

# L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств

Д.В. Борсакова<sup>1,2</sup>, Е.И. Синауридзе<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

## Контактная информация:

Борсакова Дарья Валерьевна,  
мл. научный сотрудник лаборатории  
биофизики НМИЦ детской гематоло-  
гии, онкологии и иммунологии  
им. Дмитрия Рогачева  
Минздрава России.  
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7,  
ул. Саморы Машела, 1  
E-mail: d.borsakova@gmail.com

Обзор посвящен противоопухолевому препарату L-аспарагиназе, его свойствам, механизму действия, а также новым лекарственным формам, обладающим улучшенными показателями эффективности, безопасности и фармакокинетики. Особое внимание уделено L-аспарагиназе, включенной в эритроциты.

**Ключевые слова:** иммобилизация фермента на полимерных носителях, L-аспарагиназа, L-аспарагиназа, включенная в эритроциты, методы инкапсуляции, противоопухолевый препарат, эритроцит, эритроцит-биореактор

Борсакова Д.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018; 17 (4): 82–99.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-82-99

© 2018 by NMRC PHOI

## L-asparaginase: new approaches to improve pharmacological characteristics

D.V. Borsakova<sup>1,2</sup>, E.I. Sinauridze<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup> Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

## Correspondence:

Darya V. Borsakova, researcher of  
the Laboratory of Biophysics Dmitriy  
Rogachev National Medical Research  
Center of Pediatric Hematology,  
Oncology, Immunology Ministry of  
Healthcare of Russian Federation.  
Address: Russia 117997, Moscow,  
Samory Mashela st., 1  
E-mail: d.borsakova@gmail.com

The review focuses on the antitumor L-asparaginase preparation, its properties and mechanism of action, as well as its new drug forms, which possess improved characteristics of efficiency, safety and pharmacokinetics. Particular attention is paid to L-asparaginase included in erythrocytes.

**Key words:** antitumor preparation, enzyme immobilization on a polymeric carrier, L-asparaginase, L-asparaginase included in erythrocytes, method of encapsulation, erythrocyte, erythrocyte-bioreactor

Borsakova D.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology, 2018; 17 (4): 82–99.  
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-82-99

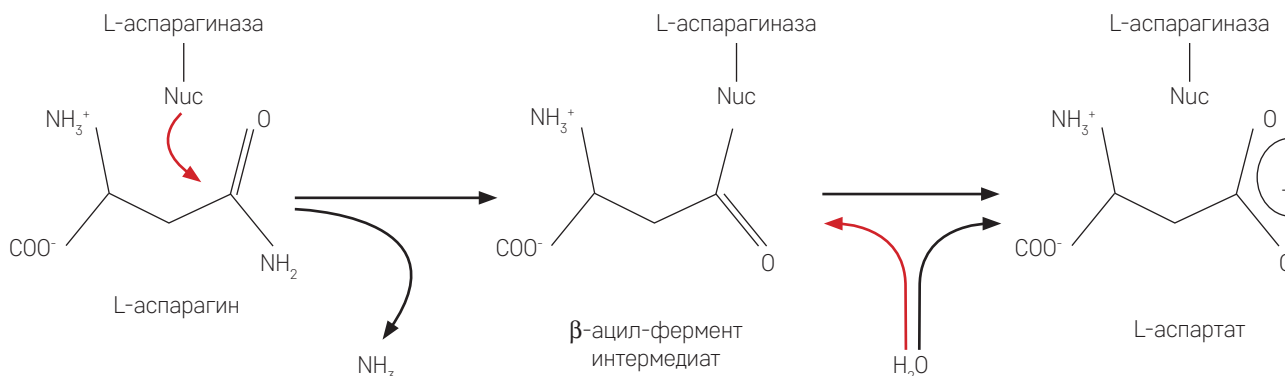
**А**спарагиназа (L-аспарагин-амидогидролаза, ЕС 3.5.1.1) – фермент класса гидролаз, который катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и иона аммония (рисунки 1). При внутривенном введении L-аспарагиназы в организм человека происходит снижение концентрации аспарагина в крови и тканевой жидкости. Соответствующие ферменты из *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Erwinia chrysanthemi* (*E. chrysanthemi*) имеют подтвержденную противоопухолевую активность и являются неотъемлемой частью комбинированной противоопухолевой терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей и взрослых [1]. Это связано с тем, что клетки некоторых опухолей, в отличие от нормальных тканей, являются аутоктофами аспарагина, то есть не имеют возможности синтезировать свой аспарагин (активность аспарагинсинтетазы в них снижена или отсутствует). Такие опухолевые клетки не могут самостоятельно восполнить сниженный уровень внутриклеточного L-аспарагина, в то время как в нормальных клетках этот уровень своевременно восполняется. При уменьшении концентрации аспарагина лейкозные клетки ис-

пытывают дефицит этой аминокислоты, происходит ингибирование синтеза белка и нуклеиновых кислот, что в конечном счете приводит к апоптозу опухолевой клетки. Таким образом, при воздействии L-аспарагиназы достигается избирательная регрессия опухолевой ткани [2].

Несмотря на выраженный терапевтический эффект, использование L-аспарагиназы ограничено тем, что ее введение вызывает ряд серьезных побочных реакций, таких как нарушения свертывания крови, гастроэнтеральные патологии, нарушения в работе печени, центральной нервной системы, острые панкреатиты, но самое важное – острые реакции гиперчувствительности на введение чужеродного белка. Эти эффекты часто вынуждают врача отказываться от препарата или заменять его на менее токсичный и иммуногенный. Наличие ограничений в применении L-аспарагиназы заставляют научное сообщество искать новые пути снижения токсичности, иммуногенности и увеличения терапевтического эффекта данного препарата. В настоящем обзоре представлены известные на данный момент подходы к улучшению фармакологических свойств L-аспарагиназы.

**Рисунок 1**

Механизм реакции гидролиза аспарагина, катализируемого L-аспарагиназой; промежуточный продукт формируется посредством нуклеофильной атаки треониновой группы фермента на субстрат (красные стрелки указывают направление нуклеофильной атаки) [3]



### Открытие противоопухолевой активности L-аспарагиназы.

В 1953 году ученые из Корнельского университета (США) обнаружили, что сыворотка морской свинки ингибирует мышинные опухолевые клетки 6С3НЕD и крысиные лимфомы [4]. Постепенно и другие лаборатории подтвердили противоопухолевый эффект сыворотки; было обнаружено, что за это отвечает фермент L-аспарагиназа. Примерно в это же время было обнаружено, что некоторые опухоли являются ауксотрофами аспарагина, то есть нуждаются в поступлении его извне для роста и размножения клеток [5].

С начала 1960-х годов L-аспарагиназа была выделена из многих источников – из микробов, дрожжей, грибов, растений и некоторых животных; L-аспарагиназы из большинства этих источников обладают противоопухолевой активностью [1, 6], но наиболее изучена L-аспарагиназа 2-го типа из *E. coli*. Благодаря доступности и легкости производства она первой достигла стадии клинических исследований. В 1967 году впервые была установлена эффективность L-аспарагиназы из *E. coli* в терапии острого лимфобластного лейкоза у детей [7, 8].

**Свойства L-аспарагиназы.** Существует два типа бактериальных аспарагиназ. Аспарагиназы 1-го типа (цитоплазматические) конститутивны, то есть синтезируются в клетке постоянно, при этом экспрессия кодирующих их генов не зависит от наличия субстрата (аспарагина). Эти аспарагиназы обладают высокими  $K_m$  к аспарагину (3,5 мМ) и активны также по отношению к глутамину [9].

Аспарагиназы 2-го типа (периплазматические) локализованы в периплазматическом пространстве бактерий, то есть в пространстве между их внешней и плазматической мембранами. Они индуцируются в условиях анаэробии, и их экспрессия жестко регулируется с помощью циклического АМФ [10]. Эти аспарагиназы имеют низкий  $K_m$  к аспарагину и слабо активны по отношению к глутамину [11].

Для лечения ОЛЛ используют только L-аспарагиназу 2-го типа, поскольку L-аспарагиназа 1-го типа не обладает терапевтической активностью [12]. Такая разница в активности обусловлена различным сродством к аспарагину:  $K_m$  L-аспарагиназы 2-го типа для аспарагина и глутамината составляют  $1,15 \times 10^{-2}$  и 6,25 мМ соответственно. Из-за схожести структуры субстратов L-аспарагиназа 2-го типа имеет также небольшую активность по отношению к глутамину и D-аспарагину – около 4 и 5% соответственно по сравнению с ее активностью по отношению к L-аспарагину [6, 13].

Бактериальные ферменты 2-го типа, включая L-аспарагиназы из *E. coli* и *E. chrysanthemi*, являются гомотетрамерами с молекулярной массой около 140 килодальтон (кДа). Гомотетрамер состоит из мономеров с молекулярной массой 36 кДа (около 330 аминокислотных остатков) [14] (рисунок 1).

Каждые два мономера аспарагиназы (А и С; В и D) плотно соединены между собой в два димера (рисунок 2 А), которые объединяются между собой, образуя тетрамер в форме «пончика» с отверстием посередине [14, 15] (рисунок 2 Б). Каждый мономер имеет 40 β-слоев и 8 α-спиралей, уложенных в N-терминальный домен и меньший по размеру C-терминальный домен [16]. Между N- и C-терминальными доменами примыкающих мономеров сформированы 4 активных каталитических центра.

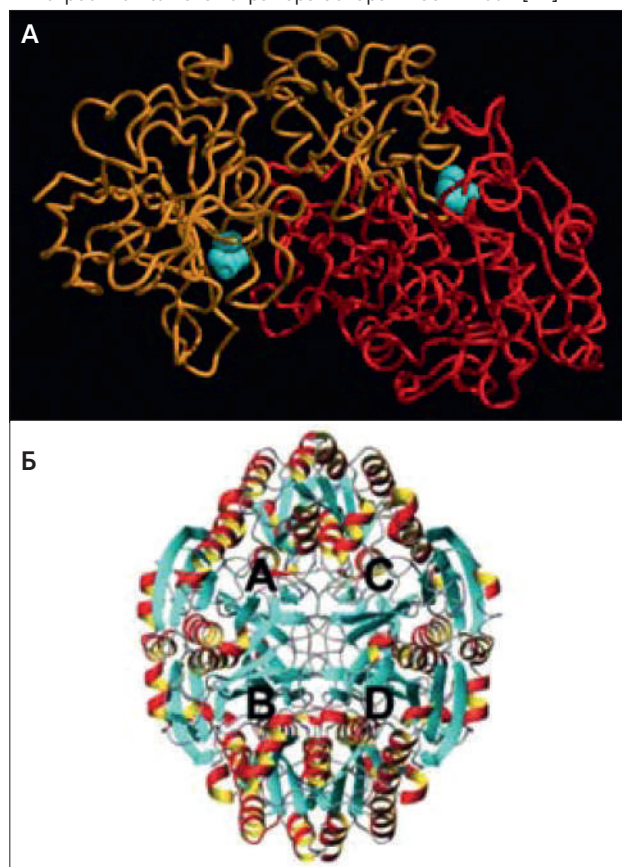
Фермент может существовать в двух основных конформациях – закрытой и открытой. При связывании субстрата с активным центром инициируется переход из открытого состояния в закрытое. После присоединения аспарагина реакция идет в две стадии (рисунок 2):

1. Нуклеофильный треонин, расположенный в непосредственной близости от активного центра фермента, взаимодействует с карбонильной группой амидного субстрата (аспарагина) с образованием промежуточного продукта реакции – ацилфермента. При этом от субстрата отщепляется молекула аммиака.

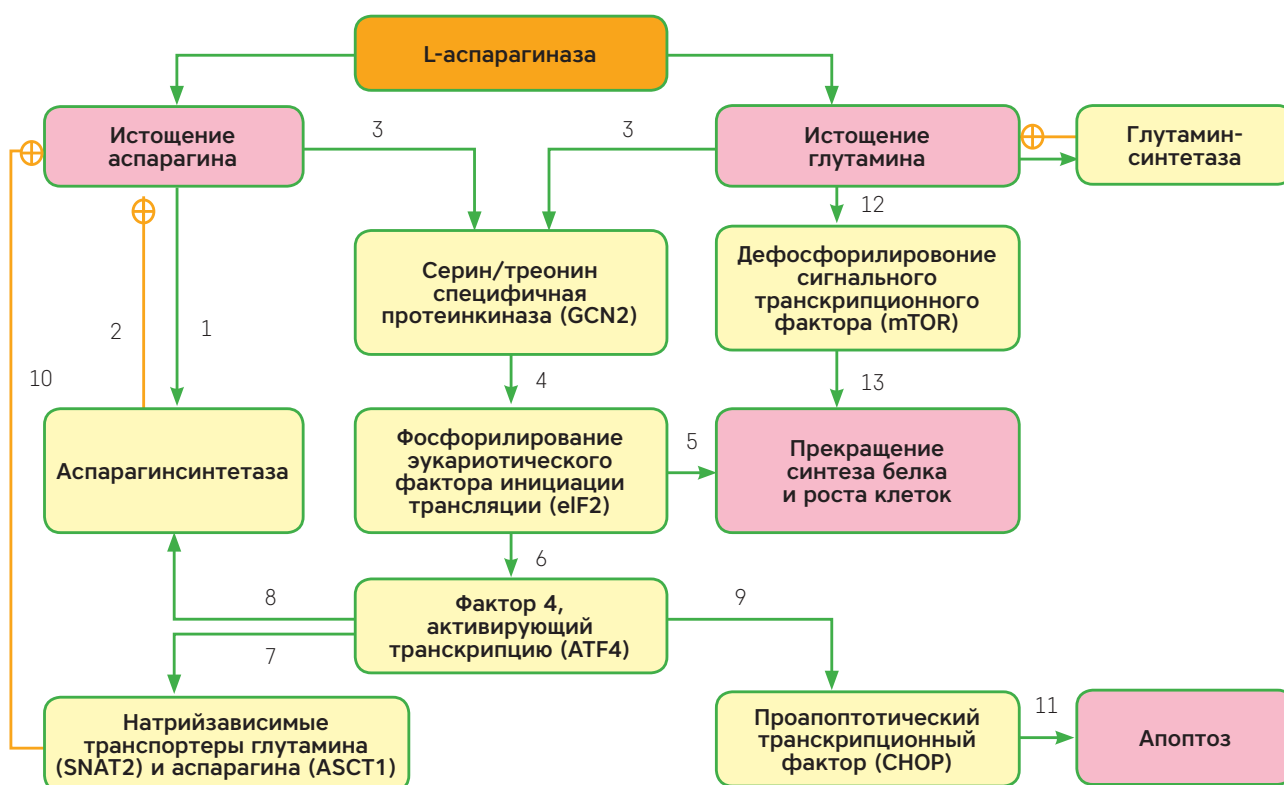
**Рисунок 2**

Структура L-аспарагиназы 2-го типа: **А** – строение димера L-аспарагиназы из *E. coli* с молекулами аспарагина, присоединенными к активным сайтам [3];

**Б** – строение полного тетрамера аспарагиназы *E. coli* [14]

**Рисунок 3**

Метаболические пути, которые запускает в клетке L-аспарагиназа [23, адаптировано]



2. Ацил-фермент реагирует с молекулой воды с освобождением L-аспарагиназы и образованием аспартата [17].

Доказано, что димер L-аспарагиназы, имеющий два активных центра, не способен расщеплять L-аспарагин. Такой активностью обладает только тетрамер фермента [18].

L-аспарагиназа может работать при pH, равном 5–10, однако оптимальная каталитическая активность фермента по отношению к аспарагину проявляется при pH = 8,0 [19]. Оптимум глутаминазной активности фермента лежит между значениями pH, равными 5,5 и 7,5 [20].

**Механизмы противоопухолевых эффектов аспарагиназы.** Прямая задача аспарагиназы при терапии лейкозов – уменьшать концентрацию аспарагина в крови, вызывая селективное ингибирование роста чувствительных к такому снижению опухолевых клеток. Уровень аспарагина зависит от концентрации циркулирующей в крови аспарагиназы [21]. Аспарагин и глутамин – основные транспортеры азота в клетках млекопитающих, поэтому при терапии L-аспарагиназой, так же как и в других случаях возникновения дефицита аспарагина и/или глутамина, в клетке запускается ряд метаболических путей, которые приводят к ее апоптозу из-за остановки клеточного цикла в постмитотической G1-фазе уже через 8 ч после введения аспарагиназы [22, 23] (рисунки 3).

Роль глутамина в супрессии опухолей широко изучается. Его концентрация в различных клетках и

тканях организма выше концентраций других аминокислот. Так, в плазме человека и эритроцитах она составляет 0,6–0,9 мМ [24, 25], в то время как концентрация аспарагина в плазме в 10–15 раз ниже – около 65 мкМ [26]. Поскольку глутамин – наиболее важный транспортер азота в животных тканях, его дефицит может вызывать нарушения в работе различных органов и систем организма. Существует мнение, что гидролиз глутамина вносит вклад в токсические эффекты аспарагиназы [27]. Важно и то, что глутамин является донором аминогруппы при синтезе аспарагина в аспарагинсинтетазной реакции, поэтому его гидролиз приводит к эффективному и постоянному распаду аспарагина и может вносить значительный вклад в антинеопластическую активность L-аспарагиназы [23].

При терапии аспарагиназой, так же как и в других случаях возникновения дефицита аспарагина и/или глутамина, в клетке запускается ряд метаболических путей, которые в зависимости от условий приводят либо к выживанию клетки, либо к ее саморазрушению (апоптозу). Упрощенная схема метаболических сдвигов, которые запускаются в клетке при терапии аспарагиназой, представлена на *рисунке 3*. Истощение аспарагина индуцирует ген аспарагинсинтетазы и пролонгирует время жизни соответствующей мРНК (1), это приводит к увеличению синтеза аспарагинсинтетазы и уменьшению дефицита аспарагина (2), что может вызвать резистентность к L-аспарагиназе. При истощении аспарагина (и/или глутамина) клетки активируют GCN2 киназу (3), которая фосфорилирует  $\alpha$ -субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции 2 (eIF2 $\alpha$  → p-eIF2) (4). Это фосфорилирование представляет собой фундаментальный метаболический переключатель, который снижает скорость общего синтеза белка и приводит к экономии энергии, необходимой для клеточного выживания. При этом фосфорилирование eIF2 $\alpha$  зависит от распада глутамина сильнее, чем от распада аспарагина. Общий синтез белка снижается (5), однако в то же время происходит предпочтительная трансляция субпопуляций мРНК, которые кодируют в зависимости от условий либо защищающие клетку белки, либо белки, вовлеченные в апоптоз. Один из таких управляющих белков – активирующий транскрипцию фактор 4 (ATF4): его активация (6) может привести как к экспрессии генов, приводящих к синтезу белков, способствующих выживанию клетки (7, 8), так и к экспрессии проапоптотических факторов (9). Белки первой группы будут способствовать выживанию клетки и снижать дефицит аспарагина (2, 10); белки второй группы в конце концов приведут к клеточной гибели – апоптозу (11). Другой важный переключатель метаболизма, на который влияет L-аспарагиназа, – сигнальный путь mTOR (12), кото-

рый контролирует рост и деление клеток и связывает условия окружающей среды со скоростью синтеза белка (13). Активность этого пути зависит от многих параметров: концентрации ростовых факторов, энергетического статуса клетки, диетарной доступности аминокислот и наличия стресса различной природы.

Согласно этой схеме глутамин играет важную роль в ингибировании роста опухолей, так как, в отличие от аспарагина, дефицит глутамина – это сигнал для дополнительного mTOR-пути [28], приводящего к ингибированию синтеза белков. Было замечено, что этот сигнальный путь активен при лечении L-аспарагиназами, имеющими глутаминзную активность (например, из *E. coli*), но отсутствует при терапии L-аспарагиназой из *Wolinella succinogenes*, которая практически не имеет такой активности. Это наблюдение позволяет полагать, что ингибирование mTOR-пути – специфический эффект индуцированного аспарагиназой истощения глутамина [29]. Имея глутамин в достаточном количестве, активированная аспарагинсинтетаза может увеличивать концентрацию аспарагина, который угнетает GCN2 и предотвращает апоптоз клеток. Важность участия глутамина в метаболизме опухоли привлекла внимание к терапевтическому потенциалу глутаминаз [23].

**Клиническое применение.** L-аспарагиназа была предложена для терапии различных видов опухолей. Наиболее эффективной она показала себя при терапии ОЛЛ у взрослых, но особенно – у детей. Результаты многочисленных клинических исследований показали хорошую выживаемость пациентов [30–35]. При лечении ОЛЛ у детей с применением L-аспарагиназы ремиссия достигается в 40–60% случаев. Этот процент увеличивается примерно до 90–95% при использовании L-аспарагиназы в комбинации с винкристином и преднизолоном [36]. Таким образом, L-аспарагиназа стала неотъемлемым препаратом в комбинированных протоколах лечения ОЛЛ [8].

Другие опухоли, такие как неходжкинская лимфома, острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), хронические лейкозы, в исследованиях отвечали на препарат неоднозначно. Большинство лимфоидных опухолей было восприимчиво к препарату, в то время как большинство солидных опухолей оставалось к нему резистентными [37, 38]. Например, в исследованиях аспарагиназы при лечении первичного ОМЛ ответ на терапию был всего у 12% пациентов [37, 39]. Некоторые исследования показали чувствительность к терапии L-аспарагиназой таких опухолей, как NK/T-клеточная лимфома (выживаемость составила 61%) [40, 41] и T-клеточный лейкоз [42]. Слабый ответ на терапию аспарагиназой стали напрямую связывать с экспрессией аспарагинсинтетазы в опухолевых клетках [43, 44]. Исходя из этого, можно

было ожидать, что наиболее эффективной L-аспарагиназа может быть при терапии солидных опухолей с низкой аспарагинсинтетазной активностью. Такими опухолями, чувствительными к аспарагиназе, оказались клеточные линии рака яичников [45], саркомы мягких тканей [46] и карциномы желудка [47].

Чтобы достичь оптимального терапевтического эффекта, концентрация аспарагина в крови должна быть менее 0,1 ммоль/л крови – это возможно при активности аспарагиназы не менее 100 МЕ/л крови [48]. В современных протоколах дозы L-аспарагиназы как у взрослых, так и у детей составляют 5000–10 000 МЕ/м<sup>2</sup> площади поверхности тела (ППТ) при введении 1 раз в неделю. Расчет площади поверхности тела проводят по формуле:

$$\text{ППТ (м}^2\text{)} = [\text{масса тела (кг)} \times \text{рост (см)}]^{1/2} / 3600$$

Сразу после введения таких доз можно ожидать, что активность L-аспарагиназы в крови будет не менее 1500 МЕ/л крови. Как следствие, независимо от клинического ответа на препарат, L-аспарагиназа в таких дозах может вызывать множество побочных эффектов. Возможны нарушения со стороны системы свертывания крови (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), геморрагии), гастроэнтеральной системы (потеря аппетита, тошнота, рвота), центральной нервной системы (депрессии, галлюцинации, дезориентации, конвульсии, кома), а также среднее повышение температуры тела, изменения в эндокринной и экзокринной частях поджелудочной железы (с острым панкреатитом), ослабление функции печени и др. [49]. Препарат вызывает появление антител, связанную с этим гиперчувствительность разной степени выраженности (от умеренной аллергии до анафилактического шока) и развитие резистентности к лекарству, так как эти антитела приводят к ускоренному клиренсу аспарагиназы ретикулоэндотелиальной системой и снижению ее концентрации в плазме [50].

Основной причиной токсичности аспарагиназы принято считать снижение уровня внеклеточного аспарагина [50] и глутамин (вследствие частичной глутаминазной активности фермента) [51], что в совокупности приводит к подавлению синтеза белка (рисунки 3). Непрерывный гидролиз глутамин ведет к значительному повышению уровня глутамата в крови, что может вызвать развитие эксайтотоксичности (нарушения в передаче возбуждающего нервного импульса), так как повышенная концентрация глутамата приводит к перевозбуждению, последующему истощению и гибели нейронов [52].

D. Kafkewitz и A. Bendich суммировали в своем обзоре результаты экспериментальных работ, которые показывают, что дефицит глутамин в организ-

ме заметно подавляет функцию иммунной системы, в то время как дефицит аспарагина такого действия не оказывает [53]. По мнению некоторых исследователей, одной из причин токсичности L-аспарагиназы может быть ее способность гидролизовать аспарагин в составе β-аспартилпептидов, которые, возможно, играют роль в метаболизме млекопитающих, пока до конца не изученную [54].

Главный фактор, ограничивающий применение L-аспарагиназы, – реакции гиперчувствительности, которые, по данным разных исследований, развиваются в ответ на внутривенное введение бактериального фермента у 5–45% пациентов [55, 56].

Для снижения иммуногенности и повышения общей терапевтической эффективности препарата предложено множество способов.

**Способы повышения терапевтической безопасности и эффективности L-аспарагиназы.** Существуют три принципиально различные группы методов, которые применяли для улучшения фармакологических характеристик препарата L-аспарагиназы. Это поиск новых природных и создание рекомбинантных аспарагиназ с модифицированными свойствами, иммобилизация фермента на полимерных носителях и включение фермента внутрь искусственных полимерных везикул или эритроцитов. Рассмотрим каждую группу методов подробнее.

L-аспарагиназы из разных источников и разработка рекомбинантных L-аспарагиназ. Поиск новых аспарагиназ из источников, отличных от *E. coli*, был первым и самым доступным направлением в биологии 30 лет назад. Как сказано выше, за прошедшие несколько десятков лет выделено и описано большое количество L-аспарагиназ из различных источников [1, 6]. Часть из них не обладала противоопухолевой активностью или была недостаточно эффективной в отношении опухолевых клеток. В лидеры вышли бактериальные L-аспарагиназы из *E. coli*, *E. chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* (аспарагиназы из *E. carotovora* и *E. chrysanthemi* на 77% идентичны по аминокислотному составу и, как следствие, близки по свойствам [23]). В настоящий момент в клинике, помимо L-аспарагиназы из *E. coli*, широко применяется также L-аспарагиназа из *Erwinia chrysanthemi*, коммерческое название – Эрвиназа (*Erwinase*®).

Противоопухолевые свойства Эрвиназы были обнаружены примерно в то же время, что и аналогичные свойства аспарагиназы из *E. coli* [6]. Впоследствии клинические исследования показали преимущество Эрвиназы перед препаратом из *E. coli*. При одинаковых дозах этих препаратов Эрвиназа реже вызывала реакцию гиперчувствительности и другие побочные эффекты [49],



поэтому ее начали применять для лечения пациентов, у которых развивалась гиперчувствительность на введение обычной и пэгилированной аспарагиназы из *E. coli*. Поскольку Эрвиназа имеет более короткий период полувыведения ( $0,60 \pm 0,13$  дня [32]), ее необходимо вводить чаще.

Наиболее успешными были поиски новых противоопухолевых аспарагиназ среди ферментов из бактерий, однако предпринимались также попытки заменить бактериальные ферменты на ферменты человека; предполагалось, что такая замена может снизить выработку антител на препарат [23], но экспериментально это не доказано. Ряд примеров новых исследованных ферментов с аспарагиназной активностью приведен в таблице 1.

Достижения современной генной инженерии позволяют создавать рекомбинантные ферменты, кодируемые генами одних организмов в клетках других. Такой подход позволяет получать ферменты с новыми свойствами, помогает упростить технологию производства и очистки фермента, что является важным этапом на пути к их клиническому применению.

Снизить иммуногенность и улучшить фармакологические свойства аспарагиназы может помочь структурная модификация молекулы на аминокислотном уровне в результате направленного мутагенеза. Таким способом была модифицирована L-аспарагиназа из *E. coli*. В результате получился фермент,

более резистентный по отношению к расщеплению человеческой аспарагинилэндопептидазой, которая с легкостью может удалять нативный фермент [57].

Наряду с прямыми попытками создать рекомбинантные L-аспарагиназы с заданными свойствами, например, с увеличенным сроком жизни фермента в организме за счет увеличения его устойчивости к протеазе трипсину [58], делались попытки комбинировать действие L-аспарагиназы с введением ингибиторов, способных снижать синтез аспарагинсинтетазы (например, ингибиторов мРНК аспарагинсинтетазы), что приводит к повышению эффективности удаления аспарагина из крови [59]. Существуют также подходы для теоретического анализа иммуногенности аспарагиназ из разных источников, в частности, растительных [60, 61]. Такой анализ использует данные биоинформатики о количестве и типе иммуногенных эпитопов в молекулах различных аспарагиназ и делает вывод о возможной иммуногенности новых молекул на основании схожести типа и количества этих эпитопов у новых ферментов и ферментов с известной иммуногенностью.

Интересные результаты были получены авторами в работе [62]: они определили, какой из эпитопов L-аспарагиназы из *E. coli* клинически ответствен за запуск иммунных реакций во время лечения ОЛЛ.

Одна из новейших разработок – создание системы направленной доставки L-аспарагиназы к солид-

Таблица 1

**Примеры некоторых новых ферментов с аспарагиназной активностью**

№ п/п	Фермент	Некоторые характеристики	Ссылки
1	Аспарагиназа из патогенной линии <i>Helicobacter pylori</i> CCUG 17874	Аспарагиназа 2-го типа; обладает кооперативностью по отношению к глутамину. Сродство этой аспарагиназы к глутамину ниже, чем у аспарагиназ из <i>E. coli</i> . <i>E. carotovora</i> и <i>E. chrysanthemy</i> ; имеет более высокую противоопухолевую активность по отношению к некоторым линиям опухолевых клеток, особенно к клеткам эпителия желудка AGS ( $IC_{50} = 1,3 \mu M$ ) и MKN28 ( $IC_{50} = 7,6 \mu M$ ), по сравнению с ферментом из <i>E. coli</i> ( $IC_{50} = 95,6 \mu M$ для AGS; для MKN28 чувствительность вообще отсутствует)	[47]
2	Аспарагиназа из непатогенной линии <i>V. succinogenes</i>	По свойствам похожа на аспарагиназу из <i>E. carotovora</i> , но имеет очень низкую активность по отношению к глутамину (0,015% аналогичной активности по отношению к аспарагину, что в 130 и 600 раз ниже, чем глутаминовая активность аспарагиназ из <i>E. coli</i> и <i>E. carotovora</i> соответственно). Не ингибируется аммонием, имеет низкую перекрестную чувствительность с другими бактериальными аспарагиназами, что позволяет использовать ее у пациентов с высокой гиперчувствительностью к другим препаратам аспарагиназы	[63]
3	Глутаминаза-аспарагиназа из <i>Pseudomonas</i> 7A	Предполагается, что ее противоопухолевая активность связана с одновременным расщеплением аспарагина и глутамин. Имеет низкие и примерно одинаковые $K_m$ по отношению к этим субстратам (4,6 и 4,4 $\mu M$ для аспарагина и глутамин соответственно). Имеет хорошую стабильность и активность при физиологических условиях. Время полувыведения из плазмы мышей после однократной инъекции в дозе 1000 ME/kg составляет 13 ч	[64] [65] [66]
4	Рекомбинантная гликозиласпарагиназа человека (ГА)	Фермент имеет аспарагиназную активность, близкую к активности L-аспарагиназы, но не имеет глутаминазной активности. Ее $K_m$ для аспарагина составляет 538 $\mu M$ (у аспарагиназ из <i>Erwinia</i> и <i>E. coli</i> – 90 и 130 $\mu M$ соответственно). Снижает аспарагин <i>in vitro</i> с 2,3 до 0,2 мМ за 18,4 ч (при концентрации 10 ME/л); аспарагиназы из <i>Erwinia</i> (10 ME/л) и <i>E. coli</i> (40 ME/л) делают это за 4 ч. Величины $IC_{50}$ против В- и Т-клеточных линий ОЛЛ были равны 16; 8 и 5 ME/л для ГА, эрвиназы и аспарагиназы из <i>E. coli</i> соответственно. Предполагается, что замена бактериального фермента на человеческий должна снизить выработку антител на препарат	[67] [68]

ным опухолям на основе *Salmonella typhimurium*, которая может обеспечить экспрессию больших количеств аспарагиназы *E. coli* непосредственно в опухоли [69]. Для этого была сконструирована плазида рASN, несущая ген, кодирующий белок аспарагиназы из *E. coli* (BL21), которая была встроена в ДНК *Salmonella*. Это обеспечивало экспрессию белка аспарагиназы непосредственно в опухоли под контролем araBAD промотора (Pbad) арабинозного оперона *Escherichia*, который индуцируется L-арабинозой. При инкубации клеток различных опухолей в среде с *Salmonella*, несущей плазмиду L-аспарагиназы, или в среде с обычной L-аспарагиназой в течение 48–72 ч наблюдали сравнимую супрессию роста опухолевых клеток (то есть одинаковую чувствительность и уровень гибели клеток) в присутствии обоих препаратов. Противоопухолевая активность сальмонеллы, несущей ген L-аспарагиназы, исследована на моделях мышинных опухолей. Показано, что на мышах наблюдается значительная супрессия роста различных видов опухолей, и выживаемость у леченых мышей была выше по сравнению с контролем. При этом наблюдали строгую корреляцию выживаемости опухолевых клеток и активности L-аспарагиназы, обеспечиваемой сальмонеллой. Авторы сделали вывод, что в дальнейшем такая система может применяться для лечения солидных опухолей [69].

**Иммобилизация L-аспарагиназы на полимерных носителях.** Еще одно направление модификации аспарагиназы с целью улучшения ее фармакологических свойств – иммобилизация фермента на полимерных носителях. Присоединение фермента к полимеру может изменить физико-химические и фармакологические свойства лекарственного препарата (растворимость, термическую стабильность, время полувыведения и др.). Полимер может защитить фермент от воздействия протеаз, блокировать те участки фермента, которые вызывают выработку антител, и создавать некую оболочку, проницаемую для субстрата (аспарагина), но затрудняющую доступность молекулы для белков и клеток иммунной системы.

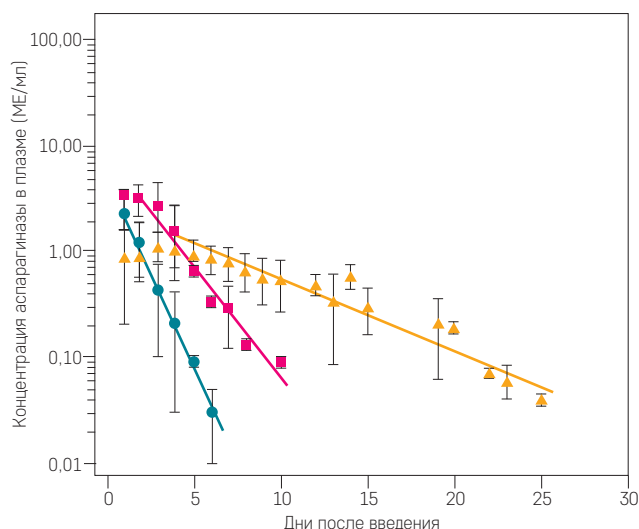
Наиболее известная форма L-аспарагиназы, иммобилизованная на полимерном носителе, – аспарагиназа с присоединенным полиэтиленгликолем (ПЭГ-аспарагиназа), разработанная Y. Kamisaki в 1981 году [70]. Фермент имел всего 8% каталитической активности по сравнению с нативным, но одинаковые оптимальный pH и  $K_m$  по отношению к аспарагину, показал сниженную иммуногенность и увеличенное время циркуляции у мышей. В более поздних работах с ПЭГ-аспарагиназой этот фермент имел уже 30% исходной активности нативной аспарагиназы и не отличался от нее по зависимости активности от pH и по стабильности в зависимости от

температуры, а также по константе Михаэлиса для аспарагина [71].

Во многих исследованиях показаны преимущества пэгилированной L-аспарагиназы над нативным ферментом, одно из которых – увеличенное время полувыведения. Предполагается, что пэгилирование блокирует потенциальные иммуногенные эпитопы нативной молекулы фермента, уменьшая тем самым ассоциированные с ними иммунный ответ и реакции гиперчувствительности. Таким образом, пэгилирование задерживает выведение фермента ретикулоэндотелиальной системой, пролонгируя время циркуляции препарата в организме [72]: в работе [50] оно составляет  $5,74 \pm 3,24$  дня (препарат Онкоспар) по сравнению с  $1,24 \pm 0,17$  дня и  $0,6 \pm 0,13$  дня для введения растворов нативных препаратов из *E. coli* или *E. chrysanthemi* соответственно. Фармакокинетика разных препаратов аспарагиназы была исследована также в работе [73]. На рисунке 4 представлены полученные в этой работе зависимости активности аспарагиназы от времени после введения в сыворотках пациентов, получивших одноразовую инъекцию одного из трех различных препаратов аспарагиназы: нативных ферментов из *E. coli*, или *E. chrysanthemi* (в дозе по 25 000 МЕ/м<sup>2</sup>), или ПЭГ-аспарагиназы из *E. coli* (в дозе 25 00 МЕ/м<sup>2</sup>).

**Рисунок 4**

Кинетика снижения активности аспарагиназы в плазме пациентов после однократного введения одного из препаратов аспарагиназы; (■) – аспарагиназа из *E. coli* в дозе 25 000 МЕ/м<sup>2</sup>, n = 10; (●) – аспарагиназа из *Erwinia* в дозе 25 000 МЕ/м<sup>2</sup>, n = 10; (▲) – пэгилированная аспарагиназа из *E. coli* (ПЭГ-аспарагиназа) в дозе 2500 МЕ/м<sup>2</sup>, n = 10 (представлены средние величины ± стандартные отклонения; прямые проведены при помощи линейного регрессионного анализа результатов в каждой группе) [73]



Увеличение времени полувыведения препарата ПЭГ-аспарагиназы позволило достичь той же скорости ремиссии и выживаемости у пациентов, получивших одно введение этой аспарагиназы в течение

Таблица 2

## Изменение характеристик L-аспарагиназы при иммобилизации на полимерных носителях

№ п/п	Полимерный носитель	Способ иммобилизации	Сохранение активности после связывания, %	$K_m$ для аспарагина, время полувыведения и изменение некоторых других свойств в сравнении с нативным ферментом	Ссылки
1	Нативный фермент (без полимера)	–	100%	$K_m = 1,15 \times 10^{-5} \text{ M}$ ( <i>E. coli</i> ) Время полувыведения $1,24 \pm 0,17$ дня ( <i>E. coli</i> ) и $0,6 \pm 0,13$ дня ( <i>E. chrysanthemi</i> ). Рабочая область $pH - 5,0-10,0$ ( $pH$ -оптимум – 8,0)	[19] [50]
2	Полиэтилен-гликоль (ПЭГ)	Ковалентная сшивка фермента с ПЭГ	8–30%	$K_m$ – как у нативного фермента. Время полувыведения увеличено до $5,74 \pm 3,24$ дня ( <i>E. coli</i> ); $pH$ -оптимум – 7,0; термостабильность одинаковая, иммуногенность снижена ( <i>E. coli</i> )	[50] [70–72]
3	Пальмитиновая кислота ( $C_{16}H_{32}O_2$ )	Ацилирование кислоты путем присоединения к $\epsilon$ - $NH_2$ -группам лизинов фермента	60–98% (в зависимости от степени ацилирования)	Увеличение каталитической активности	[79]
4	Сополимер альбумина и аспарагиназы	Сшивание с помощью глутарового альдегида	60%	После сшивания $K_m$ увеличивается в 2–3 раза. При инкубации в свежей плазме <i>in vitro</i> время полужизни фермента ( $t_{1/2}$ ) – 20 ч (у нативного фермента $t_{1/2} = 1,5$ ч). Увеличена устойчивость в присутствии протеолитических ферментов ( $t_{1/2} = 10$ ч; у нативного фермента – 0,5 ч), иммуногенность снижена	[80]
5	Белок шелка фиброин (от 40 до 120 кДа)	Сшивание с помощью глутарового альдегида	80%	$K_m = 0,844 \times 10^{-3} \text{ M}$ (у нативного фермента $\sim$ в 6 раз выше – $4,77 \times 10^{-3} \text{ M}$ ). Время жизни в плазме человека <i>in vitro</i> : $t_{1/2} = 63$ ч (у нативного фермента $t_{1/2} = 33$ ч). Увеличенная термическая стабильность (в 2 раза при 60 °C) и стабильность при хранении (на 30-й день остаточная активность – 80%; для нативного фермента – 20%); увеличенная устойчивость к действию трипсина (после 40 мин инкубации активность на 20% выше, чем у нативного фермента); сниженная иммуногенность (титр антител через неделю после второй инъекции – 2 против 24)	[81]
6	Сополимер винилпирролидона и акролеина	Образование азометиновых связей между карбонильными группами полимера и аминогруппами фермента	21–92,5% (в зависимости от условий)	Увеличенная термическая стабильность в диапазоне температур 20–50 °C	[82]
7	Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)	Ковалентное связывание азидным методом (связывание азидов КМЦ с аспарагиназой)	34–94% (в зависимости от соотношения КМЦ и фермента)	<i>In vivo</i> на кроликах $t_{1/2} = 13,2$ ч (для нативного фермента – 7 ч). Продолжительность жизни опытных животных увеличилась в 1,3–3,2 раза по сравнению с лечением свободной аспарагиназой	[83]
8	N,O-карбоксиметилхитозан	Сшивка глутаровым альдегидом	75%	Время полувыведения 40 ч; для нативного фермента – 1,6 ч. Увеличенная протеолитическая стабильность относительно трипсина и $\alpha$ -химотрипсина; оптимальный pH ближе к физиологическому, чем у нативного фермента	[84]
9	Декстран сульфат (М.в. до 500 кДа) и полиглюкин (М.в. $\sim 60 \pm 10$ кДа)	Комплексообразование	79,5–100%	$K_m - 1,5-2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ у различных модификаций комплекса; для нативного фермента – $4,2 \times 10^{-4} \text{ M}$ . Увеличена термическая стабильность и стабильность при хранении. Продолжительность жизни подопытных животных увеличилась в 1,3 раза по сравнению с лечением нативной L-аспарагиназой	[85]
10	Полисахарид леван (полимер фруктозы из <i>Z. mobilis</i> )	Ковалентное сшивание путем окисления периодатом с последующим восстановлением алкилированием	55–90,5% (у разных типов конъюгатов)	$K_m - 3,5-9,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ у разных модификаций конъюгата (у нативного фермента – $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Расширенный диапазон оптимального pH, повышенная стабильность при температуре 40 и 50 °C, увеличенное время хранения (1 месяц)	[86]
11	Полиакриламидные шарики	Ковалентная сшивка	100%	Аспарагин в 5 л буфера (50 мкМ) полностью гидролизировался за 60 мин диализа против шариков с пришитой аспарагиназой (активность аспарагиназы в диализаторе – 2000 МЕ). <i>In vivo</i> в крови овец концентрация аспарагина (40–50 мкМ) снижалась до низкого уровня после 2–3 ч гемодиализа над этим же носителем (с 2000 МЕ пришитой аспарагиназой), но потом снова увеличивалась, вероятно, из-за ускорения ресинтеза аспарагина	[87]
12	Коломиновая кислота	Ковалентное сшивание путем восстановительного аминирования	82–86%	$K_m$ – как у нативного фермента. Время жизни <i>in vitro</i> – 38 ч (для нативного фермента в тех же условиях – 15 ч). Увеличенная стабильность при инкубации в плазме мышей при 37 °C	[88]
13	Гидрогель из ПЭГ и альбумина	Иммобилизация на матрице гидрогеля	90%	200-кратное увеличение $K_m$ для аспарагина. Имплантация 7 МЕ аспарагиназы в виде гидрогеля снижала аспарагин в плазме крыс ниже предела обнаружения – 7 дней; через 10 дней эта концентрация возвращалась к норме. Сохранялось 90% исходной активности после 50 дней инкубации при 37 °C (для нативного фермента в тех же условиях активность сохранялась 2 дня)	[89] [90]



2 недели, что и у пациентов после 6–9 введений нативного фермента за то же время [74]. Например, была показана высокая эффективность применения пэгилированной аспарагиназы как препарата первой линии в протоколе интенсивной терапии ОЛЛ у детей [75]. Препарат показал сниженный титр антител к аспарагиназе, большой период полувыведения и ремиссию у пациентов не только с ОЛЛ, но и с лимфоидными опухолями [74].

Несмотря на описанные преимущества, ПЭГ-аспарагиназа не полностью лишена токсичности и побочных эффектов. Хотя ее иммуногенность снижена по сравнению с нативным ферментом, она все еще остается достаточно высокой. Кроме того, у пациентов вырабатываются антитела и к полиэтиленгликолю, что снижает общую эффективность препарата [76]. Недавно была пэгилирована аспарагиназа из *E. chrysanthemi* [77]. Сейчас этот препарат находится на стадии доклинических исследований [78].

На протяжении последних 20 лет были предприняты и другие попытки иммобилизовать фермент на различных полимерных носителях, однако ни один из них (кроме ПЭГ) на сегодняшний день в клинике не используется. Примеры такой иммобилизации приведены в таблице 2. В большинстве исследованных случаев иммобилизация на полимере немного снижала активность фермента по сравнению с исходной L-аспарагиназой, однако увеличивала его термостабильность, устойчивость к протеолитическому разрушению, срок сохранения активности (*in vitro* и *in vivo*), а в некоторых случаях увеличивала также  $K_m$  фермента для аспарагина.

**Инкапсулирование.** Еще один способ, который был использован для улучшения фармакологических свойств L-аспарагиназы, – ее инкапсулирование (включение) внутрь различных подходящих микро- или наночастиц. Такое инкапсулирование позволяет спрятать фермент как от активных протеаз плазмы, способных его деградировать, так и от иммунной системы хозяина. 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 проводит свою реакцию, находясь внутри частиц, поэтому в кровотоке отсутствуют высокие концентрации свободного фермента, которые вызывают многие побочные эффекты препарата.

В качестве частиц для включения L-аспарагиназы пробовали различные искусственные полимерные носители, а также эритроциты.

**Включение аспарагиназы в искусственные нано- и микрочастицы.** В одной из первых работ по включению аспарагиназы в искусственные нано- и

микрочастицы было описано включение этого фермента в большие (полученные упрощенным методом дегидратации – регидратации) и маленькие (полученные с помощью экструдера) липосомы, построенные из липидов разного состава. Средний их диаметр составлял 1249 и 158–180 нм для больших и малых частиц соответственно [91]. В состав липосом входили фосфатидилхолин (PC), холестерин (Chol), эфир стеариламина (SA), фосфатидилинозитол (PI) и моносиалоганглиозид (GMI) в различных композициях. Эти липосомы давали разную итоговую активность включенного фермента. Максимальная эффективность включения наблюдалась у систем, в которых отношение фосфолипидов PC:Chol:SA было равно 7:2:0,25. Для больших липосом максимальная эффективность составляла 72,5%, для маленьких везикул – 36,7%. Оба вида липосом при введении мышам с асцитными опухолями P1534 демонстрировали увеличенную по сравнению со свободным ферментом противоопухолевую активность (время выживания животных увеличивалось примерно в 2 раза) и сниженные анафилактические реакции. Малые липосомы имели более длительное время полувыведения по сравнению со свободным ферментом (11,04 ч против 1,96 ч для нативного фермента).

В работе [92] в бионаносферы из сополимера лактида и гликолида (полилактид-гликолид – PLG) удалось включить только 4,86% L-аспарагиназы. Эффективность включения и время циркуляции этих частиц (до 20 дней) были наивысшими в случае наличия концевой карбоксильной группы в молекулах полимера. Стабильность (сохранение активности) L-аспарагиназы во время инкапсуляции в эти наносферы далее попытались увеличить путем добавления различных стабилизаторов [93]. Лучшими оказались альбумин, трегалоза и плуроник F68. Активность фермента после инкапсуляции с этими соединениями оставалась на уровне 100% от исходной (в присутствии других соединений – 30–90%).

Инкапсуляция L-аспарагиназы в наночастицы из полигидроксипропирата и исследование фармакокинетики этих наночастиц на мышах проведены в работе [94]. Эффективность включения в нанокапсулы составила 28%. Активность фермента в кровотоке держалась на уровне 38% от исходной в течение 4 ч после инъекции. Нанокапсулы, несущие на поверхности гепарин, циркулировали в крови дольше, чем немодифицированные нанокапсулы: 50% активности фермента наблюдалось в кровотоке через 6 ч после инъекции. Никаких побочных эффектов и анафилактики у мышей выявлено не было.

Еще одна система для наноинкапсулирования L-аспарагиназы – полупроницаемая карбоксиметил коньяк глюкоманнан-хитозановая система (CKGM-CS), которая была получена электростатическим

комплексобразованием. L-аспарагиназа, загруженная в эту систему, продемонстрировала более высокую термо- и pH-стабильность по сравнению с нативным ферментом. Максимальная эффективность включения (68%) наблюдалась при равном соотношении хитозана и СК-глюкоманнана (при концентрации каждого 0,01%). Время, за которое активность фермента при инкубации в буфере *in vitro* (pH = 8,6; 37 °C) падала вдвое, составило 400 мин для свободного фермента и 500 мин – для иммобилизованного [95].

В работах последних лет в состав наночастиц для включения аспарагиназы начали вводить хитозан. Так, в работе [96] получены наночастицы, состоящие из трех слоев биополимеров (хитозана, гиалуроновой кислоты и снова хитозана), между которыми включена L-аспарагиназа. Кроме того, внутрь данных везикул были включены магнитные наночастицы, содержащие соли железа II и III (среднего размера – 20–30 нм). Предполагается, что при наложении магнитного поля такие везикулы могут быть контролируемо распределены по органам и тканям благодаря наличию в них магнитных частиц, то есть будут доставлять препарат направленно. После иммобилизации полностью сохранялась магнитная активность частиц и до 90% активности включенного в везикулы фермента. Частицы не были токсичны для клеток, а L-аспарагиназа внутри наночастиц сохраняла стабильность в течение 6 мес. хранения при 4 °C, хотя способность такой аспарагиназы убирать аспарагин из среды не изучена.

Одна из последних разработок – L-аспарагиназа, инкапсулированная в липидные нановезикулы, содержащие хитозан на поверхности [97]. Их получали методом обратно-фазового выпаривания из соевого фосфолипида и холестерина, взятых в отношении 1:1. К готовым нановезикулам добавляли раствор хитозана, который покрывал поверхность нановезикул в ходе простого инкубирования. Средний размер полученных нановезикул составлял  $426,60 \pm 36,34$  нм, а эффективность включения в них L-аспарагиназы –  $43,13 \pm 1,03\%$ . Препарат показал улучшенную по сравнению с нативным ферментом термическую стабильность при хранении, протеолитическую стабильность, а также эффективность *in vitro* против клеточной линии H446 рака легких: в дозе 20 МЕ/мл модифицированная аспарагиназа ингибировала в среднем на 20% больше клеток, чем нативный фермент. Биодоступность *in vivo* у крыс при однократном введении дозы 2000 МЕ/кг была улучшена, а время полувыведения увеличилось в 3 раза и составило около 7 ч (для нативного фермента – 0,9 ч).

## Использование эритроцитов в качестве носителей L-аспарагиназы

Преимущества эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов. Эритроциты исследуют в качестве носителей лекарственных препаратов около 50 лет. Как лекарственная форма для введения ферментов они имеют целый ряд преимуществ по сравнению с внутривенным введением свободной формы фермента, а также с загруженными ферментом микровезикулами из искусственных материалов. Эритроциты доступны и могут быть легко выделены из крови в достаточно больших количествах. Как и искусственные микровезикулы, они защищают включенное вещество от преждевременной инактивации и иммунологических реакций организма, а следовательно, обеспечивают более продолжительное время его жизни в циркуляции по сравнению со свободной формой фермента. Время жизни этих клеток в циркуляции (до 3 мес.) может быть гораздо больше, чем у искусственных микровезикул, а использование аутологических эритроцитов обеспечивает идеальную биосовместимость и биodeградируемость этой лекарственной формы, которую для краткости мы будем называть фармакоцитами.

Фармакоцит становится биореактором, если включенный фермент может проводить свою реакцию внутри клетки-носителя. Чтобы поддерживать устойчивую работу такого биореактора с L-аспарагиназой внутри, необходимо чтобы мембрана эритроцитов была проницаема для субстрата реакции – аспарагина. Было показано [98], что аспарагин способен проникать в человеческие эритроциты из внешней среды, хотя с достаточно низкой скоростью. Включение L-аспарагиназы в эритроциты не влияло ни на эту проницаемость, ни на активность включенного фермента. Кинетика транспорта аспарагина описана уравнением Михаэлиса–Ментен с параметрами:  $K_m = 2,50$  mM;  $V_{max} = 0,24$  ммоль/ч на 1 л клеток. Низкая скорость входа аспарагина в эритроциты может лимитировать общую эффективность работы включенного фермента.

Основные варианты методов включения аспарагиназы в эритроциты. L-аспарагиназа может быть включена в аутологичные или донорские эритроциты различными методами. Наиболее популярны разные варианты метода обратимого гипосмотического воздействия на клетки. При этом всегда проводят инкубацию клеток в гипотонической среде, содержащей препарат аспарагиназы, в результате чего клетки набухают и в их мембране образуются поры, через которые аспарагиназа входит внутрь клетки. Затем целостность клеточной мембраны восстанавливают, вновь повышая в среде инкубации тоничность до нормального уровня [98–103]. Существуют и другие методы иммобилизации L-аспарагиназы в присут-

ствии эритроцитов, однако они немногочисленны. Например, описана доставка L-аспарагиназы в эритроциты путем связывания ее с проникающим через мембрану клетки низкомолекулярным протамином [104] или иммобилизация аспарагиназы не внутри, а на поверхности эритроцитов [105].

**1. Метод обратимого гипоосмотического лизиса.** Разработка препарата инкапсулированной в эритроциты L-аспарагиназы началась с работы S.J. Updike и R.T. Wakamiya в 1983 году [99]. Авторы использовали метод обратимого гипоосмотического лизиса. Эритроциты человека лизировали путем добавления к ним двух объемов холодной воды, содержащей L-аспарагиназу, а затем «запечатывали» в теплом изотоническом растворе с 0,1%-й глюкозой. Средняя эффективность такого включения составила 20%. Гематологические индексы полученных эритроцитов с ферментом внутри значительно отличались от аналогичных показателей исходных эритроцитов (средний объем эритроцита и среднее содержание в нем гемоглобина снизились с 90 до 63 фл и с 31 до 15 пг/на клетку соответственно). Аналогичным способом авторы включили L-аспарагиназу в эритроциты макаки-резус и измерили фармакокинетику новой лекарственной формы. Финальная активность препарата в этом случае составила 60–180 МЕ/мл эритроцитов. Девять обезьян (по три в каждой группе) получили L-аспарагиназу в эритроцитах в дозах 140, 1040 и 1850 МЕ/кг. Период полувыведения инкапсулированной L-аспарагиназы составил 7 дней, то есть в 7 раз длиннее, чем у свободной формы фермента при внутривенном введении ( $t_{1/2} = 24$  ч). Аспарагин в плазме сохранялся на низком уровне в течение 20 и 10 дней после однократного введения препарата фармакоцитам с L-аспарагиназой в дозе 1850 МЕ/кг или свободного фермента соответственно. Количество антител к аспарагиназе у животных в разных группах первые 8 дней было одинаково, однако к 32-му дню титр антител в группе, получавшей L-аспарагиназу в эритроцитах, стал в 4 раза выше, чем в контроле, и далее практически не менялся.

**2. Метод предварительного набухания (метод пресвellinga).** Чтобы смягчить условия получения фармакоцитов и обеспечить тем самым их лучшую выживаемость в организме, был разработан метод постепенного набухания клеток в среде, содержащей аспарагиназу (метод пресвellinga). Этот метод использован в работе [101] для включения L-аспарагиназы из *Erwinia carotovora* в эритроциты мыши. Исходные эритроциты помещали в гипотонический буфер Хэнкса с высоким содержанием калия, где они подвергались процессу сферуляции (*preswelling*). Затем поверх слоя клеток наслаивали гемолизат

эритроцитов (100 мкл на 1 мл суспензии эритроцитов), а поверх этого слоя помещали водный раствор L-аспарагиназы и центрифугировали полученный многослойный образец при 500 g в течение 4 мин. Процесс повторяли до тех пор, пока визуально на поверхности осадка не начинали наблюдаться белые тени эритроцитов, – это была так называемая точка лизиса. После этого к эритроцитам добавляли гипертонический буфер и отмывали полученные фармакоциты с включенной аспарагиназой. Активность фермента в загруженных клетках составила 200–250 МЕ/мл эритроцитов. После введения таких фармакоцитов мышам в дозе 50 МЕ/на мышь период полувыведения фермента составил 2–3 недели; аспарагин в плазме невозможно было обнаружить в течение 2 недель после введения. Свободная L-аспарагиназа после однократного введения в той же дозе снижала аспарагин в крови до недетектируемого уровня в течение только 3 дней. Исследование *in vivo* показало, что время жизни мышей с привитой 6C3HED лимфомой составило  $18 \pm 2$  дня у контрольных животных (без лечения);  $29 \pm 6$  дней – у животных, которым вводили свободную L-аспарагиназу, и более 60 дней – у животных, которым вводили L-аспарагиназу, инкапсулированную в эритроциты.

**3. Метод обратимого гипотонического диализа.** Еще один способ постепенно снизить осмоляльность в суспензии, содержащей эритроциты, – метод диализа этой суспензии против гипоосмотического буфера. Таким методом L-аспарагиназа была включена в эритроциты собаки [100]. При этом исходные эритроциты смешивали с ферментом и диализовали против буфера с осмоляльностью 100 мОсм/кг  $H_2O$ , после чего «запечатывали» загруженные клетки, восстанавливая нормальную осмоляльность внешней среды. Активность L-аспарагиназы в полученных фармакоцитах была равна 381 МЕ/мл клеток, а эффективность включения составила 30%. При этом средний объем эритроцита уменьшился в результате процедуры примерно на 37% (с 62 до 39 фл). Время полувыведения загруженного в эритроциты фермента после введения этих фармакоцитов собакам составило 6 дней ( $n = 3$ ).

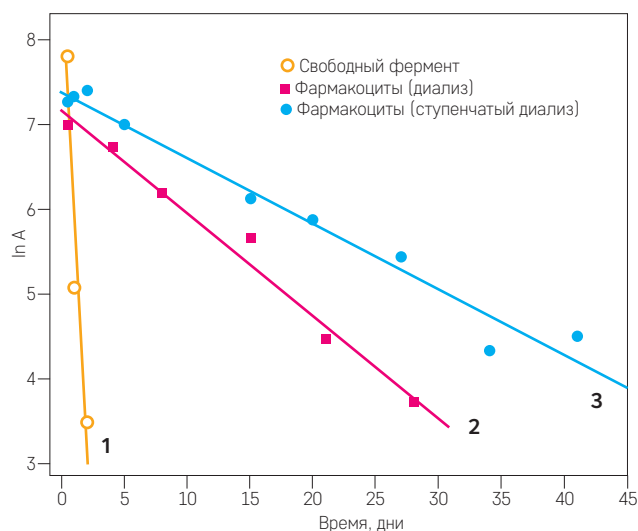
Разновидность диализного метода – метод ступенчатого диализа [106], при этом диализ проводится в 5–6 ступеней, на каждой из которых осмоляльность внешнего буфера снижается примерно на 20–30% (суммарно – в 2,5 раза). На каждой из ступеней суспензия инкубируется 15 мин. Авторы работы [103] предполагали, что основное раскрытие пор, а следовательно, и вход фермента внутрь клеток, происходит в момент смены осмоляльности суспензии. При дальнейшей инкубации поры могут частично закрываться. Процедура ступенчатого диализа более

щающаяся по сравнению с обычным диализом, так как процесс начинается с более высокой осмоляльности внешнего буфера, которая постепенно снижается на каждой последующей ступени. Чтобы доказать, что при смягчении условий обратимого гипоосмотического шока получают фармакоциты с лучшими характеристиками выживания в организме, в работе [103] L-аспарагиназа была включена в эритроциты человека тремя разными методами: обратимым гипоосмотическим лизисом (прямое добавление к эритроцитам гипотонического раствора), диализом и ступенчатым диализом. Обратимый лизис давал самый низкий процент включения фермента и приводил к наиболее драматическим изменениям в свойствах эритроцитов. Наибольший процент включения наблюдался при диализном методе инкапсулирования. Эффективность включения с помощью ступенчатого диализа была примерно на 20% меньше, чем при обычном диализе, но биохимические показатели нагруженных эритроцитов, как и их фармакокинетика, *in vivo* были существенно лучше [103].

Сравнение фармакокинетики свободной L-аспарагиназы и фермента в эритроцитах проведено на мышах линии CBA/B6/F1 (рисунок 5). Эритроциты, нагруженные ферментом с помощью метода обратимого гипоосмотического лизиса (на рисунке 5 не представлены), быстро разрушались в кровотоке, а период их полувыведения оказался лишь немного выше, чем у свободного фермента: 24 ч – для фармакоцитов и 7,2 ч – для свободного фермента (для сравнения: после диализа и ступенчатого диализа

#### Рисунок 5

Изменения в активности L-аспарагиназы в плазме мышей после однократного внутривенного введения различных препаратов L-аспарагиназы: 1 – раствора свободного фермента в дозе 5,7 МЕ/мышь ( $t_{1/2} = 7,2$  ч); 2 – L-аспарагиназы, загруженной в эритроциты методом диализа, в дозе 2,5 МЕ/мышь ( $t_{1/2} = 6$  дней); 3 – L-аспарагиназы, загруженной в эритроциты методом ступенчатого диализа, в дозе 5,7 МЕ/мышь ( $t_{1/2} = 9$  дней). Активность измерена в МЕ/л плазмы (для свободного фермента) или на 1 л эритроцитов (для фармакоцитов) [103, адаптировано]



период полувыведения L-аспарагиназы составил 6 и 9 дней соответственно) [103]. После 18 дней хранения фармакоцитов, полученных диализным методом, активность фермента в них снизилась на 10–20%; уровень АТФ – не более чем на 50%, а увеличение свободного гемоглобина в суспензии при хранении составило только 1%. Это позволяет надеяться, что полученные фармакоциты можно переливать пациенту даже после 7 дней хранения [107].

**4. Проточный диализ.** Следующей ступенью оптимизации метода включения L-аспарагиназы в мышинные и человеческие эритроциты стало использование стандартного педиатрического диализатора для гемодиализа. В созданной установке осуществлялся непрерывный противоток суспензии эритроцитов, содержащей L-аспарагиназу (во внутреннем контуре), и гипоосмотического буфера (во внешнем контуре). После диализа по-прежнему следовала процедура запечатывания эритроцитов путем восстановления тоничности внешнего буфера [102]. Запечатывающий раствор содержал NaCl, инозин, глюкозу, пируват и аденин. Эффективность включения составила 14% для мышинных эритроцитов и 20% – для эритроцитов человека. После введения L-аспарагиназы в эритроцитах мышам в дозе 1000 МЕ/кг (~ 20 МЕ/на мышь) аспарагин в плазме практически отсутствовал в течение 2 недель, тогда как однократное введение аналогичной дозы свободной L-аспарагиназы вызывало падение аспарагина до недетектируемого уровня только на 2 дня.

Эта методика была оптимизирована с целью создания препарата L-аспарагиназы, включенной в эритроциты человека, с улучшенными фармакодинамическими показателями для применения в клинике [108]. Препарат в аутологических эритроцитах, нагруженных ферментом с помощью метода проточного гипоосмотического диализа, был введен 13 пациентам. Время жизни фармакоцитов в кровотоке сильно увеличилось по сравнению с  $t_{1/2}$  для свободного фермента (27 дней и 8–24 ч соответственно). Это позволяло инкапсулированному ферменту дольше сохранять низкий уровень аспарагина в крови (в течение 10 дней для дозы 50 МЕ/кг и 50 дней при введении 150–200 МЕ/кг) [108]. Авторы также показали, что при однократной инъекции препарата в дозах от 30 до 200 МЕ/кг не наблюдается никакой клинической токсичности и никаких аллергических реакций, хотя у всех пациентов были обнаружены антитела к L-аспарагиназе [109].

В настоящее время препарат L-аспарагиназы, включенной в эритроциты человека (GRASPA®), разрешен для применения в клинике во Франции. Параллельно продолжают его расширенные кли-

нические испытания. На данный момент пять из них уже закончены, одно продолжается, а для двух (в Бельгии и США) происходит набор пациентов. К сожалению, пока не все результаты уже законченных испытаний опубликованы.

Одно из опубликованных клинических мультицентровых рандомизированных исследований – применение GRASPA у детей и взрослых с рецидивирующим ОЛП во Франции (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00723346*) [110]. Пациентам (в возрасте от 1 года до 55 лет) вводили GRASPA в дозах 50, 100 и 150 МЕ/кг. Продолжительность поддержания аспарагина в кровотоке на уровне меньше 2 мкМ после введения этого препарата в дозе 150 МЕ/кг практически совпадала со временем, достигнутым при 8 последовательных введениях (1 раз в день) раствора L-аспарагиназы из *E. Coli* в дозе 10 000 МЕ/м<sup>2</sup>, и составила в среднем 18,5 дня (от 8,9 до 45 дней). GRASPA вызывала меньшее количество аллергических реакций, клинических тромбозов и случаев снижения концентрации фибриногена и антитромбина III по сравнению со свободной L-аспарагиназой, но имела одинаковую частоту панкреатической и печеночной дисфункции. Таким образом, авторы показали, что фермент внутри эритроцитов защищен от присутствующих в плазме антител.

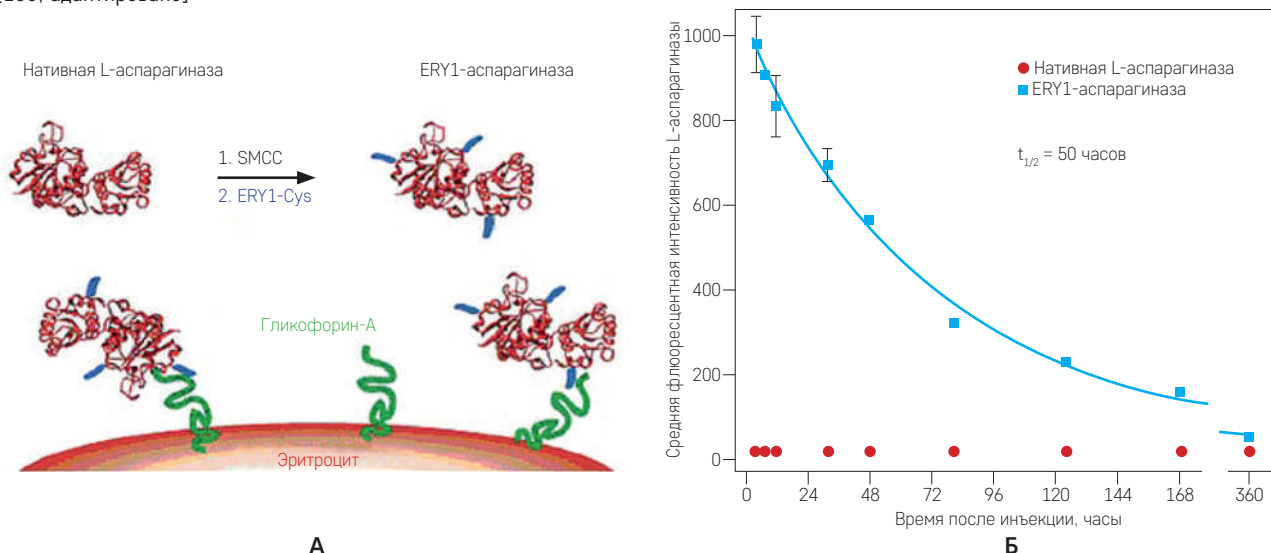
В другом клиническом испытании (*clinicaltrials.gov identifier NCT01523782*) 30 пациентов старше 55 лет с отрицательным по Филадельфийской хромосоме (*Ph*-негативным) ОЛП получали возрастающие дозы GRASPA на 3-й день от начала фазы индукции 1, а затем, при отсутствии явно выраженных отрицательных явлений, – на 6-й день фазы индук-

ции 2 [111]. Аспарагин сохранялся на уровне ниже 2 мкМ в течение как минимум 7 дней. Этот результат был достигнут у пациентов с дозами GRASPA, равными 100 и 150 МЕ/кг, но не достигнут при дозе 50 МЕ/кг. У пациентов наблюдалось также уменьшение побочных реакций и пролонгированное действие препарата. В качестве оптимальной для пожилых людей была выбрана доза 100 МЕ/кг, так как она поддерживала длительное истощение аспарагина, не обладая излишней токсичностью.

**5. Другие методы иммобилизации L-аспарагиназы.** Как было сказано выше, для загрузки L-аспарагиназы в эритроциты могут быть использованы методы не только на основе изменения осмотичности среды. В работе [104] для этой цели использовали низкомолекулярные протамины, которые в молекулярной биологии применяют для транспорта в клетку различных соединений благодаря их способности проникать сквозь клеточную мембрану. Авторы этого исследования разработали оригинальный низкомолекулярный протамин, с помощью которого включили L-аспарагиназу в эритроциты (с эффективностью около 4%). Эта процедура не сопровождалась лизисом клеток и какими-либо значительными изменениями характеристик эритроцита. По параметрам осмотической резистентности и эритроцитарным индексам загруженные эритроциты не отличались от нативных клеток. При этом в течение 2 недель из эритроцитов не наблюдалось утечки фермента, а его активность сохранялась в пределах 70% от исходной. Период полувыведения препарата из организма мышей DBA/2, которым вводили по 8 МЕ препарата, вырос в два раза по сравнению с L-аспарагиназой в

## Рисунок 6

Связывание L-аспарагиназы с поверхностью эритроцита при помощи гликофорин-А-связывающего пептида (ERY1-Cys) (А); фармакокинетика связанной с эритроцитами L-аспарагиназы и нативного фермента в крови мышей, измеренная по средней интенсивности флуоресценции L-аспарагиназы в крови после однократной инъекции 15 мкг каждого из препаратов ( $n = 3$ ) (Б) [105, адаптировано]





эритроцитах, полученных с помощью диализа, и составил  $4,5 \pm 0,5$  против  $2,4 \pm 0,7$  дня. Выживаемость мышей линии DBA/2, несущих лимфому L5178Y и получавших препарат в эритроцитах, была на 44% выше, чем у контрольных животных, получавших инъекцию физиологического раствора.

Еще один способ снизить иммуногенность препарата продемонстрирован в работе [105]. Авторы модифицировали L-аспарагиназу, присоединив к ней гликофорин-A, связывающий пептид ERY1 (рисунк 6 А). Это не повлияло на специфическую активность фермента, но позволило L-аспарагиназе связываться с мембраной эритроцитов в русле крови мышей. В результате фармакокинетика фермента в крови мышей улучшилась по сравнению с нативной и ПЭГ-аспарагиназой. Время полувыведения составило 50 ч (рисунк 6 Б) по сравнению с 3 и 33 ч для нативной и ПЭГ-аспарагиназы соответственно. L-аспарагиназа оставалась детектируемой на мембране эритроцитов в течение 2 недель.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препараты L-аспарагиназы применяются в курсах химиотерапии при таких онкологических заболеваниях как ОЛЛ, ОМЛ, рак поджелудочной железы и т.д. Клетки ряда опухолей не имеют возможности синтеза аспарагина, поэтому снижение его концентрации во внешней среде приводит в них к снижению синтеза белка и апоптозу.

Несмотря на противоопухолевую эффективность, при внутривенном введении раствора свободного фермента наблюдается целый ряд токсических эффектов, а также быстрое снижение эффективности лекарства, связанные с необходимостью введения высоких доз препарата и присутствием в плазме антител и протеолитических ферментов.

Существует большое количество подходов для улучшения фармакологических свойств L-аспарагиназы. Это поиск и создание новых рекомбинантных L-аспарагиназ с заданными свойствами (более высокой удельной активностью и улучшенной фармакокинетикой), иммобилизация фермента на полимерных носителях, а также включение его внутрь искусственных полимерных нано- и микрочастиц или эритроцитов с целью снижения иммуногенности и уве-

личения времени циркуляции фермента в кровотоке. В случаях инкапсуляции L-аспарагиназы внутрь искусственных везикул и эритроцитов это происходит за счет наличия оболочки, защищающей фермент от деградации.

На сегодняшний день не до конца изучены механизмы действия фермента и развития резистентности к нему, а также роль глутаминазной активности в терапевтическом эффекте L-аспарагиназы и в развитии ее токсических эффектов. Исследования в этих направлениях продолжаются. Параллельно идет исследование наиболее перспективных лекарственных форм препарата.

В настоящее время наравне с L-аспарагиназой из *E. coli*, Эрвиназой и ПЭГ-аспарагиназой в клинику уже входит новый препарат – L-аспарагиназа, включенная в эритроциты. Этот препарат показал многообещающие результаты в первых клинических исследованиях. В настоящий момент такие исследования продолжаются. В них участвуют пациенты разных возрастов, страдающие различными онкологическими заболеваниями. Модифицируются и методы включения препарата в эритроциты. Основные цели этой модификации – это создание более эффективной процедуры включения и получение при этом эритроцитов с минимально измененными свойствами, которые обладали бы наибольшей продолжительностью жизни в кровотоке. В будущем использование новых лекарственных форм L-аспарагиназы, в первую очередь, фермента, включенного в эритроциты, в совокупности с использованием хороших диагностических методов, способных предсказать тот или иной ответ на терапию L-аспарагиназой, смогут обеспечить эффективную стратегию терапии различных видов опухолей этим препаратом.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 15-29-01228 офи.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

## ORCID

**Borsakova D.V.** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4669-977X>

**Sinauridze E.I.** ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5948-3444>

## Литература

- Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Crit Rev Biotechnol* 2007; 27 (1): 45–62.
- Piatkowska-Jakubas B., Krawczyk-Kuliś M., Giebel S., Adamczyk-Cioch M., Czyz A., Lech Marañón E., et al. Polish Adult Leukemia Group. Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118 (11): 664–9.
- Sanson E., Jaskolski M. Structure, dynamics and electrostatics of the L-asparaginase catalytic centre: Implications for reaction mechanism. Department of Crystallography, Birkbeck College, London and Venus Internet Ltd.,

- London, UK. Available at: <http://www.man.poznan.pl/CBB/POSTER1/poster.html#xtal> (accessed April 20, 2018).
4. Kidd J.G. Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum. I. Courses of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J Exp Med* 1953; 95 (6): 565–82.
  5. Old L.J., Boyse E.A., Campbell H.A., Daria G.M. Leukemia-inhibiting properties and L-asparaginase activity of sera from certain South American rodents. *Nature* 1963; May 25; 198 (4882): 801.
  6. Wriston J.C., Yellin T.O. L-asparaginase: a review. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1973; 39: 185–248.
  7. Oettgen H.F., Old L.J., Boyse E.A., Campbell H.A., Philips F.S., Clarkson B.D., et al. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 1967; 27(12): 2619–31.
  8. Hill J.M., Roberts J., Loeb E., Khan A., MacLellan A., Hill R.W. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. Remission in human leukemia. *JAMA* 1967; 202 (9): 882–8.
  9. Del Casale T., Sollitti P., Chesney R.H. Cytoplasmic L-asparaginase: isolation of a defective strain and mapping of *ansA*. *J Bacteriol* 1983; 154 (1): 513–5.
  10. Jennings M.P., Beacham I.R. Analysis of the *Escherichia coli* gene encoding L-asparaginase II, *ansB*, and its regulation by cyclic AMP receptor and FNR proteins. *J Bacteriol* 1990; 172 (3): 1491–8.
  11. Sanches M., Krauchenco S., Polikarpov I. Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. *Curr Chem Biol* 2007; 1 (1): 75–86.
  12. Whitecar J.P.Jr., Bodey G.P., Harris J.E., Freireich E.J. L-Asparaginase. *N Engl J Med* 1970; 282 (13): 732–4. DOI: 10.1056/NEJM197003262821307
  13. Ho P.P.K., Milikin E.B., Bobbitt J.L., Grinnan E.L., Burck P.J., Frank B.H., et al. Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B: I. Purification and chemical characterization. *J Biol Chem* 1970; 245 (14): 3708–15.
  14. Kozak M., Jurga S. A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II. *Acta Biochim Pol* 2002; 49 (2): 509–13.
  15. Swain A.L., Jaskólski M., Housset D., Rao J.K., Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 (4): 1474–8.
  16. Lubkowski J., Dauter M., Aghaiypour K., Wlodawer A., Dauter Z. Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59 (Pt 1): 84–92.
  17. Palm G.J., Lubkowski J., Derst C., Shleper S., Rohm K.H., Wlodawer A. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: crystal structure of a Thr-89-Val mutant. *FEBS Lett* 1996; 390 (2): 211–6.
  18. Yun M.K., Nourse A., White S.W., Rock C.O., Heath R.J. Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase I. *J Mol Biol* 2007; 369 (3): 794–811.
  19. Илларионова Н., Петров Л., Оленникова Л.Б. Рощин С., Пасечник В. Изучение вторичной структуры L-аспарагиназы в широкой области pH величин. *Молекулярная Биология* 1980; 14 (4): 951–5.
  20. Мардашев С.П., Николаев А., Козлов Е.А., Петрий О.П. Очистка микробных аспарагиназ с помощью аффинной хроматографии. *Биохимия* 1975; 40 (1): 78–82.
  21. Agrawal V., Woo J.H., Borthakur G., Kantarjian H., Frankel A.E. Red blood cell-encapsulated L-asparaginase: potential therapy of patients with asparagine synthetase deficient acute myeloid leukemia. *Protein Pept Lett* 2013; 20 (4): 392–402. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8665&volume=20&issue=4&spage=392> (accessed April 20, 2018).
  22. Ueno T., Ohtawa K., Mitsui K., Kodera Y., Hiroto M., Matsushima A., et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 1997; 11 (11): 1858–61.
  23. Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L., Paschetto M., Digilio R., et al. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012; 7 (1): 4–13.
  24. Cooney D.A., Capizzi R.L., Handschumacher R.E. Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man. *Cancer Res* 1970; 30 (4): 929–35.
  25. Divino Filho J.C., Bárány P., Stehle P., Fürst P., Bergström J. Free amino acid levels simultaneously collected in plasma, muscle and erythrocytes of uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (11): 2339–48. DOI: <https://doi.org/10.1093/ndt/12.11.2339>
  26. Conter V., Bartram C.R., Valsecchi M.G., Schrauder A., Panzer-Grümayer R., Möricke A., et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010; 115 (16): 3206–14.
  27. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. Engineering the substrate specificity of *Escherichia coli* asparaginase. II. Selective reduction of glutaminase activity by amino acid replacements at position 248. *Protein Sci* 2000; 9 (10): 2009–17.
  28. Zoncu R., Sabatini D.M., Efeyan A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12 (1): 21–35. DOI: 10.1038/nrm3025
  29. Nicklin P., Bergman P., Zhang B., Triantafellow E., Wang H., Nyfeler B., et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009; 136 (3): 521–34.
  30. Clavell L.A., Gelber R.D., Cohen H.J., Hitchcock-Bryan S., Cassady J.R., Tarbell N.J., et al. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute

- lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 1986; 315 (11): 657–63.
31. Nesbit M., Chard R., Evans A., Karon M., Hammond G. Evaluation of intramuscular verses intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1979; 1 (1): 9–13.
  32. Müller H.J., Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998; 28 (2): 97–113.
  33. Desai S., Barr R., Andrew M., deVeber L., Pai M. Management of Ontario children with acute lymphoblastic leukemia by the Dana-Farber Cancer Institute protocols. *Can Med Assoc J* 1989; 141 (7): 693–7.
  34. Nachman J., Sather H.N., Gaynon P.S., Lukens J.N., Wolff L., Trigg M.E. Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significance of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997; 15 (6): 2222–30.
  35. Silverman L.B., Gelber R.D., Dalton V.K., Asselin B.L., Barr R.D., Clavell L.A., et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 2001; 97 (5): 1211–8.
  36. Richards N.G., Kilberg M.S. Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 629–54.
  37. Clarkson B., Krakoff I., Burchenal J., Karnofsky D., Golbey R., Dowling M., et al. Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer* 1970; 25 (2): 279–305.
  38. Crowther D. L-Asparaginase and human malignant disease. *Nature* 1971; 229 (5281): 168–71.
  39. Capizzi R.L., Bertino J.R., Skeel R.T., Creasey W.A., Zanes R., Olayon C., et al. L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med* 1971; 74 (6): 893–901.
  40. Jaccard A., Gachard N., Marin B., Rogez S., Audrain M., Suarez F., et al. GELA and GOELAMS Intergroup. 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* 2011; 117 (6): 1834–9.
  41. Matsumoto Y., Nomura K., Kanda-Akano Y., Fujita Y., Nakao M., Ueda K., et al. Successful treatment with *Erwinia* L-asparaginase for recurrent natural killer/T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44 (5): 879–82.
  42. Koishi T., Minowada J., Henderson E.S., Ohnuma T. Distinctive sensitivity of some T-leukemia cell lines to L-asparaginase. *Gan* 1984; 75 (3): 275–83.
  43. Moola Z.B., Scawen M.D., Atkinson T., Nicholls D.J. *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem J* 1994; 302 (Pt 3): 921–7.
  44. Keating M.J., Holmes R., Lerner S., Ho D.H. L-asparaginase and PEG asparaginase – past, present, and future. *Leuk Lymphoma* 1993; 10 (Suppl. 1): 153–7.
  45. Lorenzi P.L., Reinhold W.C., Rudelius M., Gunsior M., Shankavaram U., Bussey K.J., et al. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5 (11): 2613–23.
  46. Tardito S., Uggeri J., Bozzetti C., Bianchi M.G., Rotoli B.M., Franchi-Gazzola R., et al. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60 (5): 751–8.
  47. Cappelletti D., Chiarelli L.R., Pasquetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C. *Helicobacter pylori* L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377 (4): 1222–6.
  48. Pieters R., Hunger S.P., Boos J., Rizari C., Silverman L., Baruchel A., et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer* 2011; 117 (2): 238–49.
  49. Van Den Berg H. Asparaginase revisited. *Leuk Lymphoma* 2011; 52 (2): 168–78.
  50. Müller H., Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998; 28 (2): 97–113.
  51. Capizzi R.L., Cheng Y.-C. Therapy of neoplasia with asparaginase. In: *Enzymes as Drugs* (Holcenberg J.S., Roberts I. eds.). N.Y., John Wiley and Sons, 1981; pp. 1–24.
  52. Hersh E.M. Immunosuppression by L-asparaginase and related enzymes. *Transplantation* 1971; 12 (5): 368–76.
  53. Kafkewitz D., Bendich A. Enzyme-induced asparagine and glutamine depletion and immune system function. *Am J Clin Nutr* 1983; 37 (6): 1025–30.
  54. Kelo E., Noroncoski T., Stoincheva I.B., Petkov D.D., Mononen I.  $\beta$ -Aspartylpeptides as substrates of L-asparaginases from *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS Lett* 2002; 528 (1–3): 130–2.
  55. Akbayram S., Doğan M., Akgün C., Caksen H., Oner A.F. A desensitization protocol in children with L-asparaginase hypersensitivity. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010; 32 (5): e187–91. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3181e003c7
  56. Ohnuma T., Holland J.F., Freeman A., Sinks L.F. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res* 1970; 30 (9): 2297–305.
  57. Offman M.N., Krol M., Patel N., Krishnan S., Liu J., Saha V., et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood* 2011; 117 (5): 1614–21.
  58. Newsted W.J., Ramjeesingh M., Zywuiko M., Rothstein S.J., Shami E.Y. Engineering resistance to trypsin inactivation into L-asparaginase through the production of a chimeric protein between the enzyme and a protective single-chain antibody. *Enzyme Microb Technol* 1995; 17 (8): 757–64.
  59. Lorenzi P.L., Weinstein J.N., Caplen N.J. Materials and methods directed to asparagine synthetase and

- asparaginase therapies. United States Patent No US7985548 B2, Jul 26, 2011.
60. Ponomarenko J., Bui H.H., Li W., Fusseder N., Bourne P.E., Sette A., et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 2008 Dec 2; 9:514. DOI: 10.1186/1471-2105-9-514
  61. Ansari H.R., Raghava G.P. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res* 2010 Oct 20; 6: 6. DOI: 10.1186/1745-7580-6-6
  62. Werner A., Rohm K.H., Muller H.J. Mapping of B-cell epitopes in *E. coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. *Biol Chem* 2005; 386 (6): 535–40. DOI: <https://doi.org/10.1515/BC.2005.063>
  63. Distasio J.A., Niederman R.A., Kafkewitz D., Googman D. Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem* 1976; 251 (22): 6929–33.
  64. Roberts J., MacAllister T.W., Sethuraman N., Abbie G., Freeman A.G. Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. United States Patent No US6312939 B1, Nov 6, 2001.
  65. Roberts J. Purification and properties of a highly potent antitumor glutaminase-asparaginase from *Pseudomonas* 7A. *J Biol Chem* 1976; 251 (7): 2119–23.
  66. Roberts J., Schmid F.A., Rosenfeld H.J. Biologic and antineoplastic effects of enzyme-mediated *in vivo* depletion of L-glutamine, L-tryptophan, and L-histidine. *Cancer Treat Rep* 1979; 63 (6): 1045–54.
  67. Noronkoski T., Stoineva I.B., Petkov D.D., Mononen I. Recombinant human glycosylasparaginase catalyzes hydrolysis of L-asparagine. *FEBS Lett* 1997; 412 (1): 149–52.
  68. Kelo E., Noronkoski T., Mononen I. Depletion of L-asparagine supply and apoptosis of leukemia cells induced by human glycosylasparaginase. *Leukemia* 2009; 23 (6): 1167–71.
  69. Kim K., Jeong J.H., Lim D., Hong Y., Lim H.J., Kim G.J., et al. L-Asparaginase delivered by *Salmonella typhimurium* suppresses solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2015 Jun 10; 2: 15007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mto.2015.7> (accessed April 20, 2018).
  70. Kamisaki Y., Wada H., Yagura T., Matsushima A., Inada Y. Reduction in immunogenicity and clearance rate of *Escherichia coli* L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 216 (2): 410–4.
  71. Yoshimoto T., Nishimura H., Saito Y., Sakurai K., Kamisaki Y., Wada H., et al. Characterization of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of leukemia. *Jpn J Cancer Res* 1986; 77 (12): 1264–70.
  72. Fu C.H., Sakamoto K.M. PEG-asparaginase. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8 (12): 1977–84.
  73. Asselin B.L., Whittin J.C., Coppola D.J., Rupp I.P., Sallan S.E., Cohen H.J. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* 1993; 11 (9): 1780–6.
  74. Graham M.L. Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55 (10): 1293–302.
  75. Rizzari C., Citterio M., Zucchetti M., Conter V., Chiesa R., Colombini A., et al. A pharmacological study on pegylated asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006; 91 (1): 24–31.
  76. Armstrong J.K., Hempel G., Koling S., Chan L.S., Fisher T., Meiselman H.J., et al. Antibody against poly (ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 2007; 110 (1): 103–11.
  77. Abribat T. Pegylated L-asparaginase. WO Application No WO2011003886 A1 (13.01.2011). Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2011003886A1/en> (accessed April 20, 2018).
  78. Allas S., Sahakian P., Fichtner I., Abribat T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics in mice of a pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase. 51st ASH Annual Meeting Abstracts. *Blood* 2009; 114 (22): abstract [2033].
  79. Martins M.B., Jorge J.C., Cruz M.E. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie* 1990; 72 (9): 671–5.
  80. Poznansky M.J., Shandling M., Salkie M.A., Elliott J.F., Lau E. Advantages in the use of L-asparaginase-albumin polymer as an antitumor agent. *Cancer Res* 1982; 42 (3): 1020–5.
  81. Zhang Y.Q., Zhou W.L., Shen W.D., Chen Y.H., Zha X.M., Shirai K., et al. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L-asparaginase bioconjugates. *J Biotechnol* 2005; 120 (3): 315–26.
  82. Karsakevich A.S., Vina I.A., Liduma G.Y.A. Immobilization of the enzyme *E. coli* L-asparaginase on a water-soluble copolymer of vinylpyrrolidone and acrolein. *Chem Nat Compd* 1988; 24 (4): 477–80. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00598537>
  83. Карсакевич А.С., Кинстлер О.Б., Дауварте А.Х. Биологические свойства высокомолекулярных производных L-аспарагиназы, полученных после иммобилизации фермента на водно-растворимой карбоксиметилцеллюлозе. *Вопр Мед Хим* 1988; 34 (4): 107–10.
  84. Qian G., Zhou J., Ma J., Wang D., He B. The chemical modification of *E. coli* L-asparaginase by N,O-carboxymethyl chitosan. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996; 24 (6): 567–77.
  85. Карсакевич Ф.С., Дауварте А.Х., Звиргжда И.К., Лебедева Л.В., Вина И.А. Эффективные комплексы антилейкемического фермента L-аспарагиназы с декстрансульфатом. *Вопр Мед Хим* 1986; 32(4): 47–51.
  86. Vina I., Karsakevich A., Bekers, M. Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *J Mol Catal B: Enzym* 2001; 11 (4–6): 551–8.
  87. Edman P., Nylén U., Sjöholm I. Use of

- immobilized L-asparaginase in acrylic microparticles in an extracorporeal hollow-fiber dialyzer. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 225 (1): 164–7.
88. Fernandes A.I., Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1341 (1): 26–34.
  89. Jean-François J., Fortier G. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: I: Preparation and in vitro characterization. *Biotechnol Appl Biochem* 1996; 23 (Pt 3): 221–6.
  90. Jean-François J., D'Urso E.M., Fortier G. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: evaluation of performance *in vivo*. *Biotechnol Appl Biochem* 1997; 26 (Pt 3): 203–12.
  91. Gaspar M.M., Perez-Soler R., Cruz M.E. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38 (4): 373–7.
  92. Gaspar M.M., Blanco D., Cruz M.E., Alonso M.J. Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-coglycolide)nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *J Control Release* 1998; 52 (1–2): 53–62.
  93. Wolf M., Wirth M., Pittner F., Gabor F. Stabilisation and determination of the biological activity of L-asparaginase in poly(D, L-lactide-co-glycolide) nanospheres. *Int J Pharm* 2003; 256 (1–2): 141–52.
  94. Baran E.T., Ozer N., Hasirci V. *In vivo* half life of nanoencapsulated L-asparaginase. *J Mater Sci Mater Med* 2002; 13 (12): 1113–21.
  95. Wang R., Xia B., Li B.J., Peng S.L., Ding L.S., Zhang S. Semi-permeable nanocapsules of konjac glucomannan-chitosan for enzyme immobilization. *Int J Pharm* 2008; 364 (1) 6: 102–7.
  96. Teodor E., Litescu S.C., Lazar V., Somoghi R. Hydrogel-magnetic nanoparticles with immobilized L-asparaginase for biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20 (6): 1307–14.
  97. Wan S., He D., Yuan Y., Yan Z., Zhang X., Zhang J. Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of L-asparaginase. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016 Jul 1; 143: 278–84. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.046
  98. Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Жаботинский А.М., Пичугин А.В. Проницаемость эритроцитов человека для аспарагина. *Биохимия* 1985; 50 (10): 1733–7.
  99. Updike S.J., Wakamiya R.T. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. *J Lab Clin Med* 1983; 101 (5): 679–91.
  100. Naqi A., DeLoach J.R., Andrews K., Satterfield W., Keeling M. Determination of parameters for enzyme therapy using L-asparaginase entrapped in canine erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem* 1988; 10 (4): 365–72.
  101. Alpar H.O., Lewis D.A. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 1985; 34 (2): 257–61.
  102. Kravtsoff R., Ropars C., Laguerre M., Muh J.P., Chassaigne M. Erythrocytes as carriers for L-asparaginase. Methodological and mouse *in vivo* studies. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42 (7): 473–6.
  103. Sinauridze E.I., Vitvitsky V.M., Pichugin A.V., Zhabotinsky A.M., Ataullakhanov F.I. A new chemotherapeutic agent: L-asparaginase entrapped in red blood cells. *Adv Exp Med Biol* 1992; 326: 203–6.
  104. Kwon Y.M., Chung H.S., Moon C., Yockman J., Park Y.J., Gitlin S.D., et al. L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Control Release* 2009; 139 (3): 182–9. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.027
  105. Lorentz K.M., Kontos S., Diaceri G., Henry H., Hubbell J.A. Engineered binding to erythrocytes induces immunological tolerance to *E. coli* asparaginase. *Sci Adv* 2015 Jul 17; 1 (6): e1500112. DOI: 10.1126/sciadv.1500112
  106. Синауридзе Е.И. Способ получения эритроцитов, заполненных лекарственным веществом. Авторское свидетельство СССР, № 1469609, 01.12.1988.
  107. Аграненко В.А., Атауллаханов Ф.И., Витвицкий В.М., Кияткин А.Б., Жаботинский А.М., Маркова Н.А. и др. Способ консервирования фармакоцитов с включенной L-аспарагиназой. Авторское свидетельство СССР № 1777887, 01.08.1992.
  108. Kravtsoff R., Desbois I., Lamagnere J.P., Muh J.P., Valat C., Chassaigne M., et al. Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. *Eur J Clin Pharm* 1996; 49 (6): 465–70.
  109. Kravtsoff R., Colombat P., Desbois I., Linassier C., Muh J.P., Philip T., et al. Tolerance evaluation of L-asparaginase loaded in red blood cells. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 51 (3–4): 221–5.
  110. Domenech C., Thomas X., Chabaud S., Baruchel A., Gueyffier F., Mazingue F., et al. L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005–01 randomized trial. *Br J Haematol* 2011; 153 (1): 58–65.
  111. Hunault-Berger M., Leguay T., Huguet F., Leprêtre S., Deconinck E., Ojeda-Uribe M., et al. Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL).. A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study. *Am J Hematol* 2015; 90 (9): 811–8.