

©Коллектив авторов

## МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АСПАРАГИНАЗАМ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ

С.С. Александрова, Ю.А. Гладиллина, М.В. Покровская, Н.Н. Соколов, Д.Д. Жданов\*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \* эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

Аспарагиназа является одним из важнейших химиотерапевтических средств против острого лимфобластного лейкоза — наиболее распространённой формы рака крови. На сегодняшний день обе используемые в гематологии аспарагиназы из *Escherichia coli* и *Dickeya dadantii* (ранее известная как *Erwinia chrysanthemi*) индуцируют химиорезистентность у раковых клеток и побочные эффекты в виде гиперчувствительности иммунных реакций. Лейкозные клетки могут быть не восприимчивыми к аспарагиназе из-за повышенной активности аспарагинсинтетазы и других механизмов, связанных с устойчивостью к аспарагиназе. Поэтому поиск новых продуцентов L-аспарагиназ с улучшенными фармакологическими свойствами остается перспективным и актуальным направлением. В данной работе рассмотрены механизмы развития резистентности и лекарственной устойчивости к L-аспарагиназе, а также возможные пути их преодоления.

**Ключевые слова:** противоопухолевые ферменты; L-аспарагиназа; лекарственная устойчивость; иммуногенность

**DOI:** 10.18097/PBMC20226802104

### ВВЕДЕНИЕ

Препараты с ферментативной активностью используются в клинической медицине уже более 50 лет. Заместительная терапия недостаточности поджелудочной железы, ускорение заживления ран или тромболитическое лечение являются одними из наиболее успешных областей применения ферментативных препаратов. Ферменты, которые необратимо разрушают определённые жизненно важные аминокислоты, разрабатываются в качестве противоопухолевых терапевтических средств [1]. Первым бактериальным ферментом, введённым в клиническую практику, была L-аспарагиназа (L-аспарагинамидогидролаза, КФ 3.5.1.1) [2]. В настоящее время нативная L-аспарагиназа из *Escherichia coli* (EcA) и *Dickeya dadantii* (ранее известная как *Erwinia chrysanthemi*, EtA) наряду с ПЭГилированной формой аспарагиназы *E. coli* успешно используется для лечения пациентов с острым лимфобластным лейкозом [3-6]. Нормальные и опухолевые клетки нуждаются в L-аспарагине для удовлетворения своих метаболических потребностей. Нормальные клетки могут синтезировать L-аспарагин для своего роста с помощью аспарагинсинтетазы, в то время как опухолевые клетки лишены способности синтезировать аспарагин из-за отсутствия или недостаточной экспрессии данного гена и поэтому зависят от экзогенного поступления этой аминокислоты из кровотока [7]. Противоопухолевый эффект L-аспарагиназы основан на её способности гидролизовать L-аспарагин до L-аспартата и аммиака. Воздействие L-аспарагиназы на опухолевые клетки, главным образом лейкозные, приводит к нарушению синтеза белка и голоданию раковых клеток, вызывая их гибель [8]. L-аспарагиназы были идентифицированы у млекопитающих, птиц,

растений, грибов и широкого спектра бактерий [9, 10]. На сегодняшний день выявлены десятки микробных источников L-аспарагиназ, хотя не все из них продемонстрировали цитотоксичность в отношении лейкозных клеток или ингибирующие опухоль эффекты [1, 10].

Исторически L-аспарагиназы подразделяются на три семейства: растительного типа, типа *Rhizobium etili* и бактериального типа. Бактериальные L-аспарагиназы, в свою очередь, можно разделить на два типа в зависимости от индуцируемости, клеточной локализации, сродства к субстрату и четвертичной структуры [11]. L-аспарагиназы типа I — конститутивно экспрессируемые ферменты, локализованные в цитоплазме; они обладают относительно низким сродством к L-аспарагину. К числу наиболее изученных ферментов типа I относятся L-аспарагиназы *Bacillus subtilis* [12], *Pyrococcus horikoshii* [13] и *Acinetobacter soli* [14], которые показали относительно низкое сродство к L-аспарагину, повлекшее отсутствие потенциального терапевтического применения. Бактериальные L-аспарагиназы II типа представляют собой периплазматические ферменты с индуцированной экспрессией во время анаэробноза, которые обладают высоким сродством к L-аспарагину и широкой субстратной специфичностью, что приводит к мощной противоопухолевой активности [15].

Терапевтическое применение L-аспарагиназ ограничено множеством побочных эффектов: гепато- и нефротоксичностью, дисфункциями центральной нервной системы, панкреатитом, тромбоэмболией, мукозитом, гипергликемией и дислипидемией [16-18]. Кроме того, была показана генотоксическая активность L-аспарагиназы, продуцируемой *Streptomyces ansochromogenes* [19]. Считается, что такие побочные эффекты

объясняются неспецифическими эффектами этих ферментов. В дополнение к хорошо изученным антипролиферативным эффектам L-аспаргиназ, которые вызваны дефицитом L-аспарагина в среде опухолевых клеток, также было предложено несколько альтернативных механизмов. Согласно первому из них, в результате деградации альтернативных субстратов фермента, таких как L-глутамин, D-аспарагин, моноамид янтарной кислоты и аспарагинил-тРНК [20, 21], могут появиться антипролиферативные или побочные эффекты. Согласно второму, L-аспарагиназа из *E. coli* может высвобождать углеводы из  $\alpha$ 2-HS-гликопротеина фетуина, и гидролиз гликопротеинов клеточной мембраны и ингибирование их синтеза ферментом может привести к лизису клеток [22]. Согласно третьему, данный фермент также может ингибировать биосинтез гликопротеина и приводить к увеличению проницаемости мембран из-за специфического воздействия на рецептор конканавалина А [23]. Неожиданный цитотоксический аспарагин-независимый механизм был описан для мутантной L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* (RrA). RrA продемонстрировала регуляторную способность и подавляла активность теломеразы в нескольких линиях раковых клеток человека, нормальных активированных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах и ксенотрансплантатах солидных опухолей человека [24-26]. Эти наблюдения указывают на существование множества механизмов действия L-аспарагиназ на опухолевые клетки, которые также могут оказывать влияние и на нормальные клетки, вызывая тем самым разнообразные побочные эффекты и развитие устойчивости. В данном обзоре мы рассмотрели основные механизмы развития лекарственной устойчивости при применении L-аспарагиназ и результаты работ по поиску путей её преодоления.

## 1. ХАРАКТЕРИСТИКА L-АСПАРАГИНАЗ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Изучение противоопухолевого свойств L-аспарагиназ началось в 50-е годы XX века с выявления редукции лимфомы у мышей, которым вводили сыворотку из крови морских свинок [27, 28]. Вгооте предположил, что L-аспарагиназа, находящаяся в сыворотке крови морских свинок, эффективна против опухолевых клеток лимфоидной ткани [29]. За прошедшие годы было выделено и описано около пяти сотен различных L-аспарагиназ у растений, наземных и морских микроорганизмов [30],

из которых наибольшей противоопухолевой активностью обладали бактериальные L-аспарагиназы EsA и EgA [31]. Эти два фермента, идентичные по аминокислотному составу на 77%, проявляют сходные свойства (табл. 1).

Оба фермента относятся к L-аспарагиназам II класса и функционируют в виде гомотетрамеров с молекулярным весом около 140 кДа. Каждые 2 мономера объединены в димеры, образуя тетрамер. Между N- и C- концевыми доменами находятся 4 каталитических центра (рис. 1). Ферментативной активностью обладает только тетрамер [33].

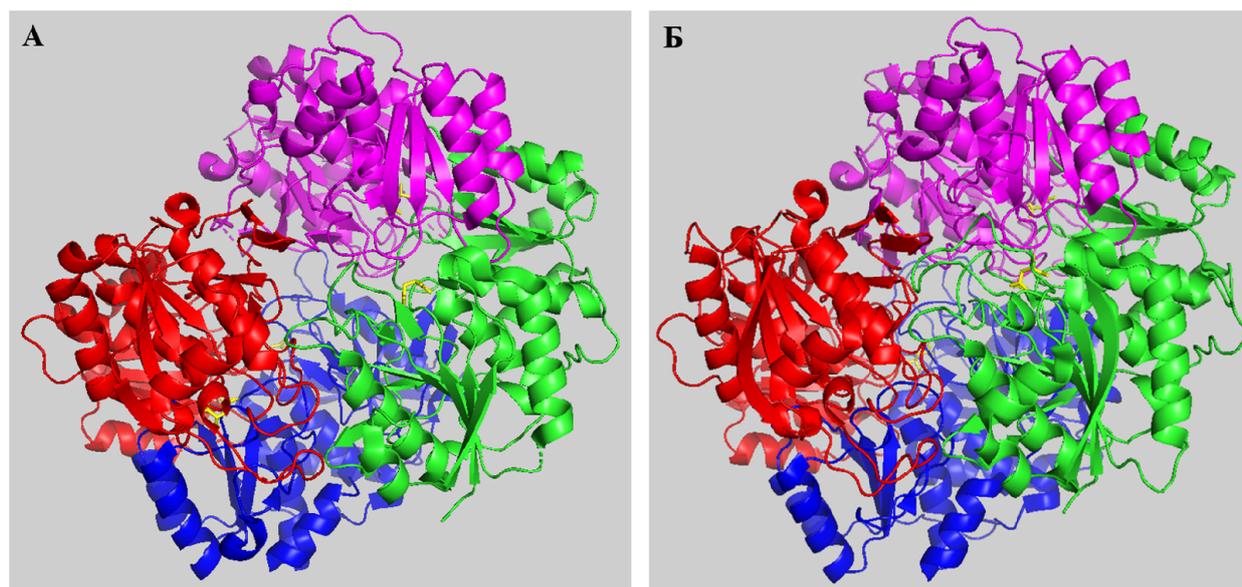
Известный механизм каталитической реакции состоит во взаимодействии нуклеофильного треонина, располагающегося вблизи активного центра фермента, с карбонильной группой аспарагина с образованием ацилфермента. При этом от субстрата отщепляется молекула аммиака, а ацилфермент реагирует с молекулой воды с образованием аспартата и свободного фермента (рис. 2) [33].

Противоопухолевое действие данных ферментов заключается в снижении концентрации L-аспарагина крови, который необходим для синтеза белков (в первую очередь мембранных белков) и азотистых оснований быстро делящихся опухолевых клеток, и обеспечения нормального клеточного цикла [7]. Быстрая пролиферация опухолевых клеток приводит к дефициту в них L-аспарагина, а введение L-аспарагиназы вызывает истощение запасов внеклеточного L-аспарагина. При лейкозах лимфобласты не способны вырабатывать аспарагин для компенсации дефицита внеклеточного аспарагина (вследствие крайне низкой активности фермента аспарагинсинтетазы), поэтому происходит остановка клеточного цикла в постмитотической G1-фазе и последующая гибель по пути апоптоза (рис. 3) [34, 35].

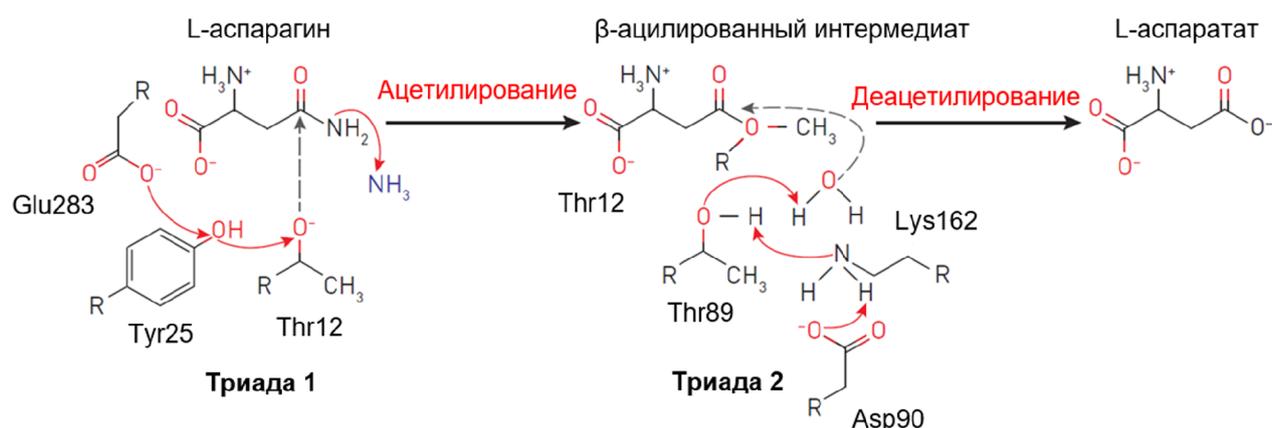
L-аспарагиназы EsA и EgA являются ключевым препаратом всех протоколов лечения таких онкологических заболеваний, как лимфоидный лейкоз, который делится на T- и B-, с дальнейшим подразделением на острый (ОЛЛ) и хронический (ХЛЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), Неходжкинская лимфома, НК/Т-лимфома, глиобластома, ретикулобластома, а также ряд солидных опухолей [10, 36]. В настоящее время в клинике применяются 3 препарата: нативный фермент из EsA (под торговыми названиями Элспар, Лейназа, Кидролаза, Краснитин, аспарагиназа Медак и ВероАспаргиназа), ПЭГилированная форма этого фермента ПЭГ-L-аспарагиназа (конъюгат нативного фермента, ковалентно связанного с ПЭГ в местах,

Таблица 1. Физико-химические свойства L-аспарагиназ, применяемых в клинической практике [32]

| Параметр  | L-аспарагиназа <i>Escherichia coli</i> | L-аспарагиназа <i>Dickeya dadantii</i> ( <i>Erwinia chrysanthemi</i> ) |
|---|--|--|
| Молекулярная масса субъединицы, кДа               | 36,8                                   | 34,2   |
| Удельная активность, МЕ/мг белка                  | 280-400                                | 330-350  |
| Оптимальный pH                                    | 8-8,6                                  | 7-10   |
| K <sub>m</sub> для аспарагина, мкМ/л              | 12                                     | 194  |
| Изоэлектрическая точка                            | 4,6-5,5                                | 8,85   |
| L-глутаминазная активность, % от L-аспарагиназной | 3                                      | 3  |



**Рисунок 1.** Гомотетрамеры L-аспарагиназ (А) ЕсА и (Б) ЕгА, демонстрирующие идентичность их четвертичных структур. Каждый мономер выделен индивидуальным цветом. Молекула субстрата L-аспарагина в активном центре каждого мономера показана жёлтым. Источник данных Protein Data Bank: для ЕсА 5f52; для ЕгА 6v5f. Структуры визуализированы в программе PyMOL (“Schrödinger Inc.,” США).

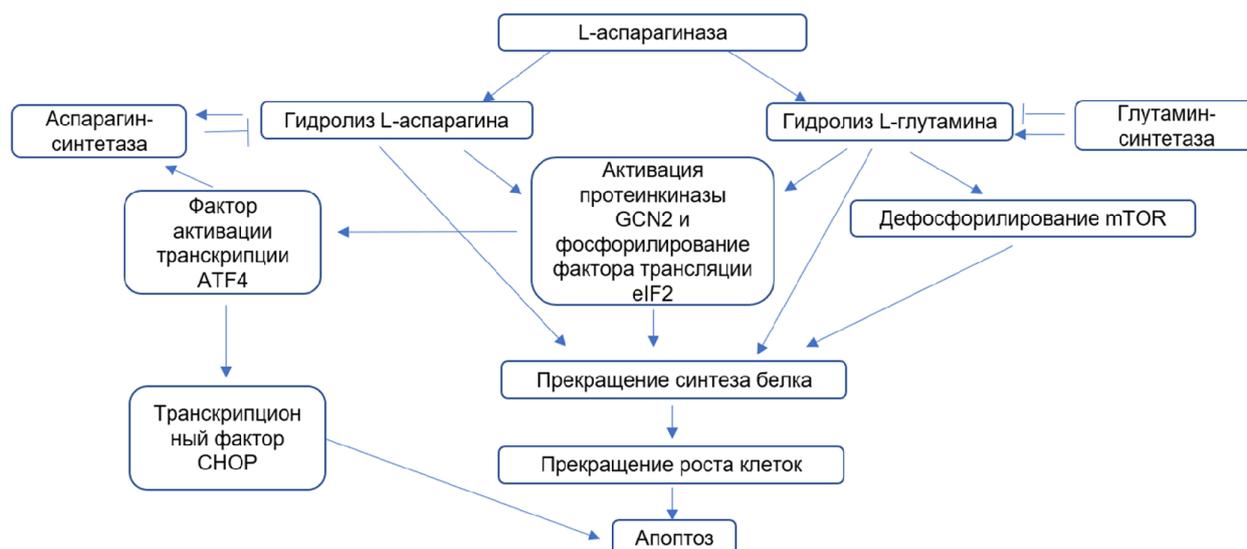


**Рисунок 2.** Механизм реакции в каталитических триадах на примере фермента ЕсА. Триада I ацилирует субстрат (L-аспарагин) с образованием β-аспартил-ферментного промежуточного продукта. Триада II деацилирует промежуточное соединение в присутствии молекулы воды с выделением L-аспарагиновой кислоты и аммиака в качестве продуктов. В первой реакции электронная плотность мигрирует от Glu283 к кислороду Tyr25, а затем к кислороду Thr12. Происходит нуклеофильная атака, приводящая к выделению аммиака и образованию эфира. Во второй реакции из-за наличия заряда на Asp90 образуется ионная связь с аминогруппой Lys162, что приводит к удалению протона из Thr89 с последующей нуклеофильной атакой молекулы воды на углерод сложного эфира. Таким образом, происходит реакция деацетилирования.

не влияющих на ферментативную активность, Онкаспар) и фермент EгА (Эрвиназа). Эффективность различных схем на основе аспарагиназы показана в таких исследованиях, как SMILE [37], GELOX [38], AspaMetDex [39] и DDGP [40].

Наиболее эффективно вышеуказанные препараты показали себя при терапии ОЛЛ у детей. Ремиссия у них достигает в 40-60% случаев при монопрепаратной терапии и до 90-95% при дополнительном применении цитостатика винкристина в комбинации с преднизолоном [41]. Однако препараты L-аспарагиназы имеют ограниченное применение, поскольку вызывают тяжёлые побочные

реакции: синдром диссеминированного сосудистого свертывания (образование тромбов), тяжёлую гипертриглицеридемию (способствующую развитию атеросклероза, панкреатита и болезни Альцгеймера), острую гипергликемию (сахарный диабет), гипофибриногению (геморрагию), остеонекроз (гибель костного мозга и остова кости) [42]. Эти реакции обусловлены образованием антител к ферменту из-за его бактериального происхождения и большой молекулярной массы. Антитела, вырабатываемые иммунными клетками в ответ на введение L-аспарагиназ, делят на нейтрализующие и не нейтрализующие. Нейтрализующие антитела



**Рисунок 3.** Механизмы противоопухолевых эффектов L-аспарагиназы. Расщепление аспарагина индуцирует экспрессию гена аспарагинсинтетазы, что приводит к уменьшению дефицита аспарагина и может вызвать резистентность к L-аспарагиназе. При гидролизе аспарагина (и/или глутамина) клетки активируют GCN2 киназу, которая фосфорилирует  $\alpha$ -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции 2. Такое фосфорилирование снижает скорость синтеза белка и приводит к экономии энергии, необходимой для выживания клеток. Общий синтез белка снижается, но происходит предпочтительная трансляция мРНК проапоптотических белков. Один из них, активирующий транскрипцию фактора 4 (ATF4), индуцирует экспрессию гена аспарагинсинтетазы, способствующей выживанию клетки, но может также активировать экспрессию генов белков апоптоза. L-аспарагиназа влияет на сигнальный путь mTOR, который контролирует рост и деление клеток в зависимости от окружающих условий. В условиях действия L-аспарагиназы он приводит к торможению синтеза белка.

способны связываться с активным участком терапевтического белка, ингибировать активность и снижать эффективность препарата, вызывая необходимость в больших и более частых дозах для достижения клинического эффекта. Не нейтрализующие антитела не связываются с активным центром, но способны ускорять клиренс лекарств, образуя иммунные комплексы с биотерапевтическими препаратами и выводить их из циркуляции через систему мононуклеарных фагоцитов.

Исследование иммуногенности нативной и ПЭГилированной ЕсА и нативной аспарагиназы *Erwinia carotovora* (ЕwА) методом поверхностного плазмонного резонанса, позволяющим определять кинетические, равновесные и термодинамические параметры межмолекулярных взаимодействий (в том числе, обнаруживать специфичность антител), показало, что 96,4% вырабатываемых антител являются нейтрализующими [43]. Частое введение ЕсА, обладающей наивысшей иммуногенностью, может приводить к развитию анафилактического шока [18].

Развитие резистентности также является одним из факторов, ограничивающим применение данного препарата. Причины резистентности опухолевых клеток к химиотерапии могут быть следствием ряда процессов, таких как: снижение внутриклеточной концентрации противоопухолевого препарата, обусловленного активным АТР-зависимым выведением вещества в межклеточную среду (такой транспорт осуществляется белком плазматической мембраны Р-гликопротеином (Рgp), являющимся

продуктом гена MDR1); нарушение апоптоза в самих опухолевых клетках (мутация или дефицит гена p53, гиперэкспрессия гена Bcl-2, делающая клетки нечувствительными к проапоптотическим стимулам); активация детоксифицирующих систем, таких как глутатион/глутатион-S-трансферазы; секвестрация препаратов во внутриклеточные везикулы лизосомы и эндосомы; изменение мишеней топоизомеразы II, влияющей на топологию ДНК; усиление репарации лекарственно-индуцированного повреждения ДНК; гиперэкспрессию генов множественной лекарственной устойчивости (MDR, MRP, BCRP и др); изменение в метаболизме липидов в том числе в церамидном пути (церамиды являются компонентом клеточной мембраны, а также служат сигнальной молекулой в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптоза); угнетение захвата препаратов при изменении поверхностных рецепторов и носителей; гиперэкспрессия таргетных ферментов, таких как тимидилат-синтетаза, являющаяся ключевым ферментом, контролирующим репликацию ДНК (является предиктивным фактором терапии солидных опухолей); хромосомные нарушения в опухолевых клетках, приводящие к гиперэкспрессии антиапоптотических генов [44]. По данным Rajic и соавт. [45], риск развития осложнений при лечении L-аспарагиназой имеет генетическую природу, по крайней мере, у детей, секвенирование всего экзона которых выявило полиморфизм гена, кодирующего белок GRIA1, гетеромерного белкового комплекса рецептора глутамата, являющегося возбуждающим нейротрансмиттером в головном мозге млекопитающих.

## 2. СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ L-АСПАРАГИНАЗ

Иммуногенность белка может быть снижена путём изменения последовательностей аминокислот, опознаваемых эпитопами В-клеток, или последовательностей, которые связаны с главным комплексом гистосовместимости, вызывающим зависимые от Т-клеток иммунные реакции. Идентификация и удаление эпитопов В-клеток сложны из-за их конформационной природы и недостаточного знания репертуара В-клеточных антител у людей различных этнических групп. Эпитопы Т-клеток у ферментов обычно присутствуют в большом количестве и удаление их требует значительного изменения последовательности полипептидов. Разработанная Cantor и соавт. [46] система нейтрального дрейфа с использованием базы данных эпитопов IEDB (<http://www.iedb.org>) позволила создать мутант EcA, содержащий 8 аминокислотных замен, 3 из которых не находятся ни в одной из 500 аспарагиназ бактериального типа. Этот мутант EcA обладал низкой иммуногенностью при сохраненной каталитической активности и стабильности. В работах, выполненных до создания базы IEDB, Moola и соавт. [47] определили, что основным антигенным эпитопом EwA является последовательность вблизи С-конца -282GIVPPDEELP287. Они получили мутантную форму фермента с пониженной в 8 раз антигенностью, заменив Pro285 на Thr285. В работе Offman получены два мутанта EcA устойчивых к деградации протеазой В и аспарагинилэндопептидазой человека — ферментом, продуцируемым лейкозными бластными клетками [48], а замена трёх аминокислот 195RKH197 на 195AAA197 позволила снизить антигенность фермента в 5 раз, что было доказано методом ИФА с использованием поликлональных антител против аспарагиназы дикого типа [49]. В структуре EcA определена последовательность 254NLYKSVF260, вызывающая активацию иммунных реакций при терапии ОЛЛ [50]. В работе Mechta и соавт. методом ИФА были определены значимые аминокислоты в В-клеточных эпитопах (Ser122, Tyr176, Tyr181) и направленным мутагенезом были получены в 10 раз менее иммуногенные белки, которые оказались способны также снижать транскрипцию аспарагинсинтетазы [51].

Фермент EгА обладает меньшей способностью к индукции аллергических и других побочных реакций, и иммуногенность данного фермента в 5 раз ниже по сравнению с EcA [52]. Также более низкую иммуногенность и более длительный период полувыведения имеют ПЭГилированные формы EcA (1 сутки) и EгА (0,6 суток) [53]. ПЭГилированная форма EгА поддерживала полное истощение аспарагина в плазме у мышей в течение 72 ч при использовании в 50 раз меньшей дозы фермента и не вызывала образования специфических антител [6].

Не вызывает выработку перекрёстных антител с EcA и EгА L-аспарагиназа *Rodospyrillum rubrum* (RrA) [54], состоящая из 172 остатков аминокислот (18 кДа), имеющая низкую степень

гомологии с вышеуказанными ферментами. RrA для функционирования не требует кофакторов и обладает низкой глутаминазой активностью (не более 0,1% от аспарагиназой). Направленным мутагенезом были получены клоны RrA, несущие замены D60K, F61L, R118H, G120R, которые показали улучшение кинетических параметров и стабильности ферментов. Замены E149R и V150P привели к повышению противоопухолевой активности и снижению токсичности для нормальных клеток [54, 55], а исследования *in vivo* на мышах с опухолями показали возрастание средней продолжительности жизни вдвое и полное излечение у 14% мышей [56]. Также было установлено, что варианты аспарагиназы RrA E149R, V150P и F151T проникают в раковые клетки молочной железы и клетки нормальных лимфоцитов [26, 57]. Проникновение происходит с помощью белка клатрина, обеспечивающего рецепторно-опосредованный эндоцитоз, то есть избирательное поглощение веществ животной клеткой, при котором макромолекула связывается с рецептором клеточной поверхности и попадает внутрь клетки в окаймлённых клатрином везикулах. Кроме аспарагиназной активности фермент проявляет антителомеразную активность внутри ядер клеток, снижая экспрессию hTERT субъединицы теломеразы и подавляя активность теломеразы на 80% и тем самым блокируя деление опухолевой клетки. Поэтому RrA потенциально может применяться в качестве противоопухолевого средства, обладающего двойным механизмом действия. Иммуногенность RrA также может быть понижена методом ПЭГилирования, так как за счёт укрупнения молекулы образуется меньше антител и уменьшается поглощение L-аспарагиназы моноцитарно-макрофагальной клеточной системой [6, 53].

Для стабилизации RrA было осуществлено хито-ПЭГилирование [58]. Этот процесс базируется на образовании конъюгатов ферментов с привитыми сополимерами разветвленной структуры на основе ионогенных хитозанов, модифицированных ПЭГ. Физико-химические свойства полимера можно целенаправленно варьировать в широком диапазоне в зависимости от степени полимеризации полисахарида хитозана и степени ПЭГилирования. Полиэлектrolитная природа сополимеров обуславливает многоточечное электростатическое взаимодействие с поверхностью белка, способствуя стабилизации конформации фермента. Конъюгирование RrA с ПЭГ-хитозаном не изменяло структуру фермента (содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -спиралей оставалось прежним) и повышало удельную активность почти на 30%. Конъюгаты за счёт поликатионных свойств способствовали сдвигу рН в область физиологических значений (с рН=9,2 до рН=7,5). Поэтому метод хито-ПЭГилирования перспективен для создания высокоэффективных лекарственных препаратов L-аспарагиназ.

Для снижения проблем иммуногенности предпринимались, пока безуспешные, попытки заменить бактериальные ферменты на ферменты человека. Аспарагиназы млекопитающих и, в частности, человека, обозначенные как hASNase 1 и

hASNase 3, радикально отличаются по структуре от бактериальных L-аспарагиназ. Так, hASNase 1 (аспарагиназоподобный белок, глиальная аспарагиназа) проявляет активность как L-аспарагиназы, так и  $\beta$ -аспартилпептидазы. Кроме этого, hASNase3 — это N-концевой домен лизофосфолипазы человека, который обладает свойствами, аналогичными бактериальным L-аспарагиназам [59]. Из печени крыс была выделена и охарактеризована фосфолипаза, обладающая 3 ферментативными активностями: фосфолипазы, ацетилгидролазы и L-аспарагиназы. L-аспарагиназной активностью обладал N-концевой домен данного фермента. Результаты кинетического анализа, мутагенеза, структурного моделирования и флуоресцентной маркировки свидетельствуют о его гомологии с EсА типа I. Все полученные аспарагиназы человека имеют очень высокие (порядка 50 мМ) значения  $K_m$  для аспарагина и поэтому не могут использоваться как терапевтические препараты. В отличие от человеческой, L-аспарагиназа морской свинки (gp ASNase 1) имеет низкую  $K_m$  для аспарагина (57,7 мкМ), не обладает глутаминазной активностью, а также на 70% гомологична hASNase 1 человека. В результате гуманизации gp ASNase 1 (замена C-концевого домена gpASNase 1 доменом hASNase 1) были получены 2 клона, с большей в 100 и 140 раз каталитической активностью, чем hASNase 1. Они обладали антипролиферативной активностью и имели  $K_m$  как у gp ASNase 1, что является основанием для создания принципиально нового препарата для клиники лейкозов [60].

### 3. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К L-АСПАРАГИНАЗАМ

Не все лейкозные клетки чувствительны к действию L-аспарагиназы, а резистентность к аспарагиназе является неблагоприятным прогностическим фактором. Первым установленным механизмом такой устойчивости является способность опухолевых клеток экспрессировать аспарагинсинтетазу (ASNS). ASNS катализирует синтез аспарагина и глутамата из аспартата и глутамината в АТР-зависимой амидотрансферазной реакции [61]. В клетках ОЛЛ экспрессия ASNS отсутствует, что является обоснованием для терапии L-аспарагиназой. Однако при некоторых формах рака ASNS чрезмерно экспрессируется, способствуя пролиферации клеток, химиорезистентности и метастазированию. Особенно высокие уровни экспрессии обнаружены в опухолевых клетках рака поджелудочной железы, головного мозга, щитовидной железы и семенников [62]. Точная роль ASNS в модуляции роста опухоли неизвестна, однако экспрессия данного гена повышается при пролиферации солидных опухолей и развитии устойчивости к химиотерапии L-аспарагиназой. Предложен механизм, согласно которому истощение аспарагина повышает активность киназы GCN2, фосфорилирующей  $\alpha$ -субъединицу фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$ , что, в свою очередь, снижает

скорость синтеза белка и, в конечном счёте, способствует выживанию лейкозных клеток [63]. Одновременно с замедлением синтеза белка увеличивается трансляция тотальной мРНК, в том числе фактора транскрипции ATF4, индукция которого способствует пролиферации опухоли при ограничении питательных веществ и индуцирует экспрессию ASNS как ключевой фактор инициации и роста опухоли в условиях ограниченного количества аминокислот. В норме ASNS необходима для нормального развития мозга, а недостаточность экспрессии, вызванная 15 уникальными мутациями в гене, приводит к задержке развития детей, микроцефалии и прогрессирующей атрофии мозга [63]. Liu и соавт. [64] изучали взаимосвязь между уровнем мРНК ASNS и реакцией на L-аспарагин в клеточных линиях NK/T лимфомы. Авторам не удалось сделать однозначного вывода, является ли ASNS онкогеном или антионкогеном. Aslanian и соавт. [65] продемонстрировали устойчивость опухолевых клеток MOLT-4 к действию L-аспарагиназы при сверхэкспрессии ASNS. Также установлено, что повышенная активность ASNS связана с полиморфизмом основного лейцин-активирующего транскрипционного фактора ATF5 [66]. Измерение уровня ASNS в крови может предсказывать устойчивость к терапии L-аспарагиназой, однако уровень ASNS является хоть и важным, но не единственным фактором устойчивости лейкозных клеток к действию терапевтического фермента [67].

Использование полногеномного скрининга при нокауте ASNS позволило обнаружить, что сенсбилизация к L-аспарагиназе опосредуется у млекопитающих WNT — сигнальной системой, регулирующей развитие злокачественных опухолей. WNT-зависимая стабилизация белков зависит от протеасомной дегградации (катаболический источник аспарагина) и гликогенсинтетазы 3. Установлено, что ингибирование этого фермента приводило к повышению чувствительности к L-аспарагиназе у резистентных лейкозных клеток [68]. Поэтому ингибирование ASNS может представлять перспективную стратегию лечения устойчивых к ASP лейкозов, так называемую аспарагин-синтетазную химиотерапию.

Первым кандидатом на роль ингибитора ASNS в культуре лейкозных клеток человека выступал аденилированный сульфоксимин, который ингибировал ASNS в наномолярных концентрациях [69]. Однако его способность проходить через клеточные мембраны ограничивается присутствием аминных и карбоксилатных функциональных групп, распознающих и связывающих аспартат. Исследование кинетических параметров действия ASNS позволяет предположить, что аналоги  $\beta$ -аспартилладенилата, серосодержащие аналоги аспартата, цистеинсульфоновая кислота и N-ацилсульфонамид могут также быть ингибиторами данного фермента [69].

В развитии устойчивости к действию L-аспарагиназы значительную роль играет глутаминсинтетаза, так как L-аспарагиназа также

может гидролизовать L-глутамин до L-глутаминовой кислоты и аммиака. Было обнаружено, что резистентные к L-аспарагиназе клетки вырабатывали больше глутамина за счёт повышения активности глутаминсинтетазы [70]. Действительно, эффективность терапевтического действия L-аспарагиназ зависит от её способности гидролизовать L-глутамин, конкурирующий за активный центр фермента с L-аспарагином. Глутамин способен восстанавливать клетки, лишённые аспарагина, посредством реакции трансамидирования, где глутамин является донором аминогруппы при синтезе аспарагина с участием ASNS. Дефицит L-глутамина ингибирует рост опухоли посредством торможения пути mTOR (в частности, протеинкиназы, которая в составе сигнальных мультимолекулярных комплексов mTOR регулирует клеточный рост и выживание), что приводит к ингибированию синтеза белков. Но, имея глутамин в достаточном количестве, ASNS увеличивает концентрацию аспарагина, который угнетает GSN2 (протеинкиназу, фосфорилирующую гидроксильные остатки серина и треонина) и предотвращает апоптоз [33].

Из вышесказанного следует, что для успешной противолейкемической активности L-аспарагиназы помимо истощения аспарагина необходимо также снижение уровня глутамина. Поэтому L-аспарагиназа EgA, обладающая относительно высоким уровнем глутаминазной активности, стала терапевтическим препаратом, дающим меньше побочных эффектов по сравнению с препаратами EsA [71].

#### 4. ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К АСПАРАГИНАЗАМ

Главным фактором, ограничивающим применение аспарагиназ, являются реакции гиперчувствительности, развивающиеся по различным оценкам у 5-45% пациентов [72, 73]. Для снижения иммуногенности и преодоления лекарственной устойчивости к аспарагиназам предложено несколько подходов, которые применяются для улучшения фармакологических характеристик L-аспарагиназы: поиски новых природных и разработка рекомбинантных аспарагиназ с улучшенными свойствами; иммобилизация фермента на полимерных носителях; включение аспарагиназы внутрь искусственных полимерных везикул или эритроцитов.

Современное развитие генной инженерии позволяет создать рекомбинантные ферменты, которые кодируются генами одних организмов в клетках других, что даёт возможность получить ферменты с нужными свойствами и упростить технологию их производства и очистки. В настоящее время в Protein Data Bank имеются данные о порядка 500 L-аспарагиназ различного происхождения, в том числе и генно-инженерных. Теоретические исследования и практический опыт позволили определить наиболее значимые аминокислоты, участвующие в каталитическом процессе и получить ферменты с улучшенными

свойствами. Получено множество мутантных форм L-аспарагиназ, обладающих улучшенными фармакологическими свойствами, по сравнению с исходными ферментами [74]. Недавний прогресс в разработке программируемых нуклеаз, таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFNs), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALENs), и кластеризованные нуклеазы, ассоциированные с короткими палиндромными повторами (CRISPR)-Cas, связанные с Cas, позволили продвинуть редактирование генов от концепции до клинической практики [75]. Доказано, что эти методы эффективны для минимизации иммуногенности некоторых ферментов, улучшения их специфичности к субстрату и стабильности. Активно развивающиеся подходы к разработке белков *de novo* с помощью нейронных сетей глубокого обучения, таких как trRosetta [76] или AlphaFold 2 [77], становятся привлекательными инструментами для создания белков с заданными свойствами. Эти методы могут быть использованы для создания мощных искусственных L-аспарагиназ, обладающих сниженной иммуногенностью, низкой специфичностью к L-глутамину и повышенной стабильностью в крови.

Важным критерием эффективности L-аспарагиназ является время полужизни фермента, обусловленное активностью сериновых протеаз крови, таких как факторы свертывания крови II, VII, IX, X, XI, XII и фактор Флетчера. Устойчивость фермента к протеазам в экспериментальных условиях тестируется по его резистентности к трипсину, поскольку селективность действия этих протеаз обеспечивается специфическими структурами N-концевых участков молекул и аминокислотная последовательность участков факторов свертывания крови гомологична таковым у трипсина. Устойчивость к трипсину (сохранение 75% активности) проявлял химерный белок, EsA с защитным одноцепочечным антителом [78].

С целью улучшения фармакологических свойств L-аспарагиназ последние 25 лет предпринимаются попытки получения иммобилизованных ферментов. Термин “иммобилизованные ферменты” означает, что фермент локализован в определенной области пространства с сохранением его каталитической активности. Иммобилизованные ферменты могут использоваться непрерывно и многократно. Однако носитель может изменять такие физико-химические и фармакологические свойства фермента, как растворимость, стабильность термическая и при хранении, оптимумы pH и температуры, период полураспада, сродство к субстрату ( $K_m$ ), время полувыведения и цитотоксичность. Носитель также защищает фермент от воздействия протеаз, блокирует участки, вызывающие выработку антител, создает оболочку, которая препятствует доступности молекулы для белков и клеток иммунной системы, но при этом проницаема для субстрата [33]. Для иммобилизации используются следующие подходы: физическая адсорбция под действием водородных, кулоновских и дисперсионных сил;

ковалентное присоединение, характеризующееся установлением необратимой химической связи между функциональными группами фермента и материалом-носителем наночастиц; захват фермента по типу “решетки”, то есть захват фермента нерастворимым в воде полимером (чаще всего полиакриламидом или поливиниловым спиртом); захват фермента по типу “микрокапсул”, то есть фермент окружен полупроницаемой полимерной мембраной [71]. Основными носителями, используемыми для модуляции функций L-аспаргиназы являются биологические и биогенные наночастицы в виде полиэтиленгликоля (ПЭГ), полигликолевой и полимолочной кислоты, липосомы (большие, малые и многослойные), дендримеры (полиамидамин, полилизин), углеродные нанотрубки (фуллерены, графен), металлы (Au, Ag, Pt, Ti, Fe, SiO<sub>2</sub>) [79]. В таблице 2 представлены основные полимерные носители L-аспаргиназы и их свойства.

Результаты многочисленных исследований демонстрируют преимущества ПЭГилированной L-аспарагиназы над нативным ферментом, так как ПЭГилирование блокирует потенциальные иммуногенные эпитопы нативной молекулы фермента, уменьшая тем самым иммунный ответ и реакции гиперчувствительности. ПЭГилирование

обеспечивает задержку выведения фермента и пролонгирует время его циркуляции в организме до 8 дней [78]. Высокая эффективность применения ПЭГилированной ЕсА как препарата первой линии химиотерапии была зарегистрирована в протоколе интенсивной терапии ОЛЛ у детей [80]. Также препарат показал сниженный титр антител к ферменту, больший период полувыведения и ремиссию у пациентов не только с ОЛЛ, но и с лимфоидными опухолями [81].

Для преодоления лекарственной устойчивости применяется инкапсулирование фермента, то есть включение внутрь различных микрокапсул, что позволяет защитить фермент от активных протеаз плазмы и от иммунной системы. Это приводит к тому, что практически не образуются антитела на вводимый чужеродный белок, что позволяет сильно удлинить время жизни препарата внутри этих частиц (и, соответственно, в кровотоке, если сами частицы достаточно долгоживущие). Кроме того, фермент проявляет каталитическую активность, находясь внутри частиц, поэтому в кровотоке отсутствуют высокие концентрации свободного фермента, которые вызывают многие побочные эффекты. В качестве частиц для включения L-аспарагиназы используют различные искусственные полимерные и природные носители (табл. 3).

Таблица 2. Полимерные носители L-аспаргиназы и некоторые свойства сополимеров

| Полимерные носители L-аспарагиназы     | Некоторые свойства сополимеров по сравнению с нативной L-аспарагиназой         |
|--|--|
| ПЭГ, пальмитиновая кислота             | Повышение каталитической активности  |
| Сополимер альбумина                    | Повышение устойчивости к протеолизу, снижение иммуногенности                   |
| Фиброин (белок шелка)                  | Термостабильность при 60°C, стабильность при хранении, снижение иммуногенности |
| Сополимер винилпирролидона и акролеина | Повышение термостабильности  |
| Карбоксиметилцеллюлоза                 | Возрастание продолжительности жизни подопытных животных до 3-х раз             |
| N,O-карбоксиметилхитозан               | Увеличение времени полувыведения в 25 раз, физиологичный pH                    |
| Декстрансульфат и полиглюкин           | Термическая стабильность и стабильность при хранении                           |
| Полимер фруктозы                       | Термическая стабильность и стабильность при хранении                           |
| Коломиновая кислота                    | K <sub>M</sub> как у нативного фермента, стабильность в кровотоке              |

Таблица 3. Наноструктуры, используемые для инкапсуляции L-аспарагиназы

| Носители                                | Состав  | % включения L-аспарагиназы   | Характеристика полученного препарата   |
|---|---|--|--|
| Липосомы                                | Фосфатидилхолин, холестерин, эфир стериламида, моносиалоганглиоза                           | От 36,7 до 72,5 в зависимости от размера липосом   | Увеличение времени выживания в 2 раза, снижение анафилактических реакций, время полувыведения в 5,5 раз больше, чем у нативного фермента |
| Бионаносферы                            | Сополимер лактида и гликозида   | 100,0  | Время циркуляции 20 дней   |
| Наночастицы                             | Полигидроксибутират   | 28,0   | Активность 38% от исходной в течение 4-х часов   |
|   | Полигидроксибутират + гепарин   | -  | Активность 50% от исходной через 6 часов. Без побочных эффектов  |
|   | Карбоксиметил-коньяк-глюкоманнан-хитозан  | 68,0   | Высокая термо- и pH стабильность   |
|   | Хитозан-гиалуроновая кислота-хитозан с солями Fe <sup>2+</sup> и Fe <sup>3+</sup>           | -  | Адресная доставка в магнитном поле, нетоксичность, стабильность фермента 4 мес. при +4°C   |
|   | Функционализированный мальтозой сердечник Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> на наночастицах Au | 77,2   | Сохранение 90% активности при 550°C в течение 3-х часов  |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -хитозан | 60,0  | Адресная доставка в магнитном поле, нетоксичность, стабильность фермента 4 мес. при +4°C |  |

Ведутся работы по инкапсуляции L-аспарагиназа в эритроциты [82]. Преимуществами эритроцитов в качестве микровезикул для доставки фермента являются простота получения аутологичных клеток из крови, идеальная биосовместимость, способность защищать фермент от инактивации и иммунологических реакций организма и, как результат, более продолжительное (до 3-х месяцев) время действия [83]. Способами включения L-аспарагиназа в эритроциты являются: метод обратимого гипосмотического воздействия на эритроциты, когда эритроциты инкубируют в гипотонической среде в присутствии фермента, при этом фермент заходит внутрь клеток, а затем восстанавливают тоничность среды [82], связывание через дисульфидную связь с богатым аргинином низкомолекулярным протамином, обладающим мощной проникающей способностью, что позволяет сохранить морфологическую целостность эритроцита и вдвое увеличить время полувыведения [83], иммобилизация фермента на поверхности эритроцитов, увеличивающая в 10 раз фармакодинамический эффект и в 1000 раз снижающая титр антител [84].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ механизмов лекарственной устойчивости к аспарагиназам и путей их преодоления, позволяет сделать следующие выводы.

1. Требуется обязательный мониторинг за уровнем аспарагина в крови онкобольных для корректировки лечения.
2. Отмечается перекрестная выработка антител ко всем препаратам L-аспарагиназа, источником которой является *E. coli*.
3. ПЭГ-аспарагиназа позволяет уменьшить число инъекций и снизить образование антител при назначении в индукции ремиссии.
4. Кроме поиска новых аспарагиназов, пригодных для лечения онкозаболеваний, разрабатываются методы улучшения уже имеющихся препаратов. Такими методами являются иммобилизация, инкапсулирование и включение фермента в эритроциты.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы) (№ 122022800499-5).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pokrovsky V.S., Chepikova O.E., Davydov D.Z., Zamyatnin A.A. Jr., Lukashov A.N., Lukasheva E.V. (2019) Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, **26**, 446-464. DOI: 10.2174/0929867324666171006132729
2. Beckett A., Gervais D. (2019) What makes a good new therapeutic L-asparaginase? *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 152. DOI: 10.1007/s11274-019-2731-9
3. Dinndorf P.A., Gootenberg J., Cohen M.H., Keegan P., Pazdur R. (2007) FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Oncologist*, **12**, 991-998. DOI: 10.1634/theoncologist.12-8-991
4. Jaccard A., Petit B., Girault S., Suarez F., Gressin R., Zini J.-M., Coiteux V., Larroche C., Devidas A., Thiéblemont C., Gaulard P., Marin B., Gachard N., Bordessoule D., Hermine O. (2009) L-asparaginase-based treatment of 15 western patients with extranodal NK/T-cell lymphoma and leukemia and a review of the literature. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, **20**, 110-116. DOI: 10.1093/annonc/mdn542
5. Völler S., Pichlmeier U., Zens A., Hempel G. (2018) Pharmacokinetics of recombinant asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **81**, 305-314. DOI: 10.1007/s00280-017-3492-5
6. Chien W.-W., Allas S., Rachinel N., Sahakian P., Julien M., Le Beux C., Lacroix C.-E., Abribat T., Salles G. (2014) Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase. *Invest. New Drugs.*, **32**, 795-805. DOI: 10.1007/s10637-014-0102-9
7. Sharma D., Singh K., Singh K., Mishra A. (2018) Insights into the microbial L-asparaginases: from production to practical applications. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **20**, 452-464. DOI: 10.2174/1389203720666181114111035
8. Lubkowski J., Vanegas J., Chan W.-K., Lorenzi P.L., Weinstein J.N., Sukharev S., Fushman D., Remppe S., Anishkin A., Wlodawer A. (2020) Mechanism of catalysis by L-asparaginase. *Biochemistry*, **59**, 1927-1945. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00116
9. Ghasemian A., Al-Marzoqi A.H., Al-Abodi H.R., Alghanimi Y.K., Kadhum S.A., Shokouhi Mostafavi S.K., Fattahi A. (2019) Bacterial L-asparaginases for cancer therapy: current knowledge and future perspectives. *J. Cell. Physiol.*, **234**, 19271-19279. DOI: 10.1002/jcp.28563
10. Batool T., Makky E.A., Jalal M., Yusoff M.M. (2016) A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **178**, 900-923. DOI: 10.1007/s12010-015-1917-3
11. Michalska K., Jaskolski M. (2006) Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. *Acta Biochim. Pol.*, **53**, 627-640.
12. Niu J., Meng F., Zhou Y., Zhang C., Lu Z., Lu F., Chen M. (2021) Non-classical secretion of a type I L-asparaginase in *Bacillus subtilis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **180**, 677-683. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.104
13. Yao M., Yasutake Y., Morita H., Tanaka I. (2005) Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* at 2.16 angstroms resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **61**, 294-301. DOI: 10.1107/S0907444904032950
14. Jiao L., Chi H., Lu Z., Zhang C., Chia S.R., Show P.L., Tao Y., Lu F. (2020) Characterization of a novel type I

- L-asparaginase from *Acinetobacter soli* and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips. *J. Biosci. Bioeng.*, **129**, 672-678. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2020.01.007
15. Sharafi Z., Barati M., Khoshayand M.R., Adrangi S. (2017) Screening for type II L-asparaginases: lessons from the genus *Halomonas*. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR.*, **16**, 1565-1573.
  16. Nowak-Gottl U., Wolff J.E.A., Kuhn N., Boos J., Kehrel B., Lilienweiss V., Schwabe D., Jürgens H. (1994) Enhanced thrombin generation, P-von willebrand factor, P-fibrin D-dimer and P-plasminogen activator inhibitor 1: Predictive for venous thrombosis in asparaginase-treated children. *Fibrinolysis*, **8**, 63-65. DOI: 10.1016/0268-9499(94)90248-8
  17. Leibundgut K., Hirt A., Zwicky C., Wuillemin W.A. (2003) Cerebral sinovenous thrombosis during asparaginase treatment. Case 3. *Hamostaseologie*, **23**, 109-112.
  18. Fonseca M.H.G., Fiúza T.D.S., de Morais S.B., de Souza C.B., Trevizani R. (2021) Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111616. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111616
  19. da Silva Lacerda G.R., Cantalice J.C.L.L., de Souza Lima G.M., de Albuquerque L.E.F., da Silva I.D.G., de Melo M.E.B., Adam M.L., do Nascimento S.C. (2019) Genotoxic activity of L-asparaginase produced by *Streptomyces ansochromogenes* UFPEDA 3420. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 41. DOI: 10.1007/s11274-019-2612-2
  20. Aghaiypour K., Wlodawer A., Lubkowski J. (2001) Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Biochemistry*, **40**, 5655-5664. DOI: 10.1021/bi0029595
  21. Kessel D. (1971) Asparaginyl-transfer RNA. A substrate for L-asparaginase. *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.*, **240**, 554-557. DOI: 10.1016/0005-2787(71)90712-X
  22. Bosmann H.B., Kessel D. (1970) Inhibition of glycoprotein synthesis in L5178Y mouse leukaemic cells by L-asparaginase *in vitro*. *Nature*, **226**, 850-851. DOI: 10.1038/226850a0
  23. Ankel E.G., Zirneski J., Ring B.J., Holcenberg J.S. (1984) Effect of asparaginase on cell membranes of sensitive and resistant mouse lymphoma cells. *In Vitro*, **20**, 376-384. DOI: 10.1007/BF02619582
  24. Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Eldarov M.A., Grishin D.V., Basharov M.M., Gladilina Y.A., Podobed O.V., Sokolov N.N. (2017) *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 282-288. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.078
  25. Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Eldarov M.A., Grishin D.V., Basharov M.M., Gladilina Y.A., Podobed O.V., Sokolov N.N. (2017) Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4+ T lymphocytes. *Cancer Med.*, **6**, 2697-2712. DOI: 10.1002/cam4.1218
  26. Plyasova A.A., Pokrovskaya M.V., Lisitsyna O.M., Pokrovsky V.S., Alexandrova S.S., Hilal A., Sokolov N.N., Zhdanov D.D. (2020) Penetration into cancer cells via clathrin-dependent mechanism allows L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to inhibit telomerase. *Pharmaceuticals*, **13**, 286. DOI: 10.3390/ph13100286
  27. Kidd J.G., Sobin L.H. (1966) The incorporation of L-asparagine-14C by lymphoma 6C3HED cells: its inhibition by guinea pig serum. *Cancer Res.*, **26**, 208-211.
  28. Kidd J.G. (1953) Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea-pig serum: I. Course of transplanted cancer of various kinds in mice and rats given guinea-pig serum, horse serum or rabbit serum. *J. Exp. Med.*, **98**, 565-582. DOI: 10.1084/jem.98.6.565
  29. Broome J.D. (1965) Antilymphoma activity of L-asparaginase *in vivo*: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**, 967-974.
  30. Ponomarenko J., Papangelopoulos N., Zajonc D.M., Peters B., Sette A., Bourne P.E. (2011) IEDB-3D: structural data within the immune epitope database. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D1164-D1170. DOI: 10.1093/nar/gkq888
  31. Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L.R., Paschetto M.V., Digilio R., Valentini G., Scotti C. (2012) Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, **7**, 4-13. DOI: 10.2174/157489212798358001
  32. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Мелик-Нубаров Н.С., Кудряшова Е.В., Гришин Д.В., Арчаков А.И. (2015) Бактериальные рекомбинантные L-аспарагиназы: свойства, строение и антипролиферативная активность. *Биомедицинская химия*, **61**(3), 312-324. [Sokolov N.N., Eldarov M.A., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Melik-Nubarov N.S., Kudryashova E.V., Grishin D.V., Archakov A.I. (2015) Bacterial recombinant L-asparaginases: properties, structure and anti-proliferative activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(3), 312-324.] DOI: 10.18097/PBMC20156103312
  33. Cantor J.R., Panayiotou V., Agnello G., Georgiou G., Stone E.M. (2012) Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. *Methods Enzymol.*, **502**, 291-319. DOI: 10.1016/B978-0-12-416039-2.00015-X
  34. Hermanova I., Zaliova M., Trka J., Starkova J. (2012) Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Exp. Hematol.*, **40**, 657-665. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.04.005
  35. Hawkins D.S., Park J.R., Thomson B.G., Felgenhauer J.L., Holcenberg J.S., Panosyan E.H., Avramis V.I. (2004) Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 5335-5341. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0222
  36. Krishnapura P.R., Belur P.D., Subramanya S. (2016) A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. *Crit. Rev. Microbiol.*, **42**, 720-737. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1022505
  37. Yamaguchi M., Kwong Y.-L., Kim W.S., Maeda Y., Hashimoto C., Suh C., Izutsu K., Ishida F., Isobe Y., Sueoka E., Suzumiya J., Kodama T., Kimura H., Hyo R., Nakamura S., Oshimi K., Suzuki R. (2011) Phase II study of SMILE chemotherapy for newly diagnosed stage IV, relapsed, or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-Cell Tumor Study Group study. *J. Clin. Oncol.*, **29**, 4410-4416. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.6287
  38. Wang L., Wang Z., Chen X., Li Y., Wang K., Xia Y., Xia Z. (2013) First-line combination of gemcitabine, oxaliplatin, and L-asparaginase (GELOX) followed by involved-field radiation therapy for patients with stage IE/IIIE extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Cancer*, **119**, 348-355. DOI: 10.1002/cncr.27752
  39. Jaccard A., Gachard N., Marin B., Rogez S., Audrain M., Suarez F., Tilly H., Morschhauser F., Thieblemont C., Ysebaert L., Devidas A., Petit B., de Leval L., Gaulard P., Feuillard J., Bordessoule D., Hermine O., GELA and

- GOELAMS Intergroup (2011) Efficacy of L-asparaginase with methotrexate and dexamethasone (AspaMetDex regimen) in patients with refractory or relapsing extranodal NK/T-cell lymphoma, a phase 2 study. *Blood*, **117**, 1834-1839. DOI: 10.1182/blood-2010-09-307454
40. Li X., Cui Y., Sun Z., Zhang L., Li L., Wang X., Wu J., Fu X., Ma W., Zhang X., Chang Y., Nan F., Li W., Su L., Wang J., Xue H., Zhang M. (2016) DDGP versus SMILE in newly diagnosed advanced natural killer/T-cell lymphoma: a randomized controlled, multicenter, open-label study in China. *Clin. Cancer Res.*, **22**, 5223-5228. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0153
41. Hijiya N., van der Sluis I.M. (2016) Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **57**, 748-757. DOI: 10.3109/10428194.2015.1101098
42. van den Berg H. (2011) Asparaginase revisited. *Leuk. Lymphoma*, **52**, 168-178. DOI: 10.3109/10428194.2010.537796
43. Avramis V.I., Avramis E.V., Hunter W., Long M.C. (2009) Immunogenicity of native or pegylated *E. coli* and *Erwinia* asparaginases assessed by ELISA and surface plasmon resonance (SPR-biacore) assays of IgG antibodies (Ab) in sera from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Anticancer Res.*, **29**, 299-302.
44. Афанасьева Д.А., Барышникова Д.А., Барышников А.Ю. (2015) Молекулярные механизмы преодоления множественной лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами. *Российский биотерапевтический журнал*, **14**, 3-10. [Baryshnikova M.A., Baryshnikov A.Y., Afanasieva D.A. (2015) Molecular mechanisms of multidrug resistance overcoming by liposomal antitumor drugs. *Russ. J. Biother.*, **14**, 3-10.] DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-1-3-10
45. Rajić V., Debeljak M., Goričar K., Jazbec J. (2015) Polymorphisms in GRIA1 gene are a risk factor for asparaginase hypersensitivity during the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **56**, 3103-3108. DOI: 10.3109/10428194.2015.1020802
46. Cantor J.R., Yoo T.H., Dixit A., Iverson B.L., Forsthuber T.G., Georgiou G. (2011) Therapeutic enzyme deimmunization by combinatorial T-cell epitope removal using neutral drift. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1272-1277. DOI: 10.1073/pnas.1014739108
47. Moola Z.B., Scawen M.D., Atkinson T., Nicholls D.J. (1994) *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem. J.*, **302**, Pt 3 921-927. DOI: 10.1042/bj3020921
48. Offman M.N., Krol M., Patel N., Krishnan S., Liu J., Saha V., Bates P.A. (2011) Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood*, **117**, 1614-1621. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298422
49. Jianhua C., Yujun W., Ruibo J., Min W., Wutong W. (2006) Probing the antigenicity of *E. coli* L-asparaginase by mutational analysis. *Mol. Biotechnol.*, **33**, 57-65. DOI: 10.1385/MB:33:1:57
50. Werner A., Röhm K.-H., Müller H.-J. (2005) Mapping of B-cell epitopes in *E. coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment., *Biol. Chem.* **386**, 535-540. DOI: 10.1515/BC.2005.063
51. Mehta R.K., Verma S., Pati R., Sengupta M., Khatua B., Jena R.K., Sethy S., Kar S.K., Mandal C., Roehm K.H., Sonawane A. (2014) Mutations in subunit interface and B-cell epitopes improve antileukemic activities of *Escherichia coli* asparaginase-II: evaluation of immunogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, **289**, 3555-3570. DOI: 10.1074/jbc.M113.486530
52. Zeidan A., Wang E.S., Weitzler M. (2009) Pegasparaginase: where do we stand? *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 111-119. DOI: 10.1517/14712590802586058
53. Medawar C.V., Mosegui G.B.G., de M. Vianna C.M., da Costa T.M.A. (2019) PEG-asparaginase and native *Escherichia coli* L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a systematic review. *Hematol. Transfus. Cell Ther.*, **42**, 54-61. DOI: 10.1016/j.htct.01.013
54. Pokrovsky V.S., Kazanov M.D., Dyakov I.N., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S. (2016) Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases. *BMC Cancer*, **16**, 89. DOI: 10.1186/s12885-016-2125-4
55. 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) Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. *Mol. Biotechnol.*, **57**, 251-264. DOI: 10.1007/s12033-014-9819-0
56. 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) Рекомбинантная внутриклеточная L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum* с низкой L-глутаминазной активностью и антипролиферативным эффектом. *Биомедицинская химия*, **59**(2), 192-208. [Pokrovskaya M.V., Pokrovskiy V.S., Aleksandrova S.S., Anisimova N.Y., Andrianov R.M., Treschalina E.M., Ponomarev G.V., Sokolov N.N. (2012) Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **59**(2), 192-208.] DOI: 10.18097/pbmc20135902192
57. Покровская М.В., Жданов Д.Д., Эльдаров М.А., Александрова С.С., Веселовский А.В., Покровский В.С., Гришин Д.В., Гладиллина Ю.А., Соколов Н.Н. (2017) Подавление активности теломеразы лейкозных клеток мутантами формами L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum*. *Биомедицинская химия*, **63**(1), 62-74. [Pokrovskaya M.V., Zhdanov D.D., Eldarov M.A., Aleksandrova S.S., Veselovsky A.V., Pokrovskiy V.S., Grishin D.V., Gladilina J.A., Sokolov N.N. (2017) Suppression of telomerase activity in leukemic cells by mutant forms of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(1), 62-74.] DOI: 10.18097/PBMC20176301062
58. Малахова М.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н., Кудряшова Е.В. (2018) Регуляция каталитической активности рекомбинантной L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* путём её конъюгирования с ПЭГ-хитозаном *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, **59**(4), 297-304. [Malakhova M.A., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N., Kudryashova E.V. (2018) Regulation of catalytic activity of recombinant L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by conjugation with a PEG-chitosan copolymer. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 185-191.] DOI: 10.3103/S0027131418040065
59. Karamitros C.S., Konrad M. (2014) Human 60-kDa lysophospholipase contains an N-terminal L-asparaginase domain that is allosterically regulated by L-asparagine. *J. Biol. Chem.*, **289**, 12962-12975. DOI: 10.1074/jbc.M113.545038
60. Rigouin C., Nguyen H.A., Schalk A.M., Lavie A. (2017) Discovery of human-like L-asparaginases with potential

- clinical use by directed evolution. *Sci. Rep.*, **7**, 10224. DOI: 10.1038/s41598-017-10758-4
61. *Haskell C.M., Canellos G.P.* (1969) L-asparaginase resistance in human leukemia – asparagine synthetase. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 2578-2580. DOI: 10.1016/0006-2952(69)90375-x
  62. *Chiu M., Taurino G., Bianchi M.G., Kilberg M.S., Bussolati O.* (2019) Asparagine synthetase in cancer: beyond acute lymphoblastic leukemia. *Front. Oncol.*, **9**, 1480. DOI: 10.3389/fonc.2019.01480
  63. *Lomelino C.L., Andring J.T., McKenna R., Kilberg M.S.* (2017) Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. *J. Biol. Chem.*, **292**, 19952-19958. DOI: 10.1074/jbc.R117.819060
  64. *Liu W.-J., Wang H., Peng X.-W., Wang W., Liu N.-W., Wang Y., Lu Y.* (2018) Asparagine synthetase expression is associated with the sensitivity to asparaginase in extranodal natural killer/T-cell lymphoma *in vivo* and *in vitro*. *Onco. Targets. Ther.*, **11**, 6605-6615. DOI: 10.2147/OTT.S155930
  65. *Aslanian A.M., Fletcher B.S., Kilberg M.S.* (2001) Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem. J.*, **357**, 321-328. DOI: 10.1042/0264-6021:3570321
  66. *Mei L., Ontiveros E.P., Griffiths E.A., Thompson J.E., Wang E.S., Wetzler M.* (2015) Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. *Blood Rev.*, **29**, 243-349. DOI: 10.1016/j.blre.2015.01.001
  67. *Aslanian A.M., Kilberg M.S.* (2001) Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginase-resistant MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem. J.*, **358**, 59-67. DOI: 10.1042/0264-6021:3580059
  68. *Hinze L., Pfirmann M., Karim S., Degar J., McGuckin C., Vinjamur D., Sacher J., Stevenson K.E., Neuberg D.S., Orellana E., Stanulla M., Gregory R.I., Bauer D.E., Wagner F.F., Stegmaier K., Gutierrez A.* (2019) Synthetic lethality of wnt pathway activation and asparaginase in drug-resistant acute leukemias. *Cancer Cell*, **35**, 664-676.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.03.004
  69. *Richards N.G.J., Kilberg M.S.* (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 629-654. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142520
  70. *Chan W.-K., Horvath T.D., Tan L., Link T., Harutyunyan K.G., Pontikos M.A., Anishkin A., Du D., Martin L.A., Yin E., Rempe S.B., Sukharev S., Konopleva M., Weinstein J.N., Lorenzi P.L.* (2019) Glutaminase activity of L-asparaginase contributes to durable preclinical activity against acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cancer Ther.*, **18**, 1587-1592. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1329
  71. *Nunes J.C.F., Cristóvão R.O., Freire M.G., Santos-Ebinuma V.C., Faria J.L., Silva C.G., Tavares A.P.M.* (2020) Recent strategies and applications for L-asparaginase confinement. *Molecules*, **25**, 5827. DOI: 10.3390/molecules25245827
  72. *Ohnuma T., Holland J.F., Freeman A., Sinks L.F.* (1970) Biochemical and pharmacological studies with asparaginase *in man*. *Cancer Res.*, **30**, 2297-22305.
  73. *Akbayram S., Doğan M., Akgün C., Caksen H., Oner A.F.* (2010) A desensitization protocol in children with L-asparaginase hypersensitivity. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, **32**, e187-e191. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e003c7
  74. *Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N., Zhdanov D.D.* (2022) Molecular analysis of L-asparaginases for clarification of the mechanism of action and optimization of pharmacological functions. *Pharmaceutics*, **14**, 599. DOI: 10.3390/pharmaceutics14030599
  75. *Li H., Yang Y., Hong W., Huang M., Wu M., Zhao X.* (2020) Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5**, 1. DOI: 10.1038/s41392-019-0089-y
  76. *Anishchenko I., Pellock S.J., Chidyausiku T.M., Ramelot T.A., Ovchinnikov S., Hao J., Bafna K., Norn C., Kang A., Bera A.K., di Maio F., Carter L., Chow C.M., Montelione G.T., Baker D.* (2021) *De novo* protein design by deep network hallucination. *Nature*, **600**, 547-552. DOI: 10.1038/s41586-021-04184-w
  77. *Evans R., Neill M.O., Pritzel A., Antropova N., Senior A., Green T., Židek A., Bates R., Blackwell S., Yim J., Ronneberger O., Bodenstein S., Zielinski M., Bridgland A., Potapenko A., Cowie A., Tunyasuvunakool K., Jain R., Clancy E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D.* (2021) Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *BioRxiv*, 10.04.463034. DOI: 10.1101/2021.10.04.463034
  78. *Fu C.H., Sakamoto K.M.* (2007) PEG-asparaginase. *Expert Opin. Pharmacother.*, **8**, 1977-1984. DOI: 10.1517/14656566.8.12.1977
  79. *Postnov V.N., Naumysheva E.B., Korolev D.V., Galagudza M.M.* (2013) Nanoscale carriers for drug delivery. *Biotekhnosfera*, **30**, 16-29.
  80. *Rizzari C., Citterio M., Zucchetti M., Conter V., Chiesa R., Colombini A., Malguzzi S., Silvestri D., d'Incalci M.* (2006) A pharmacological study on pegylated asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, **91**, 24-31.
  81. *Graham M.L.* (2003) Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1293-1302. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00110-8
  82. *Alpar H.O., Lewis D.A.* (1985) Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 257-261. DOI: 10.1016/0006-2952(85)90133-9
  83. *He H., Ye J., Wang Y., Liu Q., Chung H.S., Kwon Y.M., Shin M.C., Lee K., Yang V.C.* (2014) Cell-penetrating peptides mediated encapsulation of protein therapeutics into intact red blood cells and its application. *J. Control. Release.*, **176**, 123-132. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.12.019
  84. *Lorentz K.M., Kontos S., Diaceri G., Henry H., Hubbell J.A.* (2015) Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to *E. coli* asparaginase. *Sci. Adv.*, **1**, e1500112. DOI: 10.1126/sciadv.1500112

Поступила в редакцию: 11. 03. 2022.  
 После доработки: 21. 03. 2022.  
 Принята к печати: 25. 03. 2022.

MECHANISMS OF DEVELOPMENT OF SIDE EFFECTS AND DRUG RESISTANCE  
TO ASPARAGINASE AND WAYS TO OVERCOME THEM

*S.S. Alexandrova, Y.A. Gladilina, M.V. Pokrovskaya, N.N. Sokolov, D.D. Zhdanov\**

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Asparaginase is one of the most important chemotherapeutic agents against acute lymphoblastic leukemia, the most common form of blood cancer. To date, both asparaginases from *E. coli* and *Dickeya dadantii* (formerly known as *Erwinia chrysanthemi*), used in hematology, induce chemoresistance in cancer cells and side effects in the form of hypersensitivity of immune reactions. Leukemic cells may be resistant to asparaginase due to the increased activity of asparagine synthetase and other mechanisms associated with resistance to asparaginase. Therefore, the search for new sources of L-asparaginases with improved pharmacological properties remains a promising and prospective study. This article discusses the mechanisms of development of resistance and drug resistance to L-asparaginase, as well as possible ways to overcome them.

**Key words:** antitumor enzymes; L-asparaginase; drug resistance; immunogenicity

**Funding.** The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period (2021-2030) (no. 122022800499-5).

Received: 11.03.2022; revised: 21.03.2022; accepted: 25.03.2022.