки. При этом для действующего вещества основным критерием результативности конъюгирования считается незначительная потеря ферментативной активности, а для антител — иммунологической [118]. Как для ADI, так и для ранпирназы целесообразен поиск комбинаций с оптимальными терапевтическими характеристиками (противоопухолевый эффект, токсичность и лекарственное взаимодействие), ориентированных на лечение конкретных типов опухолей. Предполагаемые ниши для использования противоопухолевых ферментов в онкогематологии с учетом имеющихся экспериментальных и клинических данных суммированы в табл. 1.

Перспективы использования в клинической онкогематологии других ферментов пока остаются менее очевидными, прежде всего из-за недостатка экспериментальных данных как на уровне молекулярных маркеров, так и специфической антипролиферативной активности *in vitro* или *in vivo*. Однако даже приведенные в обзоре сведения позволяют заключить, что среди огромного разнообразия ферментов существуют практически неисчерпаемые ресурсы создания новых оригинальных препаратов для лечения онкогематологических заболеваний.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kidd J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. *J. Exp. Med.* 1953; 98: 565–82.
2. Broome J.D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* 1961; 191: 1114–5.
3. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: Практическая медицина, 2005. [Treshchalina Ye.M. Protivoopukholevaya aktivnost veshchestv prirodnogo proiskhozhdeniya (Anti-tumor activity of substances of natural origin). M.: Prakticheskaya meditsina, 2005.]
4. Jaccard A., Petit B., Girault S. et al. L-asparaginase-based treatment of 15 western patients with extranodal NK/T-cell lymphoma and leukemia and a review of the literature. *Ann Oncol.* 2009; 20(1): 110–6.
5. Obama K., Tara M., Niina K. L-asparaginase induced complete remission in Epstein-Barr virus positive, multidrug resistant, cutaneous T-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 1999; 69(4): 260–2.
6. Yong W., Zheng W., Zhang Y. et al. L-asparaginase-based regimen in the treatment of refractory midline nasal/nasal-type T/NK-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 2003; 78(2): 163–7.
7. Ollenschlager G., Roth E., Linkesch W. et al. Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. *Eur. J. Clin. Invest.* 1988; 18(5): 512–6.
8. Villa P., Corada M., Bartosek I. L-asparaginase effects on inhibition of protein synthesis and lowering of the glutamine content in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 1986; 32(3): 235–41.
9. Warrell R.P.Jr., Chou T.C., Gordon C. et al. Phase I evaluation of succinylated Acinetobacter glutaminase-asparaginase in adults. *Cancer Res.* 1980; 40(12): 4546–51.

10. Reinert R.B., Oberle L.M., Wek A.S. et al. Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparagine. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 31222–33.
11. Woods J.S., Handschumacher R.E. Hepatic homeostasis of plasma L-asparagine. *Am. J. Physiol.* 1971; 221: 1785–90.
12. Bendich A., Kafkewitz D., Abuchowski A., Davis F.F. Immunological effects of native and polyethylene glycol-modified asparaginases from *Vibrio succinogenes* and *Escherichia coli* in normal and tumour-bearing mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1982; 48: 273–8.
13. Distasio J.A., Salazar A.M., Nadji M., Durden D.L. Glutaminase-free asparaginase from *Vibrio succinogenes*: an antilymphoma enzyme lacking hepatotoxicity. *Int. J. Cancer.* 1982; 30(3): 343–7.
14. Capizzy R.L., Cheng Y.C. Therapy of neoplasia with asparaginase. In: *Enzymes as drug*. Ed. by J.S. Holcenberg, J. Roberts. NY: John Wiley and Sons, 1981: 1–24.
15. Storti E., Quaglino D. Dismetabolic and neurological complications in leukemic patients treated with L-asparaginase. In: *Experimental and clinical effects of L-asparaginase*. Ed. by E. Grundmann, H.F. Oettgen. Berlin, Heidelberg, NY: Springer Verlag, 1970: 344–9.
16. Roberts J., Schmid F.A., Old L.J., Stockert E. A comparative study of the antitumor effectiveness of *E. coli* and *Erwinia asparaginases*. *Cancer Biochem. Biophys.* 1976; 1(4): 175–8.
17. Steiner M., Attarbaschi A., Kastner U. et al. Distinct fluctuations of ammonia levels during asparaginase therapy for childhood acute leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 2007; 9(5): 640–2.
18. Watanabe S., Miyake K., Ogawa C. et al. The ex vivo production of ammonia predicts L-asparaginase biological activity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* 2009; 90(3): 347–52.
19. Гладиллина Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В. Клонирование, экспрессия и выделение L-аспарагиназы *Helicobacter pylori*. *Биомед. хим.* 2008; 54(4): С. 482–6.
- [Gladilina Yu.A., Sokolov N.N., Krasotkina Yu.V. Cloning, expression, and isolation of *Helicobacter pylori* L-asparaginase. *Biomed. khim.* 2008; 54(4): S. 482–6. (In Russ.)].
20. Cappelletty D., Chiarelli L.R., Paschetto M.V. et al. *Helicobacter pylori* L-asparaginase: A promising new chemotherapeutic agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 377: 1222–6.
21. Derst C., Henseling J., R hm K.H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Sci.* 2000; 9: 2009–17.
22. Avramis V.I., Panosyan E.H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44: 367–93.
23. Avramis V.I., Tiwari P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Nanomed.* 2006; 1(3): 241–54.
24. Panosyan E.H., Grigoryan R.S., Avramis I.A. et al. Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res.* 2004; 24(2C): 1121–5.
25. Rotoli B.M., Uggeri J., Dall'Asta V. et al. Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. *Cell Physiol. Biochem.* 2005; 15(6): 281–92.
26. Tardito S., Uggeri J., Bozzetto C. et al. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 60(5): 751–8.
27. Abuchowski A., Kazo G.M., Verhoest C.R. Jr. et al. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem. Biophys.* 1984; 7(2): 175–86.
28. Asselin B.L., Whitin J.C., Coppola D.J. et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 1780–6.
29. Khan A., Hill J.M. Atopic hypersensitivity to L-asparaginase: resistance to immunosuppression. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1971; 40(3): 463–569.
30. Alvarez O.A., Zimmerman G. Pepsaspargase-induced pancreatitis. *Med. Pediatr. Oncol.* 2000; 34(3): 200–5.
31. Кучумова А.В., Красоткина Ю.В., Хасигов П.З., Соколов Н.Н. Пегилирование рекомбинантной аспарагиназы *Erwinia carotovora* полиэтиленгликолем 5000. *Биомед. хим.* 2007; 53(1): 107–11.
- [Kuchumova A.V., Krasotkina Yu.V., Khasigov P.Z., Sokolov N.N. Pegylation of recombinant *Erwinia carotovora* asparaginase with polyethilenglycol. 5000. *Biomed. khim.* 2007; 53(1): 107–11. (In Russ.)].
32. Gaspar M.M., Perez-Soler R., Cruz M.E. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 38(4): 373–7.
33. Jean-Francois J., D'Urso E.M., Fortier G. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: evaluation of performance in vivo. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1997; 26(Pt. 3): 203–12.
34. Gaspar M.M., Blanco D., Cruz M.E., Alonso M.J. Formulation of L-asparaginase load poly(lactide-to-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J. Control. Release* 1998; 52: 53–62.
35. Qian G., Zhou J., Wang D., He B. The chemical modification of *E. coli* L-asparaginase by N, O-carboxymethyl chitosan. *Artif. Cell. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 1996; 24: 567–77.
36. Uren J.R., Hargis B.J., Beardsley P. Immunological and pharmacological characterization of poly-DL-alanyl-modified *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Cancer Res.* 1982; 42: 4068–71.
37. Jorge J.C., Perez-Soler R., Morais J.G., Cruz M.E. Liposomal palmitoyl-L-asparaginase: characterization and biological activity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994; 34(3): 230–4.
38. Zhang Y.Q., Zhou W.L., Shen W.D. et al. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L-asparaginase bioconjugates. *J. Biotechnol.* 2005; 120(3): 315–26.
39. Leal-Egana A., Scheibel T. Silk-based materials for biomedical applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010; 55(3): 155–67.
40. Spiess K., Lammel A., Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol. Biosci.* 2010; 10(9): 998–1007.
41. Kwon Y.M., Chung H.S., Moon C. et al. L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J. Control. Release* 2009; 139(3): 182–9.
42. Moola Z.B., Scawen M.D., Atkinson T., Nicholls D.J. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem. J.* 1994; 302(Pt. 3): 921–7.
43. Goldberg A.I., Cooney D.A., Glynn J.P. et al. The effects of immunization to L-asparaginase on antitumor and enzymatic activity. *Cancer Res.* 1973; 33: 256–61.
44. Vrooman L.M., Supko J.G., Neuberger D.S. et al. *Erwinia asparaginase* after allergy to *E. coli* asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 2010; 54(2): 199–205.
45. Zalewska-Szewczyk B., Gach A., Wyka K. et al. The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. *Clin. Exp. Med.* 2009; 2: 113–6.
46. Distasio J.A., Niederman R.A. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J. Biol. Chem.* 1976; 251(22): 6929–33.
47. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А. и др. Противоопухолевая активность L-аспарагиназы из *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биомед. хим.* 2008; 54(6): 712–9.
- [Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Borisova A.A. et al. Anti-tumor activity of *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Biomed. khim.* 2008; 54(6): 712–9. (In Russ.)].
48. Carta De-Angeli L., Pocchiari F. et al. Effect of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* on ascites sarcoma in the rat. *Nature (London)* 1970; 225: 549–50.
49. Peterson L.E., Ciegler A. L-asparaginase production by *Erwinia aroidae*. *Appl. Microbiol.* 1969; 18: 64–7.
50. Pritsa A.A., Papazisis K.T., Kortsaris A.H. et al. Antitumor activity of L-asparaginase from *Thermus thermophilus*. *Anticancer Drugs* 2001; 12: 137–42.
51. Reddy V.V.S., Jayaram H.N., Sirsi M., Ramakrishnan T. Inhibitory activity of L-asparaginase from *Mycobacterium tuberculosis* on Yoshida ascites sarcoma in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969; 132: 262–7.
52. Rowley B., Wriston J.C. Partial purification and antilymphoma activity of *Serratia marcescens* L-asparaginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967; 28: 160–5.
53. Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S. et al. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochem. (Mosc.). Suppl. Series B: Biomed. Chem.* 2012; 6: 121–31.
54. Appel I.M., Hop W.C., Pieters R. Changes in hypercoagulability by asparaginase: a randomized study between two asparaginases. *Blood Coagul. Fibrinol.* 2006; 17: 139–46.
55. Duval M., Suci S., Ferster A. et al. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* 2002; 99(8): 2734–9.
56. Durden D.L., Salazar A.M., Distasio J.A. Kinetic analysis of hepatotoxicity associated with antineoplastic asparaginases. *Cancer Res.* 1983; 43: 1602–5.
57. Eden O.B., Shaw M.P., Lilleyman J.S., Richards S. Non-randomised study comparing toxicity of *Escherichia coli* and *Erwinia asparaginase* in children with leukaemia. *Med. Pediatr. Oncol.* 1990; 18(6): 497–502.
58. Howard J.B., Carpenter F.H. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Substrate specificity and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 1020–30.
59. Bach S.J., Lasnitzki I. Some aspects of the role of arginine and arginase in mouse carcinoma 63. *Enzymologia* 1947; 12(3): 198–205.
60. Bach S.J., Maw G.A. Creatine synthesis by tumor-bearing rats. *Biochem. Biophys. Acta* 1953; 11(1): 69–78.
61. Osunkoya B.O., Adler W.H., Smith R.T. Effect of arginine deficiency on synthesis of DNA and immunoglobulin receptor of Burkitt lymphoma cells. *Nature* 1970; 227: 398–9.
62. Starr J.M., Burton A.F. The effects of arginine deficiency on lymphoma cells. *Br. J. Cancer* 1974; 30: 50–9.
63. Cheng P.N., Lam T.L., Lam W.M. et al. Pegylated recombinant human arginase inhibits the in vitro and in vivo proliferation of human hepatocellular carcinoma through arginine depletion. *Cancer Res.* 2007; 67(1): 309–17.
64. Savoca K.V., Davis F.F., van Es T. et al. Cancer therapy with chemically modified enzymes. II. The therapeutic effectiveness of arginase, and arginase

- modified by the covalent attachment of polyethylene glycol, on the taper liver tumor and the L5178Y murine leukemia. *Cancer Biochem. Biophys.* 1984; 7(3): 261–8.
65. Hernandez C.P., Morrow K., Lopez-Barcons L.A. et al. Pegylated arginase I: a potential therapeutic approach in T-ALL. *Blood* 2010; 115(25): 5214–21.
66. Hsueh E.C., Knebel S.M., Lo W.H. et al. Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* 2012; 5: 17. doi: 10.1186/1756-8722-5-17.
67. Shibata T., Kakimoto T., Chibata I. Crystallization and properties of L-arginine deiminase of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 1975; 250(12): 4580–3.
68. Takaku H., Takase M., Abe S. et al. In vivo anti-tumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginini*. *Int. J. Cancer.* 1992; 51(2): 244–9.
69. Park I.S., Kang S.W., Shin Y.J. et al. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br. J. Cancer* 2003; 89: 907–14.
70. Ni Y., Li Z., Sun Z. et al. Expression of arginine deiminase from *Pseudomonas plecoglossicida* CGMCC2039 in *Escherichia coli* and its anti-tumor activity. *Curr. Microbiol.* 2009; 58(6): 593–8.
71. Ensor C.M., Holsberg F.W., Bomalaski J.S., Clark M.A. Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2002; 62: 5443–50.
72. Gong H., Zolzer F., von Recklinghausen G. et al. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia* 2000; 14(5): 826–9.
73. Noh E.J., Kang S.W., Shin Y.J. et al. Arginine deiminase enhances dexamethasone-induced cytotoxicity in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells. *Int. J. Cancer* 2004; 112: 502–8.
74. Ascierto P.A., Scala S., Castello G. et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7660–8.
75. Curley S.A., Bomalaski J.S., Ensor C.M. et al. Regression of hepatocellular cancer in a patient treated with arginine deiminase. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(53): 1214–6.
76. Glazer E.S., Piccirillo M., Albino V. et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(13): 2220–6.
77. Izzo F., Marra P., Beneduce G. et al. Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1815–22.
78. Glazer E.S., Piccirillo M., Albino V. et al. Phase II study of pegylated arginine deiminase for nonresectable and metastatic hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(13): 2220–6.
79. Ott P.A., Carvajal R.D., Pandit-Taskar N. et al. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG20) in patients with advanced melanoma. *Invest. New Drugs* 2013; 31(2): 425–34.
80. Delage B., Luong P., Maharaj L. et al. Promoter methylation of argininosuccinate synthetase-1 sensitizes lymphomas to arginine deiminase treatment, autophagy and caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis.* 2012; 3: e342.
81. Wu L., Li L., Meng S. et al. Expression of argininosuccinate synthetase in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 28(2): 365–8.
82. Szlosarek P.W., Luong P., Phillips M.M. et al. Metabolic response to pegylated arginine deiminase in mesothelioma with promoter methylation of argininosuccinate synthetase. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(7): e1111–3.
83. Feun L.G., Marini A., Walker G. et al. Negative argininosuccinate synthetase expression in melanoma tumours may predict clinical benefit from arginine-depleting therapy with pegylated arginine deiminase. *Br. J. Cancer* 2012; 106(9): 1481–5.
84. Kelly M.P., Jungbluth A.A., Wu B.W. et al. Arginine deiminase PEG20 inhibits growth of small cell lung cancers lacking expression of argininosuccinate synthetase. *Br. J. Cancer* 2012; 106(2): 324–32.
85. Manca A., Sini M.C., Izzo F. et al. Induction of argininosuccinate synthetase (ASS) expression affects the antiproliferative activity of arginine deiminase (ADI) in melanoma cells. *Oncol. Rep.* 2011; 25(6): 1495–502.
86. Bowles T.L., Kim R., Galante J. et al. Pancreatic cancer cell lines deficient in argininosuccinate synthetase are sensitive to arginine deprivation by arginine deiminase. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 1950–5.
87. Kim H.J., Kim J.H., Yu Y.S. et al. Anti-tumor activity of arginine deiminase via arginine deprivation in retinoblastoma. *Oncol. Rep.* 2007; 18: 1373–7.
88. Kim R.H., Coates J.M., Bowles T.L. et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.* 2009; 69: 700–8.
89. Sigmura K., Ohno T., Kusuyama T., Azuma I. High sensitivity of human melanoma cell lines to the growth inhibitory activity of mycoplasmal arginine deiminase in vitro. *Melanoma Res.* 1992; 2: 191–6.
90. Szlosarek P.W., Klabatsa A., Pallaska A. et al. In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 7126–31.
91. Yoon C.Y., Shim Y.J., Kim E.H. et al. Renal cell carcinoma does not express argininosuccinate synthetase and is highly sensitive to arginine deprivation via arginine deiminase. *Int. J. Cancer* 2008; 120: 897–905.
92. Tsai W.B., Aiba I., Lee S.Y. et al. Resistance to arginine deiminase treatment in melanoma cells is associated with induced argininosuccinate synthetase expression involving c-Myc/HIF-1alpha/Sp4. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8(12): 3223–33.
93. Ni Y., Liu Y., Schwaneberg U. et al. Rapid evolution of arginine deiminase for improved anti-tumor activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 90(1): 193–201.
94. Holsberg F.W., Ensor C.M., Steiner M.R. et al. Poly(ethylene glycol) (PEG) conjugated arginine deiminase: effects of PEG formulations on its pharmacological properties. *J. Control. Release* 2002; 80: 259–71.
95. Kreis W., Hession C. Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor. *Cancer Res.* 1973; 33(8): 1866–9.
96. Занин В.А., Лукина В.И., Березов Т.Т. Выделение и некоторые физико-химические и каталитические свойства L-лизин-альфа-оксидазы из *Pseudomonas putida*. *Вопр. мед. хим.* 1989; 4: 84–9.
- [Zanin V.A., Lukina V.I., Berezov T.T. Isolation and some physicochemical and catalytic properties of *Pseudomonas putida* L-lysine alpha-oxidase. *Vopr. med. khim.* 1989; 4: 84–9. (In Russ.)].
97. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А. и др. L-Метионин-гамма-лиаза *Citrobacter freundii*: клонирование гена и кинетические параметры фермента. *Биохим.* 2006; 74(4): 454–63.
- [Manukhov I.V., Mamaeva D.V., Morozova Ye.A. et al. *Citrobacter freundii* L-methionine gamma-lyase: gene cloning and clinical parameters of enzyme. *Biokhim.* 2006; 74(4): 454–63. (In Russ.)].
98. Ito S., Nakamura T., Eguchi Y. Purification and characterization of methioninase from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem.* 1976; 79(6): 1263–72.
99. Lockwood B.C., Coombs G.H. Purification and characterization of methionine gamma-lyase from *Trichomonas vaginalis*. *Biochem. J.* 1991; 279: 675–82.
100. Sato D., Yamagata W., Kamei K. et al. Expression, purification and crystallization of L-methionine gamma-lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr.* 2006; 62(10): 1034–6.
101. Tanaka H., Esaki N., Yamamoto T., Soda K. Purification and properties of methioninase from *Pseudomonas ovalis*. *FEBS Lett.* 1976; 66(2): 307–11.
102. El-Sayed A.S. Purification and characterization of a new L-methioninase from solid cultures of *Aspergillus flavipes*. *J. Microbiol.* 2011; 49(1): 130–40.
103. Пехов А.А., Жукова О.С., Занин В.А., Березов Т.Т. Цитостатический эффект L-метионин-γ-лиазы на раковые клетки в культуре. *Бюл. эксп. биол. мед.* 1983; 5: 87–9.
- [Pekhov A.A., Zhukova O.S., Zanin V.A., Berezov T.T. Cytostatic effect of L-methionine γ-lyase on cultured cancer cells. *Byul. eksp. biol. med.* 1983; 5: 87–9. (In Russ.)].
104. Hu J., Cheung N.K. Methionine depletion with recombinant methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs. *Int. J. Cancer* 2009; 124(7): 1700–6.
105. Kokkinakis D.M., Schold S.C.Jr., Hori H., Nobori T. Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice. *Nutr. Cancer* 1997; 29(3): 195–204.
106. Tan Y., Sun X., Xu M. et al. Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5(8): 2157–63.
107. Tan Y., Xu M., Guo H. et al. Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res.* 1996; 16(6C): 3931–6.
108. Yoshioka T., Wada T., Uchida N. et al. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res.* 1998; 58(12): 2583–7.
109. Hori H., Takabayashi K., Orvis L. et al. Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase. *Cancer Res.* 1996; 56(9): 2116–22.
110. El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M. Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-methioninase. *Enzyme Microb. Technol.* 2012; 51(4): 200–10.
111. Tan Y., Zavala J.Sr., Xu M. et al. Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1996; 16(6C): 3937–42.
112. Sun X., Yang Z., Li S. et al. In vivo efficacy of recombinant methioninase is enhanced by the combination of polyethylene glycol conjugation and pyridoxal 5'-phosphate supplementation. *Cancer Res.* 2003; 63(23): 8377–83.
113. Xin L., Cao J., Cheng H. et al. Stealth cationic liposomes modified with anti-CAGE single-chain fragment variable deliver recombinant methioninase for gastric carcinoma therapy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013; 13(1): 178–83.
114. Смирнова И.П., Хадуев С.Х. L-лизин-альфа-оксидазная активность некоторых видов *Trichoderma*. *Микробиология* 1984; 53: 163–5.
- [Smirnova I.P., Khadyuev S.Kh. L-lysine alpha-oxidase activity of some *Trichoderma* spp. *Mikrobiologiya* 1984; 53: 163–5. (In Russ.)].
115. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties. *J. Biol. Chem.* 1980; 255(3): 976–81.
116. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В. и др. Влияние L-лизин-α-оксидазы на кинетику клеточного цикла культивируемых клеток лимфомы Беркитта. *Экспер. онкол.* 1985; 7(6): 42–4.
- [Zhukova O.S., Khadyuev S.Kh., Dobrynin Ya.V. et al. Influence of L-lysine α-oxidase on kinetics of cell cycle of Burkitt's lymphoma cultured cells. *Eksp. onkol.* 1985; 7(6): 42–4. (In Russ.)].
117. Гогичаева Н.В., Лукашева Е.В., Гаврилова Е.М. и др. Получение конъюгатов L-лизин-α-оксидазы с антителами. *Вопр. мед. хим.* 2000; 46(4): 410–8.

[Gogichayeva N.V., Lukasheva Ye.V., Gavrilova Ye.M. et al. Synthesis of conjugates of L-lysine α -oxidase with antibodies. *Vopr. med. khim.* 2000; 46(4): 410–8. (In Russ.)].

118. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. L-лизин- α -оксидаза: физико-химические и биологические свойства. *Биохимия* 2002; 67(10): 1394–402.

[Lukasheva Ye.V., Berezov T.T. L-lysine α -oxidase: physicochemical and biological properties. *Biokhimiya* 2002; 67(10): 1394–402. (In Russ.)].

119. Sarkissian C.N., Shao Z., Blain F. et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia-lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999; 96(5): 2339–44.

120. Calabrese J.C., Jordan D.B., Boodhoo A. et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia-lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* 2004; 43: 11403–16.

121. Ritter H., Schulz G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* 2004; 16: 3426–36.

122. Bourget L., Chang T.M. Artificial cell-microencapsulated phenylalanine ammonia-lyase. *Applied Biochem. Biotechnol.* 1984; 10: 57–9.

123. Sarkissian C.N., Gamez A. Phenylalanine ammonia-lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol. Gen. Metab.* 2005; 86(Suppl. 1): S22–6.

124. Abell C.W., Hodgins D.S., Stith W.J. An in vivo evaluation of the chemotherapeutic potency of phenylalanine ammonia-lyase. *Cancer Res.* 1973; 33(10): 2529–32.

125. Stith W.J., Hodgins D.S., Abell C.W. Effects of phenylalanine ammonia-lyase and phenylalanine deprivation on murine leukemic lymphoblasts in vitro. *Cancer Res.* 1973; 33(5): 966–71.

126. Ambrus C.M., Anthonie S., Horvath C. et al. Extracorporeal enzyme reactors for depletion of phenylalanine in phenylketonuria. *Ann. Intern. Med.* 1987; 106: 531–7.

127. Ledoux L. Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo. *Nature* 1955; 176(4470): 36–7.

128. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V. et al. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs. *FEBS J.* 2010; 277(1): 186–96.

129. Darzynkiewicz Z., Carter S.P., Mikulski S.M. et al. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet.* 1988; 21(3): 169–82.

130. Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *Biol. Chem.* 1991; 266(1): 245–51.

131. Wu Y., Mikulski S.M., Ardelt W. et al. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(14): 10686–93.

132. Juan G., Ardelt B., Li X. et al. G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4A, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia* 1998; 12(8): 1241–8.

133. Deptala A., Halicka H.D., Ardelt B. et al. Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase. *Int. J. Oncol.* 1998; 13(1): 11–6.

134. Lee I., Kalota A., Gewirtz A.M., Shogen K. Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirinase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. *Anticancer Res.* 2007; 27(1A): 299–307.

135. Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Shogen K. Effect of onconase +/- tamoxifen on ASPC-1 human pancreatic tumors in nude mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 530: 187–96.

136. Воробьев И.И., Пономаренко Н.А., Дурова О.М. и др. Структурно-функциональное исследование рекомбинантных форм онконазы. *Био-орган. хим.* 2001; 27(4): 257–64.

[Vorobyev I.I., Ponomarenko N.A., Durova O.M. et al. Structural-functional evaluation of Onconase recombinant forms. *Bioorgan. khim.* 2001; 27(4): 257–64. (In Russ.)].

137. Notomista E., Cafaro V., Fusiello R. et al. Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein. *FEBS Lett.* 1999; 463(3): 211–5.

138. Ita M., Halicka H.D., Tanaka T. et al. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2008; 7(7): 1104–8.

139. Costanzi J., Sidransky D., Navon A. et al. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirinase. *Cancer Invest.* 2005; 23(7): 643–50.

140. Mikulski S.M., Costanzi J.J., Vogelzang N.J. et al. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirinase in patients with unresectable malignant mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20(1): 274–81.

141. Porta C., Paglino C., Mutti L. Ranpirinase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. *Biologics* 2008; 2(4): 601–9.

142. Chang C.H., Sapra P., Vanama S.S. et al. Effective therapy of human lymphoma xenografts with a novel recombinant ribonuclease/anti-CD74 humanized IgG4 antibody immunotoxin. *Blood* 2005; 106(13): 4308–14.

143. Calabrese J.C., Jordan D.B., Boodhoo A. et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia-lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis. *Biochemistry* 2004; 43: 11403–16.

144. Ardelt B., Ardelt W., Pozarowski P. et al. Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle* 2007; 24: 3097–102.

145. Ильинская О.Н., Зеленихин П.В., Колпаков А.И. и др. Избирательная цитотоксичность биназы в отношении фибробластов, экспрессирующих онкогены ras и AML/ETO. *Учен. зап. Казан. ун-та. Серия «Естественные науки»* 2008; 150(4): 268–73.

[Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Kolpakov A.I. et al. Selective binase cytotoxicity against ras- and AML/ETO-oncogene-expressing fibroblasts. *Uchen. zap. Kazan. un-ta. Seriya «Estestvennye nauki»* 2008; 150(4): 268–73. (In Russ.)].

146. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochemie* 2013; 95(6): 1344–9.

147. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V. et al. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle* 2011; 10(23): 4090–7.

В.С. Покровский — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории комбинированной терапии опухолей.

Е.М. Трещалина — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией комбинированной терапии опухолей.

Адрес для переписки: В.С. Покровский, 115478, Каширское шоссе, д. 24, Москва, Российская Федерация, тел.: +7 (499) 3241409, e-mail: vadimpokrovsky@gmail.com

