

ВТОРЫЕ ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ В.Н. ОРЕХОВИЧА

УДК 616-00.04:615.355

© Березов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭНЗИМОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.

Т.Т. Березов.

Кафедра биохимии Российского университета дружбы народов,
119198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8; факс: (095) 434-04-12,
эл. почта: tberez@med.pfu.edu.ru

В докладе приводятся доказательства перспективности применения бактериальных ферментов в качестве лекарственных средств в онкологии. Показано, что современная стратегия ферментной терапии опухолей преимущественно основана на строгих биохимических особенностях и на разной чувствительности нормальных и опухолевых клеток к недостатку незаменимых факторов роста, включая аминокислоты. Показан тормозящий эффект трех бактериальных ферментов (глутамин(аспарагин)азы, метионин- γ -лиазы и лизин- α -оксидазы) на рост клеток ряда опухолей животных в опытах *in vitro* и *in vivo*. Эти результаты вселяют надежду, что промышленное производство стандартных ферментных препаратов и их рациональное применение в клинике, организованное на строго научной основе, несомненно, дадут в руки врачей еще одно ценное оружие в борьбе с опухолевыми заболеваниями человека.

Ключевые слова: энзимотерапия опухолей, аспарагиназа, глутамин(аспарагин)аза, метионин- γ -лиаза, лизин- α -оксидаза.

ВВЕДЕНИЕ. В поисках специфических биохимических маркеров в опухолевых клетках ученые уделяют огромное внимание ферментам, не только в силу их уникальных функциональных свойств и специфичности действия, но и в силу того, что ферменты могут быть использованы в качестве одного из самых тонких и избирательных инструментов для направленного изменения метаболизма раковой клетки.

Научные исследования по ферментной терапии опухолей, выполненные на нашей кафедре на протяжении трех десятилетий, включали как поиск продуцентов-микроорганизмов и разработку оригинальных лабораторных методов выделения и очистки, так и исследования физико-химических и биологических (антиопухолевых) свойств. Большинство полученных результатов опубликовано или в виде экспериментальных результатов и обзоров или защищено авторскими свидетельствами и патентами на изобретения [1-13]. О некоторых результатах будет указано более подробно во второй части данного обзора, а в первой - хочу напомнить о логике развития и движения данной проблемы на ранних этапах, малоизвестных, за исключением узкого круга специалистов – биохимиков, работающих в близкой области исследования, широкой научной общественности.

1. Ферменты в экспериментальной онкологии.

Среди поводов, побудивших нас подробно заняться применением ферментов в экспериментальной онкологии, было полученное общее заключение о существовании в опухолях обратной зависимости между скоростью синтеза белков (и других полимерных молекул, в частности нуклеиновых кислот) и активностью катаболических ферментов обмена аминокислот и полиаминов. К этому заключению мы пришли на основании систематического изучения общих и частных путей обмена аминокислот и полиаминов в различных типах злокачественных опухолей человека и животных [14-19].

Опухолевая клетка для обеспечения высокой скорости роста и деления нуждается, в первую очередь, в доставке готовых мономерных молекул аминокислот и нуклеотидов, распад которых до конечных продуктов (CO_2 , H_2O , NH_3 и др.) может резко снизить синтетические процессы. Этими обстоятельствами могут быть объяснены и нарушения, точнее, изменения, наблюдаемые в клетках опухолей животных и человека, активности пиридоксальсодержащих ферментов, катализирующих ключевые реакции распада аминокислот (аланина, тирозина, серина, треонина, амидов дикарбоновых аминокислот). Эти пиридоксальные ферменты, впервые открытые А.Е. Браунштейном [20], играют по меткому выражению академика АМН С.Р. Мардашева “первую скрипку в симфонии белкового и всего азотистого обмена” [21,22]. Отсюда возникла идея о возможности активного вмешательства в опухолевый процесс путем стимулирования скорости катаболизма аминокислот и полиаминов введением соответствующих ферментов [6,23].

Вторым стимулом к энзимотерапии опухолевых поражений послужили данные литературы по выращиванию нормальных и опухолевых клеток в культуре ткани, полученные в ряде лабораторий [24-27]. Они свидетельствовали о том, что нормальные клетки могли делиться и расти в отсутствие в искусственной питательной среде ряда заменимых аминокислот, в то время как некоторые клеточные линии опухолей теряли эту способность и нуждались в доставке извне тех же аминокислот. Более того, если нормальные клетки были наделены способностью синтеза любых аминокислот из предшественников (α -кетокислот и аммонийных солей) и источника энергии, то опухолевые клетки оказывались лишенными этой способности почти полностью.

В выборе научного направления по ферментной терапии опухолей особую роль сыграли и наши более ранние исследования особенностей обмена аспарагина в лейкозных клетках человека [17, 28]. Изучая активность ключевого фермента синтеза этого амида – аспарагинсинтетазы, было показано, что нормальные лейкоциты крови человека (доноры) и лейкоциты от больных миелолейкозом синтезируют с заметной и почти одинаковой скоростью аспарагин в присутствии аспарагиновой кислоты, аммиака и АТФ; в то же время лейкоциты, выделенные из крови больных лимфолейкозом, в аналогичных условиях не синтезировали аспарагин. В процессе этой работы, как бы попутно, был выявлен один весьма любопытный факт: оказалось, что нормальные лейкоциты (из крови доноров) были полностью лишены второго (считающегося побочным) пути синтеза аспарагина и глутамина за счет специфической реакции трансаминирования амидов, в то время как лейкозные клетки (от больных как миело-, так и лимфолейкозом) могли с измеримой скоростью синтезировать оба амида (табл. 1).

На основании этих данных было высказано предположение, что между нормальными и лейкозными клетками имеются не только количественные биохимические различия, но, возможно, и качественные молекулярные изменения, которые могут служить основой для поиска путей активного воздействия на опухолевую трансформацию.

Наконец, следует указать на результаты исследований Кидда и Брума [29, 30] о лечебном эффекте сыворотки морской свинки при лимфосаркоме. Выделенные из сыворотки крови морской свинки очищенные ферментные препараты L-

аспарагиназы обладали таким же терапевтическим действием при лимфолейкозе. Однако для получения необходимого на курс лечения количества аспарагиназы (около 1 миллиона единиц фермента) следовало бы выделить этот фермент из сыворотки крови 30 000 морских свинок.

Таблица 1. Активность аспарагинсинтетазы (Асн-С) в лейкоцитах здоровых людей и больных лейкозом.

Источник лейкоцитов	Число случаев	Активность Асн-С (в нм на мг белка в час)
Доноры	50(27)	0,01-2,0
<u>Больные острым лейкозом</u>		
• лимфобластным	20 (0)	0
• миелобластным	8 (2)	0,001-0,002
• гистиомоноцитарным	3 (0)	0
• недифференцированные формы	12 (0)	0
<u>Больные хроническим лимфолейкозом</u>	4 (0)	0

Примечание: в скобках указано количество случаев, где обнаруживается активность фермента

Следовательно, для широкого медицинского применения сыворотка крови морской свинки не могла служить надежным и реальным источником фермента. Эти результаты побудили исследователей, в том числе и С.Р. Мардашева к организации (в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР при участии В.Н. Ореховича) специальной лаборатории и к поиску других источников L-аспарагиназы [22]. На нашей кафедре аспирантом В.А. Заниным был выделен отечественный штамм-продуцент L-аспарагиназы из *E. coli*. Наша группа была включена в лабораторию С.Р. Мардашева по получению в промышленных масштабах L-аспарагиназы, выпуск которой был осуществлен в г. Олайне (Латвия).

В настоящее время широко применяется в клинической онкологии только один единственный фермент бактериальной природы - L-аспарагиназа, в частности, для лечения острых лимфобластных лимфолейкозов, лимфогранулематозов, лимфо- и ретикулобластом. Налажен промышленный выпуск этого фермента во многих странах, но не у нас. Разработаны методы выделения и очистки экспрессированной в клетках *E. coli* рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* во многих лабораториях, включая лабораторию профессора Соколова Н.Н. в ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН [31, 32]. Создание генно-инженерных штаммов – продуцентов позволило значительно расширить список микроорганизмов – потенциальных источников не только L-аспарагиназы, но и ряда других ферментов, наделенных противоопухолевой активностью в экспериментах на животных.

Таким образом, одним из главных постулатов ферментной терапии опухолевых поражений, следует признать разную чувствительность нормальных и опухолевых клеток не только к недостатку эссенциальных, незаменимых ростстимулирующих факторов (витамины, аминокислоты, макро- и микроэлементы), но и ряду так называемых заменимых веществ (легко синтезируемых в самом организме), в которых клетки опухолей в силу особенностей их метаболизма нуждаются в большей степени, чем нормальные прототипы клеток. Оказалось, что нормальные линии клеток, выделенные из

органов человека и животных, могут расти в культуре ткани в присутствии предшественников ряда аминокислот (глутамина, аспарагина, лизина, метионина, фенилаланина и др.). Линии клеток раковой опухоли легких человека, лейкоциты, полученные от больных миело - и лимфолейкозом, и некоторые линии клеток опухолей животных не могли размножаться; для своего роста и деления они нуждались в добавлении к культуральной среде готовых аминокислот [26, 27]. Учитывая эти обстоятельства, главной целью ферментной терапии опухолей является разрушение, причем необратимое, тех субстратов и веществ, которые оказались для клеток опухолей незаменимыми факторами роста.

Следует подчеркнуть, что современная стратегия и тактика применения ферментов в онкологической практике базируются не на эмпирических данных испытания большого числа ферментов и не на фундаментальных морфологических признаках и процессах клеточной пролиферации, а на строгих молекулярных, биохимических качественных и количественных различиях между нормальными и опухолевыми клетками. Именно эти различия в метаболизме клеток определяют природу и молекулярную сущность опухолевой трансформации; детальное их выяснение будет способствовать не только расширению наших знаний о раковой клетке, но и служить основой для разработки поисков путей направленного воздействия на процесс трансформации и эффективных методов лечения онкологических заболеваний человека.

2. Бактериальные ферменты как противоопухолевые препараты.

К настоящему времени известно около 20 бактериальных ферментных препаратов, используемых в опытах на трансплантируемых опухолях животных. Примеры: фенилаланинаммиаклиаза, тирозинфеноллиаза, необратимо разрушающие структуры Фен и Тир, были применены при лечении меланомы В16 весьма успешно.

К ферментным препаратам, рекомендуемым в качестве лекарственных антинеопластических средств, предъявляется ряд требований [23, 27] (табл. 2). В частности, они должны быть наделены не только высокой каталитической активностью к определенному соединению, но и высокой субстратной специфичностью, катализируя необратимое расщепление одного какого-либо вещества. Подобный фермент должен обладать большим сродством к субстрату (низкой величиной K_m) и высокой молекулярной активностью. Такие ферменты должны отличаться низкой аллергогенностью и иммуногенностью и высокой стабильностью при физиологических условиях температуры и pH среды, а также большим периодом полужизни и медленным выделением из организма. Важным критерием отбора ферментов медицинского назначения является, кроме того, легкая проницаемость через биомембраны клеток, доступность их получения из непатогенных микроорганизмов, отсутствие необходимости добавления эндогенного кофактора, включая коферменты.

Таблица 2. Требования к ферментам, применяемым в онкологии.

- Высокая активность и стабильность при физиологических значениях pH
- Высокая молекулярная активность (большое число оборотов)
- Высокое сродство к субстрату (низкая K_m)
- Медленное выведение из организма (большое $T_{1/2}$)
- Отсутствие потребности в экзогенных кофакторах
- Низкая иммуногенность
- Отсутствие торможения продуктами распада субстрата
- Необратимость энзиматической реакции
- Легкая проницаемость через мембраны клеток
- Доступность из непатогенных микроорганизмов, содержащих минимум эндотоксинов

Поскольку подбор и выделение подобного фермента, идеально отвечающего всем перечисленным требованиям, чрезвычайно трудно, на практике используется ряд так называемых обязательных критериев. К подобным требованиям относится, например, ряд кинетических свойств ферментов, в частности, высокая молекулярная активность, высокое сродство к субстрату (низкая величина K_m), высокая удельная активность, большой период полужизни и, главным образом, высокая антиопухолевая активность, когда минимальная введенная в организм доза вызывает максимальный лечебный эффект.

Ниже в качестве примера представлены некоторые сравнительные кинетические и биологические свойства полученных на нашей кафедре трех бактериальных ферментов; в качестве контроля приведены литературные данные по L-аспарагиназе, выделенной из *E. coli* [6, 23] (табл. 3).

Таблица 3. Сравнительные кинетические параметры и биологические свойства ряда бактериальных ферментов.

Фермент	K_m (мМ)	Число оборотов (моль/мин х моль/Е)	Удельная активность	Период полу- жизни (ч)	Антиопухолевая активность (Е/ <i>in vitro</i>)
L-Аспарагиназа	0,01	1000	200	2-4	2800
L-Глутамин(аспарагин)аза	0,004	2800	160	13	150-480
L-Метионин-γ-лиаза	1,300	700	19,1	4	0,1-1,0
L-Лизин-α-оксидаза	0,04	7200	66,1	2	0,1-1,0

Представленные результаты свидетельствуют о том, что наиболее перспективными с точки зрения кинетических свойств (высокая молекулярная активность и низкая величина K_m) являются L-аспарагиназа, L-глутамин(аспарагин)аза и L-лизин-α-оксидаза, в то время как по биологическим свойствам более эффективны - L-метионин-γ-лиаза и L-лизин-α-оксидаза.

Выбор трех бактериальных ферментов, исследованиями структуры и функции которых систематически на протяжении почти 20 лет занимается коллектив нашей кафедры, был не случайным, а диктовался рядом весьма существенных обстоятельств. Во-первых, как глутамин, так и аспарагин оказались незаменимыми факторами роста [23,27] для клеток, хотя по классическим биохимическим данным они относятся к заменимым аминокислотам, легко синтезируемые в клетках *in vitro* и в целостном организме животных. Во-вторых, будучи бифункциональным ферментом, глутамин(аспарагин)аза катализирует почти с одинаковой скоростью необратимое гидролитическое расщепление обоих амидов, хотя бактериальные клетки, также как клетки животных и человека содержат и специфические ферменты, действующие на каждый субстрат в отдельности.

В-третьих, обратный процесс – биосинтез глутамина и аспарагина в животных тканях катализируют другие специфические синтетазы, активность которых, по нашим и литературным данным, в ряде опухолей человека и животных чрезвычайно низка или отсутствует вообще [17, 24-26, 28].

Наконец, следует учитывать то обстоятельство, что, вызывая необратимое

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭНЗИМОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

разрушение глутамина и аспарагина под действием фермента, опухолевые клетки лишаются не только этих амидов для белкового синтеза (именно в этом видят исследователи основной молекулярный механизм лечебного действия L-аспарагиназы), но и амидного азота, абсолютно необходимого для биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов (соответственно ДНК и РНК), а также источников энергии, никотинамида, глюкозамина и галактозамина и др.

Испытания противоопухолевой активности глутамин(аспарагин)азы были проведены совместно с сотрудниками Онкологического научного центра РАМН, и некоторые результаты этих исследований будут представлены ниже.

Значительное место в работе занимали и до сих пор проводятся исследования кинетических и физико-химических свойств ферментов; предпринимаются попытки расшифровки механизма действия, химической природы активного центра фермента, в частности, вклада ряда функциональных групп белковой молекулы фермента в акте катализа [4,5,33,34]. Результаты части этих исследований были получены совместно с профессором Ивановым А.С. и его сотрудниками в НИИ биомедицинской химии РАМН [33,34]. Они свидетельствуют о том, что в акте катализа, включающего образование двух промежуточных фермент-субстратных комплексов, существенную роль играют свободные аминокислотные группы молекул фермента и субстратов.

Следующий бактериальный фермент, который также испытан в опытах *in vivo* и *in vitro* в ОНЦ РАМН (некоторые результаты представлены ниже), был получен из *Pseudomonas* в нашей лаборатории в совместных исследованиях с институтом химических исследований Университета г. Киото (Япония) [35-37]. Это метионин-γ-лиаза (пиридоксальфосфатсодержащий фермент), катализирующая необратимый распад незаменимой аминокислоты метионина на метилмеркаптан, аммиак и α-кетомасляную кислоту.

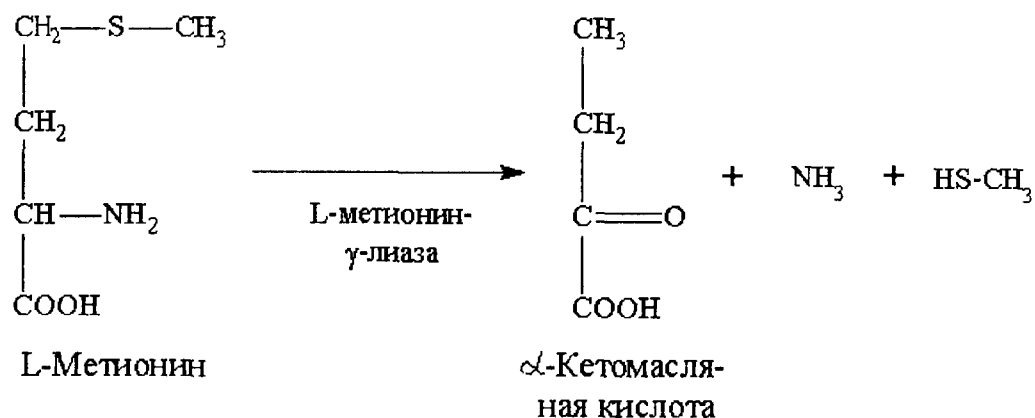


Рисунок 1.
Схема реакции, катализируемой метионин-γ-лиазой

Оказалось, что этот фермент является полифункциональным и помимо основной функции α,γ-элиминирования метионина, он катализирует также реакции γ-замещения метионина и α,β-элиминирования и β-замещения цистеина, S-метил-L-цистеина и др. тиоловых соединений. Разрушая структуру метионина, фермент лишает клетки органической серы и абсолютно необходимой для синтетических реакций лабильной метильной (CH₃)-группы. В этих реакциях участвует не свободный метионин, а S-аденозилметионин, являющийся продуктом конденсации аденозина и метионина в процессе уникальной трансферазной реакции с АТФ. Лабильная метильная группа S-аденозилметионина используется в

организме не только для синтеза физиологически активных соединений, в частности гормонов (адреналина), холина, фосфолипидов, креатина (соответственно фосфокреатина), но также в реакциях постсинтетического метилирования полимерных молекул нуклеиновых кислот и белков. Кроме того, аминопропильный остаток декарбоксилированного S-аденозилметионина целиком используется при синтезе таких полиаминов, как спермин и спермидин, которые в свою очередь принимают участие в стабилизации клеточной и субклеточной структур, в регуляции биосинтеза ДНК, РНК и белка, соответственно роста и деления клеток и т.д. Следует, очевидно, указать еще на одну уникальную функцию метионина и его формильного производного в начальной стадии синтеза белка - инициации трансляции на рибосомах клеток всех живых организмов.

Последний бактериальный фермент лизин- α -оксидаза, скорее относится к препаратам грибного происхождения. Этот фермент выделен из отечественного штамма *Trichoderma sp.* и получен в гомогенном состоянии в нашей лаборатории. Впервые он получен К. Сода и его сотрудниками в Японии, где были показаны его антиопухолевые свойства в опытах *in vitro* и *in vivo* [38,39]. По своей химической природе лизин- α -оксидаза относится к классу FAD-содержащих оксидаз L-аминокислот. Следует отметить, однако что кофермент прочно связан с каждой из двух субъединиц фермента и при очистке не освобождается в свободном виде.

Фермент катализирует окислительное дезаминирование L-лизина:

Реакция, катализируемая L-лизин- α -оксидазой

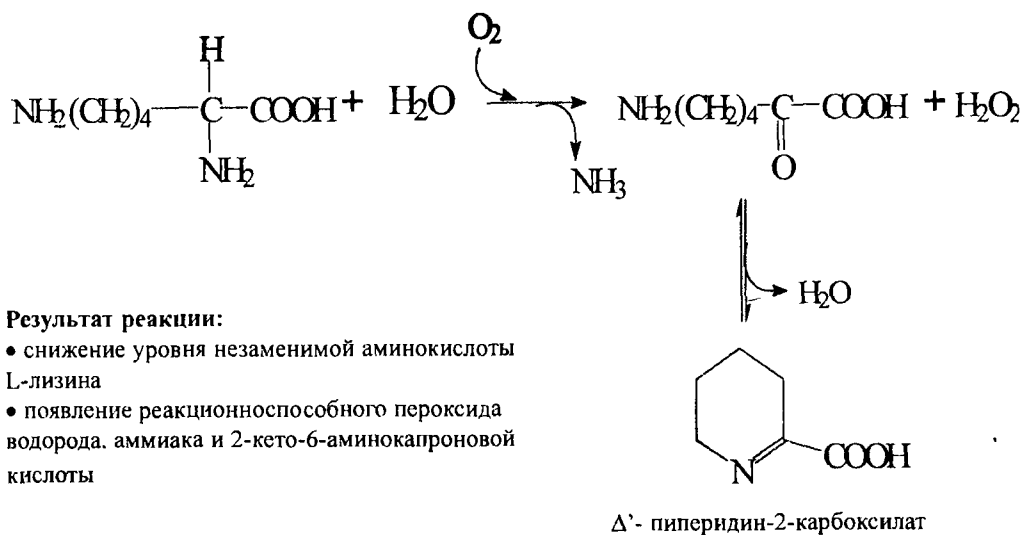


Рисунок 2.
Схема окислительного дезаминирования лизина

Поскольку реакция дезаминирования L-лизина является необратимой, фермент в опытах *in vitro* почти полностью лишает клетки опухолей в культуре ткани незаменимой аминокислоты, оказывая, тем самым, ростотормозящий эффект. В опытах на животных с перевиваемыми опухолями лизин- α -оксидаза лишает как нормальные, так и опухолевые клетки L-лизина, необходимого для синтеза белка: но этот эффект в условиях организма может оказаться кратковременным, учитывая

небольшой период полужизни почти всех бактериальных ферментов и возможность компенсации его за счет протеолиза собственных белков организма. Помимо участия в белковом синтезе, следует указать также на ряд уникальных функций L-лизина в клеточном метаболизме. В частности, ϵ -аминогруппа лизина участвует в стабилизации дезоксигемоглобина; являясь составной частью активного центра ряда ферментов (пиридоксальфосфатсодержащие ферменты, РНК-полимеразы, фосфорилазы и др.), лизин и его ϵ -аминогруппа в форме пиридоксализина принимают участие в акте катализа, способствуя выяснению молекулярного механизма каталитического действия указанных ферментов. Лизин является составной частью сложных белков дезоксирибонуклеопротеинов (богатые лизином гистоны), участвуя не только в формировании вместе с молекулой ДНК хроматина эукариот, но и в тонких молекулярных механизмах передачи наследственной информации. Исключительно важную роль играет лизин при синтезе белков соединительной ткани (проколлагена, коллагена), в которых остаток лизина подвергается постсинтетической химической модификации (реакции гидроксирования), выражающейся в превращении остатка лизина в 5-оксилизин, способствуя тем самым формированию и стабилизации третичной структуры молекулы белков. Известно, кроме того, что по количеству этой незаменимой аминокислоты судят о биологической ценности принимаемого пищевого белка, а сам лизин, как лечебный препарат, добавляемый в пищу, широко применяется при квашиоркоре – болезни, развивающейся при глубокой белковой недостаточности.

Наши исследования по всем трем указанным ферментам с возможной противоопухолевой активностью проводились по следующей схеме. В первую очередь, работа включала поиск – скрининг и отбор среди большого числа коллекционных штаммов и природных микроорганизмов продуцентов ферментов. Работа завершилась отбором не более двух-трех отечественных бактериальных штаммов, наделенных измеримой исходной ферментативной активностью. В результате отбирали продуцент фермента. На последующих этапах разрабатывались оптимальные условия культивирования микроорганизмов (химический состав питательной среды, температура, pH среды) и высокочувствительные физико-химические методы измерения энзиматической активности (например, 4 метода определения активности метионин- α -лиазы, включая стехиометрию реакций) [3,36].

Существенной частью работы было выяснение основных закономерностей регуляции синтеза фермента *de novo*, используя методы индукции и репрессии. Затем приступали к разработке методов выделения и очистки и получению высокоочищенных ферментных препаратов, гомогенность которых проверяли и подтверждали методами диск-электрофореза в полиакриламидном геле и аналитического ультрацентрифугирования, а также методами спектрального анализа.

В результате по каждому из трех ферментов был разработан оригинальный лабораторный регламент очистки и получения фермента. Все штаммы микроорганизмов, как и методы культивирования, оригинальные методы определения активности и выделения и очистки ферментов защищены авторскими свидетельствами и патентами (более 30) на изобретения.

Дальнейшая работа со всеми тремя ферментами, связанная с испытанием чистых ферментных препаратов на антиопухолевую активность, проводилась, как было указано выше, совместно с сотрудниками ОНЦ РАМН и ряда других научных центров страны и за границей (Киев, Киото, Вильнюс, Турку).

Первые серии опытов проводили на раковых клетках (животных и человека), выращенных в культуре ткани. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три испытанных ферментных препарата тормозят в клетках опухолей синтез ДНК, РНК и белка из меченых предшественников. Наибольшей противоопухолевой активностью ферменты наделены в отношении лейкозных клеток человека и животных, не уступающей активности коммерческих

препаратов L-аспарагиназы [10,12,40-43].

В опытах *in vivo* эффективность антиопухолевой активности проверяли двумя критериями: по изменению продолжительности жизни животных и торможению роста опухоли. Мыши считались лечеными, если оставались живыми в течение 120 дней после инокуляции опухоли.

В преклинических исследованиях антиопухолевая активность глутамин(аспарагин)азы и лизин- α -оксидазы была показана в опытах на животных, пораженных такими опухолями как: саркома 45, карциносаркома РС-1, гепатома 22. L-1210, P 38, A122A, 3LL, Са-755. В опытах со многими опухолевыми клеточными линиями в культуре ткани росттормозящий цитотоксический эффект был отмечен в присутствии всех трех испытанных ферментов. Была определена четкая зависимость между концентрацией фермента (доза) в среде и клеточным делением и выживаемостью раковых клеток. В присутствии этих ферментов наблюдалось 80-95 процентное торможение синтеза ДНК, РНК и белка [40-42, 44].

Для лизин- α -оксидазы был доказан антиметастатический эффект [11,45] в опытах с мышшиной опухолью легких Льюис: отмечено снижение количества метастазов в 3-4 раза и объема первоначальной исходной опухоли почти в 10 раз. Эффективность препарата подтверждена также при последующем определении уровня полиаминов в эритроцитах и активности двух ключевых ферментов обмена пуринов (аденозиндезаминазы, 5-нуклеотидазы) в альвеолярных макрофагах. С другой стороны, этот фермент характеризуется слабой аллергогенностью и не подавляет митоз и активность Т-лимфоцитов.

Для того, чтобы обеспечить доставку фермента к органам мишеням, были разработаны методы получения конъюгатов лизин- α -оксидазы и антител: (1) окислением (NaIO_4) углеводного компонента лизин- α -оксидазы (фермент является гликопротеином) и последующим ковалентным связыванием образующихся альдегидных групп с аминогруппами антител; (2) с помощью бифункционального сшивающего реагента – глутарового альдегида; (3) с использованием окисленной по углеводному компоненту пероксидазы (растительной) в качестве “мостиковой” молекулы для связывания ее с аминогруппами антител и лизин- α -оксидазы. Были изучены сравнительные каталитические и иммунологические свойства полученных конъюгатов [46-48].

Оказалось, что при окислении углеводного компонента лизин- α -оксидазы наблюдается большая потеря каталитической активности. Однако удалось подобрать условия, сохраняющие до 70% активности исходного фермента. Установлено, что наибольшая лизиноксидазная активность сохраняется при получении конъюгатов третьим (78%) и вторым способом (70%). В то же время не наблюдается и существенного снижения противоопухолевой активности конъюгированного фермента. Об этом свидетельствуют опыты с асцитными и солидными формами перевиваемых опухолей животных.

В таблице 4 суммирован спектр противоопухолевого действия лизин- α -оксидазы на солидные асцитные опухоли и на гемобластозы в сравнении с L-аспарагиназой. Показано, что при 2-х кратном введении лизин- α -оксидазы через 8 часов или 5-ти кратном ежедневном введении в диапазоне разовых доз 70-350 МЕ/кг (курсовые дозы соответственно 175-1750 МЕ/кг) существенно и достоверно продлевается жизнь мышей с двумя гемобластозами (P-388 и L-1210), Т/С = 125-154%. Самые лучшие результаты получены на мышах с асцитной опухолью АГ-22: фермент увеличивает продолжительность жизни животных почти в 4 раза, Т/С = 401%, а 29-66% мышей полностью излечиваются от опухоли. В тоже время при лечении мышей с лимфоаденозом Фишера L-5168Y лизиноксидаза оказалась совершенно неэффективной в отличие от L-аспарагиназы, которая приводила к увеличению Т/С до 146-236% и излечению около 80% животных. Среди солидных опухолей противоопухолевый эффект лизин- α -оксидазы получен при Са755 в пределах 90-96% ТРО (торможение роста опухоли), на штамме меланомы В-16 и РШМ-5 в пределах ТРО = 75-79%. Пограничная активность отмечена на С-180

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭНЗИМОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

(ТРО = 61%). Интересно, что на аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, которая отличается резистентностью к большинству известных цитостатиков, кроме препаратов платины, при введении лизин- α -оксидазы получено ТРО = 81%. Таким образом, в спектр чувствительных к этому ферменту опухолей вошли АГ-22А, Са-755, АКАТОЛ, меланома В-16, РШМ-5, 5-388, 2-1210 и La¹.

Таблица 4 Спектр противоопухолевого действия лизин- α -оксидазы.

Препарат	Опухоли мышей								Опу- холь крыс
	Гемобластозы			Асцит- ная гепато- ма 22А	Адено- карциномы		Мела- нома В-16	РШМ-5	
	Лимфолейкоз		L- 5168 У		Са- 755	АКА- ТОЛ			
	Р-388	L- 1210							
ЛО	++	++	-	+++	++ +	++	++	++	-
L-аспара- гиназа	-	-	+++	-	-	-	+	-	+

2.1. Возможный механизм действия ЛО на опухолевые клетки. Для некоторых клеточных линий перевиваемых опухолей мышей лизин, очевидно, оказывается эссенциальным фактором роста, поскольку даже при весьма низких дозах лизин- α -оксидазы исключение лизина из метаболизма вызывает торможение роста опухоли. Цитотоксический эффект этого фермента, возможно, объясняется также накоплением пероксида водорода, вызывающего разрушение или повреждение молекулы ДНК. Инактивация молекулы ДНК, в свою очередь, приводит к подавлению синтеза РНК и белка в опухолевых клетках и блокированию перехода клеток из фазы S в фазу G2/M клеточного цикла [45]. Об этом свидетельствуют опыты с меченым [³H]инозином. В присутствии концентрации лизин- α -оксидазы 10 МЕ/мг достигается резкое снижение скорости поступления метаболита в клетки высокочувствительной к этому ферменту АГ-22А, приводящее к снижению скорости синтеза пуриновых нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Так, исследование цитотоксической активности двойных конъюгатов ЛО x ПХ (лизиноксидаза-пероксидаза) и тройных ЛО x ПХ x АТ (лизиноксидаза-пероксидаза-антитела) на клетках линии СаОv показало небольшое снижение эффекта конъюгатов по сравнению с нативным ферментом; не происходит и значительной потери цитотоксической активности лизин- α -оксидазы.

Поскольку включение пероксидазы в конъюгат не приводило к повышению цитотоксической активности конъюгата по сравнению с цитотоксическим действием нативной лизин- α -оксидазы, в дальнейших экспериментах было решено использовать конъюгаты, не содержащие пероксидазы.

Для создания конъюгатов лизин- α -оксидазы с моноклональными антителами, специфичными к рецепторам определенных клеток, нами были выбраны моноклональные антитела ICO-80 к рецептору CD5. Применяв двухстадийный метод удалось получить конъюгат лизин- α -оксидазы и моноклональных антител ICO-80 к рецептору CD5 с выходом по ферментативной активности 65%. Связывание моноклональных антител с ферментом не изменяло

¹ критерии активности > 50% ТРО на солидных опухолях, > 125% Т/С на асцитных опухолях и лейкозах.

их специфичности по отношению к рецептору CD5 на поверхности клеток линии Yurkat. Изучение цитотоксического эффекта конъюгата ЛО и моноклональных антител на этих же клетках показало только незначительное снижение активности конъюгатов по сравнению с исходным ферментом (табл. 5).

Таблица 5. Ингибирование роста клеток линии Yurkat в присутствии различных интервалов концентраций конъюгата L-лизин- α -оксидазы с моноклональными антителами

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

Поскольку цитотоксический эффект лизин- α -оксидазы в значительной мере реализуется за счет пероксида водорода, образующегося благодаря каталитической реакции окислительного дезаминирования L-лизина, некоторое снижение противоопухолевой активности конъюгата можно объяснить тем, что молекула конъюгата с молекулярной массой, в несколько раз превышающей молекулярную массу лизин- α -оксидазы, не проникает через клеточную мембрану. Следовательно, в этом случае не образуется (или образуется недостаточное количество) внутриклеточного пероксида водорода, и суммарная концентрация повреждающего агента ниже, чем при применении нативного фермента.

Необходимо заметить, что опыты по цитотоксичности конъюгатов с антителами проводили *in vitro* на культуре ткани, а эффективность конъюгатов со специфическими антителами *in vivo*, 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Помимо противоопухолевого действия лизин- α -оксидаза оказалось эффективной в отношении вируса герпеса простого и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции) [49]. Был получен явный тормозящий эффект фермента как на продукцию, так и на экспрессию некоторых вирусных антигенов. Следует отметить, что лизин- α -оксидаза оказалась более специфичным анти-ВИЧ агентом, чем стандартный широко применяемый азидотимидин; для антивирусного действия требовались приблизительно в 1500 раз меньшие концентрации фермента, чем азидотимидина.

Гомогенный препарат лизин- α -оксидазы был конъюгирован с растворимой формой рекомбинантного рецептора CD4 посредством SH-групп этих белков. Антивирусную активность конъюгатов исследовали на клеточной линии MT4 в условиях, когда: а) агент добавляли до инфицирования ВИЧ и б) агент добавляли через 24 часа после инокуляции вируса, с использованием методики ИФА, образования синцития и тестов на выживаемость клеток. Антивирусный эффект наблюдали при концентрации конъюгата 0,01 мкг/мл, в то время как при концентрации 0,1 мкг/мл в условиях эксперимента а) и б) вирус не обнаруживался в клетках MT4 ни одним из использованных методов. Полное подавление репродукции ВИЧ и образования синцития наблюдали при концентрации 1,0 мкг/мл. В то же время ни одна из использованных концентраций конъюгата (даже выше 100-200 мкг/мл) не влияла на выживаемость клеток MT4. Как видно, антивирусный эффект конъюгата значительно превышает эффекты отдельных компонентов. Главное применение наблюдаемого антивирусного эффекта конъюгата – это его потенциальное клиническое применение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т. (1969) Обмен аминокислот нормальных тканей и злокачественных опухолей. М.: Медицина, 220с.
2. Березов Т.Т. (1961) Вопр. мед. химии, №4, 417-425.
3. Пехов А.А., Жукова О.С., Березов Т.Т., Добрынин Я.В., Занин В.А. (1983) Бюлл.экспер.биол. мед., №9, 43-46.
4. Кабанова Е.А., Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1986) Биохимия, **51**, 432-441.
5. Lebedeva Z.I., Kabanova E.A., Berezov T.T. (1986) Biochemistry Int., **12**, 413-420.
6. Березов Т.Т. (1984) Вестник АМН СССР, №8, 11-24.
7. Berezov T.T. (1959) J.Clin. Chem., **5**, 87-99.
8. Березов Т.Т. (1963) ДАН СССР, **149**, 1435-1437.
9. Berezov T.T., Dobrinin Ja.V. (1964) Acta Unio. Intern. Contra Cancrum., **20**, 964-967.
10. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В., Березов Т.Т. (1985) Эксперим. онкология, **7**, 42-44.
11. Уманский В.Ю., Хадуев С.Х., Залеток С.П., Балицкий К.П., Бердинских Н.К., Березов Т.Т. (1990) Бюлл. экспер. биол. мед., №5., 458-459.
12. Хадуев С.Х., Лукашева Е.В., Смирнова И.П., Березов Т.Т. (1985) Вопр. мед. химии, **31**, №5, 130-134.
13. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (1988) Прикл. биохим. микробиол., **24**, 459-465.
14. Березов Т.Т., Коган А.Х. (1964) Биохимия, **29**, 218-222.
15. Акоров М.А., Kagan Z.S., Berezov T.T. (1982) In: Cell Function and Differentiation (A. Evangelopoulos ed.), **3**, 451-462.
16. Berezov T.T., Evgrafov V.G. (1968) In: Pyridoxal Catalysis: Enzymes and Model Systems/ Eds. E.E. Snell and A.E. Braunstein): Willey & Sons, NY, pp.745-757.
17. Жердева Л.В., Березов Т.Т. (1973) Бюлл. экспер. биол. мед., №11, 85-89.
18. Гобеев В.Н., Березов Т.Т. (1976) ДАН СССР, **227**, 750-751.
19. Gobejev V.N., Khrypach L.V., Berezov T.T. (1979) Neoplasma, **26**, 169-174.
20. Браунштейн А.Е. (1987) На стыке химии и биологии. М., 1987.
21. Мардашев С.Р. (1975) Биохимические проблемы медицины, М, 1975.
22. Мардашев С.Р. (1972) В кн.: Роль аспарагиназы в энзимотерапии опухолей. (под ред. Т. Березова).
23. Березов Т.Т. (1989) Актовая речь, М.: Изд-во УДН, 3-15.
24. Neuman R.E., Mc Coy T.A. (1956) Science, **124**, 124-125.
25. Eagle H., Oyama V.I., Levy M. (1957) Arch. Biochem., **67**, 432-446.
26. Levintow I. (1957) **126**, 611-613.
27. Holcenberg J.S., Roberts J. (1981) Enzymes as Drugs, NY
28. Березов Т.Т. (1982) Бюлл. экспер. биол. мед., №3, 68-74.
29. Kidd J.G. (1953) J. Exp. Med., **98**, 565-568.
30. Broom J.D. (1965) J. Nat. Cancer Ins., **35**, 967-971.
31. Соколов Н.Н., Занин В.А., Александрова С.С. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 531-548.
32. Борисова А.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Соколов Н.Н. (2003) Биомедицинская химия, **49**, 502-507.
33. Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1995) Успехи биологической химии, **35**, 161-187.
34. Веселовский А.В., Лебедева З.И., Иванов А.С., Березов Т.Т. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, №2, 178-184.
35. Nakayama T., Esaki N., Sugie K., Berezov T.T., Tanaka H., Soda K. (1984) Anal. Biochem., **138**, 421-424.
36. Лукина В.И., Березов Т.Т., Занин В.А. (1982) Штамм *Pseudomonas taetrolens* ВКМВ-904 – продуцент фермента метиониназы: Авторское

- свидетельство 967077.
37. Занин В.А., Лукина В.И., Березов Т.Т. (1989) *Вопр. мед. химии*, **35**, 84-89.
38. Kusakabe H., Kodame K., Machida H. et al. (1979) *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 343-347.
39. Kusakabe H., Kodame K., Kuninake A., et al. (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 976-981.
40. Хадуев С.Х., Жукова О.С., Добрынин Я.В., Сода К., Березов Т.Т. (1986) *Бюлл. exper. биол. мед.*, №5, 603-604.
41. Хадуев С.Х., Жукова О.С., Добрынин Я.В., Березов Т.Т. (1987) *Бюлл. exper. биол. мед.*, №4, 458-460.
42. Янкевич Н.Б., Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Хадуев С.Х., Смирнова И.П., Березов Т.Т. (1989) *Вопр. мед. химии*, **35**, 84-86.
43. Березов Т.Т. (1995) *Молекулярные механизмы злокачественного роста и инженерная энзимология*, М., изд-во МГУ, с. 4-9.
44. Березов Т.Т., Федорончук Т.В. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, № 5, 280-289.
45. Хадуев С.Х., Уманский В.Ю., Акедо Х., Березов Т.Т. (1991) *Бюлл. exper. биол. мед.*, **112**, 1489-1493.
46. Лукашева Е.В., Веса В.С., Корнела Т.К., Березов Т.Т. (1992) *Биохимия*, **57**, 452-455.
47. Гогичаева Н.В., Лукашева Е.В., Гаврилова Е.М., Смирнова И.П., Егоров А.М., Березов Т.Т. (2000) *Вопр. мед. химии*, **46**, № 4, 410-418.
48. Трещалина Е. М., Жукова О.С., Лукашева Е.В., Седакова Л.А., Андропова Н.В., Солнцева Т.И., Гогичаева Н.В., Березов Т.Т. (2004) *Биомедицинская химия*, **50**, № 4, 376-383.
49. Березов Т.Т., Зверев В.В., Зайцев И.З., Алексеев С.Б. (1997) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, N 1, 36-38.

Поступила: 01.02.2005

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PRINCIPLES OF TUMOR ENZYME THERAPY

T.T.Berezov

Department of Biochemistry Russian Peoples' Friendship University, Miklukho-Maklaja str., 3, Moscow, 117198 Russia; fax: (095) 434-04-12, e-mail: tberez@med.pfu.edu.ru

Bacterial enzymes are antineoplastic perspective agents in oncology. Current strategy of tumor enzyme therapy is primarily based on the strictly defined differences of biochemical properties between normal and tumor cells and more precisely on their different sensitivity to deficit of essential growth factors, including amino acids. The growth inhibitory effects of three bacterial enzymes: glutamine (asparagin)ase, methionine γ -lyase and lysine α -oxidase were demonstrated in *in vitro* and *in vivo* using several tumor lines. These results suggest that commercial production of certified standard enzyme preparations and their knowledge-based rational application will provide a new potent anti-tumor preparations employed in oncology.

Key words: tumor enzyme therapy, L-asparaginase, glutamin (asparagin)ase, methionine γ -lyase and lysine α -oxidase.