

ОБЗОРЫ

УДК 612.015.1:577.155.32].08

Коллектив авторов

*Посвящается памяти
Сергея Руфовича Мардашева*

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ И ГЛУТАМИН(АСПАРАГИН)АЗЫ: НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА, СТРОЕНИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ

Н.Н. СОКОЛОВ¹, В.А. ЗАНИН², С.С. АЛЕКСАНДРОВА¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им.В.Н.Ореховича
РАМН, 119832, Москва, Погодинская ул., 10; Телефон: (095) 246-33-80
Факс: (095) 245-08-57, Эл. почта: sokolov@medic.ibmh.msk.su

²Российский Университет Дружбы народов, 117198, Москва, ул. Миклухо-
Маклая, 6; Телефон/факс (095) 434-35-05 / (095) Эл. почта: zanin@med.pfu.edu.ru

Обобщен обширный экспериментальный материал по структурно-функциональной организации, регуляции биосинтеза и активности, а также механизму действия, генетическим детерминантам, гетерологической экспрессии бактериальных L-аспарагиназ. Рассмотрены современные подходы к выделению и очистке этих ферментов, некоторые вопросы практического использования нативных и модифицированных форм L-аспарагиназ в онкологической практике в схемах комбинированной химиотерапии лейкозов. Приводятся результаты ранее проведенных в НИИ БМХ РАМН и других институтов страны исследований по изучению бактериальных L-аспарагиназ и глутамин(аспарагин)аз.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, глутамин(аспарагин)аза, энзимотерапия, гетерологическая экспрессия, лимфолейкозы, *Erwinia*, *E.coli*.

ВВЕДЕНИЕ. Ферменты - уникальные терапевтические агенты, способные оказывать быстрые специфические воздействия на различные стороны метаболизма в организме при физиологических значениях pH и температуры. В течении многих лет ферменты, обладающие протеолитической и гидролитической

активностью, используются в качестве местных и пероральных средств для лечения заболеваний самой разнообразной этиологии [1,2]. В последние годы для лечения онкологических заболеваний в медицине все более широкое применение находят ферментные препараты, при этом энзимотерапия, основанная на биохимических особенностях опухолевых клеток, и, являющаяся одной из разновидностей химиотерапии, имеет неоспоримое преимущество, связанное с высокой специфичностью действия ферментов [3].

Основной пласт работ, посвященных различным аспектам изучения бактериальных аспарагиназ, приходится на конец 60-х - 80-е годы. Нам не удалось найти в отечественной и зарубежной периодике какого-либо обзорного материала по данной проблеме за последние годы. Поэтому представляется полезным и интересным в краткой форме суммировать и обобщить ранние экспериментальные данные по структурно-функциональной организации, регуляции биосинтеза и активности, механизму действия, методам выделения и очистки, генетическим детерминантам, гетерологической экспрессии бактериальных L-аспарагиназ, их практическому использованию в онкологической практике в схемах комбинированной химиотерапии для лечения острых лимфобластных лейкозов, лимфо- и ретикулобластом.

Распространение L-аспарагиназ и их антилимфомная активность. В 1904 году Lang обнаружил в тканях животных, а Shibata - в экстрактах из грибов фермент аспарагиназу, катализирующую гидролиз аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака. Последующие работы показали, что фермент широко распространен у растений, микроорганизмов и эукариот [4]. У животных высокое содержание аспарагиназы обнаружено в сыворотке крови морской свинки (СМС) [5], а также в сыворотке крови всех представителей надсемейства *Caviioidea* [6].

Начало интенсивному изучению L-аспарагиназы положил в 1953 году Kidd [7], установивший, что введение СМС приводит к ингибированию роста некоторых трансплантируемых лейкозов у мышей. Спустя несколько лет Вгооте показал, что за противоопухолевый эффект СМС ответственна именно аспарагиназа [8]. Об этом свидетельствовали следующие данные:

- физико-химические свойства аспарагиназы из СМС не отличались от свойств фактора, ингибирующего лейкоз (при фракционировании СМС сульфатом аммония, электрофорезе, хроматографии на ДЭАЭЦ антилимфомной активностью обладали лишь те фракции, которые содержали аспарагиназу)

- при культивировании клеток лимфосаркомы 6С3НЕД на средах с аспарагином *in vitro* клетки сохраняли чувствительность к действию СМС *in vivo*. В то же время, опухолевые клетки, культивируемые *in vitro* на средах без аспарагина, утрачивали потребность в этой аминокислоте и чувствительность к действию СМС. Таким образом, аспарагин является незаменимой аминокислотой для роста клеток опухолей, ингибируемых СМС;

- линии клеток лейкемии 6С3НЕД, устойчивые к СМС *in vivo* в результате введения мышам малых доз СМС, утратили потребность в аспарагине при росте в культуре *in vitro*.

Последующие работы дали дополнительные подтверждения тому, что антилимфомным фактором СМС является аспарагиназа. Во-первых, сыворотка крови животных, принадлежащих к тому же надсемейству *Caviioidea*, что и морская свинка, обладала как противоопухолевой, так и аспарагиназной

активностью, тогда как сыворотка крови животных, не содержащая аспарагиназы, не ингибировала развитие лейкозов [6,9]. Во-вторых, аспарагиназы из ряда бактериальных источников угнетали рост лимфосаркомы 6С3НЕD и лейкемии DBA/22 Р1534 [10].

Позднее было установлено, что в основе механизма противоопухолевого действия фермента лежит уменьшение в тканях концентрации L-аспарагина, что приводит к ослаблению или прекращению синтеза белка в опухолевых клетках, и, в конечном счете, к подавлению опухоли. Более того, противоопухолевый эффект препаратов L-аспарагиназы обусловлен крайне низкой активностью аспарагинсинтетазы в чувствительных к действию фермента клетках лейкоза человека, в связи с чем введение L-аспарагиназы вызывает устойчивую регрессию развития заболевания [11,12]. По некоторым данным, формирование резистентности клеток к L-аспарагиназе может быть связано с регуляцией аспарагином синтеза аспарагинсинтетазы на уровне транскрипции гена этого фермента. На это указывают данные Hutson et al. [13], показавших, что в клетках гепатомы Фао крысы и клетках лейкоза человека (линии MOLT-4, NALL-1 и BALL-1) уровень мРНК аспарагинсинтетазы и активность фермента резко возрастают после инкубации клеток в присутствии L-аспарагиназы или в среде, не содержащей аспарагин.

В последние годы появились сообщения о том, что в основе вызываемой аспарагиназой гибели опухолевых клеток может лежать механизм апоптоза. Так Story et al. [14] при гистологическом исследовании ткани лимфоузлов собак со злокачественной лимфомой, получавших L-аспарагиназу, обнаружили массивную деструкцию опухолевых клеток, морфологически сходную с апоптотической гибелью клеток. В опытах *in vitro* на клетках лимфомы мыши линии LY-TН воздействию L-аспарагиназы также вызывало характерную для апоптотической гибели клеток деградацию ДНК до олигонуклеосомных фрагментов. Позднее Ueno et al. [15] показали, что при культивировании клеток L5178Y в среде, содержащей L-аспарагиназу *E.coli*, происходит фрагментация хромосомной ДНК, причем разрывы цепей ДНК выявляются уже в G-1 фазу клеточного цикла (через 8 час после добавления фермента).

К факторам, играющим роль в эффективности фармакологического действия аспарагиназы *in vivo*, следует отнести также высокую каталитическую активность и стабильность фермента при физиологических условиях, низкое значение K_m и медленный клиренс из крови, а также отсутствие потребности в кофакторах и простетических группах, легко диссоциирующих от фермента. Кроме того, конечные продукты катализируемой аспарагиназой реакции в высоких концентрациях не ингибируют активность фермента и не являются токсическими метаболитами для организма.

Аспарагиназа является уникальным химиотерапевтическим агентом по двум причинам. Во-первых, в отличие от других используемых в клинике химиотерапевтических препаратов, фермент оказывает цитотоксическое действие, не проникая, или не взаимодействуя непосредственно с поверхностью опухолевой клетки. Во-вторых, аспарагиназа, будучи каталитическим белком, при физиологических условиях способна с высокой специфичностью превращать за 1 мин до 90 000 молекул субстрата [16]. В этом отношении аспарагиназа существенно отличается от других химиотерапевтических средств, которые

необходимо вводить в большом избытке над молекулами-мишенями, но при этом они обладают значительно меньшей избирательностью действия.

Следует отметить, что помимо аспарагиназы, кандидатами для использования в качестве противоопухолевых препаратов является целый ряд ферментов, утилизирующих в качестве субстратов заменимые аминокислоты, такие как глутамин, аргинин, цистеин или цитруллин [17]. Эти аминокислоты имеют лишь один биосинтетический путь, который может быть изменен в некоторых опухолевых клетках. Например, бактериальные амидогидролазы, примерно с равной скоростью катализирующие гидролиз как L-глутамина, так и L-аспарагина, глутамин(аспарагин)азы, способны тормозить рост ряда устойчивых к аспарагиназе опухолей у животных и человека [16,18]. Roberts [19] показал, что глутамин(аспарагин)аза из *Pseudomonas* 7A в комбинации с 6-диазо-5-оксонорлейцином и ацивицином подавляет развитие опухолей молочной железы *in vitro* и толстого кишечника у мышей. Основными проблемами, связанными с терапевтическим использованием глутамин(аспарагин)аз, являются высокая антигенность, короткое время полувыведения и токсичность [1].

Идея использования L-аспарагиназы в качестве противоопухолевого средства стимулировала интенсивные исследования по поиску микроорганизмов, продуцирующих L-аспарагиназы, обладающие противолейкозным действием, разработке технологии очистки гомогенных препаратов фермента, изучению свойств, структуры и механизма каталитического действия, получению лекарственной формы фермента и клиническому применению L-аспарагиназы в онкологии.

Противоопухолевым действием обладают далеко не все L-аспарагиназы микробного происхождения. Так противолейкозную активность проявляют L-аспарагиназы из *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Vibrio succinogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* и некоторых других источников. В то же время, L-аспарагиназы из *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas geniculata* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* противоопухолевого действия не оказывают. Более того, в случае присутствия в клетках нескольких изоферментов L-аспарагиназы, терапевтическим действием обладает лишь один из них (например, изоформа EcA2 у *E.coli*).

Механизм реакции, некоторые свойства и строение. L-Аспарагиназа (L-аспарагин-амидогидролаза; КФ 3.5.1.1.), относящаяся к треониновым амидогидролазам, катализирует гидролитическое расщепление L-аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака и является одним из ключевых ферментов, осуществляющих взаимосвязь азотистого и углеродного обмена у про- и эукариотических организмов.

Полностью механизм реакции пока не ясен, но тем не менее на основании результатов кинетического анализа предполагается, что в ходе ее происходит нуклеофильная атака β -амидной группы аспарагина, приводящая к образованию промежуточного комплекса β -аспартил-фермент (рис.) [20]. Основным вопросом в изучении механизма действия аспарагиназы является идентификация первичного нуклеофила в структуре белковой молекулы, участвующего в образовании промежуточного ацил-ферментного комплекса.

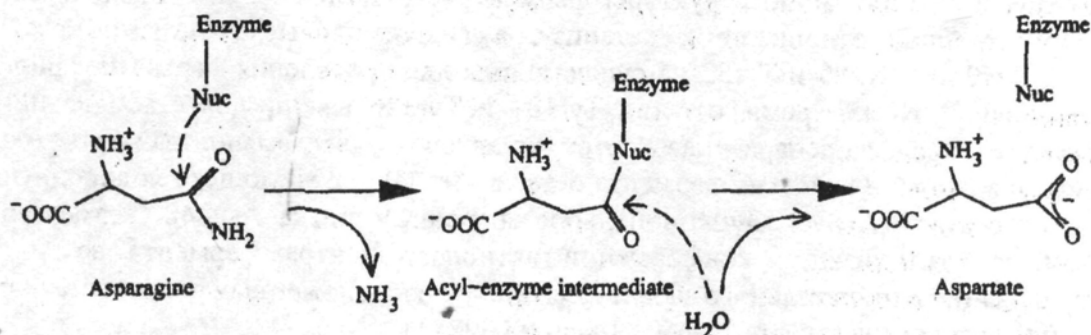


Рисунок.

Схема реакции, катализируемой L-аспарагиназой *E.coli*. Нуклеофилом в молекуле фермента, возможно, является остаток Thr12 [20].

При изучении взаимодействия аспарагиназ с химически модифицированными аналогами субстрата были получены противоречивые результаты. В одном случае аналог субстрата связывался с консервативным, присутствующим в структуре всех известных бактериальных аспарагиназ остатком Thr12 глутамин(аспарагин)аза *Acinetobacter glutaminasificans* [21], в другом - аналог субстрата взаимодействовал с не являющимся консервативным остатком Ser120 (аспарагиназа *E.coli*) [22]. Аминокислотные остатки фермента, входящие в его активный центр, были идентифицированы в реакции аспарагиназы с аналогом аспарагина 5-диазо-5-оксонорвалином (DONV). Взаимодействующий с DONV остаток Thr12 находится в пределах восьмичленной консервативной аминоконцевой последовательности аспарагиназ *Er.carotovora*, *E.coli* и *P.vulgaris*. Получены доказательства того, что DONV ковалентно присоединяется к пептиду, включающему 116-121 остатки молекулы фермента. Участок активного центра аспарагиназы *E.coli* идентифицирован как фрагмент, состоящий из аминокислотных остатков Ser-Thr-Ser (117-119). Опыты по химической модификации аспарагиназы и результаты исследований с помощью ЯМР указывали на важность для активности фермента остатков гистидина и одного или двух остатков тирозина [23].

Выделение кристаллических препаратов ряда бактериальных амидогидролаз и их рентгеноструктурный анализ (аспарагиназа EcA2 [24], аспарагиназа *Erwinia chrysanthemi* [25] глутамин(аспарагин)аза *Pseudomonas* 7A [26], глутамин(аспарагин)аза *Acinetobacter glutaminasificans* [27]), а также изучение структуры мутантных форм аспарагиназ, полученных методами направленного мутагенеза, позволили установить роль отдельных аминокислотных остатков в катализе и стабилизации структуры фермента.

В опытах на мутантных формах аспарагиназы EcA2 *E.coli* было показано, что по меньшей мере, пять остатков аминокислот (Thr12, Tyr25, Trh89, Asp90 и Lys162) являются крайне важными для проявления активности фермента [28-30]. Palm et al. [20] получили мутантную форму аспарагиназы *E.coli*, в молекуле которой остаток Thr89 был заменен на остаток Val. Анализ структуры этого белка, у которого остаток Thr12 был ковалентентно связан с аспаратом, указывает на то, что первичным нуклеофилом является остаток Thr12.

Derst et al. [31] в опытах по специфическому мутагенезу и химической модификации исследовали вклад пяти тирозиновых остатков аспарагиназы *E.coli*

в катализ и стабилизацию структуры фермента. Установлено, что Tyr25 имеет непосредственное отношение к катализу, а гидроксильные группы остатков Tyr181, Tyr250, Tyr289 и Tyr32 не существенны для проявления ферментативной активности. В то же время, остатки Tyr181 и Tyr326 важны для стабилизации нативного тетрамера аспарагиназы. Этот же автор позднее выявил важную роль для специфичности действия фермента остатка Asp248, образующего водородную связь с остатком Asp90. Функциональное значение остатка Asn248, возможно, состоит в стабилизации конформации активного центра фермента за счет нейтрализации отрицательного заряда нескольких расположенных рядом остатков дикарбоновых аминокислот (Asp60, Asp90 и Glu283).

Аспарагиназа способна катализировать помимо гидролиза L-аспарагина реакцию переноса β -аспартила с аспарагина на аммиак или гидроксилламин и гидролиз аспартогидроксамовой кислоты, а также синтез последней из аспарагиновой кислоты и гидроксилламина [32,33]. При этом образование аспартогидроксамовой кислоты из аспарагина и гидроксилламина протекает с более низкой скоростью, чем ее гидролиз. Трансферазные реакции требуют значительного избытка гидроксилламина. Считается, что реакции гидролиза и переноса катализируются одним ферментом, и что при этом образуется фермент-амидный комплекс, который может взаимодействовать как с H_2O , так и с гидроксилламином. Реакция образования аспартогидроксамовой кислоты из аспарагиновой кислоты и гидроксилламина, вероятно, является обратной реакции гидролиза и протекает с крайне низкой скоростью.

Среди L-аспарагиназ микроорганизмов наиболее полно изучены и охарактеризованы в плане их биосинтеза, строения, физико-химических, кинетических и биологических свойств L-аспарагиназа *E.coli* (EcA2; терапевтически активная изоформа) и фермент *Er.carotovora*, что объясняется их использованием в онкологической практике.

Таблица Некоторые свойства L-аспарагиназ из *E.coli* и *Erwinia*

Свойство	Аспарагиназа	
	EcA2 (<i>E.coli</i>) [11,34-37]	<i>Erwinia</i> [38,39,40]
Локализация	Периплазматическая	Периплазматическая
Мол.масса (кДа)	130,000	135,000
Субъединичное строение	Тетрамер	Тетрамер
Удельная активность (МЕ/мг белка)	250-300	650-700
pH оптимум	в широком диапазоне pH от 5,0 до 8,6	8-8,5
Стабильность	pH 6-9 (47-60°)	pH 3.0-12.0
ИЭТ	4,8-5,2	8,5-9
K_m (М)	$1,25 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}
Глутаминазная активность (% от аспарагиназной)	2-4	9-15
Противоопухолевая активность	+	+

Аспарагиназа *Er. carotovora* обладает высокой стабильностью в растворах в интервале pH от 3,0 до 12,0, а фермент ЕсА2 из *E. coli* термостабилен при pH 6-9 в диапазоне температур 47-60°C. Изoeлектрическая точка ферментов *E. coli* и *Er. carotovora* находится соответственно при pH 4,5 и 7,6, а значения K_m для L-аспарагина составляют около 10^{-5} М. Следует отметить, что изоферменты L-аспарагиназы из *E. coli* ЕсА1 (терапевтически неактивный) и ЕсА2 (обладает противоопухолевой активностью) значительно отличаются по величине K_m (соответственно 10^{-3} и $1,15 \times 10^{-5}$ М). Помимо дезамидирования L-аспарагина большинство бактериальных аспарагиназ способны гидролизовать, но с меньшей скоростью, D-аспарагин, L- и D-изомеры глутамина. Так, для аспарагиназы *Er. carotovora* относительная скорость гидролиза D-аспарагина, L- и D-глутамина составляет 5, 9-15 и 0,02% соответственно от таковой для L-аспарагина [38]. У L-аспарагиназы *E. coli* L-глутаминазная и D-аспарагиназная активности составляют около 4-5% от L-аспарагиназной [41].

Определена первичная структура аспарагиназ у *E. coli* А-1-3 [42], *Er. chrysanthemi* 1066 [43], *Wolinella succinogenes* [44] и ряда др. микроорганизмов. Так ферменты из *E. coli* и *Er. carotovora* построены соответственно из 321 и 327 аминокислотных остатков, из которых 143 являются идентичными, причем аминоконцевые участки более близки по последовательности аминокислот, чем С-концевые. Бактериальные аспарагиназы имеют молекулярную массу около 140-150 кДа и построены из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых состоит из двух доменов, причем индивидуальная субъединица не обладает каталитической активностью [17]. Каждая субъединица содержит 14 β -слоев и 8 α -спиралей, распределенных между двумя доменами [24,26], которые соединены линкерной последовательностью примерно из 20 аминокислотных остатков. N-Терминальный домен аспарагиназы содержит 8 β -слоев и 4 α -спирали, а меньший С-концевой домен (остатки 213-326) состоит из 4-х параллельных β -слоев и 4-х α -спиралей. Предполагается, что активный центр L-аспарагиназы *E. coli* локализован между N- и С-концевыми доменами, принадлежащим различным субъединицам, при этом каждый домен имеет два активных центра, хотя только тетрамер обладает каталитической активностью. Установлено, что атомы кислорода боковых цепей остатков Gln59, Asp90 и Glu283 взаимодействуют с α -NH₂-группой субстрата, α -карбоксильная группа аспарагина контактирует с атомами азота остатков Asp90 и с O^γ Ser58. β -Карбоксильная группа субстрата взаимодействует с атомами азота Thr89, карбонильным кислородом Ala114, O^γ Thr12, O^γ Thr89 и молекулой воды [26].

Биосинтез аспарагиназ у микроорганизмов. L-аспарагиназа ЕсА2 локализуется в периплазматическом пространстве, тогда как ЕсА1 (терапевтически неактивная конститутивная изоформа) в цитоплазме [45]. Биосинтез изоформы ЕсА2 резко индуцируется (>100 раз) в анаэробных условиях в присутствии некоторых аминокислот в качестве единственного источника углерода. Наиболее общим и доказанным механизмом регуляции образования L-аспарагиназы у бактерий *Enterobacteriaceae*, в том числе *Escherichia* и *Erwinia*, является катаболитная репрессия глюкозой, что фенотипически выражается в снижении дифференциальной скорости роста в присутствии соответствующего индуктора и углеродистого соединения, например, глюкозы. Изучение регуляции образования L-аспарагиназы у *Er. chrysanthemi* показало, что биосинтез фермента репрессируется как глюкозой, так и глицерином, но не изменяется в присутствии

источников азота и аспартата. Аспарагин не является индуктором синтеза фермента [46,47]. Оптимальными источниками углерода, обеспечивающими рост и уровень активности L-аспарагиназы, являются галактоза, ксилоза, и четырехуглеродные спирты, а азота - дрожжевой экстракт и некоторые аминокислоты (глутамат, серин, треонин или аспартат), стимулирующие образование фермента. Биосинтез L-аспарагиназы ЕС-2 у *E.coli* позитивно регулируется двумя плеiotропными белками FNR (продукт гена *fnr*), который активирует многие гены в условиях анаэробнозиса, и CPR (белок-рецептор cAMP), контролирующего инициацию транскрипции генов в путях катаболизма [48,49].

Выделение и очистка L-аспарагиназ. Препараты кристаллических и гомогенных L-аспарагиназ были получены из ряда штаммов *E.coli* [35,36,50,51], *Proteus vulgaris* [52], *Vibrio succinogenes* [53], *Er.carotovora* [39,40] и некоторых других бактерий. Детальные процедуры выделения описаны для многих микробных аспарагиназ, включая терапевтически активные ферменты из *E.coli* и *Er.carotovora* [11].

Первые методы очистки L-аспарагиназ из штаммов *E.coli* включали несколько предварительных стадий для удаления основной массы балластных белков (термообработка, фракционирование макромолекул сульфатом аммония и органическими растворителями), а также 1-2 этапа колоночной хроматографии. Так, описана 4-х ступенчатая процедура препаративного выделения фермента, включающая фракционирование сернокислым аммонием и этанолом, что позволило получить гомогенный кристаллический белок с 25%-ным выходом [35]. Для очистки используемой в клинике L-аспарагиназы "Elspar" (фирма Merck), был разработан способ, основанный на фракционировании метанолом, двух этапах хроматографии (ДЭАЭ 50 и КМ-сефароза) и осаждении этанолом.

Описан ряд препаративных способов получения граммовых количеств терапевтически активной L-аспарагиназы из *Er.carotovora*. Один из первых методов выделения этого фермента был разработан Buck et al. [54]. L-аспарагиназу экстрагировали из клеток при pH 12,5, адсорбировали на КМ-целлюлозе и после элюции с ионообменника осаждали сернокислым аммонием при 60%-ном насыщении. После повторной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе фермент кристаллизовали из 40-50%-ного этанола; удельная активность кристаллической L-аспарагиназы составила 650-700 МЕ/мг белка. В дальнейшем получение высокоочищенных бактериальных L-аспарагиназ было в значительной мере упрощено использованием аффинной хроматографии. Например, Lee et al. [55] разработали крупномасштабный метод очистки L-аспарагиназы из 880 л культуральной среды, включавший один этап хроматографии бесклеточного экстракта на аффинном сорбенте L-asparagine Sepharose 6 Fast Flow, с выходом фермента около 38%. Аффинный сорбент был получен связыванием аспарагина при pH 9,0 с эпокси-активированной Sepharose 6 Fast Flow. Всего было выделено 14×10^6 МЕ активности фермента (35 г белка) со степенью чистоты более 90%. Общее время, необходимое для выделения такого количества препарата, составило всего 68 час. Maladkar et al. [56] описали способ очистки L-аспарагиназы из *Er.carotovora* ЕС-113 с 60%-ным выходом, состоявший в хроматографии бесклеточных экстрактов на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-фильтрации на сефадексе G-200, ионообменной хроматографии на оксиапатите и аффинной хроматографии на Sepharose CL-6B.

Разработан метод препаративного выделения рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia*, клонированной и экспрессированной в клетках *Erwinia* [57]. Фермент был экстрагирован из бактериальных клеток при высоком значении pH, после чего балластные белки осаждали при низком значении pH. Для хроматографической очистки использовали S-Sepharose FF (емкость смолы до 34 мг белка/ мл геля). Выход L-аспарагиназы, пригодной для терапевтических целей, составил 92%.

Активность аспарагиназ обычно выражается в международных единицах активности (МЕ). За 1 МЕ активности фермента принимается его количество, катализирующее высвобождение из L-аспарагина 1 мкмоль аммиака за 1 мин в оптимальных условиях инкубационной среды. Удельная активность рассчитывается на 1 мг белка и для гомогенных (кристаллических) препаратов аспарагиназ варьирует от 50 (*Pseudomonas fluorescens* AG) до 200-300 (*E.coli*) и даже 650-700 МЕ/мг белка (*Er.carotovora*).

Все используемые в настоящее время в клинике лекарственные препараты L-аспарагиназы выделяют исключительно из штаммов *E.coli*, *Er.carotovora* или *Er.chrysanthemi*. Удельная активность фермента у диких штаммов *Erwinia* на порядок выше таковой у микроорганизмов других систематических групп и составляет от 0,1 до 5-6 МЕ/мг белка. Как считает Озолин [58], высокая аспарагиназная активность фитопатогенных бактерий рода *Erwinia* может быть связана с использованием аспарагина и глутамина растительной клетки в качестве пластического и энергетического материала. При этом образующийся аммоний нейтрализует кислую среду растительной клетки, что создает оптимальные условия для размножения фитопатогенов. С помощью фенотипической и генетической селекции ряду авторов удалось примерно в 10 раз повысить удельную активность L-аспарагиназы *E.coli* НАР (до 8 МЕ/мг белка) [37,59]. Описан продуцент *Er.carotovora* 268М с удельной активностью около 12 МЕ/мг белка [60].

Тем не менее, относительно низкая удельная активность фермента в биомассе даже у суперпродуцентов, наличие у мутантов отрицательных свойств (неспособность к росту на минимальных питательных средах и к транспорту ряда веществ, нарушения в дыхательной цепи, чувствительность к фаголизису и др.), трудности создания стабильных продуцентов, сложности управления биосинтезом и выполнения фармакопейных требований к препарату значительно усложняют технологический процесс получения очищенной L-аспарагиназы из клеток диких и мутантных штаммов и повышают стоимость лекарственной формы фермента.

Гетерологическая экспрессия L-аспарагиназ. Появление методов генетической инженерии открыло принципиально новый способ получения многих биологически-активных соединений, в том числе и лекарственных препаратов, путем создания рекомбинантных штаммов-суперпродуцентов, отличающихся от природных сверхсинтезом тех или иных продуктов. К их числу можно отнести инсулин, интерферон, соматотропный гормон, ростовые факторы, цитокины, иммуногенные препараты, иммунотоксины, вакцины и др. [61].

Основой для использования технологии рекомбинантных ДНК с целью получения микробных L-аспарагиназ явилась расшифровка первичной структуры генов, ответственных за синтез L-аспарагиназ у *E.coli* и штаммов *Erwinia*. Синтез изоформ L-аспарагиназы EcA1 и EcA2 у *E.coli* кодируется генами *ansA* и *ansB*

соответственно [62]. Сравнение нуклеотидной последовательности генов *ansA* и *ansB* выявило высокую область гомологии (307-342 нуклеотиды). Ген *ansB*, кодирующий терапевтически активный изофермент EcA2, был клонирован с использованием основанной на ПЦР стратегии и секвенирован. Положение *ansB* гена на физической карте *E.coli* (3144 п.о.) соответствовало примерно 63,8 мин на генетической карте [63]. Minton et al. [43] определили полную нуклеотидную последовательность гена *Er.carotovora* NCPPB 1066, кодирующего терапевтически активную L-аспарагиназу. Структурный ген имеет открытую рамку считывания, начинающуюся со стартового ATG кодона в позиции 1044 п.о. и заканчивающуюся TGA стоп-кодом. Ген кодирует сигнальный пептид из двадцати одной аминокислоты на N-конце, который четко соответствует сигнальным пептидам других секретируемых белков. Предсказание аминокислотной последовательности фермента показало 46%-ную идентичность с установленной первичной структурой L-аспарагиназы *E.coli*, хотя на основании предсказания вторичной структуры оба белка имели более высокую гомологию.

В литературе имеется ряд сообщений о конструировании систем гетерологической экспрессии гена L-аспарагиназы *E.coli* и *Er.chrysanthemi*. Сконструированы IPTG-индуцибельные системы экспрессии гена *ansB* L-аспарагиназы EcA2 *E.coli* [64]. Наиболее эффективная из этих систем включает экспрессионный вектор pTWE1 (производное pT7-7), в котором ген *ansB* находится под контролем промотора бактериофага T7. Уровень синтеза L-аспарагиназы достигал 10-15% от общего клеточного белка. Рекомбинантная L-аспарагиназа, секретируемая в периплазматическое пространство, была выделена в гомогенном состоянии путем двухстадийной очистки (фракционирование сернокислым аммонием и хроматофокусирование при pH 4-5,5), и по свойствам была идентична ферменту из дикого штамма. Выход L-аспарагиназы составил 10-15 мг/л культуральной среды. Ген L-аспарагиназы *Er.chrysanthemi* клонирован и экспрессирован в клетках *E.coli* и *Er.carotovora* в составе рекомбинантной плазмиды pASN32 (производное pUC9) [65]. Рекомбинантный белок секретиrowался в периплазму в количестве, составлявшем 5-6% от содержания растворимых белков клетки. L-Аспарагиназа, очищенная из клеток *E.coli* путем гель-фильтрации и хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой, была гомогенна по данным электрофореза в денатурирующем ПААГ, и по удельной активности (660 МЕ/мг белка), ИЭТ (8,5), молекулярной массе субъединицы (32 кДа) и четвертичной структуре не отличалась от L-аспарагиназы *Er.chrysanthemi*. Осуществлена экспрессия L-аспарагиназы *Er.chrysanthemi* в составе химерного белка с человеческим α -натрийуретическим пептидом предсердия в клетках *E.coli*. После энзиматического гидролиза Ха-протеазой фермент был выделен с использованием аффинной и ионообменной хроматографии, при этом уровень экспрессии L-аспарагиназы составил около 8% от тотального белка клетки [66].

В последние годы в связи с бурным развитием ПЦР-технологии и расшифровкой последовательностей аминокислот, кодируемых генами аспарагиназы (*ans*), появилась возможность применения ПЦР-амплификации с использованием праймеров, специфичных для 5'- и 3'-кодирующих участков гена *ans*, для создания стабильных и высокоактивных рекомбинантных продуцентов микробных аспарагиназ. Клонированный ген может быть использован в качестве пробы для поиска гомологичного гена *ans*. Альтернативно, клонирование гена *ans*

может быть осуществлено путем его ПЦР-амплификации с использованием праймеров, сконструированных на основании идентификации консервативных мотивов в последовательности бактериальных L-аспарагиназ.

Большой фундаментальный и практический интерес представляет собой селекция новых рекомбинантных форм микробных L-аспарагиназ, например *Er.carotovora*, *Er.chrysanthemi* с использованием методологии "молекулярной эволюции". Этот методический подход, предложенный и разработанный Stemmer [67], основан на конструировании и селективном отборе коротких ДНК-овых и РНК-овых олигонуклеотидов из смеси огромного количества синтезированных химическим путем фрагментов случайной последовательности. Один цикл рекомбинации ДНК включает амплификацию нужного гена при помощи ПЦР, получение набора случайных фрагментов ДНК после расщепления ДНКазой I, очистку фрагментов путем электрофореза в агарозном геле, сборку фрагментов ДНК с помощью ПЦР-подобной реакции в отсутствии праймеров, амплификацию ДНК-фрагментов в ходе стандартной ПЦР с последующим клонированием в соответствующих векторах и селекцией клонов. Этот подход является мощным инструментом для выделения белков, кардинально отличающихся по функции от исходных или родственно близких. Для применения технологии "молекулярной эволюции" в отношении L-аспарагиназы может быть использован ряд подходов.

Во-первых, это случайная фрагментация клонированного гена L-аспарагиназы ДНКазой I, амплификация с помощью, "егго-приме" ПЦР, субклонирование и селекция *in vivo* новых ферментов с использованием визуального цветного чашечного теста.

Другой подход основан на природном многообразии L-аспарагиназ *Erwinia*, доступных в ряде российских и зарубежных коллекций микроорганизмов. Гены L-аспарагиназы из различных видов *Erwinia* амплифицируются путем ПЦР с использованием праймеров в не строгих условиях, что позволяет амплифицироваться гомологичным последовательностям, после чего соответствующие гены клонируются, секвенируются и сравниваются с таковыми L-аспарагиназы *Er.carotovora*. Экспрессия клонированных генов и тщательное изучение полезных терапевтических свойств новых вариантов L-аспарагиназ *Erwinia* могут привести к идентификации ферментов, превосходящих по своим терапевтическим свойствам L-аспарагиназу *Er.carotovora*.

Использование бактериальных L-аспарагиназ в онкологии. В настоящее время в онкологической практике нашли практическое применение выпускаемые за рубежом препараты нативных L-аспарагиназ из *E.coli*, (ASP, Elspare), *Erwinia* (ERW, Erwinase) и иммобилизованного на полиэтиленгликоле фермента из *E.coli* (PEG, Oncaspar). Наиболее широко и успешно L-аспарагиназа применяется для лечения острых лимфобластных лейкозов, лимфо- и ретикулосарком, что объясняется специфичностью сдвигов обменных процессов в клетках этих форм опухолей [68-70]. В ряде случаев отмечается положительный эффект при использовании фермента для лечения болезни Ходжкина, хронической лимфоцитарной лейкемии и меланосаркомы. В общем плане современные схемы использования L-аспарагиназы при лечении острого лимфобластного лейкоза взрослых и детей в комбинированной химиотерапии включают несколько этапов: индукцию, консолидацию и реиндукцию ремиссии и поддерживающее лечение. Схемы лечения препаратами L-аспарагиназы больных различными формами

лейкозов подробно разработаны [71-76]. Как правило, аспарагиназа вводится в/в или в/м в течение 28 дней в ежедневной дозе от 200 до 1000 МЕ/кг. В случае полной ремиссии проводится поддерживающая терапия, возможно дополнительное введение фермента в течение еще 14 дней. Общая доза на курс лечения составляет 300 000-400 000 МЕ. Противопоказаниями для терапии препаратами аспарагиназы являются беременность, анафилактические реакции, панкреатиты. К побочным явлениям, наблюдающимся при лечении ферментом, относятся аллергические реакции, токсическое действие на печень, депрессивные состояния, снижение уровня фибриногена и свертывающих факторов крови и ряд других [77-80]. Развитие гиперчувствительности к L-аспарагиназе, проявляющееся в диапазоне от слабых аллергических реакций до анафилактического шока, является основным лимитирующим фактором при лечении препаратами L-аспарагиназ онкологических больных. В этом отношении представляет интерес эпитопное картирование антигенных детерминант L-аспарагиназ и получение модифицированных рекомбинантных форм фермента со сниженной антигенностью. Первый шаг в этом направлении был сделан Moola et al. [81], которые выделили мутантные формы L-аспарагиназы *Er.carotovora* (замена Pro285 на Thr285), антигенность которых была в 8 раз ниже, по сравнению с антигенностью нативного фермента. Описанные в этой работе способы успешной модификации фермента указывают на принципиальную возможность создания лекарств на основе L-аспарагиназ с пониженной иммуногенностью и кросс-реактивностью.

Следует отметить, что эффективность терапевтического действия L-аспарагиназы зависит от способности фермента гидролизовать и L-глутамин, который может конкурировать за активный центр фермента с L-аспарагином (концентрация в плазме крови последнего примерно в 10 раз ниже, чем L-глутамина). В этом отношении представляют интерес бактериальные аспарагиназы, не обладающие глутаминазной активностью. Примером таких ферментов являются оказывающие противоопухолевое действие аспарагиназы *Vibrio succinogenes* [82,83,84], *Ps.fluorescens* AG, *Ps.stutzeri* MB-405 и ряда других микроорганизмов.

Среди препаратов L-аспарагиназы наименее токсичными являются ферменты, полученные из различных штаммов *Erwinia*. Производство различных L-аспарагиназ необходимо для обеспечения полноценного и непрерывного лечения взрослых и детей. Отсутствие перекрестной алергизирующей реактивности у нативных препаратов и алергогенности у иммобилизованных ферментов позволяют применять их последовательно у одного больного при развитии иммунотоксичности, особенно на первом и втором этапах лечения.

Модифицированные (иммобилизованные) препараты аспарагиназ. Как уже отмечалось выше, L-аспарагиназа отвечает многим требованиям, предъявляемым к используемым в энзимотерапии препаратам: (отсутствие потребности в кофакторах, высокая каталитическая активность, низкое значение K_m и др.). Тем не менее, относительно низкая стабильность нативных препаратов L-аспарагиназ в физиологических условиях, их иммунологическая несовместимость и алергогенность [85] обусловили поиск более эффективных лекарственных форм этого фермента. К числу таких форм следует отнести растворимые стабилизированные препараты L-аспарагиназы, полученные методами химической модификации или иммобилизации на водорастворимых

полимерах (ПЭГ, поли-DL-аланин, альбумин, полисахариды и др.) [86-89]. Например, ПЭГ (мол. масса 5000) может быть конъюгирован с L-аспарагиназой по участкам, не затрагивающим район активного центра фермента [90]. При использовании иммобилизованных L-аспарагиназ *E.coli* и *Er.carotovora* возрастает продолжительность циркуляции фермента в крови и его биологическая стабильность, вероятно, обусловленные повышением устойчивости к протеолизу, снижаются способность связываться с антителами и поглощение РЭС, гиперчувствительность и анафилактическая активность. Все это вызывает повышение терапевтического эффекта и уменьшение побочного действия, лимитирующего необходимость длительного применения L-аспарагиназы. В последнее время разрабатывается создание липосомальных препаратов фермента [87,91], иммобилизация аспарагиназы на гидрогеле ПЭГ-альбумина [92], инкапсулирование фермента в poly(lactide-co-glycolide) наночастицы [93], химическая модификация аспарагиназы N_2O -карбоксиметил-хитозаном в присутствии L-аспарагиновой кислоты [94] и др.

Некоторые результаты исследований по изучению бактериальных L-аспарагиназ в России. В конце 60-х начале 70-х годов в СССР, под руководством акад. АМН С.Р. Мардашева, академика РАМН Т.Т.Березова и проф. А.Я. Николаева в рамках программы: "Ферменты и их применение в народном хозяйстве и медицине" проводились широкие исследования по поиску активных штаммов-продуцентов L-аспарагиназы, разработке способа очистки фермента и созданию на его основе отечественного противолейкозного лекарственного препарата. В этих исследованиях участвовали Институт биомедицинской химии РАМН (лаборатория энзимологии), Университет дружбы народов (кафедра биохимии), кафедра биохимии I Московского медицинского института им. И.М. Сеченова и Институт органического синтеза Академии Наук Латв. ССР. В результате этих работ нами впервые в стране была выделена в кристаллическом состоянии L-аспарагиназа из клеток *E.coli* ATCC 9637, не уступавшая по специфической противоопухолевой активности коммерческому лекарственному препарату фермента японской фирмы "Куова", и обладавшая менее сильным токсическим действием по сравнению с зарубежным аналогом [50,95,96]. Технология очистки кристаллической L-аспарагиназы, включавшая несколько этапов фракционирования сульфатом аммония, ацетоном и 2-метилпентан-2,4-дионом, была максимально адаптирована к условиям крупномасштабного производства и прошла успешную апробацию на заводе медицинских препаратов N1 (г. Рига, Латвия). Однако, по не зависящим от нас обстоятельствам, работы по завершению программы создания отечественного лекарственного препарата фермента были прекращены.

В ходе этих исследований нами был выделен и идентифицирован новый продуцент *Pseudomonas fluorescens* AG, синтезирующий два изофермента L-аспарагиназы, причем один из них гидролизует как L-аспарагин, так и L-глутамин. Эти ферменты, полученные в гомогенном (аспарагиназа А) и кристаллическом (аспарагиназа-глутаминаза АГ) состоянии, также как и L-аспарагиназа *E.coli* ATCC 9637, обладали противолейкозной активностью [83,97]. Другой штамм *Pseudomonas, aurantica* ВКМ-548 синтезировал только глутамин(аспарагин)азу [98]. Последнее обстоятельство представляет большой интерес в связи с обнаруженной противоопухолевой активностью препаратов глутамин(аспарагин)аз, в том числе и у *Pseudomonas*, в отношении ряда опухолей

человека и животных, устойчивых к действию L-аспарагиназы [16,18,19]. Очевидно, что при введении такого бифункционального фермента, дезамидирующего как L-аспарагин, так и L-глутамин, терапевтический эффект усиливается.

В результате проделанной работы нами была создана обширная коллекция штаммов-продуцентов L-аспарагиназы, разработана технология культивирования и оптимизированы биотехнологические параметры биосинтеза ферментов микроорганизмами, изучены механизмы регуляции индуцированного биосинтеза аспарагиназ и глутаминаз, а также аспарагинсинтетазы и глутаминсинтетазы у *Ps.fluorescens* AG, представляющие особый интерес в плане повышения продуктивности продуцентов, детально изучены физико-химические свойства, строение и механизм каталитического действия ряда микробных L-аспарагиназ и аспарагиназ-глутаминаз [50,83, 95-105].

ЛИТЕРАТУРА

1. Holcenberg J.S. (1982) Ann. Rev. Biochem. **51**, 795-812.
2. Goldberg D.M. (1992) Clin. Chim. Acta **206**, 45-76.
3. Лебедева З.П., Бerezov T.T. (1995) Вестник РАМН №2, 57-61.
4. Wriston J.C. Jr., Yellin T.O. (1973) Adv. Enzymol. **39**, 185-248.
5. Broome J.D. (1961) Nature, **191**, 1114-1115.
6. Old L.J., Boyse E.A., Campbell H.A., Daria G.M. (1963) Nature, **198**, 801-804.
7. Kidd J.G. (1953) J. Exp. Med. **98**, 565-581.
8. Broome J.D. (1963). J. Exp. Med., **118**, 99-120.
9. Holmquist N.D. (1963) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **113**, 444-447.
10. Mashburn L.T., Wriston J.I. (1964) Arch. Biochem. Biophys. **105**, 450-452.
11. Wriston J.G. (1985) Methods Enzymol. **113**, 608-618.
12. Keefer J.F., Moraga D.A., Schuster S.M. (1985) Biochem. Pharmacol. **34**, 559-565.
13. Hutson R.G., Kitoh T., Moraga A.D.A., Cosic S., Schuster S.M., Kilberg M.S. (1997) Am. J. Physiol. **272** (5 Pt 1), 1691-1699.
14. Story M.D., Voehringer D.W., Stephens L.C., Meyn R.E. (1993) Cancer Chemother. Pharmacol. **32**, 129-133.
15. Ueno T., Ohtawa K., Mitsui K., Koder Y., Hiroto M., Matsushima A., Inada Y., Nishimura H. (1997) Leukemia **11**, 1858-1861.
16. Schmid F.A., Roberts J., (1974) Cancer Chemother. Rep. **58**, 829-840.
17. Holcenberg J.S., Roberts J. eds, 1981, Enzymes as Drugs. New York: Wiley-Intersci. pp.22-57.
18. Spiers A.S.D., Wade H.E. (1976) Br. Med. J. **1**, 1317-1319.
19. Roberts J. (1983) Division of Microbial and Biochemical Technology, American Chemical Society Annual Meeting, Wash. D. C., Paper MCBT-55.
20. Palm G.J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Rohm K.H., Wlodawer A. (1996) FEBS Lett. **390**, 211-216.
21. Holcenberg J.S., Ericsson L., Roberts L. (1978) Biochemistry **17**, 411-417.

22. Peterson R.G., Richards F.F., Handschumacher R.E. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2072-2076.
23. Bagert U., Rohm K.H. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **999**, 36-41.
24. Swain A.L., Jaskolski M., Housset D., Rao J.K.M., Wlodawer A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1474-1478.
25. Miller M., Rao J.K.M., Wlodawer A., Gribskov M.R. (1993) *FEBS Lett.* **328**, 275-279.
26. Lubkowski J., Wlodawer A., Ammon H.L., Copeland T.D., Swain A.L. (1994) *Biochemistry* **33**, 10257-10265.
27. Lubkowski J., Wlodawer A., Housset D., Weber I.T., Ammon H.L., Murphy K.C., Swain A.L. (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **50**, 826-832.
28. Wehner A. (1993) Ph.D. Thesis, Philipps-Universitat, Marburg, Germany.
29. Harms E., Wehner A., Aung H.P., Rohm K.H. (1991) *FEBS Lett.* **285**, 55-58.
30. Derst C., Wehner A., Specht V., Rohm K.H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 533-540.
31. Derst C., Henseling J., Rohm K.H. (1992) *Protein Eng.* **5**, 785-789.
32. Ehrman M., Cedar H., Schwartz J.H. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 88-94.
33. Meister A., Levintow L., Greenfield R.E., Abendschein P.A. (1955) *J. Biol. Chem.* **215**, 441-447.
34. Kristiansen T., Einarson M., Sundberg L., Porath J. (1972) *FEBS Lett.* **7**, 294-298.
35. Ho P.P.K., Milikin E.B., Bobbitt J.L. et al. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 3708-3715.
36. Arens A., Rauenbusch E., Irion E. et al. (1970) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 197-205.
37. Nakamura N., Morikawa Y., Fujio T., Tanaka M. (1971) *Agric. Biol. Chem.* **35**, 219-225.
38. Howard J.B., Carpenter F.H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1020-1030.
39. Cammack K.A., Marlborough D.I., Miller D.S. (1972) *Biochem. J.* **126**, 361-379.
40. North A.C.T., Wade H.E., Cammack K.A. (1969) *Nature*, **224**, 594-595.
41. Campbell H., Mashburn L.T. (1969) *Biochemistry*, **8**, 3768-3775.
42. Maita T., Matsuda G. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 105-117.
43. Minton N.P., Bulhman H.M., Scawen M.D., et al. (1986) *Gene*, **46**, 25-35.
44. Lubkowski J., Palm G.J., Gilliland G.L. et al. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **241**, 201-207.
45. Cedar H., Schwartz J.H. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 3753-3754.
46. Wade H.E. (1980) *Microorganisms and Nitrogen Sources*, (Payhe Y.W. ed) Wiley, Chichester, pp. 563-575.
47. Callow D.S., Capell S.J., Evans C.G.T. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **65**, ii.
48. Jerlstrom P.G., Liu J., Beacham I.R. (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 127-130.
49. Jennings M.P., Beacham, I.R. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 1491-1498.
50. Мардашев С.Р., Козлов Е.А., Соколов Н.Н. и др. (1972) *Вопр. мед. химии*, **18**, 318-321.
51. Itai A., Yonei N., Matsui Y., Iitaka Y.J. (1976) *J. Mol. Biol.* **105**, 321-325.
52. Tosa T., Sano R., Yamamoto K., Matuo Y., Chibata I. (1972) *Biochemistry* **11**, 217-222.

53. *Distasio J.A., Niederman R.A., Kafkewitz D., Goodman D.* (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 6929-6933.
54. *Buck P.W., Elsworth R., Miller G.A. et al.* (1971) *J. Gen. Microbiol.* **65**, 1-10.
55. *Lee S.M., Wroble M.H., Ross, J.T.* (1989). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1**, 1-11.
56. *Maladkar N.K., Singh V.K., Nath S.R.* (1993) *Hinsustan Antibiot. Bull.* **35**, 77-86.
57. *Goward, C.R., Stevens, G.B., Tattersall, R., and Atkinson, T.* (1992) *Bioseparation*, 2:335-341.
58. *Озолин Р.К., Гривиня П.П., Савенкова Л.Ф. и др.* (1985) *Аспарагиназа и сериндегидратаза микроорганизмов: Продуценты, регуляция и свойства* – Рига, Зинатне.
59. *Barnes W.R., Vela G.R., Dorn G.I.* (1978) *Appl. Environmental Microbiol.* **35**, 766-770.
60. *Озолин Р.К., Гривиня П.П., Герцберг З.В. и др.* (1979) *А.с. № 649746*, СССР.
61. *Ritschel W.A., Foruza H.* (1994) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **16**, 453-467.
62. *Jerlstrom P.G., Bezjak D.A., Jennings M.P., Beacham I.R.* (1989) *Gene*, **76**, 37-46.
63. *Bonthron D.T.* (1990) *Gene*, **91**, 101-105.
64. *Harms E., Wehner A., Jennings M.P. et al.*, (1991) *Protein Purif. Express.* **2**, 144-150.
65. *Gilbert H.J., Blazek R., Bullman H.M., Minton N.P.* (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132** (Pt1), 151-160.
66. *Ma N.T., Wang Y.F., Roe B.A., and Harrison R.G.* (1995) *Biotechnol. Bioengineering* **47**, 483-491.
67. *Stemmer W.P.* (1994) *Nature*, **370** (6488), 389-391.
68. *Taguchi T.* (1988) *Gan To Kagaku Ryoho*, **15**, 1815-1825.
69. *Fiere D., Danaila C.* (1996) *Rev. Prat.*, **46**, 55-61.
70. *Kantarjian H.M.* (1994) *Am. J. Med.* **97**, 176-184.
71. *Muller H.J., Boos J.* (1998) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **28**, 97-113.
72. *Chabner B.A.* (1990) *Cancer Chemotherapy: Principles and practice*. Chabner B.A. and Collins J.M. eds., Philadelphia, Lippincote.
73. *Aguayo A., Cortes J., Thomas D., Pierce S., Keating M., Kantarjian H.* (1999) *Cancer* **86**, 1203-1219.
74. *Clavell L.A., Gelber R.D., Cohen H.J. et al.* (1986) *N. Engl. J. Med.* **315**, 657-663.
75. *Haskell C.M. ed.* (1980) *Cancer Treatment*, (3 rd ed. Philad.) W.B Saunders Co.,
76. *Dorr R.T., Fritz W.L., eds.* (1980) *Cancer Chemotherapy Handbook*. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc., pp. 230-237.
77. *Billett A.L., Carls A., Gelber R.D. et al.* (1992) *Cancer* **70**, 201-206.
78. *Feinberg W.M., Swenson M.R.* (1988) *Neurology* **38**, 127-133.
79. *Priest J.R., Ramsay N.K., Steinherz P.G. et al.* (1982) *J. Pediatr.* **100**, 984-989.
80. *Pui C.H., Burghen G.A., Bowman W.P., Aur R.J.*, (1981) *J. Pediatr.* **99**, 46-50.
81. *Moola Z.B., Scawen M.D., Atkinson T., Nicholls D.J.* (1994). *Biochem. J.* **302**, 921-927.
82. *Durden D.L., Distasio J.A.* (1981) *Int.J. Cancer* **27**, 59-65.

83. *Мардашев С.Р., Николаев А.Я., Соколов Н.Н., Козлов Е.А., Куцман М.Е.* (1975) *Биохимия*, **40**, 984-989.
84. *Manna S., Sinha A., Sadhukhan R., Chakrabarty S.L.* (1995) *Curr. Microbiol.* **30**, 291-298.
85. *Killander D., Dohlwitz A., Engstedt L., Franzen S., et al.* (1976) *Cancer* **37**, 220-228.
86. *Abuchowski A., Kazo G.M., Verhoest C.R.Jr., Van Es T., Kafkewitz D., Nucci M.L., Viau A.T., Davis F.F.* (1984) *Cancer Biochem. Biophys.* **7**, 175-186.
87. *Jorge J.C., Perez-Soler R., Morais J.G., Cruz M.E.* (1994) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **34**, 230-234.
88. *Inada Y, Furakawa M., Sasaki H., Kodera Y. et al.,* (1995) *Trend Biotechnol.* **13**, 86-91.
89. *Holle L.M.* (1997) *Ann. Pharmacother.* **31**, 616-624.
90. *Keating M.J., Holmes R., Lerner S. Ho D.H.* (1993) *Leuk. Lymphoma* **10** Suppl. 153-157.
91. *Casper M.M., Perez-Soler R., Cruz M.E.M.* (1996) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **38**, 373-377.
92. *Jean-Francois J., D'Urso E.M., Fortier G.* (1997) **26 (Pt 3)**, 203-212.
93. *Casper M.M., Blanco D., Cruz M.E., Alonso M.J.* (1998) *J. Controlled Release* **52**, 53-62.
94. *Qian G., Zhou J., Ma J., Wang D., He B.* (1996) *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **24**, 567-577.
95. *Николаев, А.Я., Козлов, Е.А., Соколов Н.Н., Кондратьева Н.А., Добрынин Я.В., Мардашев С.Р.* (1974) *Вопр. мед. химии* **20**, 272-276.
96. *Кондратьева, Н.А., Лорие, Ю.И., Круглова, Г.В. и др.* (1980) *Пробл. гематологии* **№7**, 3-9.
97. *Раков С.С., Прозоровский В.Н., Гребенищикова О.Г., Кондратьева Н.А.* (1977) *Вопр. мед. химии* **23**, 503-508.
98. *Березов, Т.Т., Занин, В.А., Смирнова, И.П.* (1980) **А.с., N739096 (СССР).**
99. *Николаев, А.Я., Соколов, Н.Н., Мардашев С.Р.* (1971) *Биохимия* **38**, 643-648.
100. *Соколов, Н.Н., Николаев А.Я., Мардашев, С.Р.* (1971) *Микробиология* **40**, 631-637.
101. *Соколов, Н.Н., Николаев А.Я.* (1976) *Биохимия*, **41**, 747-751.
102. *Еременко, В.В., Соколов Н.Н.* (1974) *Прикл. биохим. и микробиол.* **10**, 52-57.
103. *Лебедева З.И., Березов, Т.Т., Орехович В.Н.* (1981) *Биохимия* **46**, 85-91.
104. *Кабанова Е.А., Лебедева З.И., Березов Т.Т.* (1986) *Биохимия* **51**, 432-441.
105. *Лебедева З.И., Кабанова Е.А., Березов Т.Т.* (1986) *Биохимия* **51**, 293-301.

Поступила 20.11.00.

BACTERIAL L-ASPARAGINASES AND GLUTAMINE(ASPARAGINE)ASES: SOME PROPERTIES, STRUCTURE AND ANTITUMOUR ACTIVITY

N.N.SOKOLOV¹, V.A.ZANIN², S.S.ALEXANDROVA¹

¹Orechovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow, 119832
Tel./fax (095) 246-33-80 / (095) 245-08-57; E.mail: sokolov@medic.ibmh.msk.su

²Peoples' Friendship University, Mikluho-Maklaya St. 6, Moscow, 117198
Tel./fax (095) 434-35-05 / (095); E.mail: zanin@med.pfu.edu.ru

Experimental material on structurally and functional organization, regulation of biosynthesis and activity, mechanism of action, genetic determinants, heterologous expression of bacterial L-asparaginases is accumulated. The modern approaches to isolation and purification of these enzymes, some questions of practical using in oncology in the schedules combined chemotherapy of leukemia the native and modified forms of L-asparaginases are discussed. The some results before carried out in the IBMC RAMS and number institutes of the Russia on study bacterial L-asparaginases and glutamine(asparagine)ases are summarized.

Key words: L-asparaginase, glutamine(asparagine)ase, enzyme therapy, leukemia, heterologous expression, *Erwinia*, *E.coli*