

УДК 616-006.04:615.355  
© Коллектив авторов

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЬЮГАТОВ

Е.М.Трещалина<sup>1</sup>, О.С.Жукова<sup>1</sup>, Е.В.Лукашева<sup>2</sup>, Л.А.Седакова<sup>1</sup>, Н.В.Андропова<sup>1</sup>,  
Т.И.Солнцева<sup>1</sup>, Н.В.Гогичаева<sup>2</sup>, Т.Т.Березов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение Российский онкологический научный центр  
им. Н.Н.Блохина Российской академии медицинских наук, 115478 Москва,  
Каширское ш., д.24, факс:(095)324-14-09, эл. почта: treshalina@nm.ru

<sup>2</sup>Российский университет дружбы народов, 117198 Москва,  
ул. Миклухо-Маклая, д.8, факс:(095)434-04-12, эл. почта: lukashev@aha.ru

Изучение биологических свойств L-лизин- $\alpha$ -оксидазы (ЛО) из *Trichoderma harzianum* Rifai позволило выявить существенные отличия противоопухолевого действия ЛО от L-аспарагиназы *E.coli* в тестах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что при парентеральном введении относительно низких доз (35-350 МЕ/мл) ЛО проявляет широкий спектр противоопухолевой активности в отношении 8 штаммов перевиваемых опухолей мышей и крыс различного гистогенеза. Впервые получены конъюгаты ЛО с моноклональными антителами CD5 с сохранением существенной ферментативной и цитотоксической активности ЛО и специфичности антител. Обсуждается перспективность ЛО и ее конъюгатов для дальнейшего изучения с целью клинического применения в онкологии.

**Ключевые слова:** энзимотерапия злокачественных новообразований, конъюгаты ферментов с антителами.

**ВВЕДЕНИЕ.** Как следует из данных литературы, клиническое применение нашли только те ферменты, которые проявляют противоопухолевое действие путем необратимого распада отдельной аминокислоты, незаменимой для опухолевого роста. L-аспарагиназа бактериального происхождения из *E. coli* и *Erwinia chrysanthemi* является пока единственным ферментом со специфическим избирательным действием при гемобластозах человека [1-7]. Механизм противолейкозного действия этого фермента связан с дезамидированием L-аспарагина, который оказался незаменимым для роста некоторых опухолевых клеток.

Достаточный опыт использования аспарагиназы в экспериментальной онкологии выявил ряд ее недостатков. Главный из них - низкая устойчивость в обычных физиологических условиях, отсутствие строгой субстратной специфичности, наличие высокой иммунореактивности, вызывающей побочные эффекты, и отсутствие противоопухолевого эффекта аналогичных ферментов, полученных из других бактериальных штаммов. Узкий спектр противоопухолевой активности L-аспарагиназы нашел свое отражение в эксперименте: чувствительными к препарату оказались лимфоаденоз Фишера L-5178у (полное излечение), карциносаркома Уокера 256 и меланома Гардинг-Пасси (ингибирование роста опухоли и продление жизни) [8].

## СВОЙСТВА L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЬЮГАТОВ

Поиски других ферментов для энзимотерапии рака привели к открытию флавинадениндинуклеотид-содержащей L-лизин- $\alpha$ -оксидазы (ЛО) из грибов *Trichoderma* сначала в Японии из *Tr. viride* [9], а затем в нашей стране из *Tr. harzianum* Rifai [10]. Известно, что L-лизин, являясь незаменимой аминокислотой, стабилизирует дезоксигемоглобин, участвует в синтезе белков, играет особую роль в структуре и функциях белков соединительной ткани и ряда ферментов. Изучение различных свойств нового фермента показало, что ЛО подвергает окислительному дезаминированию L-лизин с образованием  $\alpha$ -кето- $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и пероксида водорода; фермент наиболее активен в широком интервале pH от 5,0-10,0. ЛО имеет высокую каталитическую активность и специфичность действия, низкое значение  $K_m$ , что свидетельствует о ее высоком сродстве к субстрату [11]. Показана способность ЛО снижать уровень L-лизина в крови животных практически до нуля в течение суток, следствием чего является существенное ингибирование синтеза белка и нуклеиновых кислот [10].

Таким образом, L-лизин- $\alpha$ -оксидаза может быть рассмотрена в качестве перспективного агента для онкологии. Задачей настоящей работы было изучение противоопухолевого действия ЛО и ее конъюгатов с целью создания на ее основе лекарственного препарата для энзимотерапии опухолей.

**МЕТОДИКА.** ЛО использовали в виде гомогенного по данным электрофореза в полиакриламидном геле лиофилизированного препарата (удельная активность 50 МЕ/мг белка), приготовленного на кафедре биохимии Российского Университета дружбы народов и в НПО "Фермент" (г. Вильнюс, Литва).

В опытах *in vivo* ЛО изучали на мышах и крысах с перевиваемыми опухолями при внутрибрюшинном введении в разовых дозах 35-1000 МЕ/кг в сравнении с L-аспарагиназой *E. coli* ("Гриндекс", Латвия), которую в концентрации 20-50 МЕ/мл вводили мышам также внутрибрюшинно в оптимальной разовой дозе 1000 МЕ/кг в течение 10 дней. О противоопухолевой активности судили по стандартным критериям (торможению роста опухолей (ТРО) и увеличению продолжительности жизни Т/С мышей), вычисленным в процентах по отношению к группам, не получавшим специфического лечения (контроль). О токсичности судили по числу погибших животных в группе.

В качестве возможных молекулярных мишеней действия ЛО были выбраны  $\beta$ -адренорецепторы и белки, ответственные за адгезивные свойства клеток. Объектами исследования служили клетки асцитной гепатомы 22 мышей и перевиваемых лейкозов мышей Р388 и L1210. Число рецепторов, приходящихся на одну клетку, рассчитывали по специфическому связыванию  $\beta$ -адреноблокатора [ $^3$ H]-дигидроалprenолола ([ $^3$ H]ДНА), которое соответствовало разности между общим и неспецифическим связыванием [ $^3$ H]ДНА в присутствии избытка холодного пропранолола ( $10^{-5}$ М) в условиях *in vitro* до и после 20-минутной прединкубации клеток с препаратом [12]. Изучение поступления в клетку предшественника синтеза пуринов [ $^3$ H]инозина под действием фермента проводили с помощью метода ингибиторного анализа [13].

Конъюгаты ЛО с антителами получали по методам, описанным в [14]. Экспрессию рецепторов CD5 оценивали в реакции непрямой иммунофлуоресценции, учитываемой на проточном цитофлуориметре FACS Calibur ("Becton Dickinson", США).

Антипролиферативный эффект ЛО и ее конъюгатов с АТ исследовали на опухолевых клетках человека *in vitro*. В качестве объектов исследования были использованы клетки карциномы яичника человека CaOv и неходжкинской лимфомы линии Yurkat, экспрессирующей на поверхности клеток рецептор CD95. Клетки обеих линий выращивали на среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Цитотоксичность соединений определяли с помощью МТТ-теста [15]. МТТ тест основан на ферментном восстановлении бесцветной соли тетразолия [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-диметилтетразолия бромид] дегидрогеназами

живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимых в диметилсульфоксиде. Для эксперимента клетки вносили в 96-луночный планшет. Далее в лунки добавляли диметилсульфоксид и измеряли поглощение окрашенных растворов на Titertek Multiscan MCC/340 при длине волны 540 нм. Ингибирование роста клеток определяли по формуле:  $ИК\% = (1 - N_0/N_k) \cdot 100\%$ , где  $N_0$  - оптическое поглощение в опыте, а  $N_k$  - оптическое поглощение в контроле.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Показано, что при 2-х кратном введении ЛО через 96 часов или 5-ти кратном ежедневном введении в диапазоне разовых доз 70-350 МЕ/кг существенно и достоверно продлевает жизнь мышей с двумя гемобластомами Р-388 и L-1210, Т/С=125-154% ( $p < 0,05$ ). При лечении мышей с лимфаденозом Фишера L5178y ЛО была совершенно неэффективна в отличие от L-аспарагиназы, которая приводила к Т/С=146-236% и излечению >80% мышей. Среди солидных опухолей противоопухолевый эффект ЛО получен при Са-755 в пределах ТРО=90-96%, на В-16 и РШМ-5 в пределах ТРО=75-79%. Пограничная активность отмечена на С-180, ТРО=61%. На плазмацитоме МОПС-406 и карциносаркоме Уокера W-256 активность ЛО практически отсутствовала. Лучшие результаты получены на мышях с асцитной опухолью АГ-22. При применении ЛО продолжительность жизни мышей увеличивалась в 4 раза, Т/С=401%, а 29-66% мышей полностью излечивались от опухоли. Интересно, что на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, которая отличается резистентностью к большинству известных цитостатиков, кроме препаратов платины, при введении ЛО получено ТРО=81%. Таким образом, в спектр чувствительных к ЛО опухолей вошли АГ-22, Са-755, АКАТОЛ, меланома В-16, РШМ-5, Р-388, L-1210 и La (табл. 1).

Таблица 1. Спектр противоопухолевого действия L-лизин-α-оксидазы в сравнении с L-аспарагиназой

| Фермент                  | Солидные или асцитные опухоли |     |       |        |        | Гемобластозы |         |       |        |    |
|--------------------------|-------------------------------|-----|-------|--------|--------|--------------|---------|-------|--------|----|
|                          | Са-755                        | 3LL | С-180 | М-В-16 | АКАТОЛ | АГ-22*       | L-5178y | Р-388 | L-1210 | La |
| L-лизин-α-оксидаза       | ++                            | +   | +     | +      | +      | +++          | -       | +     | +      | +  |
| L-аспарагиназа<br>E.coli | -                             | -   | -     | +      | -      | -            | +++     |       |        |    |

Примечания: критерии активности: > 50% ТРО на солидных опухолях; > 125% Т/С на асцитных опухолях и лейкозах

Диапазон действующих доз ЛО изучен на наиболее чувствительных опухолях в режиме ежедневного введения в течение 5-ти дней. Результаты показали, что при гемобластозах и асцитной опухоли значимый эффект достигался введением низких доз и прямо зависел от величины примененной дозы. При лечении высокочувствительной АГ-22 эффективные разовые дозы варьировали от 35 до 750 МЕ/кг (курсовые дозы, соответственно, 175-3750 МЕ/кг). Менее чувствительные солидные опухоли отвечали на терапию ЛО только при разовых дозах от 200 до 500 МЕ/кг. У всех мышей, независимо от опухоли, первые признаки токсичности отмечали при введении ЛО в разовых дозах 350 МЕ/кг или 500 МЕ/кг (курсовые дозы 1750 и 2500 МЕ/кг): мыши теряли в весе, проявляли беспокойство, у некоторых мышей наблюдали диарею. Эти дозы близки к максимально переносимой дозе (МПД). Гибель мышей от токсичности наступала на 5-7 сутки после окончания курса введения ЛО в разовых дозах 750-1000 МЕ/кг (курсовые дозы 3750-5000 МЕ/кг). Следовательно, терапевтический диапазон разовых доз ЛО при ежедневном внутривнутреннем введении в течение 5 дней составил 35-300 МЕ/кг (курсовые дозы, соответственно, 175-1750 МЕ/кг).

Анализируя результаты, полученные при изучении противоопухолевой активности ЛО, естественно предположить, что среди перевиваемых опухолей мышей различного гистогенеза достаточно много опухолей с эссенциальной потребностью в L-лизине. Если исключить лизина из метаболизма

## СВОЙСТВА L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЬЮГАТОВ

чувствительных к ЛО опухолей фатально для их пролиферации, то фермент с высокой субстратной специфичностью по отношению к лизину должен летально ингибировать эту пролиферацию. При справедливости такого допущения вполне объясним спектр активности и эффективность ЛО при чрезвычайно низких дозах.

*Возможный механизм действия ЛО на опухолевые клетки.* В опытах *in vitro* продемонстрировано, что экспозиция опухолевых клеток различного генеза с ЛО вызывала ингибирующий эффект. По-видимому, цитотоксический эффект фермента основан на разрушении или повреждении молекул ДНК под действием образованного в присутствии фермента пероксида водорода [16]. Инактивация матрицы ДНК приводит к подавлению синтеза НК и белка в опухолевых клетках и блокированию перехода клеток из фазы S в фазу G2/M клеточного цикла [17]. На клетках суспензионной культуры асцитной гепатомы АН-130, которые преинкубировали с ЛО в концентрации 2,5 МЕ/мл было показано, что если в среде происходит энзиматическое уменьшение уровня лизина более чем в 1,5 раза, то снижается клеточный рост и способность единичных клеток и колоний пенетрировать брыжейку и появляться в кровотоке (первая стадия инвазии) [18]. Это может объяснить один из механизмов ингибирующего действия ЛО в отношении высокометастазирующих опухолей.

Опыты с [ $^3\text{H}$ ]инозином показали, что ЛО в концентрации 10 МЕ/мл снижает поступление предшественника синтеза пуринов в клетки высоко чувствительной к ферменту АГ-22 (табл. 2). При этом скорость ферментативного включения меченого метаболита уменьшается и достигает 28% при максимальной концентрации фермента. Это позволяет предположить, что ЛО может влиять на поступление в клетки и других веществ.

Таблица 2. Изменение поступления [ $^3\text{H}$ ]инозина в клетки асцитной гепатомы 22 под действием L-лизин- $\alpha$ -оксидазы

| ЛО<br>МЕ/мл | $V_0$<br>нмоль/мин $\times 10^3$ кл | Поступление $^3\text{H}$ -инозина<br>(% от контроля) |
|-------------|-------------------------------------|--|
| -           | 2,34                                | 100  |
| 0,1         | 1,76                                | 75   |
| 1,0         | 0,87                                | 38   |
| 10,0        | 0,66                                | 28   |

Примечания:  $V_0$  - начальная скорость поступления метаболита.

На клетках АГ-22, Р-388 и L-1210 с различной чувствительностью к ЛО было показано, что под действием чрезвычайно низких концентраций фермента, составляющих  $5 \times 10^{-6}$  МЕ/ $10^6$  кл число  $\beta$ -адренорецепторов на клетках гепатомы уменьшается на 40%, а у 50% исходно не способных к адгезии клеток появляется способность прикрепления к подложке. Прежде всего, было установлено, что АГ-22, Р-388 и L-1210 имели примерно одинаковые исходные кинетические характеристики высокоаффинных  $\beta$ -адренорецепторов ( $K_d = 0,3-0,6$  нМ;  $V_{\text{макс}} = 1000 - 1300$  рец/кл), но существенно отличались по спонтанной адгезии на пластинке: клетки АГ-22 не прикреплялись к подложке, а для клеток Р-388 и L-1210 адгезия составляла 90%. Показано, что под влиянием ЛО в концентрации от  $5 \times 10^{-6}$  МЕ/ $10^6$  кл до 0,5 МЕ/ $10^6$  кл число  $\beta$ -адренорецепторов в клетках АГ-22 уменьшалось в 2 раза. В этих же концентрациях ЛО вызывала адгезию у половины клеточной популяции. В клетках Р-388 блокада рецепторов и снижение адгезии были выражены значительно слабее, не коррелировали друг с другом и проявлялись при более высоких концентрациях ЛО. Такой же эффект получен и на клетках L-1210.

Таким образом, ответ клеточной мембраны АГ-22 на действие ЛО, оцениваемый по изменению числа  $\beta$ -адренорецепторов и прикрепленных к подложке клеток, получен при концентрациях препарата на 3-4 порядка меньших по сравнению с Р-388 или L-1210. Этим, возможно, и обусловлена более высокая чувствительность АГ-22 к ЛО-терапии. Изменение числа  $\beta$ -адренорецепторов на

поверхности опухолевых клеток может оказаться определяющим в прогнозировании чувствительности опухоли к ЛО.

Различная эффективность ЛО на спектре опухолей может быть также следствием неодинаковой биодоступности препарата. При внутрибрюшинной терапии происходит прямой контакт с опухолевыми клетками, находящимися в асците, тогда как к солидной опухоли фермент доставляется через общий кровоток. Лучшие результаты лечения асцитной опухоли и солидных аденокарцином, известных чувствительностью к прооксидантам, дает основания предположить не менее существенную роль оксидазной активности фермента в реализации его противоопухолевого эффекта.

К вопросу о механизме действия ЛО можно добавить также данные о низкой аллергенности фермента. После применения ЛО лишь у части морских свинок наступает слабая транзиторная аллергическая реакция. Показатель анафилактического индекса (АИ) составлял для L-аспарагиназы *E.coli*  $АИ=2,8\pm0,35$ , в то время как для ЛО  $АИ=0,8\pm0,3$ . Для ЛО кожная анафилаксия, индекс интенсивности реакции ИИР=4-8, для аспарагиназ - до 60. ЛО имеет слабый аллергенный потенциал, не оказывает существенного влияния на гуморальный иммунный ответ к белковым антигенам (овальбумину и L-аспарагиназе из *E.coli*), не влияет на функциональную активность Т-системы и лишена митостатического эффекта в отношении пролиферирующих клеток костного мозга. ЛО наиболее активна при физиологических значениях рН.

Данные о возможном механизме действия ЛО могут быть дополнены результатами, полученными при изучении антиметастатической активности фермента [17]. Авторы показали, что действие ЛО на метастазы опухоли Льюис в легкие сопровождается уменьшением внутриклеточного содержания аденозина в альвеолярных макрофагах, играющих ключевую роль в специфической противоопухолевой резистентности. Поскольку описанный эффект получен при применении адекватных терапевтических доз фермента, можно предположить, что в случае лечения первичных опухолей этот механизм реализуется тоже.

*Получение конъюгатов ЛО с неспецифическими антителами и изучение их физико-химических и биологических свойств.* Для успешной лекарственной терапии болезней, в особенности онкологических, желательно наличие двух существенных качеств препарата: высокой избирательности действия на определенный субстрат и целенаправленного транспорта к пораженному органу-мишени в организме. Что касается первого из них, то ЛО действует практически только на L-лизин. Низкая величина константы Михаэлиса по отношению к L-лизу обеспечивает высокую скорость ферментативного превращения субстрата даже при низких концентрациях последнего. Что касается возможности направленного транспорта в организм, то, естественно, фермент не наделен этим свойством. Общим путем придания лекарственному препарату сродства к каким-либо клеткам органов и тканей является его связывание с определенной молекулой-вектором. Наилучшими константами связывания с лигандами клеток-мишеней являются антитела (АТ), которые и были выбраны для конъюгации с ферментами.

Первоначально при связывании ЛО с АТ получались конъюгаты с сохранением лишь очень небольшой части исходной ферментативной активности, но позже удалось подобрать методы и условия, сохраняющие до 70% ферментативной активности. Эти методы были основаны на использовании в качестве мостиковой молекулы между ЛО и антителами либо глутарового альдегида, либо окисленной по углеводным компонентам растительной пероксидазы (ІІХ) [14]. Физико-химические свойства конъюгатов ЛО с неспецифическими АТ мало отличались от свойств нативного фермента. Так, незначительно увеличивалась константа Михаэлиса (с 0,014 до 0,033 мМ), что указывает на ухудшение сродства иммобилизованной ЛО к субстрату, не изменялась зависимость скорости ферментативной реакции от рН, но ухудшалась термостабильность фермента. Наиболее сильно различия проявлялись в уменьшении сроков хранения при +4°C конъюгатов ЛО по сравнению с нативным ферментом.

### СВОЙСТВА L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЬЮГАТОВ

Изучение цитотоксической активности двойных конъюгатов ЛО $\times$ ПХ и тройных ЛО $\times$ ПХ $\times$ АТ на клетках линии СаОv (табл.3) показало небольшое снижение эффекта конъюгатов по сравнению с нативной ЛО. К положительному результату данного эксперимента нужно отнести тот факт, что при включении ЛО как в комплекс с ПХ, так и в тройной конъюгат с ПХ и АТ, не происходит значительной потери цитотоксической активности ЛО.

Так как включение ПХ в конъюгат не приводило к повышению цитотоксической активности конъюгата по сравнению с цитотоксическим действием нативной ЛО, в дальнейших экспериментах было решено использовать конъюгаты, не содержащие ПХ. Для создания конъюгатов ЛО с моноклональными антителами, специфичными к рецепторам определенных клеток, были выбраны

Таблица 3. Ингибирование роста клеток линии СаОv в присутствии различных концентраций конъюгата L-лизин- $\alpha$ -оксидаза-АТ-пероксидаза, а также отдельных компонентов этого конъюгата

| Соединение                 | Концентрация Е/мл |                   |                   |                   |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            | $5 \cdot 10^{-3}$ | $5 \cdot 10^{-4}$ | $5 \cdot 10^{-5}$ | $5 \cdot 10^{-6}$ |
| ЛО                         | 86,8              | 74,9              | 36,7              | 21,8              |
| ЛО $\times$ ПХ             | 76,6              | 51,7              | 24,0              | -                 |
| ЛО $\times$ ПХ $\times$ АТ | 61,8              | 42,4              | 9,9               | -                 |
| АТ                         | 10,5              | 14,8              | 17,0              | -                 |
| ПХ                         | 22,5              | 21,4              | 19,0              | -                 |

Примечание: (-) прочерк означает, что исследование не проводилось

моноклональные антитела ICO-80 к рецептору CD5. Использование двухстадийного метода [14] позволило получить конъюгат L-лизин- $\alpha$ -оксидазы и моноклональных антител ICO-80 к рецептору CD-5 с выходом по ферментативной активности 65%. Связывание моноклональных антител с ЛО не изменяло их специфичности по отношению к рецепторам CD5 на поверхности клеток линии Yurkat. Исследование цитотоксического эффекта конъюгата ЛО и моноклональных антител на этих же клетках показало незначительное снижение активности конъюгата по сравнению с исходным ферментом (табл. 4).

Поскольку цитотоксический эффект ЛО в значительной мере реализуется за счет пероксида водорода, образующегося в результате каталитической реакции превращения L-лизина, некоторое снижение биологической активности конъюгата можно объяснить тем, что молекула конъюгата с молекулярной массой в несколько раз превышающей молекулярную массу ЛО, не проникает через клеточную мембрану. Следовательно, в этом случае не образуется внутриклеточный пероксид водорода, то есть суммарная концентрация повреждающего агента ниже, чем при использовании нативного фермента. Следует отметить, что опыты по изучению цитотоксической активности конъюгатов с антителами проводили на культуре тканей, а *in vivo* эффективность конъюгатов со специфическими антителами, возможно, будет возрастать благодаря их высокому сродству к определенным клеткам. Кроме того, известно, что растворимые модифицированные производные ферментов, как правило, характеризуются пониженной иммуногенностью и увеличенным временем выведения из организма.

Таблица 4. Ингибирование роста клеток линии Yurkat в присутствии различных интервалов концентраций конъюгата L-лизин- $\alpha$ -оксидаза моноклональные антитела

| Соединение         | Концентрация Е/мл | Ингибирование роста клеток, % |
|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| ЛО                 | $1 \cdot 10^{-4}$ | 78,9                          |
| ЛО                 | $1 \cdot 10^{-5}$ | 18,4                          |
| ЛО $\times$ ICO-80 | $1 \cdot 10^{-4}$ | 56,6                          |
| ЛО $\times$ ICO-80 | $1 \cdot 10^{-5}$ | 1,3                           |

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Проведенное исследование показало, что фермент микроскопического гриба *Trichoderma harzianum* Rifai L-лизин- $\alpha$ -оксидаза является малотоксичным веществом с оригинальным противоопухолевым эффектом, принципиально отличающим его от известного препарата L-аспарагиназы *E.coli* как по спектру, так и по возможному механизму действия. Из этого следует, что помимо бактериальных штаммов-продуцентов L-аспарагиназы, которые могут быть источником активных препаратов, большой интерес представляют условно патогенные грибы - продуценты веществ с иными биологическими свойствами, чем препараты аспарагиназы. Оригинальные биологические свойства ЛО, выявленные в рамках настоящей работы, указывают на то, что новый фермент может представлять практический интерес для энзимотерапии злокачественных новообразований. Опыты показали, что конъюгирование фермента с антителами, специфичными по отношению к рецепторам опухолевых клеток, приводит к незначительному изменению его физико-химических и цитотоксических свойств. ЛО высоко активна в отношении большого числа опухолевых моделей в относительно низких терапевтических дозах, обладает низкой аллергогенностью и демонстрирует оригинальный механизм активности что принципиально отличает новый фермент от L-аспарагиназы. Это дает основания считать, что ЛО может занять место в химиотерапии опухолей. Для выявления особенностей биологического действия конъюгатов ЛО, целесообразно продолжить их исследование *in vivo*.

Авторы статьи выражают благодарность директору НИИ ЭДиТО, заведующему лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей профессору А.Ю. Барышникову и старшему научному сотруднику лаборатории Е. Р. Полосухиной за предоставление моноклональных антител ISO-80 и исследование специфичности связывания конъюгатов моноклональных антител с рецепторами CD95 клеток линии Yurkat.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карсакевич Э.С. (1984) Известия АН Латвии, №7, 129-131.
2. Кондратьева Н.А. (1984) Антибиотики, №7, 527-531.
3. Навашин С.М., Вядро М.М. (1989) Итоги науки и техники. Онкология, М.- ВИНТИ, 21, 186.
4. Пунтус Т.П. (1981) Автореферат канд. дисс, Противоопухолевая активность и фармакологические св-ва препарата L- аспарагиназа. М.Б с. 27
5. Chabner B. A., Loo T.L. (1996) In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, (Second. edn., B. A. Chabner and D. L. Longo - eds.,) pp. 485-492.
6. Howard J.B., Carpenter F.H. (1972) J. Biol. Chem., **247**, 1020-1034.
7. Rizzari C., Zucchetti M., Conter V. et al. (2000) Ann. Oncol, **11**, 189-193.
8. Kidd J.D. (1953) J. Exp. Med, **98**, 565-568.
9. Kusakabe H., Kodama K., Machida H. et al. (1979) Agric. Biol. Chem, **43**, 347-343.
10. Хадуев С.Х., Лукашева Е.В., Смирнова И.П., Березов Т.Т. (1985) Вopr. мед. химии, **31**, 130-134.
11. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (1988) Прикладная биохимия и микробиология, **24**, 459-465.
12. Власенкова Н.К., Солнцева Т.И., Герасимова Г.К. (1996) Материалы 1 Съезда Онкологов стран СНГ, Москва, ч.1, с.91-92.
13. Amandgolov B.S., Lebedin K.S., Kadagizge S.G. et al. (1999) 9th Int. Congress on Anti-Cancer Treatment, PP77.

#### СВОЙСТВА L-ЛИЗИН- $\alpha$ -ОКСИДАЗЫ И ЕЕ КОНЪЮГАТОВ

14. Гогичаева Н.В., Лукашева Е.В., Гаврилова Е.М., Смирнова И.П., Егоров А.М., Березов Т.Т. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, 410-418.
15. Boyt M.R. (1989) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, **3**, 1-12.
16. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A. et al. (1980) *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 387-392.
17. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В. и соавт. (1985) *Эксперим. онкология*, №7, 42-44.
18. Уманский В.Ю., Хадуев С.Х., Залеток С.П. и соавт. (1990) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, N5, 458-459.

•Поступила 09.12.2003

#### BIOLOGICAL PROPERTIES OF L-LYSINE $\alpha$ -OXIDASE IN NATIVE AND CONJUGATED FORM

H.M.Treshalina<sup>1</sup>, O.S.Zhukova<sup>1</sup>, E.V.Lukasheva<sup>2</sup>, L.A.Sedakova<sup>1</sup>, N.V.Andronova<sup>1</sup>, T.I.Solntzeva<sup>1</sup>,  
N.V.Gogichaeva<sup>2</sup>, T.T.Berezov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Blokhin Cancer Research Center of RAMS, Kashirskoye sh. 24, Moscow, 115478 Russia,  
fax:(095)324-14-09, e-mail: treshalina@nm.ru

<sup>2</sup>Russian Peoples' Friendship University, Miklukho-Maklaja str., 8, Moscow, 117198 Russia; fax  
(095)434-04-12, e-mail: lukashev@aha.ru

The significant difference between biological properties of L-lysine- $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai (LO) and L-asparaginase from *E.coli* has been observed *in vitro* and *in vivo*. High antitumor activity was shown against 8 types of murine and rat transplanted tumors with a wide range of LO therapeutic doses: 35-350 U/mg. The LO conjugates with monoclonal antibodies CD5 specific to the surface of cell line Yurkat were obtained without significant loss of either enzymatic and cytotoxic activity or immunological specificity. The further perspective investigation for the clinical application of the native or conjugated enzymes is discussed.

**Key words:** cancer enzymotherapy, enzyme conjugates with antibodies, cytotoxic activity.