Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 3, с. 312-324.

УДК 612.015.
©Коллектив авторов

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ: СВОЙСТВА, СТРОЕНИЕ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ✓

Н.Н. Соколов[1]*, М.А. Эльдаров[2], М.В. Покровская[1], С.С. Александрова[1], О.Ю. Абакумова[1], О.В. Подобед[1], Н.С. Мелик-Нубаров[3], Е.В. Кудряшова[3], Д.В. Гришин[1], А.И. Арчаков[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, 119121, ул. Погодинская, 10; факс: +7 495 2450857;
эл. почта: Sokolov2144@yandex.ru
[2]Центр "Биоинженерия" РАН, Москва
[3]Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

L-Аспарагиназы на протяжении более 40 лет успешно применяются в комбинированной химиотерапии острых лимфобластных лейкозов у детей, и спектр опухолей, чувствительных к действию данных ферментов, постоянно расширяется. В данном обзоре обобщены результаты работ по созданию новых систем гетерологической экспрессии бактериальных L-аспарагиназ *Erwinia carotovora* (EwA), *Helicobacter pylori* (HpA), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA) и *Rhodospirillum rubrum* (RrA), выделению высокоочищенных и кристаллических препаратов фермента, характеристике их физико-химических, кинетических и структурных свойств. Полученные рекомбинантные L-аспарагиназы EwA, YpA, HpA и RrA сопоставимы с применяющимся в клинике лекарственным препаратом L-аспарагиназы *Escherichia coli* (EcA) по эффективности цитотоксического действия на клетки лейкозов человека. Они представляют практический интерес в плане создания на их основе новых эффективных противоопухолевых лекарственных препаратов. Дальнейшие перспективы исследований по бактериальным L-аспарагиназам связаны с получением аналогов L-аспарагиназы RrA посредством направленного изменения структуры белка методами генетической инженерии, а также с разработкой препаратов L-аспарагиназ, модифицированных полиэтиленгликолем и хитозаном для улучшения фармакокинетических характеристик.

Ключевые слова: L-аспарагиназа, L-глутаминаза, рекомбинантные белки, лейкозы, пегилированная L-аспарагиназа, ХИТО-пегилирование.

DOI: 10.18097/PBMC20156103312

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные L-аспарагиназы II класса (КФ 3.5.1.1) – периплазматические ферменты, катализирующие реакцию гидролиза L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака [1]. Они также осуществляют гидролиз L-глутамина, но с меньшей скоростью, чем L-аспарагина [2]. L-Аспарагиназы *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) уже более 40 лет успешно применяются в химиотерапии опухолей [3-7], прежде всего, острого лимфобластного лейкоза, а также неходжкинской лимфомы [8, 9] и лимфомы Беркита [10]**.** Имеются данные об использовании этого фермента для лечения солидных опухолей [11, 12]. Всё это подчеркивает возрастающую актуальность изучения L-аспарагиназ.

Биохимический механизм противоопухолевого действия фермента заключается в снижении концентрации L-аспарагина крови, который необходим не только для синтеза белка и азотистых оснований (а значит и нуклеотидов и нуклеиновых кислот), но также и для обеспечения нормального прохождение клеточного цикла [13]. Быстрорастущие опухолевые клетки испытывают дефицит во внутриклеточном, синтезированном *de novo*, L-аспарагине и в значительно большей степени, чем нормальные ткани, зависят

* - адресат для переписки
✓ Обзор заказан редколлегией к юбилею журнала и ИБМХ

от поступления экзогенного L-аспарагина. Особенно сильно эта зависимость проявляется у опухолевых клеток крови [14]. Введение L-аспарагиназы вызывает истощение запасов внеклеточного L-аспарагина, остановку клеточного цикла в G1-фазе и последующую гибель клеток [15, 16], причина которой не всегда связана с апоптозом. Противоопухолевое действие L-аспарагиназы может быть обусловлено прямым рецептор-опосредованным воздействием данного фермента на опухолевые клетки [17].

Лечение существующими на фармацевтическом рынке препаратами L-аспарагиназы приводит к появлению таких серьезных побочных эффектов как аллергические реакции, подавление иммунитета, гипергликемия, тромбоз, нарушения функции печени, почек, поджелудочной железы и др. [18-20]. Многие из них обусловлены способностью фермента осуществлять гидролиз не только L-аспарагина, но и L-глутамина. Последний служит основной формой транспорта аминного азота в организме и донором аминогрупп для многих биосинтетических реакций. Поэтому продолжительное снижение в организме уровня L-глутамина приводит к нарушению многих биохимических процессов, особенно в печени [21-23].

По литературным данным, относительная скорость гидролиза L-глутамина под действием L-аспарагиназы *Erw. chrysanthemi* составляет от 9% до 15% по отношению к таковой для L-аспарагина [24], а у лекарственного препарата L-аспарагиназы *E. coli* – около 2% [22]. Дезамидирование L-глутамина, а также развитие различных аллергических реакций снижают терапевтическую эффективность L-аспарагиназ [25]. Очевидно, для проведения химио- и энзимотерапии лейкозов целесообразно располагать набором L-аспарагиназ, обладающих высокой ферментативной активностью, но отличающихся по своим антигенным свойствам и обладающих сниженной токсичностью за счёт относительно невысокой L-глутаминазной активности. Этими обстоятельствами объясняется большой интерес к получению новых препаратов L-аспарагиназ с улучшенными терапевтическими свойствами.

В настоящее время описана только одна L-аспарагиназа из дикого штамма *Wolinella succinogens* (WsA), практически лишённая L-глутаминазной активности [26]. Доклинические испытания подтвердили, что этот фермент обладает выраженным противолейкозным действием, не оказывающим гепатотоксического эффекта [27]. В настоящее время получение рекомбинантной L-аспарагиназы WsA запатентовано [28], и в США ведется работа по созданию на её основе лекарственного препарата.

В данном обзоре обобщены результаты многолетних исследований лаборатории медицинской биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ) по созданию и изучению рекомбинантных бактериальных L-аспарагиназ.

1. ИСТОРИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО БАКТЕРИАЛЬНЫМ L-АСПАРАГИНАЗАМ В ИБМХ

ИБМХ занимает ведущие позиции в области изучения микробных L-аспарагиназ, которое было инициировано в 1960-1970 гг. в рамках программы “Ферменты и их применение в народном хозяйстве и медицине”. В этих исследованиях, начатых под руководством академиков С.Р. Мардашева, Т.Т. Березова и проф. А.Я. Николаева, принимали участие лаборатория энзимологии ИБМХ, кафедра биохимии Университета дружбы народов, кафедра биохимии I Московского медицинского института им. И.М. Сеченова, а также и Институт органического синтеза АН Латв. ССР. Именно в ИБМХ впервые в стране была выделена в кристаллическом состоянии L-аспарагиназа из клеток *E. coli* ATCC 9637. Её специфическая противоопухолевая активность была сопоставима с коммерческим лекарственным препаратом фермента фирмы “Kyowa” (Япония), а токсическое действие – значительно менее выражено, чем у сравниваемого препарата [29-31]. Технологический регламент получения кристаллической L-аспарагиназы, был прост и максимально адаптирован к условиям промышленного производства. Получение аспарагиназы *E. coli* ATCC 9637 под названием “Asparaginasum” было налажено в Латвии (Институт органического синтеза АН Латвии).

Позднее был выделен и идентифицирован новый продуцент *Pseudomonas fluorescens* AG, синтезирующий два изофермента L-аспарагиназы, причем один из них осуществлял гидролиз как L-аспарагина, так и L-глутамина. Ферменты были получены в гомогенном (аспарагиназа А) и кристаллическом (аспарагиназа-глутаминаза АГ) состоянии и обладали противолейкозной активностью [32, 33]. В то же время, штамм *Ps. aurantica* BKM-548 синтезировал только один бифункциональный фермент глутамин(аспарагин)азу [34]. Последнее обстоятельство особенно интересно в связи с обнаруженной противоопухолевой активностью препаратов глутамин(аспарагин)аз в отношении ряда опухолей человека и животных, устойчивых к действию других препаратов L-аспарагиназы [35-37].

2. РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

В онкологии и гематологии используются лекарственные препараты нативных L-аспарагиназ, получаемые из природных штаммов *E. coli* (EcA) или *Erw. chrysanthemi* (ErA), а также модифицированная полиэтиленгликолем (ПЭГ) L-аспарагиназа *E. coli* (“Онкаспар”) [38]. Грандиозные успехи и достижения микробиологии, молекулярной биологии, генной инженерии, иммунологии, химической технологии и ряда других наук привели к появлению в 1980-е годы новой научной дисциплины – биотехнологии. Одним из основных направлений в области биомедицины стало получение генно-

инженерных штаммов-продуцентов, обладающих сверхсинтезом заданных продуктов, и создание нового поколения эффективных лекарственных биотехнологических препаратов – биофармацевтиков (инсулинов, интерферонов, соматотропного гормона, ростовых факторов, цитокинов, вакцин и др.) [39, 40].

Для быстрого скрининга большого числа колоний рекомбинантных штаммов нами был разработан метод детекции L-аспарагиназной активности на содержащих L-аспарагин твёрдых дифференциальных средах [41, 42]. По своей специфичности и чувствительности этот метод превосходил широко использовавшийся в то время метод Gulati и соавт. [43]. Наш метод был основан на способности L-аспарагина и L-аспарагиновой кислоты образовывать прочные цветные комплексы с ионами металлов (Cu, Ni, Co) и получении ярко окрашенных продуктов разрушения этих комплексов при взаимодействии с гексацианоферратом калия [44]. С его помощью можно выявлять и отбирать продуценты L-аспарагиназы с удельной активностью от 0,1 МЕ (международных единиц активности) на мг белка.

Основное направление наших работ по получению генно-инженерных L-аспарагиназ было связано с конструированием систем гетерологической экспрессии L-аспарагиназы *Erw. carotovora* (EwA) – микроорганизма, родственного продуценту широко применяемой в онкологии L-аспарагиназы *Erw. chrysanthemi*. В создании новых рекомбинантных продуцентов L-аспарагиназ с улучшенными терапевтическими свойствами мы ориентировались на получении фермента с низкой L-глутаминазной активностью. На первом этапе исследований был проведён поиск дикого штамма *Erw. carotovora* с минимальной активностью L-глутаминазы. Скрининг имевшихся в нашем распоряжении штаммов позволил выбрать оптимальный штамм, у которого уровень L-глутаминазной активности по отношению к L-аспарагиназной был минимален (~3%), Этот штамм и был использован нами для выделения гена [45].

Стратегия выделения гена L-аспарагиназы из отобранного штамма *Erw. carotovora*, включала следующие основные этапы [46-48]:

- сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных L-аспарагиназ и нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов с последующей идентификацией наиболее консервативных участков ферментов бактериального происхождения;
- синтез вырожденных праймеров и амплификация центрального участка гена;
- выделение фрагментов ДНК, кодирующих полную аминокислотную последовательность гена L-аспарагиназы методом “инвертированной” ПЦР [49], и определениие нуклеотидной последовательности полученного гена и его фланкирующих участков;
- конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих экспрессию гена аспарагиназы в рекомбинантных штаммах *E. coli* под контролем промоторов pBAD и T7.

Анализ нуклеотидной последовательности нового гена (GenBank Acc. #AY327441) [46, 48] и соответствующей ей кодирующей аминокислотной последовательности позволил установить, что фермент EwA (синоним ECAR-LANS) не имеет аналогов среди известных бактериальных L-аспарагиназ, степень отличия его аминокислотной последовательности от наиболее гомологичного белка L-аспарагиназы *Erw. chrysanthemi* составляет 13%. Данная последовательность кодирует полноразмерный предшественник ECAR-LANS с собственным сигнальным пептидом для экспорта белка в периплазму и последующего процессинга (рис. 1).

Первыми разработанными нами системами экспрессии бактериальных L-аспарагиназ были системы, осуществляющие синтез L-аспарагиназы *Erw. carotovora* под контролем промоторов pBAD (*E. coli*/pBADLANS) и T7 (*E. coli*/pACYCLANS) [46-48, 50]. После трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) плазмидой pACYCLANS был получен рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pACYCLANS.

Позднее, совместно с В.Г. Богушем и К.В. Сидоруком (“ГосНИИгенетика”) нами сконструирован штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pACYCLANS(KM), содержавший экспрессионную плазмиду pACYC_LANS(KM) с делетированным геном устойчивости к ампициллину [51]. Этот штамм обладал более высокой L-аспарагиназной активностью по сравнению с исходным *E. coli* BL21(DE3)/pACYCLANS. Такой результат, вероятно, объясняется тем, что β-лактамаза, обеспечивающая устойчивость к ампициллину, как и L-аспарагиназа, являются белками с периплазматической локализацией. Следовательно, активная выработка клетками β-лактамазы может негативно сказываться на накоплении в периплазме L-аспарагиназы. Кроме того, L-аспарагиназа штамма *E. coli* BL21(DE3)/pACYCLANS(KM) обладала низкой L-глутаминазной активностью (~3% от L-аспарагиназной), что сопоставимо с таковой у лекарственного препарата L-аспарагиназы *E. coli* (2%) и значительно ниже L-глутаминазной активности у L-аспарагиназы *Erw. chrysanthemi* (9-15%) [22, 24].

В последующем нами были разработаны системы экспрессии и ряда других микробных L-аспарагиназ, обладающих противоопухолевой активностью и созданы соответствующие генно-инженерные штаммы-суперпродуценты: *Yersinia pseudotuberculosis, Helicobacter pylori* и *Rhodospirillum rubrum*.

2.1. Рекомбинантная L-аспарагиназа Y. pseudotuberculosis (YpA)

Для получения рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего L-аспарагиназу *Y. pseudotuberculosis* Q66CJ2 (YpA), был синтезирован гомолог гена ansB, кодирующий предшественник L-аспарагиназы штамма *Y. pseudotuberculosis IP 32953* [52, 53]. Ген клонировали в векторе pBad24, после чего был получен штамм-продуцент *E. coli*/BL21(DE3)/pBad/YERS.

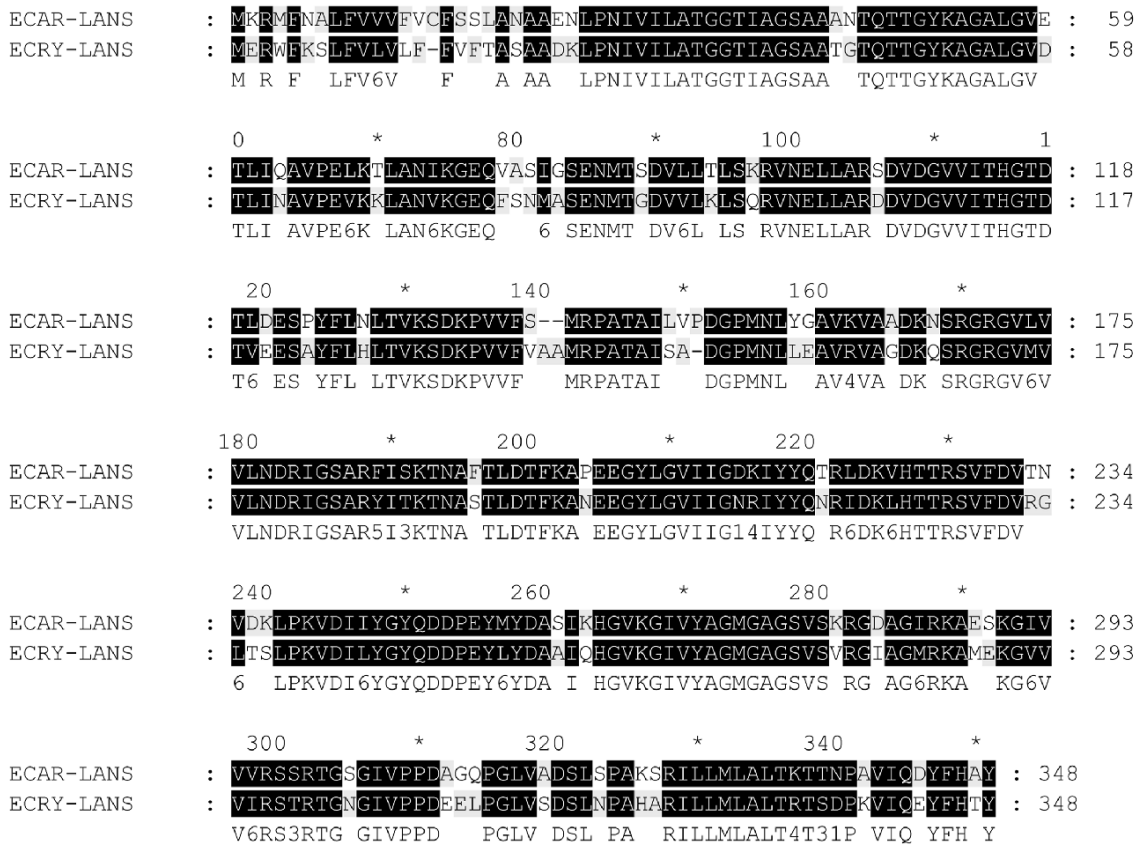

Рисунок 1. Сравнение аминокислотных последовательностей L-аспарагиназ *Erw. chrysanthemi* (GenBank Acc # A14577, ECRY-LANS) и *Erw. carotovora* (GenBank Acc # AY327441, ECAR-LANS).

2.2. Рекомбинантная L-аспарагиназа H. pylori (HpA)

Поиск по подобию в базе белковых и транслированных нуклеотидных последовательностей, доступных на сервере NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) показал, что L-аспарагиназа штамма *H. pylori* (NP_223379) (HpA) является одним из 10 наиболее близких гомологов L-аспарагиназы WsA (GAA61503), не обладающей L-аспарагиназной активностью. Степень идентичности HpA и WsA составляет 53%, а гомологии – 73%.

L-Аспарагиназа *H. pylori* была клонирована в виде полноразмерного предшественника фермента. Ген L-аспарагиназы HpA (GeneID: 890242) был амплифицирован с геномной ДНК штамма *H. pylori* (GeneBank ID: AE001439) методом ПЦР. Полученная плазмида pET22b-HpA позволила осуществлять синтез HpA под контролем lac-оперона и T7 промотора в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3)/plysE [54], синтезирующих полимеразу фага T7.

L-глутаминазная активность HpA оказалась очень низкой и составляла примерно 0,01% от L-аспарагиназной активности, что существенно ниже, чем у лекарственных препаратов L-аспарагиназ *E. coli* и *Erw. chrysanthemi* [22, 24]. Полученный результат был подтверждён данными рентгеноструктурного анализа HpA, которые выявили существенное сходство активных центров HpA и WsA [55]. Всё это указывает на перспективность использования HpA в качестве обладающего низким токсическим эффектом препарата для терапии лейкозов.

2.3. Рекомбинантная L-аспарагиназа Rh. rubrum (RrA)

Известно, что бактериальные L-аспарагиназы, обладающие противоопухолевой активностью, относятся к периплазматическим ферментам [56]. В этом плане представляет большой научный и практический интерес разработанная нами система экспрессии (внутриклеточной) цитоплазматической L-аспарагиназы *Rh. rubrum* (RrA) [57].

Ген RrA был клонирован в векторе pET23a и экспрессирован в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Очень низкая L-глутаминазная активность фермента (не более 0,1% от L-аспарагиназной) позволяет считать целесообразным разработку на его основе эффективного противоопухолевого препарата.

2.4. Получение мутантных форм L-аспарагиназы Rh. rubrum (RrA)

С целью идентификации функционально важных участков белковой молекулы и улучшения биологических и физико-химических свойств RrA, методом направленного мутагенеза, проведенного на основе несущей ген RrA плазмиды pET23, мы получили 10 многоточечных мутантных форм фермента [58]. Пять из них было экспрессировано

в клетках *E. coli* и выделено с помощью хроматографии на Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl в высокоочищенном виде. Замены G86P, D88H, M90K (RrAH), I17S, D18T, D20H (RrAF), G121L, D123A (RrAI), D32Q, P33L (RrAG) приводили к снижению L-аспарагиназной активности, что указывает на важность этих аминокислотных остатков для катализа. Мутации D60K, F61L (RrAD) и R118H, G120R (RrAJ) приводили к улучшению кинетических параметров и стабилизации фермента. Замены E149R, V150P (RrAB) вызывали усиление антипролиферативной и цитотоксической активности RrA, а мутации A64V, E67K, особенно в комбинации с E149R, V150P (RrAE), значительно дестабилизировали рекомбинантный белок. У мутантных форм RrA не обнаружено сдвига оптимума pH в область физиологических значений.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

К настоящему времени методология получения высокоочищенных препаратов бактериальных L-аспарагиназ из диких и генно-инженерных штаммов разработана достаточно хорошо, что объясняется востребованностью этого фермента в онкологической практике [6].

Препараты кристаллических и гомогенных L-аспарагиназ были получены из ряда штаммов *E. coli* [29, 59, 60], *Erw. carotovora* [61-66], *P. vulgaris* [67], *V. succinogenes* [26], *S. marcencens* [68] и некоторых других бактерий. Детальные процедуры выделения описаны для многих микробных аспарагиназ, включая ферменты из *E. coli* и *Erw. chrysanthemi* [24], используемые в качестве лекарственных препаратов.

При выделении новых рекомбинантных L-аспарагиназ *Erw. carotovora*, *H. pylori*, *Y. pseudotuberculosis* и *Rh. rubrum* мы ориентировались на известную методологию очистки этих ферментов. Основные этапы очистки рекомбинантных L-аспарагиназ приведены в таблице 1.

Для получения бесклеточного экстракта на первом этапе очистки клетки разрушают ультразвуком. Полученный после ультрацентрифугирования (30000 *g*) супернатант последовательно подвергается хроматографии на колонках с Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl 650m (L-аспарагиназы RrA и YpA) [52, 53] или SP-Sepharose (L-аспарагиназа Hpa) [54].

Для выделения L-аспарагиназы *Erw. carotovora* разработан ряд методов. Один из них включает фракционирование сульфатом аммония, колоночную хроматографию на SP-Sepharose FF и концентрирование в ячейке “Amicon” [46, 47, 69]. Другой метод очистки EwA состоит в использовании однокомпонентного элюата вместо градиента концентрации соли, что исключает необходимость дальнейшего обессоливания и концентрирования белка [70]. Аналогичный подход был применён и при очистке L-аспарагиназы HpA [54,72].

Препараты генно-инженерных L-аспарагиназ были получены в близком к гомогенному состоянии, а фермент из *Erwinia carotovora* – и в кристаллическом виде (рис. 2) [55].

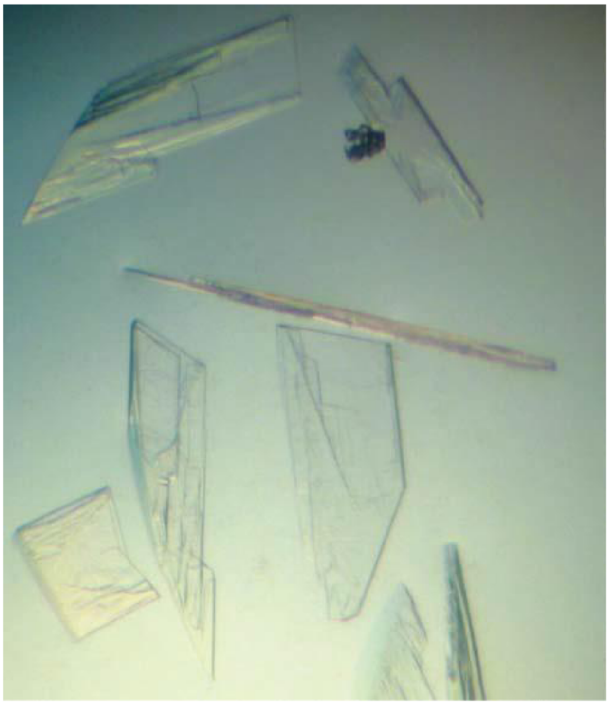

Рисунок 2. Кристаллы L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, полученные в присутствии PEG 3350 (16-18% (вес/объём) и 0,2 M NaF (адаптировано из [81]).

Вышеописанные подходы к очистке этого фермента легли в основу экспериментально-производственного регламента получения субстанции L-аспарагиназы *Erw. carotovora* [71]. С его помощью наработано около 25,5 г чистого белка (8850000 МЕ активности фермента), который был использован для проведения доклинических испытаний лекарственной инъекционной формы рекомбинантной L-аспарагиназы.

Таблица 1. Очистка рекомбинантных L-аспарагиназ.

Фермент	**Стадии хроматографической очистки**	**Уд. активность (МЕ/мг белка)**	**Выход (%)**	**Ссылки**
EwA (*Erw. carotovora*)	SP-Sepharose (или КМ- Sepharose)	430	70-75	[45-47, 51, 69, 70, 72]
RrA (*Rh. rubrum*)	последовательно Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl 650m	170	73	[57, 58]
Hpa (*H. pylori*)	SP-Sepharose	90	62	[54, 71]
Ypa (*Y. pseudotuberculosis*)	последовательно Q-Sepharose и DEAE-Toyopearl 650m	63	82	[52]

4. ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERW. CAROTOVORA*

4.1. Пегилирование

Одним из наиболее эффективных способов модификации терапевтически значимых ферментов является их химическая модификация полиэтиленгликолем (ПЭГ), так называемое пегилирование [73, 74]. При использовании модифицированных ПЭГ L-аспарагиназ (ПЭГ-АСП) возрастает продолжительность их циркуляции в крови и биостабильность, вероятно, связанные с повышением устойчивости к протеолизу; снижается связывание с антителами и поглощение ретикулоэндотелиальной системой, а также способность вызывать аллергические реакции [75, 76]. Всё это повышает терапевтическую эффективность и уменьшает вероятность побочных эффектов при длительном применении L-аспарагиназы.

Вначале был разработан лабораторный метод получения ПЭГ-АСП [77] для фермента *Erw. carotovora*. В качестве модифицирующего реагента использовали метоксиполиэтиленгликоль *n*-нитрофенилкарбонат (mPEG-NPh) с молекулярной массой 5000. Высокая степень модификации – более 10 молекул mPEG на 1 молекулу фермента – была достигнута при 4,5-кратном молярном соотношении mPEG-NPh и L-аспарагиназы. При этом сохранялось более 57% специфической активности L-аспарагиназы. Препарат ПЭГ-АСП был более устойчив к протеолизу и температурному воздействию, проявлял пониженную иммуногенность при сохранении высокой противоопухолевой активности. Всё это позволяет рассматривать модифицированный фермент в качестве перспективной основы для создания лекарственного препарата, более эффективного по сравнению с нативной L-аспарагиназой.

Однако, использование импортных коммерческих препаратов mPEG-NPh для получения лекарственной формы ПЭГ-АСП ограничено их дороговизной. Поэтому мы выбрали другой подход к получению ПЭГ-АСП. Он заключался в синтезе N-гидроксисукцинимидного эфира монометокси-полиэтиленгликоль-гемисукцината (mPEG-suc-NHS) с последующим присоединением его к аминогруппам L-аспарагиназы [71]. Полученный препарат ПЭГ-АСП не содержал примеси свободного ПЭГа. Анализ молекулярной массы методом скоростной седиментации показал, что в препарате фермента содержатся две фракции, одна из которых представлена нативной L-аспарагиназой (160 кДа), другая – ПЭГ-АСП (480 кДа).

Важно отметить, что модификация L-аспарагиназы не приводила к существенному изменению ферментативной активности. Препараты ПЭГ-АСП имели удельную активность 350-500 МЕ/мг. У образцов сравнения (непегилированная L-аспарагиназа) ферментативная активность составляла в среднем 430 МЕ/мг.

4.2. ХИТО-пегилирование

На примере рекомбинантного препарата L-аспарагиназы EwA был разработан новый подход для регуляции каталитических свойств ферментов, используемых в медицинской практике. Данный подход основан на образовании конъюгатов ферментов с привитыми сополимерами разветвлённой структуры на основе хитозана, модифицированного ПЭГ. Полиэлектролитная природа ПЭГ-хитозанов способствует их многоточечному электростатическому взаимодействию с поверхностью белка, что позволяет модулировать каталитические свойства фермента, в том числе за счёт сдвига pH оптимума активности фермента в область физиологических значений pH. Для оптимизации молекулярной архитектуры и состава конъюгатов был синтезирован ряд сополимеров хитозана “щёточной” структуры, а также конъюгаты EwA с этими сополимерами [78, 79]. Такая оптимизация молекулярной архитектуры и состава конъюгатов приводила к увеличению каталитической эффективности фермента (k_{cat}/K_M) при в 3-6 раз и 4-6 кратному повышению активности L-аспарагиназы. Наиболее яркий эффект на каталитическую активность фермента оказывает степень пегилирования хитозана. На примере конъюгата EwA–ПЭГ-хитозан (15 кДа) с различным уровнем пегилирования можно видеть, что зависимость активности конъюгатов EwA–ПЭГ-хитозан от степени пегилирования хитозана имеет оптимум, достигаемый при отношении ПЭГ/хитозан=10–20. При этом активность наиболее активного конъюгата в 4 раза превышает удельную активность нативного фермента (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические параметры EwA и конъюгатов EwA-ПЭГ-хитозан в зависимости от молекулярной массы хитозана и состава конъюгатов.

Образец	Состав конъюгата	Удельная активность, МЕ/мг
EwA	----------	490 (±20)
EwA-хитозан	EwA-хитозан (5 кДа)	2940 (±20)
	EwA-хитозан (15 кДа)	1284 (±17)
	EwA-гликоль-хитозан (72 кДа)	260 (±20)
	EwA-хитозан (160 кДа)	46 (±7)
EwA-ПЭГ-хитозан	EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), n(PEG)/n(chit)* = 2	1668 (±20)
	EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), n(PEG)/n(chit)* = 8	1644(±17)
	EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), n(PEG)/n(chit)* = 14	1856 (±15)
	EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), n(PEG)/n(chit)* = 20	1950 (±17)
	EwA-ПЭГ-хитозан (15 кДа), n(PEG)/n(chit)* = 40	163 (±20)

Примечание: * - n(PEG)/n(chit) - число цепей ПЭГ на молекулу хитозана.

Одной из основных причин изменения активности конъюгата по сравнению с нативным ферментом является смещение pH-оптимума активности фермента в сторону физиологических значений pH. Причем величина сдвига pH-оптимума зависит от количества свободных аминогрупп в составе хитозана (то есть уменьшается при увеличении степени ПЭГилирования хитозана).

Кроме того, образование конъюгатов с ПЭГ-хитозаном приводит к возрастанию термостабильности и стабильности к трипсинолизу, по сравнению с нативным ферментом, снижая его константу инактивации в 2-4 раза в зависимости от состава конъюгата. Конъюгаты EwA с ПЭГ-хитозаном обладают в 4-5 раз более низкой L-глутаминазной активностью, что позволяет надеяться на минимизацию побочных эффектов фермента при его клиническом применении. В опытах *in vitro* конъюгаты EwA с ПЭГ-хитозаном проявляли более высокую противоопухолевую активность (на 20-40%) по сравнению с нативным ферментом в отношении клеток хронического миелоидного лейкоза человека К-562 и клеток аденокарциномы молочной железы MCF7.

5 ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ

В этом отношении наиболее подробно изучена L-аспарагиназа *Erwinia carotovora* [6, 45, 51, 55, 69, 70, 72, 80-83]. Результаты исследования физико-химических, структурных, каталитических и других свойств указывают на то, что рекомбинантная L-аспарагиназа *Erw. carotovora*, выделенная из штамма суперпродуцента *E. coli* BL21(DE3)/pACYC_LANS(KM), по своим свойствам соответствует известным бактериальным L-аспарагиназам, продуцируемым штаммами рода *Erwinia*. В нативных условиях препарат EwA представляет структуру, состоящую из двух идентичных субъединиц. В денатурирующих условиях молекулярная масса субъединицы L-аспарагиназы составляет 34240±2000 Да. Структуры белков в препаратах L-аспарагиназы и ПЭГ-АСП близки как между собой, так и со структурой природного белка. В таблице 3 приведены некоторые физико-химические, каталитические, структурные и биологические свойства рекомбинантных L-аспарагиназ.

Один из наименее изученных вопросов касается четвертичной структуры L-аспарагиназы в растворе при физиологических условиях. Представление об олигомерной структуре L-аспарагиназы сформировано на основе данных кристаллографических исследований фермента [84], которые показали участие двух субъединиц в образовании каталитического центра фермента (рис. 3). Последний расположен в удалении от интерфейса мономеров в тетрамере и ориентирован по направлению к внешней поверхности молекулы. Это означает, что димер L-аспарагиназы должен обладать каталитической активностью. Полученные кристаллы EcA группы C2 (PDB 1NNS) доказывают, что L-аспарагиназа может находиться в виде димера. Электрофорез в полиакриламидном геле нативной и обработанной тетранитрометаном EcA в обоих случаях выявил сложную смесь моно- и мультимеров с различной молекулярной массой [37]. В экспериментах по аналитическому ультрацентрифугированию было показано, что раствор EcA содержит компоненты с коэффициентами седиментации 4S (64500 Да), 5,6S (125000 Да) и 8,6S (250000 Да), что соответствует молекулярным массам димера, тетрамера и октамера аспарагиназы [85]. Процентное соотношение этих компонентов может меняться с течением времени.

Наши исследования, проведенные совместно с ЗАО “Биокад” (Т.В. Черновская) [71], показали, что молекулярная масса L-аспарагиназы в нативных условиях составляет 68435±2500 Да. С учётом данных о молекулярной массе мономера L-аспарагиназы около 34000 Да [65,86], наши результаты свидетельствуют о том, что в нативных условиях препарат L-аспарагиназы представляет структуру, состоящую из двух субъединиц.

Олигомеризация L-аспарагиназы, по-видимому, оказывает влияние и на стабильность молекулы фермента. Действительно, некоторые L-аспарагиназы характеризуются значительной структурной устойчивостью в денатурирующих условиях, которая может показаться удивительной для фермента с нековалентно связанными субъединицами. Например, после 48-часовой инкубации в 0,2 М фосфатном буфере, (pH 7,4), содержащем 8 М мочевину, диссоциируют только 50% молекул ErA [61].

Таблица 3. Некоторые свойства рекомбинантных бактериальных L-аспарагиназ.

Параметр	Фермент				
	EwA	**HpA**	**YpA**	**RrA**	**EcA**
Мол. масса субъединицы, кДа	34240 ± 2000	~34	~36	~18	36,8
Уд. активность МЕ/мг белка	330-350	91	~62	~170	280-400
ИЭТ	8,85±0,1	~8,1	5,4±0,3	5,1±0,3	4,6-5,5
Оптимум pH	7-10	5,0-9,0	8,0-8,5	9,2	8-8,6
K_m для L-аспарагина, мкМ	~194	~21	17±0,9	~220	~12
L-глутаминазная активность, % от L-аспарагиназной	~3	~0,001	5,7	<0,1	~3
Противоопухолевое действие	+	+	+	+	+

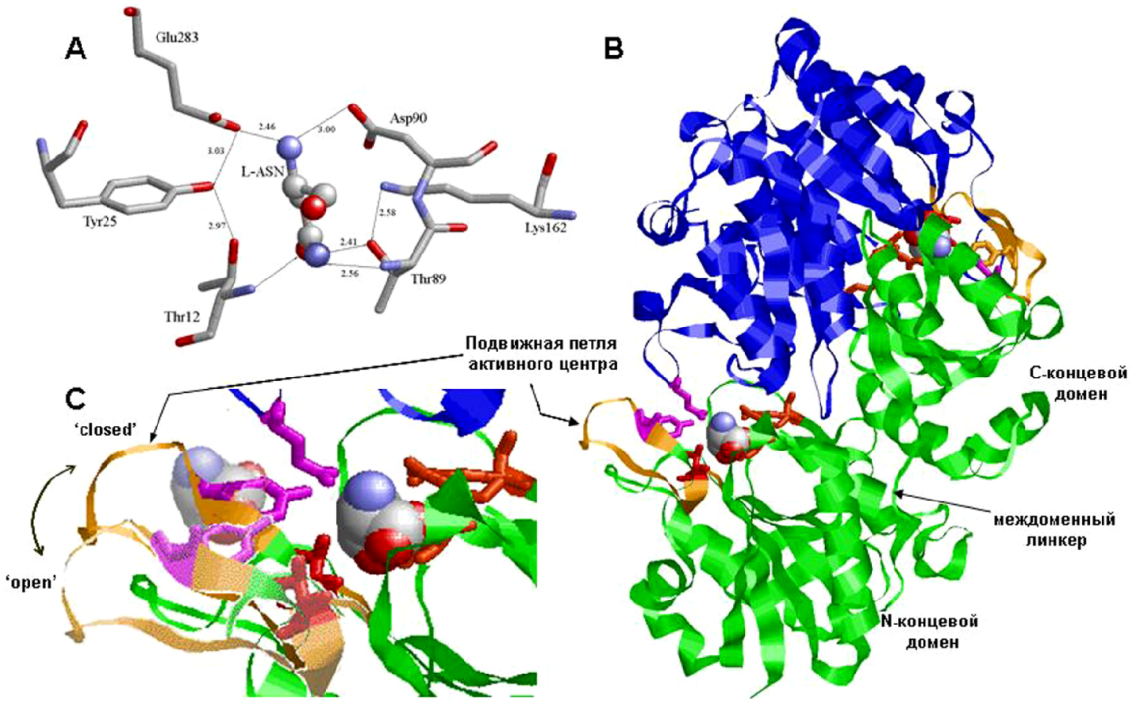

Рисунок 3. Трёхмерная модель L-аспарагиназы *E. coli* (адаптировано из [84]). (A) Структура активного центра аспарагиназы в комплексе с L-Asn, (B) образующего его димера и (C) подвижной петли активного центра.

Интересно отметить, что олигомеризация L-аспарагиназы является субстрат-зависимым процессом, что предполагает возможность аллостерической регуляции каталитической активности. Действительно, оба стереоизомера аспарагина способствуют агрегации мономеров L-аспарагиназы и предотвращают диссоциацию фермента [87]. По-видимому, формирование и диссоциация молекулы L-аспарагиназы находится в зависимости от связывания лиганда с активным центром фермента. В случае избытка субстрата, активный центр преимущественно находится в связанном состоянии, и молекула стабилизирована в каталитически активной конформации. После исчерпания субстрата олигомер L-аспарагиназы диссоциирует до мономеров, и фермент переходит в неактивное состояние.

6. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

6.1. Нативная L-аспарагиназа Erw. carotovora

Цитотоксическая противоопухолевая активность L-аспарагиназы EwA была исследована на ряде линий клеток лейкоза человека (Т-клеточного острого лимобластного лейкоза человека Jurkat и Molt-4, хронического миелоидного лейкоза человека K-562 и промиелоцитарного лейкоза человека HL-60) [12, 72]. В качестве препарата сравнения был использован лекарственный препарат L-аспарагиназы EcA из *E. coli* (“Medac”, Германия) (рис. 4).

Инкубация клеток различных опухолевых линий с возрастающими количествами L-аспарагиназ вызывала значительное дозо-зависимое снижение числа жизнеспособных клеток по сравнению с контролем. L-Аспарагиназы EwA и EcA проявляли сходную высокую активность по отношению к клеткам Jurkat и Molt-4: величина LD_{50} для этих линий составляла 1,0 МЕ/мл. Несколько менее чувствительными оказались клетки K-562 (для обоих ферментов LD_{50} = 2 МЕ/мл). Слабее всего цитотоксическое противоопухолевое действие L-аспарагиназ проявилось на клетках HL-60: величина LD_{50} в данном случае была больше 10 МЕ/мл).

L-аспарагиназа EwA подавляла рост клеток всех исследованных линий солидных опухолей человека и животных (рис. 5). При определённых дозах (начиная с 2 МЕ/мл) эффективность её действия сопоставимо с L-аспарагиназой EcA. Клетки НГУК1 и ЭПНТ5 (невринома Гассерова узла и глиобластома крыс), а также опухолей человека: аденокарциномы яичника SKOV-3 и гепатокарциномы Hep G2 оказались наиболее чувствительны к цитостатическому действию L-аспарагиназы EwA. Значение LD_{50} EwA для этих клеток составляло 5 МЕ/мл. Менее чувствительными были клетки фибросаркомы HT1080, аденокарциномы молочной железы MCF7 и карциномы простаты человека LnCap (LD_{50} = 7,5 МЕ/мл); клетки карциномы яичника CaOV оказались достаточно устойчивыми к действию L-аспарагиназ (LD_{50} = 10,0 МЕ/мл) [12].

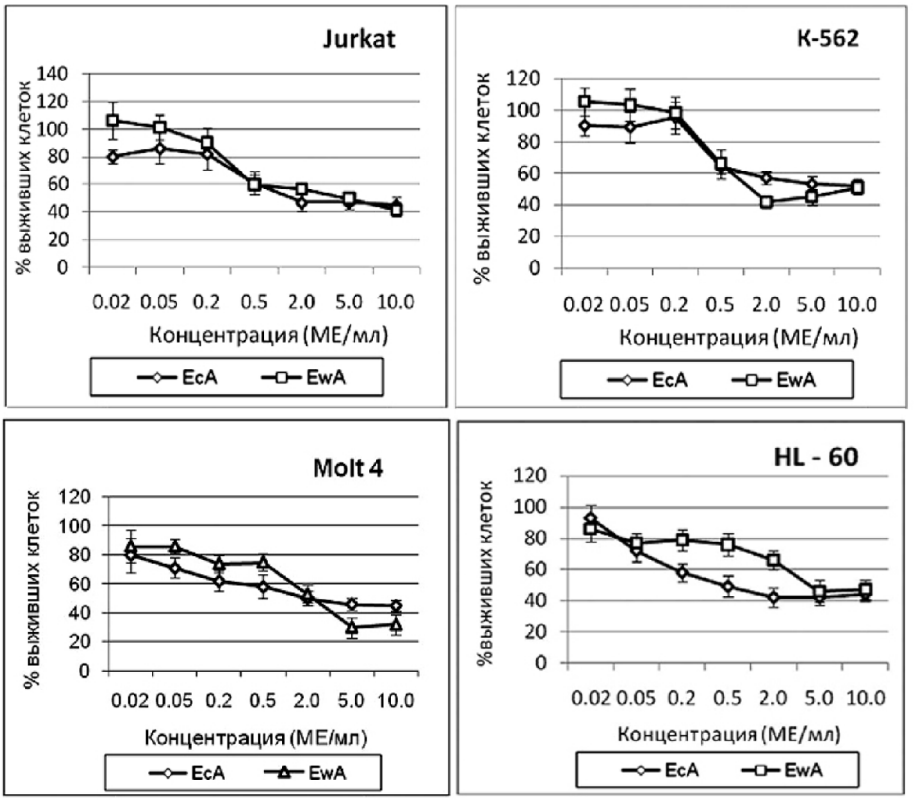

Рисунок 4. Цитотоксическая активность L-аспарагиназ EwA и EcA в отношении клеток острых лейкозов человека - Jurkat и Molt-4, промиелоцитарного лейкоза человека HL-60 и хронического лейкоза человека К-562.

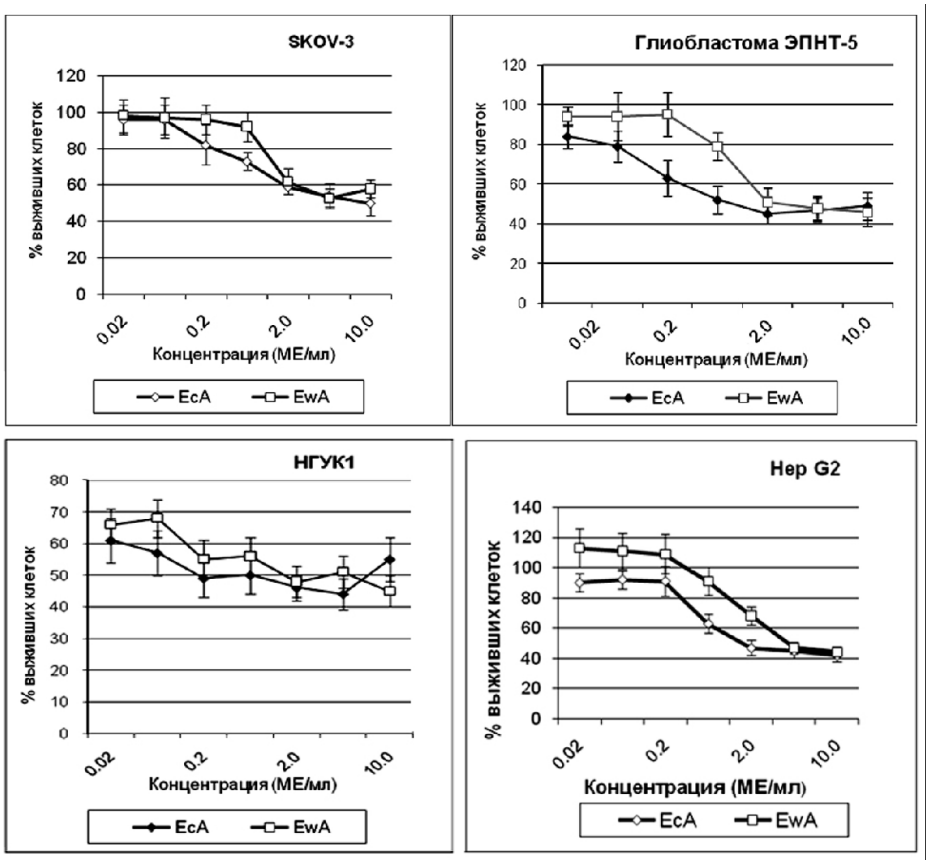

Рисунок 5. Противоопухолевая цитотоксическая активность L-аспарагиназ EwA и EcA в отношении клеток солидных опухолей: НГУК1, ЭПНТ-5, SKOV-3 и Нер G2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантная L-аспарагиназа EwA вполне сопоставима с L-аспарагиназой EcA по эффективности цитотоксического действия на клетки лейкозов человека. На основании данных о значительной противоопухолевой активности L-аспарагиназы EwA, полученных на линиях клеток солидных опухолей, можно также сделать вывод о перспективности дальнейших исследований с целью создания препарата для терапии этих опухолей человека.

6.2. ПЭГ-АСП Erw. carotovora

ПЭГ-АСП менее эффективно подавляет рост опухолевых клеток лейкозов человека по сравнению с нативными L-аспарагиназами (EwA и EcA) [71]. Через 72 ч инкубации значительное снижение числа жизнеспособных клеток К-562 и Jurkat наблюдалось уже при концентрации EwA и EcA равной 0,5 МЕ/мл, тогда как ПЭГ-АСП вызывала аналогичное подавление роста клеток при более высоких концентрациях: 2,0 МЕ/мл для Jurkat и 5,0 МЕ/мл для К-562. Линия клеток Molt-4 оказалась ещёменее чувствительной к действию ПЭГ-АСП [71].

Вместе с тем, по противоопухолевой активности в отношении клеток солидных опухолей ПЭГ-АСП вполне сопоставима с L-аспарагиназой EcA. Так, противоопухолевая активность этих препаратов на клетках MCF-7 проявлялась, начиная с концентрации 0,5 МЕ/мл. В высоких концентрациях ПЭГ-АСП действовала даже более эффективно, чем EcA, подавляя рост этих клеток. Снижение на 50% числа жизнеспособных клеток MCF-7, по сравнению с контролем, наблюдалось при концентрации ПЭГ-АСП до 5,0 МЕ/мл. Чувствительность клеток LnCap к противоопухолевому действию обеих L-аспарагиназ в диапазоне концентраций ферментов 2,0-10,0 МЕ/мл была примерно одинакова.

6.3. Рекомбинантная L-аспарагиназа Y. pseudotuberculosis (YpA)

Очищенные препараты YpA в опытах *in vitro* обладали цитостатической активностью в отношении клеток Т-лимфобластоидной лейкемии человека Jurkat и Molt-4, а также аденокарциномы молочной железы человека – MCF-7, при этом по эффективности действия они были сравнимы с коммерческим препаратом L-аспарагиназы EcA [88, 89].

6.4. Рекомбинантная L-аспарагиназа H. pylori (HpA)

Данная L-аспарагиназа обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток острого лимфобластного лейкоза MOLT-4, лимфомы Беркита Raji, а также хронического миелоидного лейкоза К-562 [72]. Иммунологически HpA отличается от лекарственного препарата L-аспарагиназы EcA, что указывает на возможность использования HpA в случае необходимости замены других лекарственных препаратов L-аспарагиназы.

6.5. Рекомбинантная L-аспарагиназа Rh. rubrum (RrA)

Цитотоксический эффект этого фермента выявлен на клеточных линиях К-562 (LD_{50}=1,80 МЕ/мл; C_{min}=0,016 МЕ/мл), DU145 (LD_{50}=9,19 МЕ/мл; C_{min}=0,08 МЕ/мл), MDA-MB-231 (LD_{50}=34,62 МЕ/мл; C_{min}=0,4 МЕ/мл) и MCF7 (LD_{50}=43,3 МЕ/мл; C_{min}=10 МЕ/мл). По критерию LD_{50} сравнительная цитотоксичность на этих клеточных линиях убывает в ряду EcA>RrA>EwA. При изучении противоопухолевой активности установлено, что 10-кратное введение в разовой дозе 4000 МЕ/кг значимо и достоверно продлевает СПЖ мышей с L5178y: 29,2±7,3 против 17,0±0,9 дней в контроле, T/C=172% ($p<0,05$) с излечением 14% мышей без признаков опухолевого процесса на аутопсии. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали [57].

Таким образом, RrA можно считать первой внутриклеточной L-аспарагиназой с установленной *in vivo* антипролиферативной активностью. К положительным характеристикам фермента можно отнести короткую аминокислотную последовательность и очень низкую L-глутаминазную активность, что позволяет предполагать относительно высокую избирательность специфического действия, определяющую перспективность нового фермента для онкологии.

7. ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ L-АСПАРАГИНАЗЫ *ERW. CAROTOVORA*

Сотрудниками ЗАО “Биокад” разработана и получена лекарственная форма L-аспарагиназы *Erw. carotovora*, включающая декстран, маннитол и полисорбат 80. Доклиническое изучение лекарственной формы L-аспарагиназы было проведено в лаборатории лекарственной токсикологии (руководитель проф. Е.В. Арзамасцев) Института экспериментальной кардиологии ФГУ “РКНПК” Минздравсоцразвития, Данные доклинических испытаний на лабораторных животных свидетельствуют о низкой токсичности этого препарата, его хорошей переносимости, об отсутствии мутагенного, аллергизирующего, тератогенного эмбриотоксического и местно-раздражающего действия при внутримышечном и внутривенном способах введения, а также об отсутствии нарушений со стороны основных органов и систем организма подопытных животных. На ряде линий мышиных перевиваемых опухолей исследована противоопухолевая активность лекарственной формы L-аспарагиназы. Показано, что лимфоидная лейкемия L 1210, привитая мышам DBA/2, оказалась нечувствительной к L-аспарагиназе. В то же время, фермент тормозил рост лимфосаркомы ЛИО-1 и лимфаденоза L 5178 Y. Выраженный лечебный эффект был получен при использовании лекарственной формы L-аспарагиназы в дозе 500 МЕ/кг при длительности введения 8 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление большой группы лекарственных средств, созданных методами генетической инженерии, может служить наглядным примером успеха биотехнологии. В число этих препаратов входят и микробные L-аспарагиназы, нашедшие широкое применение в онкогематологии. Проведённые в ИБМХ исследования по созданию гетерологических систем экспрессии микробных рекомбинантных аспарагиназ, выделению и многоплановой характеристике свойств нативных и модифицированных форм ферментов позволили выявить ряд L-аспарагиназ (EwA, HpA, HpA, и RrA), перспективных для создания отечественного лекарственного противолейкозного препарата. Особый интерес представляет L-аспарагиназа RrA, которая не обладает перекрестной аллергизирующей реактивностью с используемыми в клинике L-аспарагиназами из *E. coli* и *Erw. chrysanthemi*, что позволит применять вышеуказанные ферменты последовательно у одного больного при развитии иммунотоксичности.

Работы выполнены при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (МНТЦ): гранты №№1263 и 2828; Российского фонда фундаментальных исследований: гранты №№ 06-04-49792, 02-04-49002а, 04-04-49085а, 14-04-00325 и субсидии Минобрнауки РФ RFMEFI60414X0022.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Derst C., Henseling J., Rohm K.H.* (2000) Protein Science, **9**, 2009-2017.
2. *Miller H., Slaser J., Balis M.* (1969) Cancer Res., **29**, 183-187.
3. *Avramis V.I., Tiwari P.N.* (2006) Int. J. Nanomedicine, **1**, 241-254.
4. *Pieters H., Hunger S.P., Boos J. et al.* (2011) Cancer, **117**, 238-249.
5. *Capizzi R. J.S.H.* (1993) In: Cancer Medicine (Holland J., Fries E., eds.), Philadelphia: Lea and Febiger, , pp 796-805.
6. *Соколов Н.Н., Занин В.А., Александрова С.С.* (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 531-548.
7. *Muller H.J., Boos J.* (1998) Crit. Rev. Oncol. Hematol., **282,** 97-113.
8. *Mottl H., Bajciova V., Nemec J. et al.* (2003) Pediatr. Hematol. Oncol., **20**, 103-110.
9. *Vieira Pinheiro J.P., Lanversa C., Würthwein G. et al.* (2002) Leuk. Lymphoma, **43**, 1911-1920.
10. *Harris E., Paneesha S., Jackson N. et al.* (2002) Clin. Lab. Haematol., **24**, 111-114.
11. *Lorenzi P.L., Reinhold W.C., Rudelius M., Gunsior M. et al.* (2006) Mol. Cancer Ther., **5**, 2613-2623.
12. *Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Каралкин Р.К., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н.* (2012) Биомед. химия, **58**, 555-560.
13. *Stams W.A., den Boer M.L., Beverloo H.B. et al.* (2005) Leukemia, **19**, 318-319.
14. *Horowitz B., Madras B.K., Meister A. et al.* (1968) Science, **160**, 533-535.
15. *Ueno T., Ohtawa K., Mitsui K. et al.* (1997) Leukemia, **11**, 1858-1861.
16. *Holleman A., den Boer M.L, Kazemier K.M. et al.* (2003) Blood, **102**, 4541-4546.
17. *Ankel E.G., Zirneski J., Ring B.J., Holcenberg J.S.* (1984) In Vitro, **20**, 376-384.
18. *Wang B., Relling M.V., Storm M.C. et al.* (2003) Leukemia, **17**, 1583-1588.
19. *Woo M.H., Hak L.J., Storm M.C. et al.* (2000) J. Clin. Oncol., **18**, 1525-1532.
20. *Chakrabarti R., Schuster S.M.* (1997) Int. J. Pediatric Hematol. Oncol., **4**, 597-611.
21. *Kafkewitz D., Bendich A.* (1983) Am. J. Clin. Nutr., **37**, 1025-1030.
22. *Ollenschlager G., Roth E., Linkesch W. et al.* (1988) Eur. J. Clin. Invest., **18**, 512-516.
23. *Reinert R.B., Oberle L.M., Wek S.A. et al.* (2006) J. Biol. Chem., **281**, 31222–31233.
24. *Wriston J.G. Jr.* (1985) Methods Enzymol., **113**, 608-618.
25. *Killander D., Dohlwitz A., Engstedt L.* (1976) Cancer, **37**, 220-228.
26. *Distasio J.A., Niederman R.A., Kafkewitz D., Goodman D.* (1976) J. Biol. Chem., **251**, 6929-6933.
27. *Distasio J.A., Salazar A.M., Nadsji M., Durden D.L.* (1982) Int. J. Cancer. **30**, 343-347.
28. *Durden D.* (1998) US Patent. № PCT/US98/11905.
29. *Мардашев С.Р., Козлов Е.А., Соколов Н.Н. и др.* (1972) Вопр. мед. химии, **18**, 318-321.
30. *Николаев А.Я., Козлов Е.А., Соколов Н.Н. и др.* (1974) Вопр. мед. химии, **20**, 272-276.
31. *Кондратьева Н.А., Лорие Ю.И., Круглова Г.В. и др.* (1980) Пробл. гематол, №7, 3-9.
32. *Николаев А.Я., Соколов Н.Н., Козлов Е.А., Куцман М.Е.* (1975) Биохимия, **40**, 984-989.
33. *Мардашев С.Р., Николаев А.Я., Коваленко Н.А., Раков С.С.* (1975) Вопр. мед. химии, **21**, 29-35.
34. *Лебедева З.И., Березов Т.Т.* (1997) Бюл. экспер. биол. мед., №11, 598-600.
35. *Schmid F.A., Roberts J.* (1974) Cancer Chemother. Rep., **58**, 829-840.
36. *Holcenberg J.S., Roberts J. (eds.)* (1981) Enzymes as Drugs. New York: Wiley-Intersci. pp. 22-57.
37. *Spiers A.S.D., Wade H.E.* (1976) Br. Med. J., **1**, 1317-1319.
38. *Keating G.M.* (2013) BioDrugs, **27**, 413-418.
39. *Baneyx F.* (1999) Curr. Op. Biotechnol., **10**, 411-421.
40. *Demain A.L., Vaishnav P.* (2009) Biotechnol. Adv., **27**, 297-306.
41. *Покровская М.В., Покровский В.С., Соколов Н.Н.* (2011) Прикл. биохим. микробиол., **47**, 183-186.
42. *Покровская М.В., Соколов Н.Н., Покровский В.С., Арчаков А.И., Гусева Д.А.* (2010) Патент на изобретение РФ №2398876 от 10.09.2010 г. Бюлл. изобр. 10.09.2010.
43. *Gulati R., Saxena R.K., Gupta R.* (1997) Lett. Appl. Microbiol., **24**, 23-26.
44. *Sillen L.G., Martell A.E.* (1971) Stability constants of metal-ion complexes. London: Chemical Soc., 865 p.
45. *Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Сидорук К.В., Жгун А.А., Борисова А.А., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Богуш В.Г, Красоткина Ю.В., Гервазиев Ю.В., Покровская М.В., Соков Б.Н., Березов Т.Т., Скрябин К.Г., Арчаков А.И.* (2005) Мол. медицина, **1**, 45-53.
46. *Эльдаров М.А., Жгун А.А., Гервазиев Ю.В., Александрова С.С.,Богуш В.Г., Сидорук К.В., Свешникова Е.В., Борисова А.А., Омельянюк Н.М., Арчаков А.И., Скрябин К.Г., Соколов Н.Н.* (2004) Патент на изобретение РФ №2224797 от 27 февраля 2004 г. Бюлл. изобрет. №14, 20.05.2004.

47. *Bogush V.G., Borisova A.A., Eldarov M.A., Sidoruk K.V., Sokolov N.N. et al.* (2003) PCT/RU Patent №WO03018742 от 03.06.2003.
48. *Эльдаров М.А., Жгун А.А., Гервазиев Ю.В., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Арчаков А.И., Скрябин К.Г., Соколов Н.Н.* (2004) Патент на изобретение РФ №2221868 от 20 января 2004 г. Бюлл. изобрет. №2. 20.01.2004.
49. *Garces J.A., Gavin R.H.* (2001) Methods Mol. Biol., **161**, 3-8.
50. *Омельянюк Н.М., Борисова А.А., Александрова С.С., Покровская М.В.. Эльдаров М.А., Арчаков А.И., Скрябин К.Г., Соколов Н.Н.* (2005) Биотехенология, №1, 27-34.
51. *Сидорук К.В., Богуш В.Г, Эльдаров М.А., Гончарова О.В., Чугунова Н.М., Покровская М.В., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Соколов Н.Н.* (2010) Патент РФ №2441916 от 06 октября 2010 г., Бюлл. изобрет. №4 20.02.2012.
52. *Сидорук К.В., Покровский В.С., Борисова А.А., Омельянюк Н.М., Александрова С.С., Покровская М.В., Гладилина Ю.А., Богуш В.Г., Соколов Н.Н.* (2011) Бюл. экспер. биол. мед., **152**, 219-223.
53. *Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Omeljanjuk N.M., Borisova A.A., Anisimova N.Y., Sokolov N.N.* (2012) Protein Expr. Purif., **82**, 150-154.
54. *Гладилина Ю.А., Соколов Н.Н., Красоткина Ю.В.* (2008) Биомед. химия, **54**, 482-486.
55. *Dhavala P., Krasotkina J., Dubreuil C., Papageorgiou A.C.* (2008) Acta Crystallogr. Sect. F., **64**, 740-742.
56. *Cedar H., Schwartz J.H.* (1967) J. Biol. Chem., **242**, 3753-3755.
57. *Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Анисимова Н.Ю., Андрианов Р.М. Трещалина Е.М,, Пономарев Г.В., Соколов Н.Н.* (2013) Биомед. химия, **59**, 192-208.
58. *Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Veselovsky A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Mishin A.A., Zhdanov D.D., Sokolov N.N.* (2015) Mol. Biotechnol., **57**, 251-264.
59. *Ho P.P.K., Milikin E.B., Bobbitt J.L. et al.* (1970) J. Biol. Chem., **245**, 3708-3715.
60. *Itai A., Yonei N., Matsui Y., Iitaka Y.J.* (1976) J. Mol. Biol. **105**, 321-325.
61. *Cammack K.A., Marlborough D.I., Miller D.S.* (1972) Biochem J., **126**, 361-379.
62. *Warangkar S.C., Khobragade C.N.* (2010) Enzyme Research, Article ID 165878.
63. *Lee S.M., Wroble M.H., Ross J.T.* (1989) Appl. Biochem. Biotechnol., **1**, 1-11.
64. *Maladkar N.K., Singh V.K., Nath S.R.* (1993) Hinsustan Antibiot. Bull., **35**, 77-86.
65. *Goward C.R., Stevens G.B., Tattersall R., Atkinson T.* (1992) Bioseparation, **2**, 335-341.
66. *Kotzia GA., Labrou N.E.* (2007) J. Biotechnol., **127**, 657-669.
67. *Tosa T., Sano R., Yamomoto K., Matuo Y., Chibata I.* (1972) Biochemistry **11**, 217-222.
68. *Whelan H., Wriston J.C. Jr.* (1974) Biochim. Biophys. Acta, **365**, 212-222.
69. *Борисова А.А., Эльдаров М.А., Жгун А.А. и др.* (2003) Биомед. химия, **49**, 502-507.
70. *Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Y.V., Sokolov N.N.* (2004) Appl. Biochem. Biotechnol., **39**, 1-7.
71. *Карасев В.С., Бочкова О.П., Чугунов А.М., Мелик-Нубаров Н.С., Гроздова И.Д., Черновская Т.В., Денисов Л.А., Руденко Е.Г., Морозова Е.Л., Богуш В.Г., Сидорук К.В., Колтун И.О., Скатова Г.Е., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Соколов Н.Н.* (2010) Патент на изобретение РФ №2441914 от 06 октября 2010 г. Бюлл. изобрет. №4, 10.02.2012.
72. *Гладилина Ю.А.* (2008) Дисс. канд. наук, ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва.
73. *Abuchowski A., Kazo G.M., Verhoest C.R.Jr. et al.* (1984) Cancer Biochem. Biophys., **7**, 175-186.
74. *Pasut G., Sergi M., Veronese F.M.* (2008) Adv. Drug Deliv. Rev., **60**, 69-78.
75. *Michael L.G.* (2003) Advanced Drug Delivery Rev., **55**, 1293-1302.
76. *Inada Y., Furakawa M., Sasaki H., Kodera Y. et al.* (1995) Trend Biotechnol., **13**, 86-91.
77. *Kuchumova A.V., Krasotkina Y.V., Khasigov P.Z. Sokolov N.N.* (2007) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **1**, 230-232.
78. *Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V., Sokolov N.N.* (2014) Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem., **8**, 252-259.
79. *Кудряшова Е.В., Суховерхов К.В.* (2015) Биохимия, **80**, 113-119.
80. *Papageorgiou A.C., Posypanova G.A., Andersson C.S., Sokolov N.N., Krasotkina J.* (2008) FEBS J., **275**, 4306-4316.
81. *Wikman L.E., Krasotkina J., Kuchumova A., Sokolov N.N., Papageorgiou A.C.* (2005) Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., **61**(Pt 4), 407-409.
82. *Мезенцев Ю.В., Мольнар А.А., Гнеденко О.В., Красоткина Ю.В., Соколов Н.Н., Иванов А.С.* (2006) Биомед. химия, **52**, 258-271.
83. *Красоткина Ю.В., Соколов Н.Н.* (2010) Мол. медицина, №4, 11-16.
84. *Sanches M., Krauchenco S., Polikarpov I.* (2007) Curr. Chem. Biol., **1**. 75-86.
85. *Kirschbaum J., Wriston J.C.Jr., Ratych O.T.* (1969) Biochim. Biophys. Acta, **194**. 161-167.
86. *Gilbert H.J., Blazek R., Bullman H.M.S., Minton N.P.* (1986) J. Gen. Microbiol., **132**, 151-160.
87. *Shifrin S., Parrot C.J.* (1974) J. Biol. Chem., **249**, 4175-4180.
88. *Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Андрианов Р.М., Жданов Д.Д., Омельянюк Н.М., Трещалина Е.М., Соколов Н.Н.* (2013) Прикл. биохим. микробиол., **49**, 24-28.
89. *Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омельянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н.* (2008) Биомед. химия, **54,** 712-719.

Поступила: 13. 05. 2015.

BACTERIAL RECOMBINANT L-ASPARAGINASES: PROPERTIES, STRUCTURE AND ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY

N.N. Sokolov[1], M.A. Eldarov[2], M.V. Pokrovskaya[1], S.S. Aleksandrova[1], O.Yu. Abakumova[1], O.V. Podobed[1], N.S. Melik-Nubarov[3], E.V. Kudryashova[3], D.V. Grishin[1], A.I. Archakov[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow 119121 Russia; fax: +7(495)2450857; e-mail: Sokolov2144@yandex.ru
[2]Centre "Bioengineering", Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[3]Lomonosov Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, Russia

For more than 40 years L-asparaginases are used in combined therapy of acute lymphoblastic leukemia in children and the range of tumors sensitive to these enzymes constantly extends. This review summarizes results of studies aimed at creation of new systems for heterological expression of bacterial L-asparaginases as *Erwinia carotovora* (EwA), *Helicobacter pylori* (HpA), *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA) and *Rhodospirillum rubrum* (RrA); special attention is paid to isolation of purified enzymes and their crystallization, modification by chitosan/polyethylene, physicochemical, kinetic and structural properties characterization, and the study of the cytotoxic or anti-proliferative activity of new recombinant L-asparaginases on cell cultures *in vitro*. The resultant recombinant L-asparaginases (EwA, YpA, HpA и RrA) exhibit reasonable cytotoxic action on the human leukemia cells comparable to the pharmacologically available L-asparaginase EcA and represent practical interest in respect to creation, on their basis, new effective antineoplastic remedies. Further prospects of researches on bacterial L-asparaginases are associated with development of analogs of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase (RrA) by means of directed changes of the protein structure using genetic engineering, development of chito-PEGylation for receiving L-asparaginase preparations with improved pharmacokinetic characteristics.

Key words: L-asparaginase, L-glutaminase, recombinant proteins, leukemia, PEGylated L-asparaginase, chito-PEGylation.