

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО – ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА (ИБМХ)»

На правах рукописи

ШИШПАРЁНОК АНАСТАСИЯ НИКОЛАЕВНА

ИММОБИЛИЗАЦИЯ L-АСПАРАГИНАЗ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ ЦЕЛЛЮЛОЗУ ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ИХ СТАБИЛЬНОСТИ И ПРОЛОНГИРОВАНИЯ ДЕЙСТВИЯ

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, доцент
Жданов Дмитрий Дмитриевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Классификация L-аспарагиназ.....	11
1.2. Продуценты L-аспарагиназ.....	13
1.3. Структура L-аспарагиназ.....	14
1.4. Механизм каталитического действия L-аспарагиназ.....	20
1.5. Механизмы противоопухолевого действия L-аспарагиназ.....	22
1.6. Клиническое применение L-аспарагиназ.....	25
1.7. Чувствительность опухолей к L-аспарагиназам.....	29
1.8. Конъюгаты L-аспарагиназ.....	37
1.9. Бактериальная целлюлоза: структура, продуценты и свойства.....	43
1.10. Бактериальная целлюлоза как носитель для терапевтических агентов.....	48
1.11. Методы модификации бактериальной целлюлозы.....	55
1.12. Методы иммобилизации белков на бактериальную целлюлозу.....	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	65
2.1. Получение инокулята штамма-продуцента бактериальной целлюлозы.....	65
2.2. Получение плёнок бактериальной целлюлозы.....	65
2.3. Оценка толщины плёнок бактериальной целлюлозы.....	66
2.4. Лиофильное высушивание плёнок бактериальной целлюлозы.....	66
2.5. Оценка содержания воды и адсорбционной ёмкости для нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы.....	67
2.6. Иммобилизация L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> на нативные плёнки бактериальной целлюлозы.....	67
2.7. Получение композита бактериальной целлюлозы и хитозана.....	68
2.8. Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью TEMPO.....	69
2.9. Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью NaIO ₄	70
2.10. Инфракрасная спектроскопия нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы.....	71
2.11. Оценка морфологии нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы.....	71

2.12. Определение ферментативной активности L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> и подбор оптимального реакционного буфера.....	71
2.13. Определение активности L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на нативные плёнки бактериальной целлюлозы, выращенные в течение различного времени.....	72
2.14. Оценка скорости высвобождения L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном.....	73
2.15. Кинетические модели высвобождения L-аспарагиназы из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном.....	74
2.16. Определение влияния денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы.....	76
2.17. Тест на возможность повторного использования L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	78
2.18. Определение кинетических параметров реакции L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки бактериальной целлюлозы.....	78
2.19. Определение цитотоксической активности L-аспарагиназ.....	79
2.20. Статистическая обработка результатов.....	80
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	81
3.1. Влияние времени культивирования продуцента бактериальной целлюлозы на толщину плёнок.....	81
3.2. Влияние времени культивирования продуцента бактериальной целлюлозы на эффективность адсорбции L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i>	83
3.3. Параметры плёнок бактериальной целлюлозы.....	84
3.4. Исследование морфологии плёнок бактериальной целлюлозы.....	85
3.5. Инфракрасная спектроскопия нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы с иммобилизованной L-аспарагиназой.....	88
3.6. Ферментативная активность L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на нативных плёнках бактериальной целлюлозы.....	91

3.7. Подбор оптимальных условий для получения композита бактериальной целлюлозы и хитозана.....	93
3.8. Высвобождение L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> из нативных плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном.....	96
3.9. Влияние иммобилизации на кинетические параметры реакции, катализируемой L-аспарагиназой <i>Erwinia carotovora</i>	98
3.10. Влияние денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы.....	100
3.10.1. Влияние температуры на активность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	101
3.10.2. Влияние pH на активность L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	106
3.10.3. Влияние ионов металлов на ферментативную активность L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	108
3.10.4. Влияние мочевины на активность L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> , иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	109
3.10.5. Влияние трипсина на активность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	111
3.10.6. Возможность повторного использования L-аспарагиназы <i>Erwinia carotovora</i> иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы.....	114
3.11. Цитотоксическое действие иммобилизованных L-аспарагиназ на клетки опухолей.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	126
ВЫВОДЫ.....	127
БЛАГОДАРНОСТИ.....	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

L-аспарагиназа (L-АСНаза) или L-аспарагин аминогидролаза – это фермент, относящийся к классу гидролаз (КФ 3.5.1.1), который катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака [1]. В настоящее время L-АСНаза используется для лечения острых лимфобластных, миелобластных и миеломонобластных лейкозов, а также лимфосарком и лимфогрануломатоза [2]. Механизм терапевтического действия L-АСНазы основан на истощении запасов критически важной для некоторых опухолей аминокислоты L-аспарагина. В нормальных клетках уровень L-аспарагина, необходимый для клеточного метаболизма и деления, поддерживается ферментом аспарагинсинтетазой (АСНС) [3]. Однако в лейкозных и некоторых других опухолевых клетках уровень синтеза АСНС значительно снижен [4], поэтому данные клетки зависят от поступления L-аспарагина из внеклеточного пространства. Истощение L-аспарагина L-АСНазой в сыворотке крови приводит к нарушению метаболизма, недостаточному белковому синтезу и, в конечном итоге, к гибели опухолевых клеток по пути апоптоза [5].

L-АСНазы, которые на данный момент используются в клинике, – это ферменты, полученные из *Escherichia coli* (*E. coli*, как свободная, так и её пэгилированная формы) и из *Dickeya dadantii* (ранее известная как *Erwinia chrysanthemi*, далее в тексте обозначена как *E. chrysanthemi* ввиду общепринятого упоминания этого видового названия в большинстве публикаций) [6]. Терапевтическая эффективность наиболее часто используемого фермента из *E. coli* снижена из-за относительно высокой гидролитической активности L-глутамина, основной аминокислоты, участвующей в метаболизме аммиака. Высокая глутаминазная активность данного фермента приводит к развитию ряда побочных эффектов [7]. Фермент из *E. chrysanthemi* и гомологичный фермент из *Pectobacterium carotovorum* (ранее известная как *Erwinia carotovora*, поэтому далее в тексте обозначена как *E. carotovora* ввиду общепринятого упоминания этого видового названия в публикациях) создавались как препараты второго ряда терапии при возникновении гиперчувствительности к L-АСНазе из *E. coli*. В то же время L-АСНаза *E. chrysanthemi* обладает меньшей токсичностью и, как следствие, меньшим числом побочных эффектов, однако менее стабильна по сравнению с

ферментом *E. coli* [8]. Следует отметить, что L-АСНазы в нативной форме обладают низкой стабильностью, высокой иммуногенностью и коротким временем полужизни за счёт расщепления протеазами крови [9].

L-АСНазы обладают токсическим действием также в отношении некоторых солидных опухолей. Однако, низкая стабильность L-АСНаз *in vivo*, ограничивает применение данных ферментов для терапии солидных опухолей.

Вышеперечисленные недостатки, связанные с использованием свободной формы фермента, можно преодолеть путём иммобилизации L-АСНаз на различные носители. Иммобилизация способна минимизировать побочные эффекты фермента, такие как иммуногенность и токсичность и повысить стабильность. Первая стратегия иммобилизации основана на заключении фермента внутри защитной структуры или инкапсуляции в липосомы, эритроциты или микрокапсулы. Это позволяет снизить токсичность, продлить период полужизни *in vivo*, обеспечивает целевую доставку и контролируемое высвобождение фермента и не изменяет химическую структуру фермента [10].

Вторая стратегия включает модификацию структуры фермента, такую как ковалентное связывание (конъюгация), адсорбция на носителе и поперечная сшивка фермента [11]. Химическая модификация остатков изменяет гидрофобность и поверхностный заряд фермента, с одной стороны приводя к снижению активности фермента, с другой стороны – увеличению периода полужизни L-АСНаз и замедлению их выведения из организма.

Бактериальную целлюлозу (БЦ) можно использовать в качестве носителя для иммобилизации ферментов благодаря её биосовместимости, нетоксичности и высокой чистоте [12]. БЦ обладает потенциалом в качестве носителя для доставки лекарств и локального высвобождения в месте применения [13]. Так как нативные плёнки БЦ не обладают физико-химическими характеристиками, способствующими длительному высвобождению лекарств, актуальной является разработка её модификаций для иммобилизации L-АСНазы. Наряду с этим, включение функциональных групп в БЦ позволяет ковалентно иммобилизовать фермент для увеличения его стабильности и продолжительности действия. Использование БЦ для локализованной доставки L-АСНазы может быть

перспективной стратегией для противоопухолевой терапии, обеспечивая длительное локальное воздействие фермента на опухолевые клетки.

Степень разработанности темы

На сегодняшний день эффективной стратегией для иммобилизации L-АСНаз является конъюгация с полиэтиленгликолем (ПЭГ) [14]. Однако конъюгаты L-АСНаз часто вызывают реакции гиперчувствительности [8] и не обладают высокой цитотоксической активностью в отношении солидных опухолей [15]. В качестве перспективных носителей для иммобилизации противоопухолевых препаратов значительное внимание исследователей привлекают биополимеры, в частности, БЦ [16]. БЦ уже используется для иммобилизации различных биологически активных веществ для обработки ран и ожогов [17]. На основе нативной БЦ были разработаны трансдермальные таргетные системы для доставки антител к CTLA-4 [13] и антител к 131I- α PD-L1 [18] в опухолевые клетки меланомы. Модифицированные формы БЦ разработаны для таргетных систем доставки доксорубина в перитонеально диссеминированные опухоли [19], а также в опухоли молочной железы [20,21]. Однако в работах не рассматривалась возможность применения БЦ для иммобилизации ферментов, обладающих противоопухолевым действием. В то же время в исследованиях, посвященных использованию БЦ в качестве носителя для различных промышленных ферментов (липаз, лакказ, пероксидаз и др.), выявлено увеличение их стабильности после иммобилизации на БЦ [22–24]. В связи с этим нами предложена разработка различных модификаций БЦ для иммобилизации L-АСНаз с целью увеличения их стабильности и продолжительности действия на клетки опухолей.

Целью данной работы является увеличение стабильности и пролонгирование цитотоксического действия L-АСНаз путём иммобилизации на плёнки БЦ.

Задачи:

1. Иммобилизовать L-АСНазу на нативные плёнки БЦ различного времени выращивания, определить ферментативную активность и продолжительность высвобождения иммобилизованного фермента.
2. Разработать и охарактеризовать модификации плёнок БЦ для увеличения времени высвобождения L-АСНаз.
3. Разработать модификации плёнок БЦ для увеличения стабильности L-АСНаз и оценить влияние денатурирующих факторов на активность иммобилизованного фермента.
4. Определить цитотоксическую активность иммобилизованных L-АСНаз на клетках линий солидных опухолей.

Научная новизна

В работе впервые предложен новый носитель для L-АСНаз – плёнки БЦ. Оптимизирован подход для выращивания плёнок БЦ, со стандартизированными параметрами, пригодными для иммобилизации фермента. Разработаны методики модификации плёнок БЦ, позволяющие иммобилизовать L-АСНазы для увеличения их стабильности и продолжительности действия. Результаты данной работы позволяют использовать L-АСНазу для развития методов энзимотерапии, а именно, для индукции цитотоксичности в опухолевых клетках, изначально не чувствительных к действию этого фермента.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе представлены подходы по улучшению фармакологических свойств терапевтических L-АСНаз за счёт иммобилизации на плёнках БЦ. Разработаны модификации плёнок, способные увеличить продолжительность действия и стабильность фермента к денатурирующим факторам.

Полученные модификации плёнок БЦ с иммобилизованным ферментом L-АСНазой могут использоваться для индукции гибели малочувствительных к действию фермента опухолевых клеток. Разработанные модификации плёнок БЦ и способы иммобилизации L-АСНаз применимы для увеличения продолжительности

действия и стабилизации других терапевтически значимых белков. Представленные в работе подходы могут использоваться для выяснения физиологического действия L-АСНаз на малочувствительные клетки и увеличивают возможности применения данных ферментов в медицине.

Методология и методы исследования

Разработана методология получения нативных, модифицированных хитозаном и окисленных плёнок БЦ. Предложены подходы для физической адсорбции и ковалентной иммобилизации L-АСНаз на плёнках. Для анализа структуры и исследования физико-химических свойств полученных плёнок БЦ использованы методы ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Методы исследования ферментативной активности L-АСНаз использованы для определения продолжительности действия, профиля высвобождения, а также устойчивости фермента к денатурирующим факторам. Применены методики работы с линиями эукариотических клеток для определения цитотоксической активности иммобилизованных L-АСНаз.

Достоверность результатов

Достоверность результатов исследования подтверждена проведением независимых повторных экспериментов, а также статистического анализа. Данные получены с использованием современных методов исследования на сертифицированном оборудовании и реактивов надлежащей чистоты. Предложенные в работе новые методики были предварительно отработаны. Полученные данные не противоречат результатам, опубликованным в отечественной и зарубежной литературе. Результаты работы опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на 27-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2024), Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024), VI Международной конференции «ПОСТГЕНОМ'2024 XI, Российский симпозиум БЕЛКИ И

ПЕПТИДЫ» (Москва, 2024), 78-ой Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» с международным участием (Нижний Новгород, 2025).

Положения, выносимые на защиту

1. Имобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, модифицированные хитозаном, позволяет увеличить время высвобождения L-АСНазы и прологировать действие на опухолевые клетки в два раза по сравнению с нативными плёнками.

2. Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнках БЦ, окисленных NaIO_4 , позволяет увеличить её стабильность и повысить цитотоксическую активность на опухолевые клетки, изначально слабо чувствительные к действию данного фермента.

Личный вклад автора

Соискателем была проанализирована отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автором были предложены методы и осуществлено культивирование продуцента БЦ, проведены модификации плёнок БЦ для увеличения продолжительности действия L-АСНаз, проведены модификации плёнок БЦ для увеличения стабильности L-АСНаз. Автором проведена иммобилизация ферментов методом физической адсорбции и ковалентной сшивкой с БЦ. Автором осуществлено определение продолжительности действия, стабильности и цитотоксичности иммобилизованных L-АСНаз, а также кинетики высвобождения фермента. Автор принимал участие в проведении инфракрасной спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии, а также лично проводил статистический анализ результатов. Автор лично принимал участие в подготовке публикаций.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, из них 6 в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ и 4 работы в сборниках тезисов конференций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Классификация L-аспарагиназ

L-АСНазы широко распространены в природе и встречаются в различных царствах живых организмов [25]. По данным Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 95,5% всех депонированных белковых последовательностей L-АСНазы обнаружены в бактериях, другая часть – в грибах (1,68%), животных (1,25%), растениях (0,24%) и археях (0,88%) [26].

L-АСНазы подразделяются на три основных класса на основании их эволюционного родства: L-АСНазы бактериального типа (класс 1, содержащий типы I и II), L-АСНазы растительного типа (класс 2, содержит тип III) и L-АСНазы ризобиального типа (класс 3, типы IV и V) [27]. На основании наличия каталитических доменов, сходства последовательностей и структурных свойств наиболее тесно связаны друг с другом типы I и II. Типы IV и V объединяют общие структурные свойства. Тип III представляет собой наиболее отличную группу всех L-АСНаз [28].

Среди L-АСНаз тип I выявлен у наибольшего числа видов бактерий, за ним следуют типы II, III, IV и V [28] (Рис. 1). Бактериальные L-АСНазы (типы I, II) отличаются внутри-/внеклеточной локализацией, сродством к субстрату и олигомерной формой [29]. L-АСНазы типа I представляют собой гомодимерный фермент, расположенный в цитоплазме, с низким сродством к L-аспарагину (значения константы Михаэлиса (K_m) гидролиза аспарагина находятся в миллимолярном диапазоне) и относительно высоким сродством к L-глутамину [1]. Цитозольные бактериальные L-АСНазы типа I участвуют в метаболизме азота и экспрессируются конститутивно [30]. Бактериальные L-АСНазы II типа, как правило, гомотетрамерные, расположены в периплазматическом пространстве. Ферменты типа II обладают высоким сродством к L-аспарагину с K_m в микромолярном диапазоне. Помимо L-аспарагина, многие L-АСНазы типа II катализируют гидролиз L-глутамин и нескольких других субстратов, таких как D-аспарагин, D-глутамин, N-ацетил-L-аспарагин и глицин-L-аспарагин [31]. L-

АСНазы типа II участвуют в метаболизме углерода, и их экспрессия индуцируется во время анаэробноза [29].

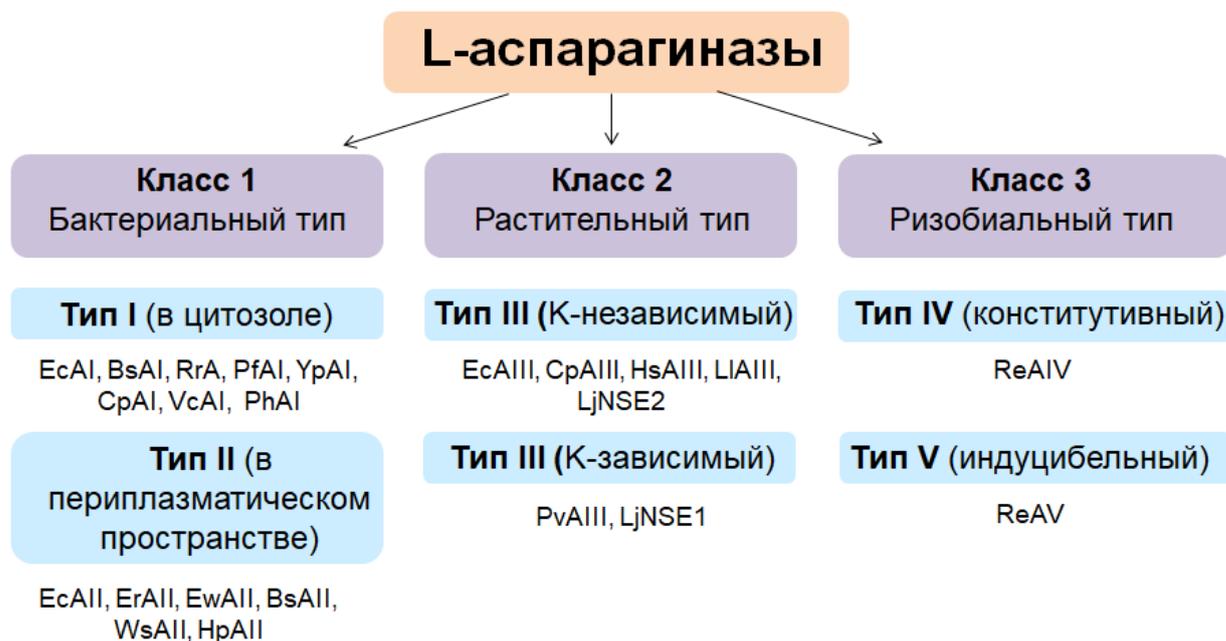


Рисунок 1. Классификация L-АСНаз. Сокращения названий L-АСНаз: EcA – *Esherichia coli*; BsA – *Bacillus subtilis*; RrA – *Rhodospirillum rubrum*; PfA – *Pyrococcus furiosus*; YpA – *Yersinia pestis*; CpA – *Cavia porcellus*; VcA – *Vibrio cholerae*; PhA – *Pyrococcus horikoshii*; ErA – *E. chrysanthemi*; EwA – *E. carotovora*; WsA – *Wolinella succinogenes*; HpA – *Helicobacter pylori*; HsA – *Homo sapiens*; LIA – *Lupinus luteus*; LjNSE – *Lotus japonicas*; PvA – *Phaseolus vulgaris*; ReA – *Rhizobium etli*.

L-АСНазы растительного типа (тип III, класс 2) относятся к суперсемейству N-концевых нуклеофильных гидролаз (Ntn) и обладают аспарагиназой и изоаспартиламинопептидазной активностью. Эти ферменты расположены в периплазматическом пространстве и имеют низкое сродство к L-аспарагину (миллимолярный диапазон K_m) [32]. Ферменты класса 2 имеют очень низкую или неопределяемую глутаминазную активность. L-АСНазы растительного типа подразделяются на K^+ -зависимые и K^+ -независимые. Для проявления каталитической активности K^+ -зависимым L-АСНазам необходимо присутствие K^+ , который участвует в связывании субстрата в активном центре [33]. L-АСНазы типа III присутствуют не только в растениях, но и в микроорганизмах, насекомых и млекопитающих, включая человека (HsAIII) [34].

Среди L-АСНаз ризобиального типа (класс 3) ферменты типа IV экспрессируются конститутивно и являются термостабильными, в то время как ферменты типа V индуцибельные и экспрессируются только в присутствии L-аспарагина и являются термолабильными [30]. L-АСНазы ризобиального типа имеют низкое сродство к L-аспарагину (K_m порядка 4 мМ) и не обладают глутаминазной активностью [35].

1.2. Продуценты L-аспарагиназ

Основными продуцентами L-АСНаз для биотехнологических нужд являются бактерии, нитчатые грибы и дрожжи. Данные микроорганизмы способны быстро расти на простых и недорогих субстратах, а также могут быть легко подвергаются генетическим модификациям, в результате чего облегчается процесс экстракции, очистки и производства [36].

L-АСНазы были обнаружены у 72% бактерий, у оставшихся 28% видов бактерий последовательности белков не содержат известных доменов L-АСНазы [28]. На сегодняшний день наиболее распространёнными продуцентами L-АСНаз являются *E. coli*, *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio succinogenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter spp.*, *Photobacterium spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Proteus vulgaris*, *Streptomyces griseus*, *Melioribacter roseus*, *Rhodospirillum rubrum* [37]. Среди бактерий естественными продуцентами L-АСНаз являются дикие виды *Bacillus* [38].

L-АСНазы также были обнаружены в дрожжах из родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Yarrowia* и *Rhodotorula* и плесневых грибах – *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium* [39]. Штаммы *S. cerevisiae* способны секретировать как внутриклеточные, так и внеклеточные формы L-АСНаз, в то время как L-АСНазы грибов часто секретируются внеклеточно [40]. На данный момент описаны несколько L-АСНаз млекопитающих, самыми известными из них являются L-АСНаза человека (HsAIII) [41] и L-АСНаза морской свинки (SpAIII) [42], которые не обладают глутаминазной активностью, характерной для бактериальных L-АСНаз.

Тем не менее, основными источниками коммерческих терапевтических L-АСНаз являются EcAII и ErAII, так как их ферменты характеризуются высокой специфичностью к L-аспарагину и высокой противоопухолевой активностью. Также потенциальным терапевтическим ферментом является L-АСНаза из *E. carotovora* (EwA) [37], которая обладает специфичностью к L-аспарагину, сравнимой с таковой у L-АСНаз *E. coli* и *E. chrysanthemi*.

При производстве L-АСНаз для достижения более высокого выхода, улучшенной стабильности и более легкой очистки часто используют гетерологичную экспрессию, которая основана на выработке фермента в организме-хозяине, отличном от его естественного источника [27]. Для гетерологической экспрессии L-АСНаз используют в основном такие микроорганизмы, как *E. coli*, *Bacillus subtilis* и *Pichia pastoris* [43].

1.3. Структура L-аспарагиназ

Аспарагиназы класса 1

L-АСНазы различных классов имеют разную архитектуру и олигомерные состояния. Наиболее известные L-АСНазы класса 1 – из *E. coli* (EcAI, EcAII), *E. chrysanthemi* (ErAII), *E. carotovora* (EwA) – представляют собой гомотетрамеры (димеры двух близких димеров). Однако некоторые ферменты типа I функционируют как димеры (например, из *Pyrococcus horikoshii*) или гексамеры (например, из *Thermus thermophilus*). L-АСНазы II типа обладают высоким сходством между собой в аминокислотной последовательности, третичной и четвертичной структуре. Строение активного центра этих ферментов, а также их третичные структуры высококонсервативны [31].

Бактериальные L-АСНазы II типа являются гомотетрамерами с молекулярной массой около 140 кДа. Каждый мономер фермента имеет массу около 36 кДа и состоит из ~330 аминокислотных остатков, включающих 14 β -цепей и 8 α -спиралей, расположенных в двух доменах: большом N-концевом домене и меньшем C-концевом домене. Домены соединены линкером из ~26 остатков. На границах мономеров образуются четыре идентичных активных центра: два между мономерами А и С и два – между мономерами В и D (Рис. 2А). N- и C-концевые домены мономеров участвуют в формировании каждого активного центра, поэтому

гомотетрамеры L-АСНаз описываются как димеры димеров. Каждый димер фермента имеет два кармана активных центров, образованных аминокислотами из обоих мономеров. Димеры удерживаются в основном ван-дер-ваальсовыми и электростатическими силами. Ассоциация двух димеров приводит к образованию тетрамера [36].

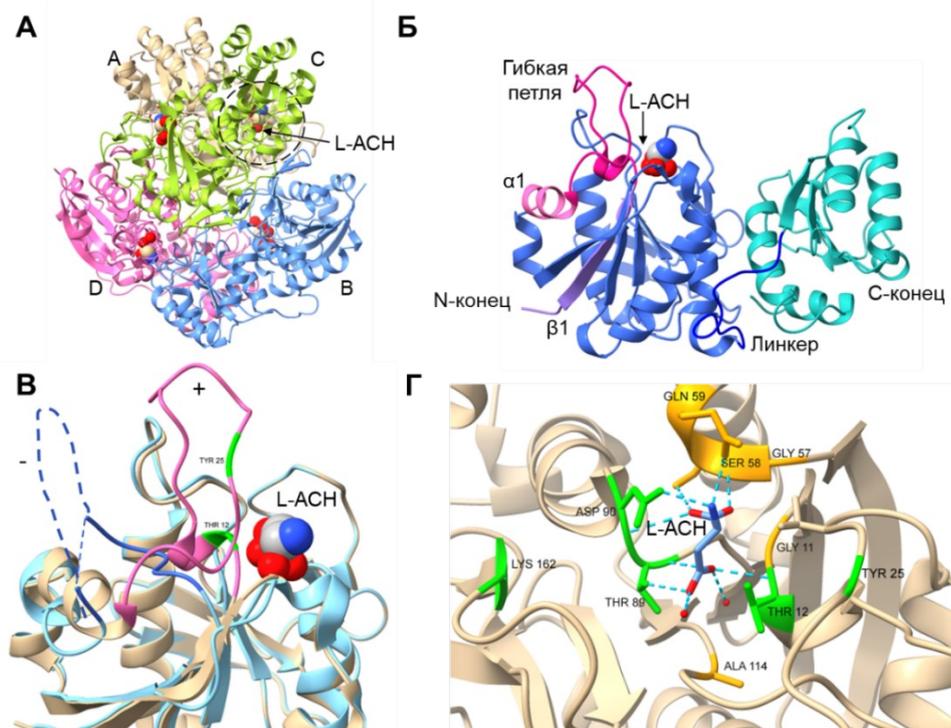


Рисунок 2. Тетрамер ЕсАII и активный центр фермента. (А) Гомотетрамер ЕсАII (PDB ID 3ECA) образован из двух димеров А – С и В – D, между которыми находятся активные центры (отмечены красно-синим цветом). (Б) Структура мономера ЕсАII. N-концевая часть и С-концевая часть связаны линкером (линкер отмечен синим цветом). Гибкая петля отмечена розовым цветом. (В) Сравнение конформационных состояний гибкой петли в присутствии L-аспарагина (L-АСН, «+», PDB ID 3ECA, розовый цвет) и в отсутствии L-аспарагина («-», PDB ID 6V23, голубой цвет, пунктирные линии). (Г) Структура активного центра ЕсАII протомера цепи А. Зелеными цветом показаны аминокислотные остатки, участвующие в катализе (Тре12, Тир25, Тре89, Асп90, Лиз162, Гли283), оранжевым цветом – аминокислотные остатки, участвующие в связывании L-аспарагина (Гли11, Гли57, Сер58, Гли59, Ала114). Пунктирными линиями показаны водородные связи между L-аспарагином и аминокислотными остатками ЕсАII, красными сферами – молекулы воды. Структуры визуализированы в программе ChimeraX 1.9.

Симметрия, обнаруженная в тетрамерах L-АСНаз ЕсАII и ЕгА, совпадает с симметрией ЕwА, а общая конформация мономеров также идентична. ЕwА и ЕгА имеют почти идентичную конформацию мономеров, тогда как между ЕwА и ЕсАII больше отличий. Наибольшие различия обнаружены в гибких частях поверхности, но они менее важны для общей структуры и ориентации активного центра. Одним из важных структурных различий, обнаруженных между ЕwА и ЕсАII, является наличие в ЕсАII одной дисульфидной связи, включающей Цис77 и Цис105 [44].

Активный центр L-АСНаз типа I и типа II имеет общие свойства [31]. Каждый активный центр L-АСНазы состоит из двух частей: жёсткой, в основном участвующей в связывании субстрата, и гибкой, несущей два (Тре12 и Тир25) из шести остатков, участвующих в катализе [36]. Гибкая петля активного центра (остатки 11–31 для ЕсАII) находится между β 1-цепью и α 1-спиралью в N-домене (Рис. 2Б) и действует как «крышка», модулируя сродство к субстрату [1,45]. Индукция активной конформации Тре12 позволяет замыкать гибкую петлю на связывающем кармане при связывании субстрата, так что все каталитически значимые остатки оказываются в непосредственной близости. Закрытие гибкой петли необходимо для стабилизации нуклеофила Тре12, участвующего в катализе, в правильной конформации и сближении его с субстратом (Рис. 2В).

Каталитическая активность бактериальных L-АСНаз связана с двумя каталитическими триадами, состоящими из полярных аминокислот [46]. В каждой каталитической триаде (в ЕсАII это остатки Тре12–Тир25–Глу283 и Тре89–Асп90–Лиз162) находится высококонсервативный Тре, который действует как нуклеофил во время катализа [45] и для активации нуждается во взаимодействии с сильным основанием. Все шесть остатков каталитических триад лежат на неструктурированных участках протомера (Рис. 2Г) [47].

Аспарагиназы класса 2

Ферменты 2 класса синтезируются как один полипептидный предшественник из двух цепей α и β . Цепи α и β ферментов класса 2 соединены высоко варьируемым линкером (156–178 аминокислотные остатки в ЕсАIII), который в процессе созревания подвергается аутопротеолитическому расщеплению [28,48], что приводит к образованию N-концевой α -субъединицы (~20 кДа) и C-концевой β -субъединицы (~15 кДа). После созревания фермент

имеет структуру гетеротетрамера (димера из двух $\alpha\beta$ гетеродимеров), который обладает топологией сэндвича ($\alpha\beta\beta\alpha$). В димере субъединица α состоит из 7 альфа-спиралей и 4 бета-листов, субъединица β состоит из 2 альфа-спиралей и 10 бета-листов (Рис. 3А, Б). Все L-АСНазы класса 2 обладают стабилизационной петлей с Na^+ для поддержания паттерна водородных связей в активном центре (Рис. 3В).

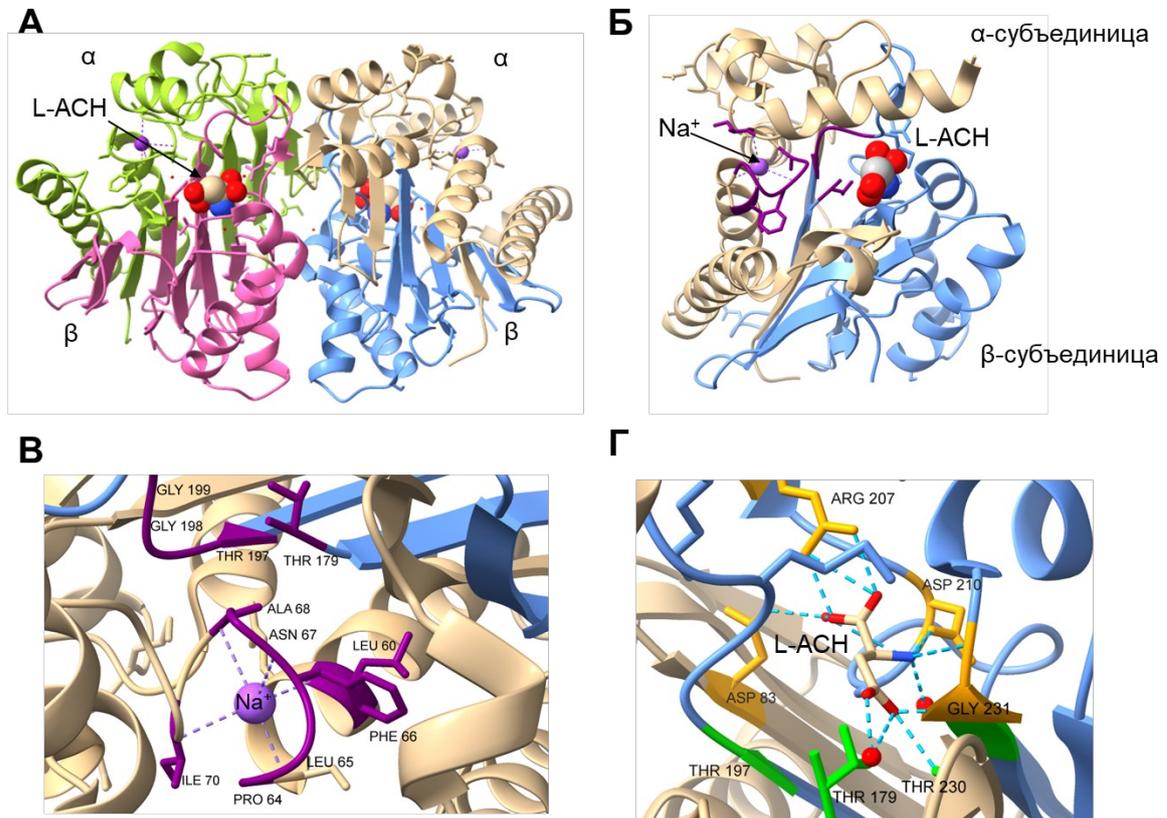


Рисунок 3. Структура ЕсАIII. (А) Тетрамер ЕсАIII (PDB 2ZAL) состоит из двух гетеродимеров. Гетеродимеры состоят из α (отмечены бежевым и зеленым цветом) и β (отмечены голубым и розовым цветом) субъединиц. (Б) Стабилизирующая петля в α -субъединице (отмечена фиолетовым). Na^+ в петле показан в виде фиолетовой сферы. (В) Детальный вид стабилизационной петли ЕсАIII. Координационные связи Na^+ с аминокислотами петли отмечены пунктирными фиолетовыми линиями. (Г) Активный центр ЕсАIII. Аминокислотные остатки, участвующие в катализе (Тре179, Тре197, Тре230), отмечены зеленым, оранжевым – аминокислотные остатки (Асп83, Арг207, Асп210, Гли231), участвующие в связывании субстрата/продукта. Пунктирными линиями показаны водородные между L-аспарагином и аминокислотными остатками ЕсАIII, красными сферами – молекулы воды. Структуры визуализированы в программе ChimeraX 1.9.

Стабилизационная петля расположена вблизи активного центра в α -цепи и создает позиционный замок на каталитическом остатке Тре179, образуя водородную связь между его свободной аминогруппой и соседним остатком Асн67, связанным с Na^+ . Это взаимодействие необходимо для правильной ориентации Тре179. Калий-зависимые ферменты также обладают активационной петлей с K^+ . Эта активационная петля может переключать фермент между активным и неактивным состояниями в присутствии/отсутствии K^+ [30].

Активный центр ЕсАIII расположен в субъединице β между двумя бета-слоями, окруженными с каждой стороны слоем альфа-спиралей, и включает треониновую триаду: Тре179–Тре197–Тре230 (Рис. 3Б, Г). Тре230 и Тре179 стабилизируют γ -карбоксильную группу субстрата или продукта. Другие остатки, участвующие в связывании субстрата/продукта, расположены в непосредственной близости: Арг207, Гли233, Асп210, Гли231, Сер211 и Асп83. Эти остатки участвуют в связывании α -аминогруппы субстрата или продукта посредством водородных связей [49].

L-АСНаза человека (HsAIII) имеет высокую степень структурной гомологии с бактериальной ЕсАIII [48]. Эукариотические L-АСНазы могут существовать в мономерной или димерной форме. Образование димеров в эукариотических L-АСНазах, сходное с таковым в бактериальных L-АСНазах, может влиять на стабильность фермента, субстратную специфичность и общую каталитическую активность. В их активном центре находятся аминокислотные остатки Сер или Тре [50].

Аспарагиназы класса 3

К L-АСНазам 3 класса, согласно недавно предложенной классификации, относятся ферменты *R. etli* (ризобияльные L-АСНазы), которые подразделяются на ReAIV (конститутивные) и ReAV (индуцибельные) [30]. Ферменты класса 3 имеют структуру, которая не имеет гомологии с известными L-АСНазами классов 1 и 2 [28] и является наименее изученной среди всех классов L-АСНаз. Кристаллические структуры ReAV обладают сходством с глутаминазами из *Bacillus subtilis* (1mki), *E. coli* (1u60) и *Micrococcus luteus* (3if5), β -лактамазами из *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptomyces clavuligerus* и пептидогликан гликозилтрансферазой из *Atopobium parvulum* [35].

ReAIV имеет оптимум pH 9–11 и $K_m = 1,3$ мМ (при pH = 9,0) [51], в то время как ReAV является ферментом с аллостерической регуляцией (металлопротеин) с K_m 4,2 мМ при таких же значениях pH. ReAV представляет собой димер, активный центр которого содержит высоко специфичный сайт связывания Zn^{2+} (Рис. 4А).

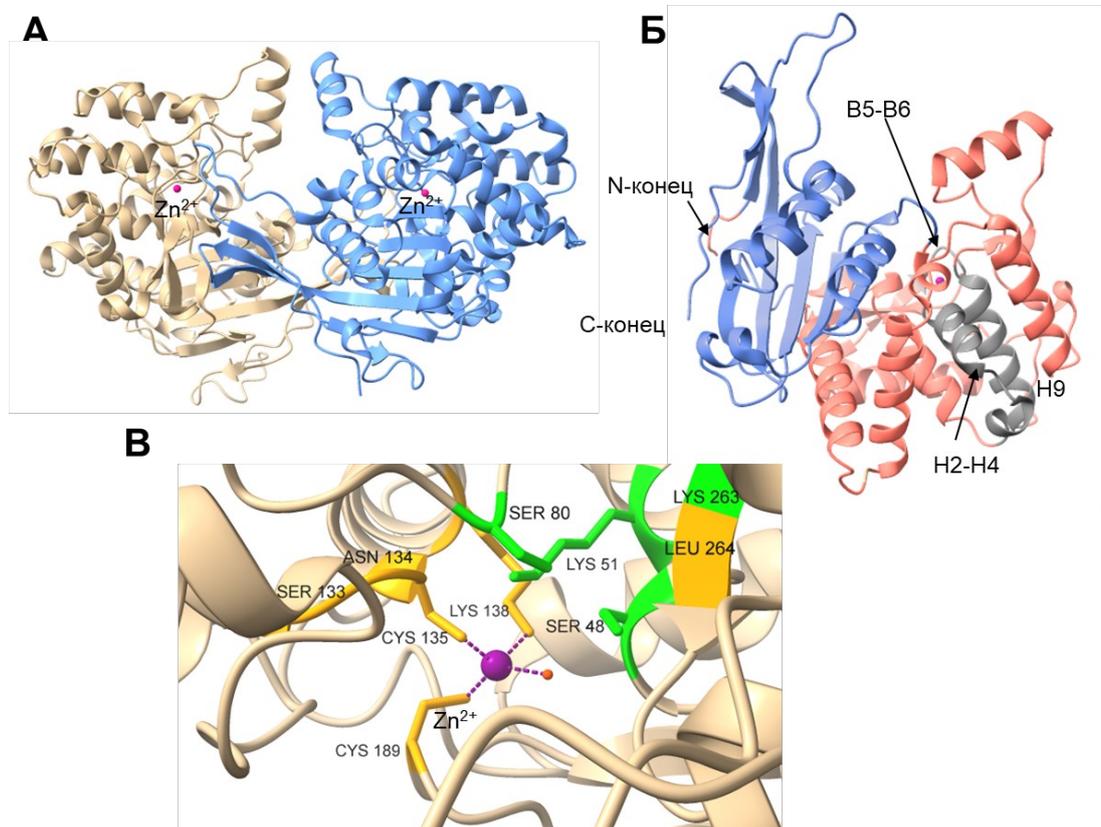


Рисунок 4. Структура димера и активного центра ReAV. (А) Экспериментальная кристаллическая структура димера ReAV (PDB ID 7OZ6). (Б) Доменная структура мономера ReAV. Каталитический домен отмечен темно-розовым цветом, стабилизационный домен – сиреневым цветом. Серым цветом показаны участки, который формируют активный центр (H2, H4, H9 и петля между B5-B6) (В) Экспериментальная кристаллическая структура активного центра ReAV (PDB ID – 7OU1). Аминокислотные остатки, участвующие в катализе (Сер48, Сер80, Лиз51 и Лиз263), отмечены зеленым, оранжевым – аминокислотные остатки (Сер133, Асн134, Цис135, Лиз138, Цис189, Лей264), участвующие в связывании субстрата/продукта. Розовым отмечен Zn^{2+} . Структуры визуализированы в программе ChimeraX 1.9.

Протомер ReAV имеет α/β -доменную структуру из каталитического домена, состоящего в основном из α -спиралей и содержащего активный сайт, и

стабилизирующего домена, состоящего в основном из антипараллельных β -слоев (Рис. 4Б). Zn^{2+} был обнаружен около спирали Н9 и петли, соединяющей нити В5–В6, с тетраэдрической координационной сферой, образованной Цис135, Лиз138, Цис189 и молекулой воды (Рис. 4Б). Роль Zn^{2+} в каталитическом действии ReAV пока что не выяснена.

Вблизи сайта связывания Zn^{2+} находится предполагаемый активный сайт, который расположен в середине α -спирального домена, в щели, окруженной спиралями Н2, Н4, Н9 и петлей, соединяющей В5-В6 слои (Рис. 4Б). Активный центр включает два тандема каталитических нуклеофилов Сер-Лиз (Сер48, Сер80, Лиз51 и Лиз263, Рис. 4В), все из которых соединены сетью водородных связей с Zn^{2+} , и три молекулы воды вблизи Сер48. Сер48 запускает нуклеофильную атаку на амидную группу субстрата [35]. Для ReAIV предполагаемым каталитическим нуклеофилом является Сер47, который является частью двух тандемов Сер-Лиз в активном центре [51].

1.4. Механизм каталитического действия L-аспарагиназ

Существуют два основных каталитических механизма, описанных для L-АСНаз: механизм двойного замещения и механизм прямого (одинарного) замещения. Для бактериальных ферментов класса 1 характерен механизм двойного замещения (реакция двойного нуклеофильного замещения «пинг-понг»), который осуществляется через образование ковалентного ацил-ферментного промежуточного продукта (Рис. 5А, Б). Данный механизм действия подобен механизму действия классических сериновых протеаз, активность которых зависит от набора аминокислотных остатков, известных как «каталитическая триада» [52].

Реакция гидролиза L-аспарагина бактериальными L-АСНазами по механизму двойного замещения состоит из двух этапов (Рис. 5А) [53].

На первом этапе при взаимодействии L-АСНазы с субстратом происходит поляризация гидроксильных групп расположенного в активного центре нуклеофильного остатка Тре. Далее активированный нуклеофильный остаток фермента Тре атакует амидный углерод L-аспарагина с образованием ковалентного ацил-ферментного промежуточного продукта. В то же время молекула аммиака отщепляется от субстрата. Из-за выхода аммиака из активного центра этот

каталитический этап необратим [37]. Высвобождение аммиака инициирует второй этап замещения [30]. Второй этап обратим и включает нуклеофильную атаку молекулой воды ацил-ферментного комплекса и его гидролиз с образованием L-аспарагиновой кислоты и высвобождением аммиака [54]. Для ферментов класса 2 основные каталитические этапы аналогичны этапам механизма двойного замещения для ферментов класса 1 [34].

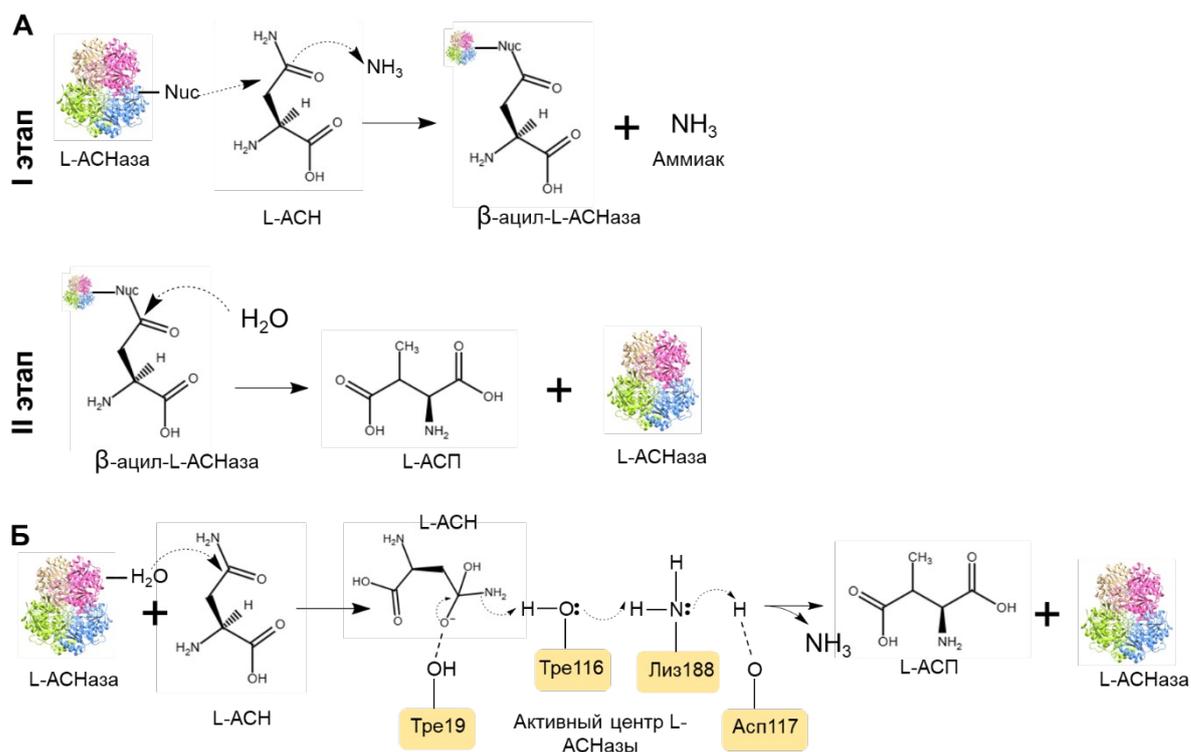


Рисунок 5. Механизмы каталитического действия L-ACНаз. (А) Основные этапы механизма двойного замещения. На первом этапе в результате взаимодействия нуклеофильного Тре с амидной группой L-аспарагина (L-АСН) образуется два продукта: 1) промежуточный продукт – ацил-фермент и 2) молекула аммиака, которая отщепляется от субстрата. На втором этапе происходит гидролиз ацил-фермента с образованием L-аспарагиновой кислоты и высвобождением L-ACНазы. (Б) Схема механизма прямого замещения. Молекула воды напрямую атакует боковую цепь L-аспарагина. Аммиак и L-аспарагиновая кислота высвобождаются одновременно. L-АСН – L-аспарагин, L-АСП – L-аспарагиновая кислота. Адаптировано по материалам статей Nunes et al. [37] и Lubkowski et al. [52].

Механизм прямого замещения был выявлен у L-АСНазы морской свинки [53]. Главное различие между механизмами двойного и прямого замещения заключается в том, что в механизме двойного замещения образуется промежуточный продукт – β -ацил-фермент [54], то есть при механизме прямого замещения фермент не взаимодействует химически с субстратом (Рис. 5Б). В активном центре L-АСНазы находятся две молекулы воды, одна из которых является нуклеофилом. Эта вода взаимодействует с несколькими остатками активного центра фермента, из которых наиболее значимым является Асп117. Асп117 инициирует реакцию гидролиза, действуя как основание и отрывая протон от воды, в результате чего субстрат оказывается в тетраэдрическом переходном состоянии. Далее активированная молекула воды напрямую атакует карбонильную группу боковой цепи L-аспарагина. Отрыв аминогруппы от L-аспарагина фермента стимулируется отдачей протона от Тре116. Протонный челнок от Асп117 через Лиз188 репротонирует Тре116 и восстанавливает Асп117. После этого оба продукта, аммиак и L-аспарагиновая кислота высвобождаются одновременно из активного сайта [53]. Подобно первому механизму, гидролиз L-аспарагина является необратимым.

Природа каталитического механизма не связана напрямую с терапевтическими свойствами L-АСНаз. Тем не менее, обнаружено несколько других гидролаз, использующих остаток боковой цепи Тре в качестве нуклеофила и во всех таких случаях этот остаток расположен на N-конце и активируется собственной α -аминогруппой [31].

1.5. Механизмы противоопухолевого действия L-аспарагиназ

Противоопухолевая активность L-АСНазы в первую очередь зависит от ее способности расщеплять внеклеточный L-аспарагин, который необходим для роста опухолевых клеток. В результате расщепления L-аспарагина в плазме крови при действии L-АСНаз может происходить ингибирование синтеза белка, остановка клеточного цикла (обычно в фазе G1), а также индукция апоптоза в восприимчивых опухолевых клетках (Рис. 6) [55]. Считается, что расщепление L-аспарагина в плазме крови, вызванное L-АСНазой, является эффективной терапией для тех опухолей, которые экспрессируют АСНС на низком уровне. При этом в нескольких

исследованиях была установлена отрицательная корреляция между эффективностью действия L-АСНазы и высокой экспрессией АСНС. Поэтому высокая экспрессия АСНС является одним из маркёров для клинического прогнозирования резистентности к действию L-АСНазы [56].

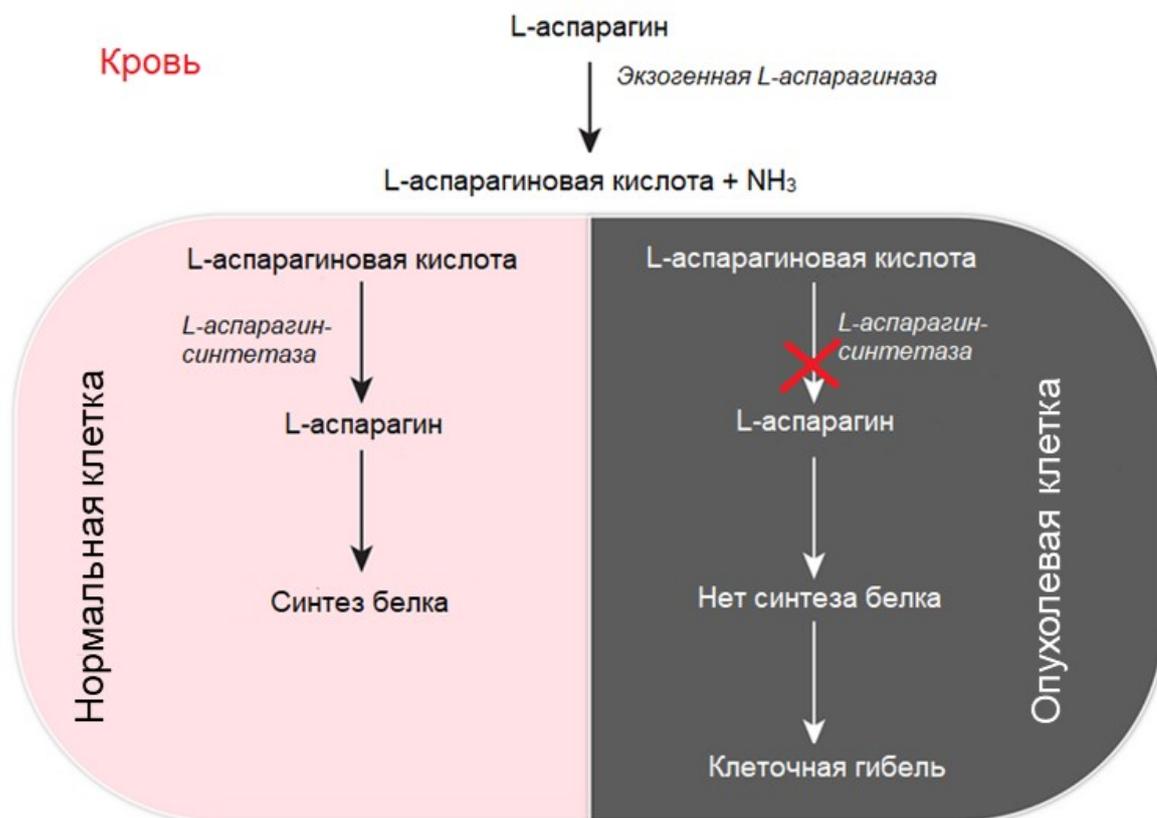


Рисунок 6. Основной механизм действия L-АСНазы на опухолевые клетки.

L-АСНазы также способны расщеплять внеклеточный L-глутамин, поэтому при снижении уровня внеклеточного L-глутамин опухолевые клетки становятся зависимыми от поступления L-аспарагина. Несмотря на то что в большинстве работ основное внимание исследователи уделяют получению L-АСНаз с уменьшенной глутаминазной активностью, недавно было высказано предположение, что устойчивый и длительный противоопухолевый эффект L-АСНазы может проявляться только при наличии глутаминазной активности [57]. Так, некоторые солидные опухоли демонстрируют высокие показатели потребления глутамин для биосинтеза белка и пролиферации клеток и имеют высокую восприимчивость к истощению глутамин. Это особенно характерно для аденокарциномы протоков поджелудочной железы, у которой в 95% случаев присутствуют мутации в протоонкогене KRAS (Kirsten rat sarcoma virus, вирус

саркомы крыс Кирстен), что приводит к перепрограммированию клеточного метаболизма и зависимости от поступления глутамина [58].

Также были получены данные о вкладе L-АСНазы в уменьшение метастазирования за счёт ингибирования эпителиально-мезенхимального перехода. Приобретение мезенхимальных свойств опухолевыми клетками способствует их отрыву от первичной опухоли и облегчает их последующую миграцию, способствуя метастатическому прогрессированию [59]. На мышинной модели рака молочной железы показано, что уровень L-аспарагина может влиять на метастазирование посредством ингибирования синтеза белков, имеющих в составе повышенное содержание L-аспарагина и ответственных за эпителиально-мезенхимальный переход [60].

Основной мишенью L-АСНазы при истощении пула внеклеточного L-аспарагина и глутамина является mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина у млекопитающих) – протеинкиназа серин-треониновой специфичности, фосфорилирующая белки. По сравнению с другими аминокислотами L-аспарагин может активировать mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1, мишень рапамицинового комплекса 1 у млекопитающих), который способствует росту клеток. Нерманова и др. показали, что L-АСНаза способна ингибировать активность комплекса mTORC1 за счёт снижения уровня L-аспарагина в лейкозных клетках через активацию RagB (Ras-related GTP-binding protein B, Ras-родственный ГТФ-связывающий белок B). Ингибирование mTORC1 приводило к уменьшению синтеза пиримидинов и аутофагии лейкозных клеток [61].

Другой механизм действия L-АСНазы был показан на клетках глиобластомы SF188, которые обладают высокой чувствительностью к ферменту. В этих клетках обработка L-АСНазой приводила к уменьшению митохондриального мембранного потенциала, в результате чего увеличивался уровень проапоптотических белков семейства антиапоптотических белков маркеров В-клеточной лимфомы-2 (BCL-2, B-cell lymphoma-2) и активировался внутренний путь апоптоза [62].

В ряде работ описан механизм прямого воздействия L-АСНазы на опухолевые клетки путем расщепления L-аспарагина в составе гликопротеиновых мембранных рецепторов (CD19, CD40, IGF-R), а также их пептидных спейсеров на

поверхности злокачественных гематологических клеток. В результате расщепления гликозидной части эти рецепторы уже не могут связываться со своими лигандами и стимулировать пролиферацию раковых клеток [63].

Некоторые L-АСНазы обладают способностью напрямую проникать в опухолевые клетки. Например, L-АСНаза из *Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) может проникать в ядро опухолевых клеток через клатриновый рецептор-зависимый путь, что приводит к подавлению теломеразной активности в клеточных линиях опухолей и ксенотрансплантатов солидных опухолей человека [64].

1.6. Клиническое применение L-аспарагиназ

L-АСНаза – первый терапевтический фермент с противоопухолевыми свойствами, который был широко изучен исследователями и учёными по всему миру. L-АСНаза была впервые обнаружена Лангом в 1904 г. В 1922 г. Клементи выявил присутствие L-АСНазы в сыворотке крови морской свинки. В 1961 г. Брум обнаружил, что L-АСНаза, выделенная из сыворотки морской свинки, имеет противоопухолевую активность в отношении клеток лимфомы 6С3НED. В 1964 г. Машберн и др. показали, что L-АСНаза, продуцируемая бактериями *E. coli*, обладает такой же противоопухолевой активностью, как и фермент, выделенный из сыворотки морской свинки [65]. Препарат L-АСНазы *E. coli* (ЕсАII) стал использоваться для лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) с конца 1970-х годов. В 2011 году агенство FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) одобрили L-АСНазу ЕгАII для лечения ОЛЛ [57]. В настоящее время на рынке доступны пять препаратов на основе L-АСНаз. Четыре препарата L-АСНазы получены из *E. coli*: в виде нативной формы (Элспар, Лейназа, Кидролаза) и конъюгированной с ПЭГ – Онкаспар. Пятый препарат получен из бактерии *E. chrysanthemi* (Табл. 1) [66].

Нативная и пэгилированная формы L-АСНазы ЕсАII являются препаратами первой линии терапии для лечения ОЛЛ. Основными параметрами, необходимыми для первичной оценки терапевтического потенциала L-АСНаз, являются такие кинетические параметры, как K_m , число оборотов (K_{cat}) и максимальная скорость (V_{max}). Эти параметры дают представление о сродстве фермента к субстрату [69].

Таблица 1. Список коммерческих препаратов L-АСНаз и их основные свойства

Источник	Коммерческое название препаратов	Удельная активность (МЕ/мг белка)	K_m (мкМ) L-аспарагин	K_m (мМ) L-глутамин	Время полужизни
ЕсАII	Элспар, Кидролаза, Лейназа, Коласпаза, Спектрила	400–600	10	6,25	8–30 ч [67]
ЕгАII	Эрвиназа, Крисантаспаза	330–350	48	1,10	8–22 ч [67]
PEG-ЕсАII	Пегаспаргаза (онкаспар), Каласпаргаза пегол (аспарлас)	400–600	10	более 3	5–7 дней [68]

Противоопухолевая активность L-АСНаз зависит от скорости клиренса фермента, выработке антител к этому микробному белку, потенциального развития резистентности и способности опухолевых клеток синтезировать L-аспарагин *de novo* [70].

L-АСНазы как типа I, так и типа II характеризуются наличием как аспарагиназной, так и глутаминазной ферментативной активности. Тем не менее, для L-АСНаз, используемых в клинике, значение K_m для L-аспарагина должно находиться в микромолярном диапазоне, поскольку концентрация L-аспарагина в крови человека составляет около 50 мкМ. L-АСНазы типа II (ЕсАII, ЕгАII) имеют высокое сродство к L-аспарагину (Табл. 1), поэтому используются в качестве химиотерапевтических средств при лечении ОЛЛ [71].

Глутаминазная активность L-АСНаз ЕсАII и ЕгАII составляет 2 и 10% соответственно от L-аспарагиназной [72]. Глутамин является наиболее распространенной и универсальной заменимой аминокислотой в организме (концентрация в плазме крови 500–800 мкМ), которая имеет основополагающее значение для промежуточного метаболизма, обмена азота в тканях и гомеостаза pH [73]. Наличие глутаминазной активности у L-АСНаз способствует истощению глутамина, который является субстратом для синтеза L-аспарагина *de novo* с помощью фермента АСНС (Рис. 7).

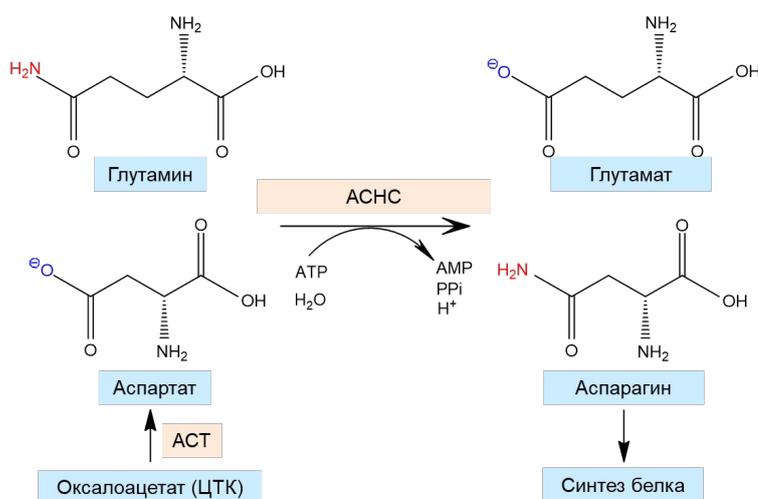


Рисунок 7. Реакция синтеза L-аспарагина из L-аспартата и L-глутамина под действием АСНС. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, АСТ – аспараттрансаминаза.

Клинические исследования показали, что низкий уровень глутамина в сыворотке соотносится с эффективностью лечения L-АСНазой пациентов с рефрактерным ОЛЛ [74].

Глутамин необходим также для роста нормальных клеток, поэтому глутаминазная активность L-АСНаз является причиной развития побочных эффектов со стороны иммунной системы, включая реакции гиперчувствительности, лихорадку, кожную сыпь, аллергические реакции и анафилактический шок. Побочные эффекты, связанные с неиммунной токсичностью (панкреатит, гепатотоксичность, коагулопатия и нейротоксичность), встречаются реже, но могут развиваться с большей степенью тяжести [6]. Клинические реакции гиперчувствительности и скрытая инактивация из-за

выработки антител к L-АСНазе ЕсАII приводят к её инактивации в 60% случаев [75].

L-АСНаза ЕгАII используется в качестве препарата второй или третьей линии в европейских и американских протоколах при развитии реакций гиперчувствительности или скрытой аллергии к L-АСНазе ЕсАII [75]. Тем не менее, период полужизни L-АСНазы ЕгАII составляет 8–24 ч, что требует более частого введения препарата [76].

L-АСНаза ЕwА проявляет очень низкую глутаминазную активность – около 1,5% от ее аспарагиназной активности, подобно L-АСНазе ЕсАII. С другой стороны, аминокислотная последовательность ЕwА больше похожа на последовательность ЕгАII (75–77% идентичности), которая вызывает меньше серьезных иммуноопосредованных побочных эффектов [77]. Удельная аспарагиназная активность L-АСНазы ЕwА по разным данным варьирует от 386 МЕ/мг [78] до 595 МЕ/мг, что сравнимо с активностями коммерческими препаратами ЕсАII и ЕгАII. Поэтому ЕwА может рассматриваться в качестве перспективного терапевтического средства.

На основе L-АСНазы *E. coli*, конъюгированной с монометоксиполиэтиленгликолем (мПЭГ, 5 кДа), разработан препарат «Онкаспар» (пэгаспарагаза). В пэгаспарагазе 69–82 молекулы цепей ПЭГ ковалентно присоединены к боковым цепям аминокислот цистеина L-АСНазы [79]. Препарат «Онкаспар» был одобрен FDA в 1994 году для лечения пациентов с ОЛЛ, имеющих аллергические реакции на L-АСНазу. Активность пэгаспарагазы сравнима с активностью нативного фермента, но по сравнению с ним пэгаспараза имеет меньшую иммуногенность и более длительное время циркуляции в кровотоке [80]. Период полужизни пэгаспарагазы составляет приблизительно 6 дней, что более чем в 5 раз дольше, чем у нативной L-АСНазы ЕсАII (20 ч) и в 9 раз дольше, чем у L-АСНазы ЕгАII [81]. Однако, несмотря на более продолжительное действие, уровень пэгаспарагазы в сыворотке не коррелируют с истощением L-аспарагина [68]. В одном из открытых рандомизированных клинических исследований фазы I на 21-й день predetermined целевой порог активности L-АСНазы, превышающий 0,1 МЕ/мл (т. е. уровень активности, считающийся адекватным для истощения L-

аспарагина), наблюдался у 91–95% пациентов, получающих пегаспаргазу по сравнению с 19–22% пациентов, получающих L-АСНазу ЕсАII [82].

При использовании пегаспаразы часто наблюдаются побочные эффекты различной степени тяжести. У взрослых с ОЛЛ они развиваются чаще, чем у детей, особенно гепатотоксичность и дисфункция поджелудочной железы. Частота реакций гиперчувствительности при применении пегаспаргазы и не модифицированной L-АСНазы ЕсАII была сопоставимой: у 30–40% пациентов развиваются реакции гиперчувствительности [8]. Предполагается, что использование пегаспаргазы во время индукционной фазы поможет снизить последующий риск реакций гиперчувствительности независимо от препарата L-АСНазы, используемого на последующих фазах лечения [83].

Другой формой пэгилированной L-АСНазы является каласпараза [84]. Каласпаргаза пегол (аспарлас) – форма пэгилированной L-АСНазы, одобренная FDA в 2018 году. Препарат содержит L-АСНазу ЕсАII и полиэтиленгликолевую часть. Однако, для каласпаргазы используется сукцинимидилкарбонатный линкер, который более стабилен, чем сукцинимидилсукцинатный линкер в пегаспаразе. Уретановые связи в каласпаргазе, образованные с группами лизинов, более устойчивы к гидролизу. Каласпаргаза и пегаспараза имеют сопоставимые фармакокинетические и фармакодинамические свойства в доклинических исследованиях [85].

Текущие исследования направлены на поиск новых источников L-АСНаз и разработку новых вариантов рекомбинантных L-АСНаз с высокой активностью, низкой иммуногенностью и длительным периодом полужизни [86].

1.7. Чувствительность опухолей к L-аспарагиназам

Низкая экспрессия *АСНС* или её отсутствие определяет чувствительность опухолей к терапии L-АСНазой. Недавно было показано, что гиперметилование промотора *АСНС* предотвращает экспрессию белка *АСНС* в клетках ОЛЛ при дефиците аминокислот. Большинство клеток ОЛЛ обладают низкой экспрессией *АСНС*, поэтому L-АСНаза лучше подходит для лечения лейкемии, особенно лимфобластомы, чем других видов рака [3]. На данный момент предполагается, что метилирование промотора *АСНС* в сочетании с экспрессией *АСНС* служит

биомаркером для прогнозирования чувствительности L-АСНазе [6]. Степень метилирования промотора *АСНС* сильно коррелирует с чувствительностью к L-АСНазе и терапевтическим прогнозом при детском Т-клеточном ОЛЛ (Т-ОЛЛ). Гипометилирование промотора связано с резистентностью к L-АСНазе и является плохим прогностическим биомаркером при Т-ОЛЛ [87]. Уровни экспрессии *АСНС* положительно связаны с частотой рецидивов и отрицательно связаны с выживаемостью при опухолях молочной железы [88]. Тем не менее, в нескольких доклинических исследованиях было выявлено, что терапия, нацеленная на метаболизм L-аспарагина, может быть эффективна против некоторых солидных опухолей [15].

1.7.1. Чувствительные группы солидных опухолей

На данный момент L-АСНаза исследуется для лечения различных солидных опухолей с низкой экспрессией *АСНС*, включая светлоклеточную карциному яичников, панкреатическую протоковую аденокарциному, колоректальный рак и глиобластому [6] и других. Недавние исследования показали эффективность L-АСНаз на некоторых клеточных линиях солидных опухолей: педиатрической глиобластомы [62], колоректального рака [89], гепатоцеллюлярной карциномы [90], рака лёгкого [91], рака яичников [92], рака поджелудочной железы [58], меланомы [93], рака молочной железы [94], аденокарциномы лёгких, карциномы печени НерG2 и аденокарциномы простаты [15]. Анализ метаболома 928 клеточных линий показал, что более низкие уровни L-аспарагина, вызванные подавлением экспрессии *АСНС*, сенсibiliзируют подгруппу клеточных линий рака желудка и гепатоцеллюлярной карциномы, и что чрезмерное метилирование *АСНС* приводит к отсутствию экспрессии белка *АСНС*, что делает их восприимчивыми к L-АСНазе как *in vitro*, так и *in vivo* [95]. Однако трансляционная значимость этих исследований еще не подтверждена [96]. Тем не менее, L-АСНазы показали эффективность против некоторых солидных опухолей *in vivo*. L-АСНа ЕсА II была эффективна в свободной форме при лечении гепатоцеллюлярной карциномы [97] и колоректального рака [98]. ЕсА II, инкапсулированная в наночастицы с ротеноном была эффективна против трижды негативного рака молочной железы и колоректального рака [89], а инкапсулированная в эритроциты – против протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [99]. Кризантаспаза

была эффективна против гепатоцеллюлярной карциномы с мутацией гена, кодирующего β -катенин [100]. В 2024 году были начаты клинические исследования фазы I использования L-АСНазы совместно с ингибитором митоген-активируемой протеинкиназы киназы МЕК (MAPK/ERK, mitogen-activated protein kinase kinase) кобиметинибом для лечения рака поджелудочной железы [101], а также клинические исследования фазы I применения L-АСНазы для лечения запущенных или метастатических солидных опухолей [102].

1.7.2. Резистентность к действию L-аспарагиназ, компенсаторные механизмы солидных опухолей и стратегии преодоления резистентности

Хотя некоторые солидные опухоли имеют низкую экспрессию *АСНС* и чувствительны к действию L-АСНаз, большинство солидных опухолей обладают устойчивостью за счёт высокой экспрессии *АСНС*. Наиболее высокая экспрессия *АСНС* среди всех солидных опухолей была выявлена в ацинарных клетках поджелудочной железы. Также высокая экспрессия *АСНС* характерна для клеток рака лёгкого, тройного негативного рака молочной железы, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и рака носоглотки [103]. В активации транскрипции гена *АСНС* участвуют два сигнальных пути, направленных на обеспечение выживания клеток – защитный механизм, запускаемый в клетках млекопитающих в результате истощения запаса аминокислот (AAR, amino acid response) и повышенный стресс эндоплазматического ретикулума (Рис. 8). Сигнальный путь AAR контролирует экспрессию генов посредством изменений в структуре хроматина, транскрипции и инициации трансляции. Среди сигнальных путей AAR преобладающим сигнальным путём является GCN2-eIF2-ATF4, который активирует транскрипцию *АСНС* во время AAR [104]. Стресс эндоплазматического ретикулума, который активируется клеточными повреждениями, также приводит к увеличению транскрипции *АСНС* через путь UPR [105]. Вследствие активации киназ GCN2 и PERK, (характерных для AAR и UPR сигнальных путей, соответственно) в ответ на реакции стресса происходит фосфорилирование α -субъединицы фактора инициации eIF2. Это приводит к снижению синтеза большинства белков и преимущественной трансляции других белков, включая фактор транскрипции ATF4 [106] (Рис. 8).

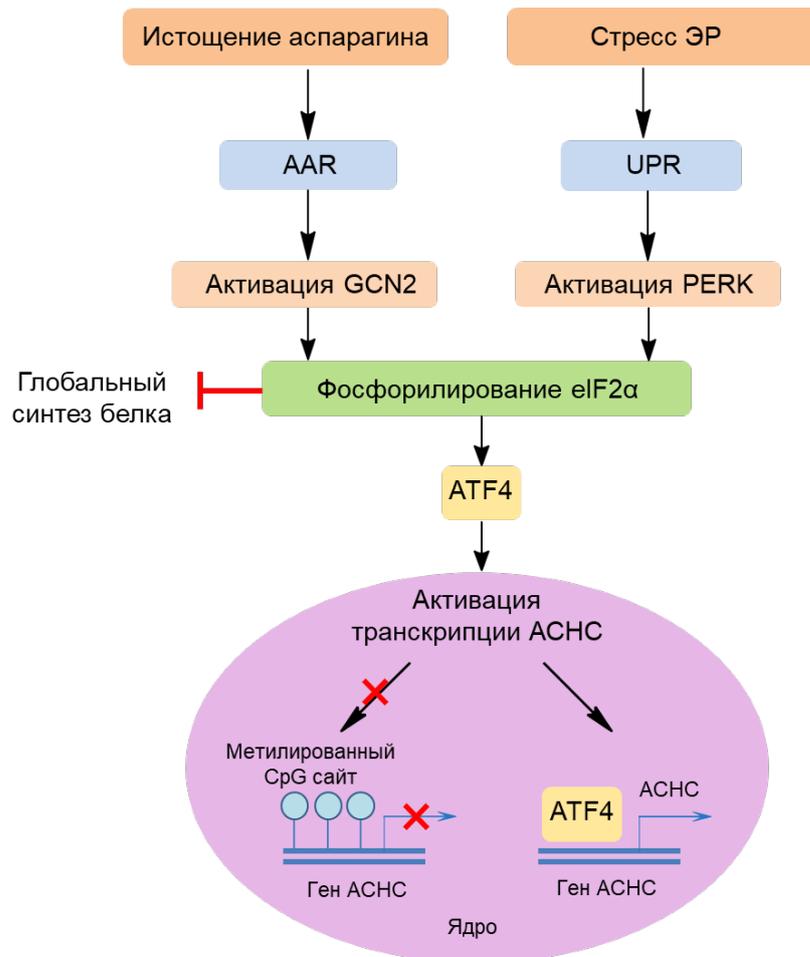


Рисунок 8. Регуляторный механизм экспрессии *AHC* в клетке. Истощение L-аспарагина активирует сигнальный путь AAR, тогда как стресс ЭР активирует UPR путь. В результате активации этих путей увеличивается активность киназы eIF2. Фосфорилирование eIF2α замедляет глобальный синтез белка и увеличивает трансляцию некоторых мРНК, включая транскрипционный фактор ATF4. Связывание ATF4 с элементом энхансера в промоторе гена *AHC* вызывает экспрессию фермента. ЭР – эндоплазматический ретикулум; UPR (unfolded protein response) – путь развернутого белкового ответа; GCN2 (general control nonderepressible 2 kinase) – недерепрессируемая 2-киназа общего контроля; PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase – PKR-подобная киназа ЭР; eIF2α (eukaryotic initiation factor 2) – эукариотический фактор инициации 2α; ATF4 (activating transcription factor 4) – активирующий фактор транскрипции 4. Адаптировано по материалам статьи Hanada et al. [103].

ATF4 является основным фактором индукции экспрессии *AHC*, работая как трансактиватор посредством связывания с энхансером в промоторе *AHC*. В

опухолевых клетках с низким уровнем L-аспарагина происходит увеличение синтеза ATF4 и, следовательно, экспрессии *ACHC* [107]. Разработано несколько ингибиторов GCN2, которые увеличили эффективность действия L-АСНаз при комбинированной терапии ОЛЛ, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака поджелудочной железы и меланомы [6].

В солидных опухолях в дополнение к общему регуляторному механизму экспрессии *ACHC*, были выявлены другие компенсаторные механизмы при истощении L-аспарагина. К ним относятся сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы MAPK (mitogen-activated protein kinase), аутофагия и макропиноцитоз [103], которые могут активироваться при терапии L-АСНазой. Поэтому для воздействия на данные механизмы также разрабатываются различные подходы лечения L-АСНазой в сочетании с ингибиторами этих механизмов. Сигнальный путь MAPK, в частности ось RAS-RAF-MEK-ERK, часто активируется в опухолевых клетках для выживания и устойчивости к терапии. В некоторых клетках L-АСНаза способна ингибировать этот путь за счёт снижения фосфорилирования ERK и последующего снижения транскрипции генов *Bcl-2* и *c-Myc*, что усиливает активацию каспазы-3 и вызывает апоптоз. Кроме того, окислительный стресс, индуцируемый L-АСНазой, приводит к повышению чувствительности раковых клеток к активным формам кислорода (АФК) и усилению апоптоза [108]. В меланоме и опухолях поджелудочной железы резистентность к действию L-АСНазы обусловлена гиперактивацией одного из сигнальных путей MAPK – MEK-ERK, который имеет решающее значение для индукции экспрессии *ACHC*. При этом путь GCN2/eIF2 α активируется для индукции экспрессии ATF4 и нескольких киназ RTK (receptor tyrosine kinase; рецепторная тирозинкиназа), которые инициируют каскад сигналов через ось MAPK/mTORC1. Сигнальный путь MAPK стимулирует активность mTORC1 и последующую трансляцию ATF4 для достижения максимальной индукции ATF4 и экспрессии *ACHC* (Рис. 9) [107].

Для повышения чувствительности опухолей к действию L-АСНазы с гиперактивацией сигнальных путей MAPK разработано несколько подходов. Истощение L-аспарагина в сочетании с подавлением сигнального пути MAPK различными ингибиторами эффективно подавляло рост и метастазирование

меланомы *in vivo* [104]. В частности, на данный момент проводится клиническое исследование I фазы (NCT05034627) о возможности применения ингибитора MEK кобиметиниба в комбинации с каласпаргазой у пациентов с раком поджелудочной железы [101]. Другим направлением, которое развивается для преодоления устойчивости к действию L-АСНазы, является воздействие на иммунные контрольные точки [110].

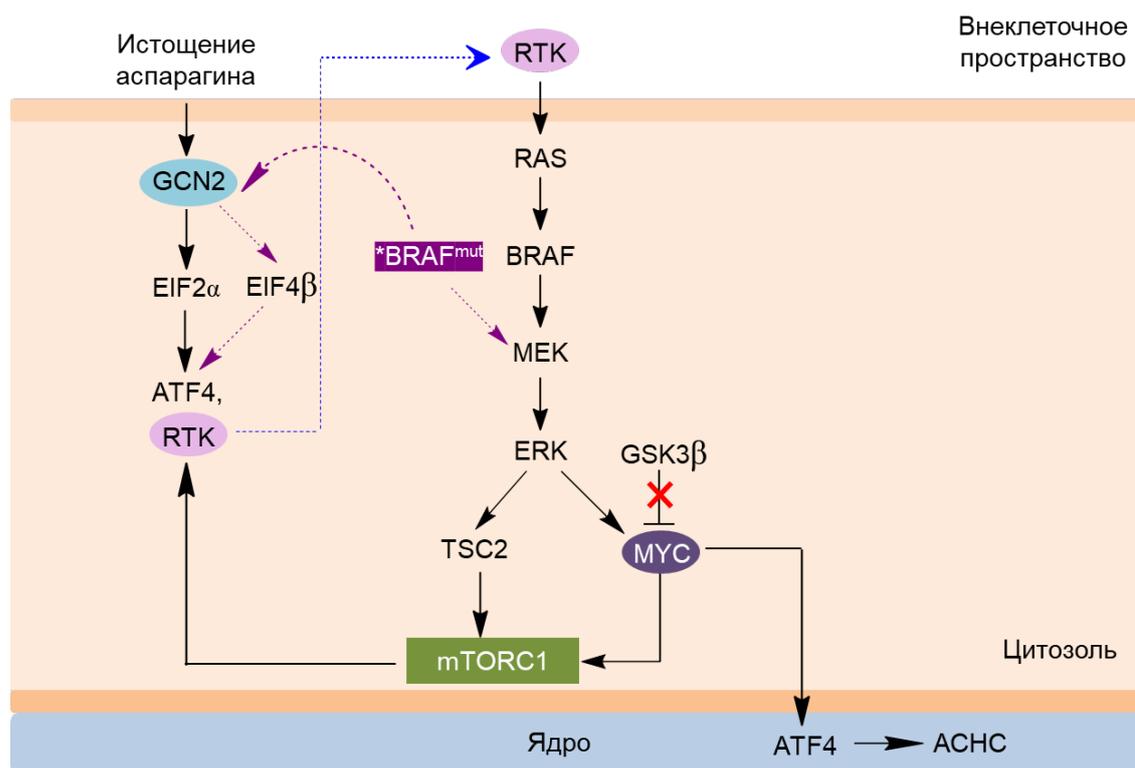


Рисунок 9. Основные регуляторные механизмы истощения L-аспарагина при меланоме. Истощение L-аспарагина вызывает гиперактивацию сигнального пути MAPK (MEK-ERK) и нарушает деградацию с-MYC. с-MYC поддерживает трансляционную индукцию ATF4 и активность mTORC1. Ингибирование MAPK ослабляет трансляционную индукцию ATF4 и экспрессию АСНС. В клетках меланомы онкоген BRAF, имеющий мутацию, напрямую вызывает гиперактивацию нисходящего пути MEK-ERK (фиолетовые стрелки), а также активацию пути GCN2-ATF4, что способствует синтезу L-аспарагина. с-MYC (cellular myelocytomatosis oncogene) – протоонкоген, функционирующий как фактор транскрипции; ERK (Extracellular signal-regulated kinase) – активируемая внеклеточными сигналами киназа. Адаптировано по материалам статьи Pathria et al. [109].

Снижение уровня L-аспарагина за счёт расщепления L-АСНазой приводит к снижению активности mTORC1. Снижение активности mTORC1, в свою очередь, влияет на функционирование Т-клеток, что приводит к уменьшению продукции интерферона-гамма (IFN- γ), окислительному стрессу в иммунных клетках микроокружения опухоли и нарушению противоопухолевого иммунитета. Это позволяет раковым клеткам избежать атаки иммунных клеток [108]. Было показано, что воздействие на регуляторные Т-клетки с помощью L-АСНазы и ингибиторов контрольных точек может повысить эффективность терапии. Доказана эффективность применения слитого белка L-АСНазы и эластина в комбинации с антителом к белку запрограммированной клеточной гибели-1 (apD-1, Programmed cell Death protein 1) [110].

В более позднем исследовании было обнаружено, что активированный путь MAPK ингибирует деградацию протоонкогена c-MYC (протоонкоген, функционирующий как фактор транскрипции), опосредованную гликогенсинтазой киназой-3 бета (GSK3- β), и повышает уровень ATF4 (Рис. 9). Повышенные уровни c-MYC могут поддерживать клетки меланомы в адаптации к ограничению L-аспарагина, способствуя поглощению незаменимых аминокислот и активности mTORC. Мутации в онкогене BRAF играют важную роль в индукции ATF4. BRAF обеспечивает индукцию ATF4, активируя mTOR и eIF4B. В отличие от пути MEK-ERK, этот сигнальный путь остаётся временно активным даже во время лечения ингибиторами BRAF [109]. Подобная регуляция реакции на истощение аминокислот наблюдается в раке легких с мутантным KRAS (протоонкоген, представитель семейства белков Ras), где KRAS регулирует экспрессию ATF4 для поддержания гомеостаза аминокислот [111].

Среди других типов солидных опухолей, устойчивых к действию L-АСНаз, можно выделить колоректальные карциномы, для которых характерна повышенная экспрессия *ASHC* и повышенный уровень L-аспарагина. Уровень L-аспарагина поддерживается в основном за счет сигнального пути KRAS/PI3K/АКТ/mTORC1 и высокой экспрессии транскрипционного фактора SRY-box 12 (SOX12, sex-determining region Y (SRY)-box). В то же время опухолевый супрессор TP53 отрицательно влияет на экспрессию *ASHC* и прогрессирование опухоли [112]. Особенно устойчивыми к действию L-АСНазы являются колоректальные

карциномы с мутациями гена аденоматозного полипоза толстой кишки (*APC*, adenomatous polyposis coli) или β -катенина, которые встречаются у 85% пациентов с данным типом рака. Мутации *APC* избирательно активируют β -катениновую ветвь сигнального пути WNT ниже по течению от гликогенсинтазакиназы 3-зависимого белка (*GSK3*, glycogen synthase kinase 3-dependent protein). *GSK3* способен фосфорилировать большое количество клеточных белков, приводя к их убиквитинированию и деградации, в результате чего постоянно синтезируется свободный L-аспарагин, который предотвращает гибель опухолевых клеток при воздействии L-АСНазой. Тем не менее, селективное ингибирование *GSK3* в сигнальном пути WNT в колоректальных карциномах с мутациями *APC* или β -катенина приводило к гибели опухолевых клеток [113]. Другим механизмом устойчивости колоректального рака к действию L-АСНазы служит макропиноцитоз. В клетках колоректального рака с мутациями *KRAS* дефицит L-аспарагина активирует запуск макропиноцитоза для восстановления внутриклеточного уровня L-аспарагина за счёт расщепления альбумина. Ингибирование макропиноцитоза снижает скорость пролиферации таких клеток [114].

Одним из механизмов, который может активироваться в злокачественных клетках для выживания при обработке L-АСНазой, является аутофагия. Аутофагия возникла в ходе эволюции как процесс, необходимый для выживания клеток в условиях дефицита питательных веществ, в том числе аминокислот. Возникновение аутофагии после обработки L-АСНазой описано при остром миелоидном лейкозе, хроническом миелоидном лейкозе и в клетках некоторых солидных опухолей [91]. В опухолевых клетках (ОЛЛ и некоторых других) при действии L-АСНазы аутофагия регулируется через сигнальные пути АКТ/mTORC и ERK. АКТ блокирует аутофагию через активацию mTOR. mTOR, в свою очередь, ингибирует белки, запускающие аутофагию, через фосфорилирование. Активация пути ERK наоборот положительно регулирует аутофагию. Ингибирование фосфорилирования ERK снижает уровень белка LC3 II (Light Chain 3 II, мембраносвязанной формы белка LC3, ассоциированного с аутофагосомой), тем самым подавляя аутофагию [115]. В исследовании на клеточных линиях аденокарциномы лёгких A549 и H1975 с низкой экспрессией *ASHC* было показано,

что L-АСНаза может не только активировать начальную стадию аутофагии, но и запускать позднюю стадию аутофагии и повышенную экспрессию белка LC3 II. Кроме того, после обработки клеток аденокарциномы легких L-АСНазой было выявлено увеличение уровня АФК, который определял как цитотоксичность L-АСНазы, так и запуск аутофагии. При этом, при добавлении ингибитора аутофагии хлорохина к клеткам, обработанным L-АСНазой, значительно повышалась гибель опухолевых клеток за счёт накопления L-АСНазы в клетках аденокарциномы лёгкого и значительного повышения уровня АФК. В то же время добавление ингибитора АФК N-ацетил-цистеина снижало эффективность действия L-АСНазы и супрессировало аутофагию [91]. В исследованиях на клетках ОЛЛ, глиобластомы, рака яичников и колоректального рака также было выявлено, что ингибирование аутофагии путём введения хлорохина в сочетании с L-АСНазой усиливает ингибирование роста клеток [103].

1.8. Конъюгаты L-аспарагиназ

Ограничения, связанные с использованием нативных форм L-АСНаз, были частично преодолены путём иммобилизации L-АСНаз на различные носители [37] (Рис. 10).

Органические носители занимают ведущее место в иммобилизации L-АСНазы. Их можно разделить на два основных класса: природные и синтетические носители. В качестве природных материалов используют нетоксичные, биосовместимые и биоразлагаемые. Их реактивные функциональные группы (такие, как амино- и гидроксильные группы) легко модифицировать. В литературе описаны такие природные носители для L-АСНазы как целлюлоза, декстран, крахмал, инулин, альгинат, хитозан, альбумин, желатин, коллаген, фиброин шелка и липиды [116]. Конъюгация L-АСНазы и альбумина привела к повышению устойчивости к протеолизу в 20 раз, а также увеличению выживаемости мышей с лимфосаркомой в 2 раза по сравнению с нативным ферментом [117]. В другом конъюгате прикрепление поли(DL-аланиновых) пептидов к остаткам лизина на поверхности L-АСНазы EwA увеличивало в 100 раз время полужизни фермента в плазме у макак-резусов и снижало иммуногенность.

Носители L-аспарагиназ



Рисунок 10. Основные носители для иммобилизации L-АСНаз. Адаптировано по материалам статьи Ulu et al. [116].

В отличие от нативного фермента, модифицированный фермент не вызывал реакции IgE или IgG даже после третичной иммунизации [118]. Для получения L-АСНаз с более длительным действием была разработана и запатентована в 2017 г. стратегия пасилирования (PASylation®). В качестве носителя здесь выступает синтетический полипептид, состоящий из Про-Ала-Сер (PAS) аминокислот, которые в физиологических условиях не имеют упорядоченной структуры и образуют случайную спираль с биофизическими свойствами, похожими на ПЭГ. Из-за химически инертных метильных (Ала) и триметиленовых (Про) боковых групп эти полипептиды не имеют никакой реакционной способности боковой цепи [119].

Второй тип органических носителей, используемых для иммобилизации L-АСНазы, – это синтетические носители. По сравнению с природными органическими носителями для этого класса материалов характерны более разнообразные функциональные группы, гидрофобные и гидрофильные характеристики, а также наличие свободных объемов или пористых структур. Биосовместимые синтетические носители более предпочтительны для ферментов, которые используются в качестве лекарств. Наиболее распространенным синтетическим носителем для L-АСНазы является ПЭГ – неионный полимер с высокой растворимостью в воде и биосовместимостью. ПЭГ пришивается к поверхностным лизинам белка с помощью линкеров в процессе, который называется пэгилированием [120]. На основе конъюгатов L-АСНаз и ПЭГ разработано несколько коммерческих препаратов, описанных выше. Благодаря

своему большому гидродинамическому объему полиэтиленгликоли создают экранирующий эффект вокруг пэгилированного препарата, защищая от агрегации, ферментативного расщепления и распознавания клетками иммунной системы и увеличивая период полужизни. Клинические исследования онкаспара, в котором полимеры ПЭГ конъюгированы сукцинимидил-сукцинатным линкером, показали, что эта форма фермента имеет период полураспада в крови в 5 раз больше, чем у фермента дикого типа [121].

Стратегия пэгилирования L-АСНаз улучшена в нескольких работах для предотвращения потери активности, вызванной диссоциацией фермента, а также высокой степени полидисперсности при стандартном не сайт-специфичном пэгилировании. В одной из модификаций пэгилирования использовали цистеин-направленную конъюгацию субъединиц L-АСНазы. Рекомбинантные сайты конъюгации цистеина были введены путём мутагенеза в поверхностно-экспонированные сайты белка, чтобы избежать влияния на каталитическую активность и воздействовать на потенциальные протеолитические и иммуногенные эпитопы. Эта модификация стабилизировала тетрамерную структуру L-АСНазы и способствовала повышению каталитической активности в полтора раза [122]. Другой протокол N-концевого сайт-специфического пэгилирования оптимизировали с использованием моноПЭГ-АСНазы, что позволило получить фермент с повышенной стабильностью при хранении и устойчивостью к протеолитическому расщеплению [123].

Также пэгилирование использовали для получения формы L-АСНазы EгАII (крисантаспазы) с увеличенным периодом полужизни и уменьшенной иммуногенностью. Было показано, что по сравнению с крисантаспазой, пэгилированная крисантаспаза приводила к полному истощению L-аспарагина в плазме мышей в течение до 72 ч при дозе, меньшей в 50 раз. У мышей, получавших ПЭГ-р-крисантаспазу, специфические антитела против фермента не обнаруживались [124]. В работе Torres-Obreque и др. [125] для увеличения времени полужизни нативной крисантаспазы разработан процесс сайт-специфического N-концевого пэгилирования фермента с помощью ПЭГ-N-гидроксисукцинимидила (mPEG-NHS). Модифицированная крисантаспаза показала повышенную стабильность при высоких температурах (55 °C) и сохраняла специфическую

активность при хранении. Через 20 дней специфическая активность пэгилированной крисантаспазы не изменялась, а нативная крисантаспаза теряла около 93% специфической активности.

Для улучшения свойств L-АСНаз применяли конъюгацию ПЭГ с различными сополимерами, такими как ПЭГ-альбумин [126]; линейный ПЭИ (полиэтиленимин)-ПЭГ, ПЭИ, спермин [127]; ПЭГ- α -циклодекстрин [128], ПЭГ-хитозан и гликоль-хитозан [129]. ПЭГ-хитозан и гликоль-хитозан были конъюгированы с L-АСНазой EwA. Конъюгация с разветвленным сополимером ПЭГ-хитозан увеличивала каталитическую активность в физиологических условиях (рН 7,5) в 3–4 раза для L-АСНазы [129]. С L-АСНазой *R. rubrum* были разработаны комплексы с полиаминами: линейным ПЭИ, разветвленным ПЭИ, ПЭИ-ПЭГ и спермином. Активность конъюгатов L-АСНазы *R. rubrum* со спермином и ПЭИ-ПЭГ была на 23–30% выше, чем у нативного фермента. Эти конъюгаты обладали более высокой термостабильностью, а конъюгат с ПЭИ-ПЭГ был устойчив к трипсинолизу за счёт снижения константы инактивации [127]. L-АСНаза EsA II была инкапсулирована в полые сферы из альгинат-привитого ПЭГ- α -циклодекстрина, в результате чего увеличилось сродство с субстратом, расширился оптимум рН и температур реакции фермента [128]. Кроме комплексов с ПЭГ, разработаны комплексы L-АСНаз с поли(метилметакрилат-со-метакриловой кислотой)-крахмалом [130] и поли(2-гидроксиэтилметакрилат)-крахмалом [131].

Наряду с преимуществами, ПЭГ имеет ряд недостатков, таких как иммуногенность и низкая биоразлагаемость, поэтому было разработано несколько альтернативных методов конъюгации L-АСНаз с носителями. С целью повышения стабильности и снижения побочных эффектов, наблюдаемых у нативных и пэгилированных L-АСНаз, для иммобилизации L-АСНаз также применяли различные наноформуляции – липосомы и наночастицы. Одним из преимуществ использования липосом и наночастиц является снижение аллергических реакций, поскольку антигенные детерминанты фермента могут быть «замаскированы» инкапсуляцией. L-АСНазу инкапсулировали в липосомах из фосфатидилхолина и холестерина [132], лецитина и холестерина [133], липосомах, модифицированных хитозаном [134], лецитина-холестерина-DSPE-ПЭГ-2000 (DSPE – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) [135]. Исследования липосом [132] в сыворотке

человека, загруженных L-АСНазой, показали, что активность фермента сохраняется через 48 ч и составляет 80–90% от исходной. Кроме того, авторы показали, что L-АСНаза в составе липосом менее токсична для нормальных клеток, чем свободный фермент. При иммобилизации L-АСНазы на липосомы, модифицированные хитозаном, повышалась устойчивость фермента к действию различных денатурирующих факторов, увеличивалось в 12 раз время полужизни и в 1,4 раза цитотоксическая активность в отношении клеточной линии рака лёгкого H446 по сравнению со свободным ферментом [134]. Несмотря на все преимущества, использование липосом для иммобилизации L-АСНаз имеет существенные недостатки, так как липосомы имеют относительно короткий период полужизни [136].

Неорганические материалы широко используются для иммобилизации L-АСНаз. Наночастицы из неорганических материалов с полым ядром применяют для инкапсулирования L-АСНаз, а в случае высокой удельной площади поверхности частиц – для конъюгации фермента на поверхности. L-АСНазу иммобилизовали на таких наночастицах, как гидрогель-магнитные наночастицы [137]; магнитные наночастицы, функционализированные PVDMA (поли(2-винил-4,4-диметилазлактоном)) [138]; наночастицы хитозана-триполифосфата [139]; наночастицы Au/Ni/Au/PEDOT-PPy-COOH (PEDOT – поли (3,4-этилендиокситиофен; PPy – полипиррол) [140]; хлормодифицированные магнитные наночастицы Fe₃O₄@MCM-41 (MCM-41 – мезопористый углерод со структурой MCM-41) [141] и другие. Например, магнитные наночастицы, функционализированные PVDMA [138] продемонстрировали высокую ёмкость загрузки (318 мкг/мг). Иммобилизованный фермент мог сохранять более 96% активности после 10 циклов использований и более 73% активности после 10 недель хранения. Иммобилизация L-АСНазы на магнитные наночастицы Fe₃O₄-хитозан приводила к увеличению активности фермента в 3 раза в слабом магнитном поле, а также способствовала сохранению 60,5% исходной активности после 16 циклов использования [142]. Несколько наночастиц разработали для доставки L-АСНаз в клетки человека. Например, были созданы многофункциональные магнитные наночастицы для совместной доставки эрлотиниба и L-АСНазы в опухолевые клетки яичников под контролем МРТ [143]

и полые наночастицы из мезопористого материала [144]. Такие наночастицы обладают несколькими преимуществами: они не влияют на активность фермента, защищают его от воздействия различных факторов и могут быть поверхностно модифицированы для улучшения циркуляции и нацеливания *in vivo* без изменения ёмкости загрузки [144]. Кроме наночастиц, для иммобилизации L-АСНаз широко используются однослойные и многослойные углеродные нанотрубки. Многослойные нанотрубки показали самую высокую ёмкость загрузки L-АСНазы (около 90%) среди описанных в литературе материалов для иммобилизации L-АСНаз [145]. Большинство носителей для L-АСНаз на основе неорганических наночастиц всё же не применяются для доставки L-АСНаз в клетки, так как имеют высокую токсичность, и у них отсутствуют поверхностные функциональные группы, в отличие от биосовместимых полимеров [142].

Для уменьшения иммунологических побочных реакций в качестве альтернативы ПЭГ-L-АСНазам применяли инкапсулирование L-АСНазы в эритроциты (Graspa, эриаспаза) [70]. Данная стратегия иммобилизации L-АСНазы позволяет сохранять активность фермента при циркуляции в крови. Компанией Erytech Pharma S.A. было проведено клиническое исследование (NCT01518517), в котором сравнивали эриаспазу со свободной формой L-АСНазы [146]. При лечении эриаспазой наблюдали пролонгирование действия фермента и значительное снижение частоты возникновения реакций гиперчувствительности у пациентов с ОЛЛ. Кроме того, показана эффективность эриаспазы у пациентов с раком поджелудочной железы. В исследовании фазы IIb эриаспазы в сочетании с гемцитабином или FOLFOX (лейковорин, 5-фторурацил и оксалиплатин) в качестве терапии второй линии (NCT02195180) у пациентов улучшились общая выживаемость и медиана общей выживаемости [147]. Тем не менее в дальнейшем препарат не был зарегистрирован комитетом Европейского агентства по лекарственным средствам, так как предоставленных данных было недостаточно и лекарство содержало другой тип L-АСНазы, нежели тот, который использовался в клинических исследованиях [148].

1.9. Бактериальная целлюлоза: структура, продуценты и свойства

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – это линейный полимер молекул D-глюкозы, соединённых β -(1→4) гликозидной связью, синтезируемый несколькими видами бактерий. Цепи БЦ преимущественно закручены влево и организованы в волокна, содержащие гидроксильные группы на своей поверхности. Кольцо β -D-глюкопиранозы и все -ОН группы играют важную роль в образовании меж- и внутримолекулярных водородных связей между соседними цепями волокон БЦ [149] (Рис. 11).

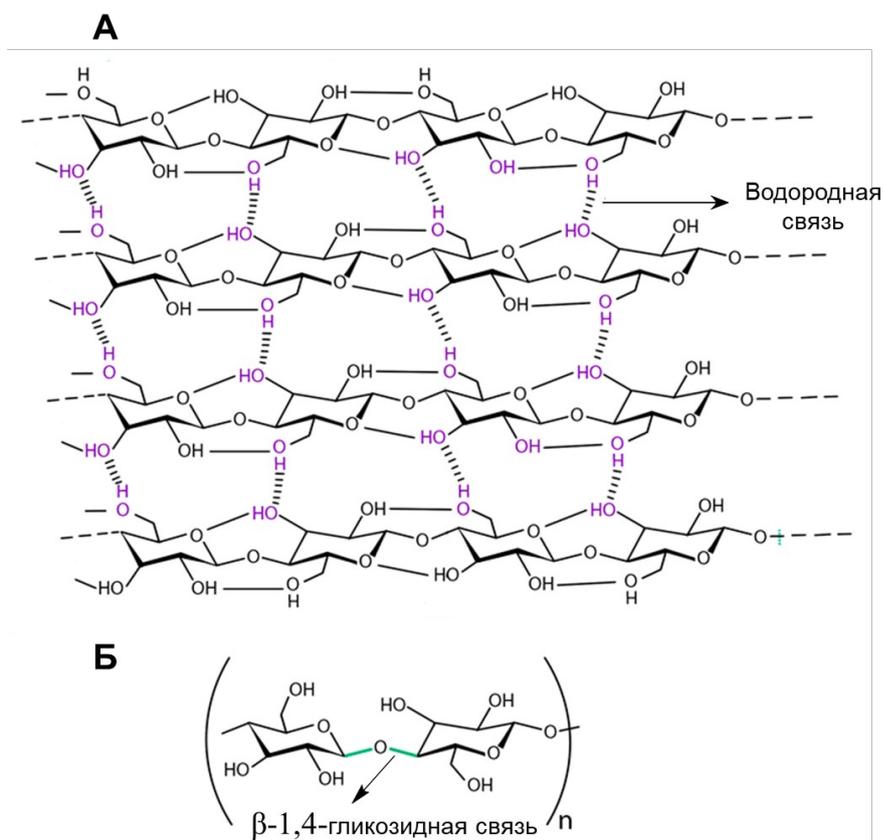


Рисунок 11. Химическая структура БЦ. (А) Водородные связи в БЦ. (Б) Гликозидные связи в БЦ.

Водородные связи и ван-дер-ваальсовы силы способствуют параллельной укладке молекул целлюлозы в кристаллические нановолокна. Волокна БЦ обладают многоуровневой иерархической организацией. Наименьшим элементом волокон БЦ являются нанофибриллы (2–4 нм), которые объединяются в микрофибриллы (10–95 нм) и затем макрофибриллы (60–400 нм) [150].

Основными свойствами плёнок БЦ является высокое содержание воды (>90%), пористость, большая площадь поверхности, проницаемость для газов и

воды и простота функционализации. Цепи БЦ организованы в высококристаллическую (70–90%) нановолокнистую трёхмерную сеть, т.е., имеет высокоупорядоченную структуру [151]. БЦ обладает высокой механической прочностью: модуль Юнга отдельных волокон составляет 2 ГПа, для кристаллических доменов модуль Юнга может достигать 130 ГПа, предел прочности составляет от 10 до 300 МПа, удлинение – от 1,5 до 2,0% [150].

По сравнению с растительной целлюлозой, БЦ имеет ряд отличий с точки зрения чистоты, размеров и морфологии. Несмотря на то, что БЦ имеет ту же химическую структуру, что и растительная целлюлоза, с молекулярной формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$, БЦ обладает высокой чистотой из-за отсутствия лигнина, пектина и гемицеллюлозы [152]. Для производства БЦ отсутствует необходимость сложной многоступенчатой очистки, что делает ее более доступной для промышленного, прежде всего, биомедицинского применения. Диаметр фибрилл в БЦ тоньше и составляет 2–4 нм, а диаметр фибрилл для растительной целлюлозы достигает 0,2–0,5 мкм. БЦ и растительная целлюлоза отличаются степенью полимеризации: для БЦ степень полимеризации волокон составляет 2000–8000, в то время как для растительной целлюлозы – 10000–15000 [153].

Основные продуценты БЦ – грамотрицательные бактерии родов *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, а также некоторые виды грамположительных бактерий, такие как *Sarcina ventriculi* [154]. Данные микроорганизмы способны внутриклеточно синтезировать биополимер и выделять его через клеточную стенку через поры, расположенные вдоль продольной оси клетки. Предполагается, что бактерии производят целлюлозные плёнки для защиты от УФ-излучения и других внешних агентов окружающей среды [155].

Продуценты БЦ при биотехнологическом производстве могут расти как в динамических перфузионных биореакторах, так и в статических условиях культивирования. БЦ, полученная в статических условиях, представляет собой гелеобразную пленку на поверхности среды (Рис. 12). Пленка играет роль носителя для иммобилизации клеток продуцента, обеспечивая доступ к границам раздела фаз воздух/жидкость, где подача кислорода не ограничена [156].

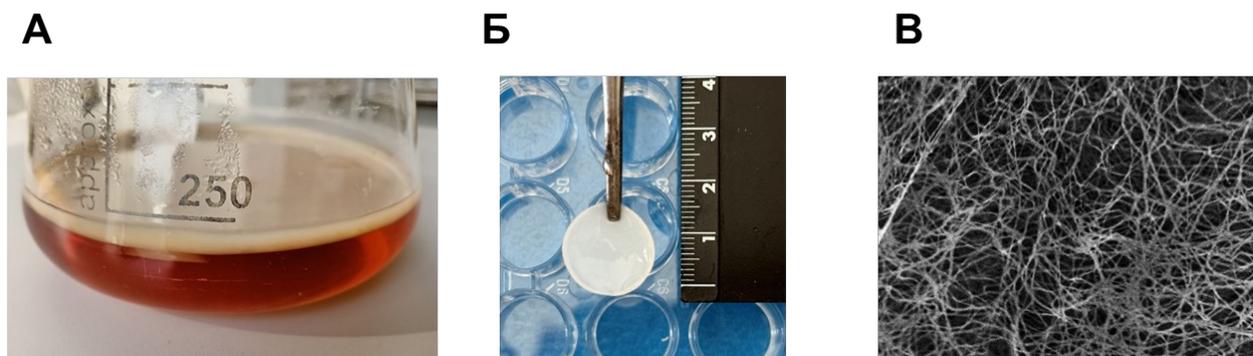


Рисунок 12. Внешний вид БЦ. Рост плёнок бактериальной культуры *K. hansenii* при статическом культивировании (А) в колбе на 1000 мл; (Б) Очищенная плёнка БЦ; (В) Микрофотография плёнок БЦ, полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ); увеличение 10000.

Плёнки БЦ, выращенные в статических условиях, обычно имеет высокую кристалличность и прочность на разрыв. В условиях перемешивания бактерии образуют сферическую аморфную целлюлозу в среде. В отличие от статического метода, выращивание при перемешивании насыщает питательную среду кислородом и обеспечивает более быстрый рост клеток. БЦ, полученная при перемешивании, имеет более высокую водоудерживающую способность, более низкий модуль Юнга и кристалличность [157]. Выращивание при перемешивании культур способствует повышению эффективности производства БЦ, в то время как статические культуры поддерживают генетическую стабильность продуцента и обеспечивают высокое качество, размер и форму мембран [158].

Основной средой для выращивания продуцентов БЦ является среда Хестрина-Шрамма (смесь дрожжевого экстракта, пептона и буферных солей) и её модификации, а также среды Яманака, Сона и кукурузный экстракт. Питательные среды можно классифицировать по их предоставлению различных источников углерода для синтеза БЦ. Самыми распространенными источниками углерода для синтеза БЦ являются глюкоза, сахароза, галактоза, фруктоза, глицерин и маннит [159]. Для производства БЦ также используются фруктовая мякоть, фруктовые остатки, целлюлозные отходы, текстильные отходы, экстракт чая, табачный экстракт и т.д. [154].

Оптимальным диапазоном рН среды для получения БЦ считается рН 4–7. Чтобы предотвратить накопление кислых соединений (в т.ч. глюконовой кислоты)

в среде, которое негативно влияет на структуру гидрогелей БЦ, необходимо использовать буфер для стабилизации pH. Температурный диапазон выращивания продуцентов БЦ варьируется в зависимости от штамма. Для *Komagataeibacter sp.* в статических условиях оптимален диапазон 25–30 °С, для *Acetobacter xylinum* – 28 °С, а для *Acetobacter senegalensis* МА1 требуется 33,5 °С. Диапазон 28–30 °С подходит для *Gluconacetobacter sp.* RV28, *Pseudomonas sp.* RV14 и *Enterobacter sp.* RV11. Высокие температуры (> 35 °С) вызывают денатурацию питательной среды, а низкие замедляют клеточный метаболизм продуцентов БЦ [160].

На производство БЦ также влияет скорость перемешивания. При низкой скорости перемешивания 100 об/мин образуется однородный твердый шарик диаметром 0,5–1 см. При увеличении скорости перемешивания около 150–250 об/мин размер БЦ уменьшается, а при 300 об/мин образуются комки неправильной формы. Увеличение скорости перемешивания до 500 об/мин может снизить количество целлюлозоотрицательных штаммов почти до нуля. Поэтому умеренные обороты подходят для оптимального производства БЦ [161].

Некоторые исследования показали, что условия культивирования бактерий могут влиять на морфологию и структуру БЦ. Например, изменения в источниках углерода и концентрациях этанола, используемых в среде культивирования, приводят к изменениям в микроструктуре мембран: пористости поверхности, диаметру волокон и размеру пор [152].

Основные процессы, которые протекают в ходе синтеза БЦ бактериальными клетками, – это полимеризация и кристаллизация. Эти процессы не зависят друг от друга: если кристаллизация затруднена или подавлена, полимеризация всё равно продолжается [162].

Бактерии, продуцирующие целлюлозу, метаболизируют глюкозу через пентозофосфатный путь и/или цикл Кребса в сочетании с глюконеогенезом, в зависимости от физиологического состояния клетки [162]. БЦ синтезируется в периплазматическом пространстве с помощью набора ферментов: глюкокиназы, фосфоглюкомутазы, УДФ-глюкозофосфорилазы и целлюлозосинтазы (Рис. 13).

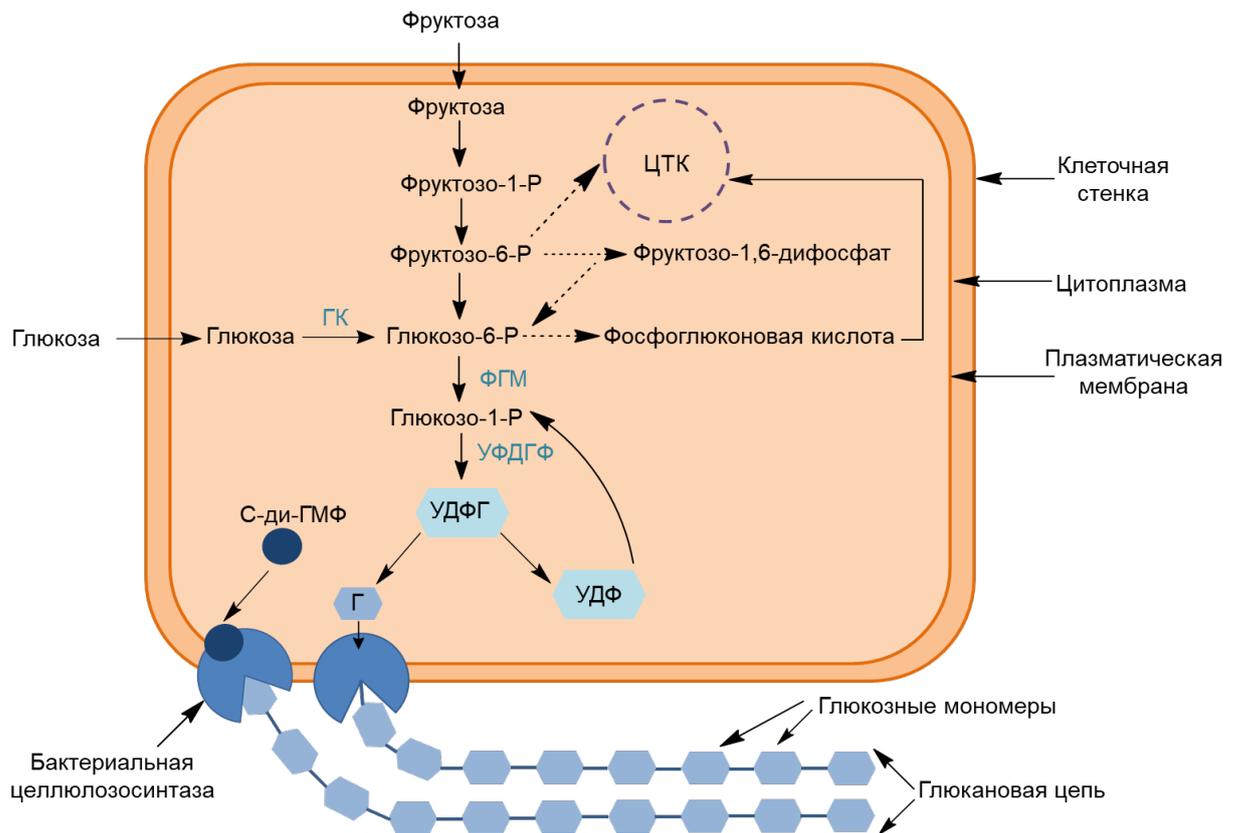


Рисунок 13. Механизм биосинтеза целлюлозы у *Komagataeibacter xylinus*.

Глюкоза полимеризуется с помощью целлюлозосинтазы в 1,4-глюкановые цепи. Остатки глюкозы добавляются к невосстанавливающим концам глюкановой цепи, а восстанавливающие концы являются зарождающимися полимерными цепями, расположенными вдали от клеток. ГК – глюкокиназа; ФГМ – фосфоглюкомутаза; УДФ – уридилдифосфат; УДФГ – уридилдифосфатглюкоза; УДФГФ – УДФГ пиррофосфорилаза; С-ди-ГМФ – циклическая дигуановая кислота; Г – глюкоза. Адаптировано по материалам статьи Singhania et al. [154].

Синтез БЦ из субстрата глюкозы включает серию реакций:

- 1) превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат ферментом глюкокиназой;
- 2) превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат ферментом фосфоглюкомутазой;
- 3) превращение глюкозо-1-фосфата в УДФ-глюкозу в присутствии УТФ и фермента УДФГ-пиррофосфорилазы;
- 4) перенос остатков глюкозы из УДФ-глюкозы в зарождающуюся цепь β -d-1,4-глюкана, который полимеризуется в БЦ с помощью бактериальной целлюлозосинтазы, которая находится в цитоплазматической мембране [163].

После синтеза продуцентами БЦ подвергают обработке для удаления бактериальных клеток, органических кислот, солей, а также остаточных сахаров и других компонентов культуральной среды, которые могут быть интегрированы в целлюлозную сеть. Этот процесс очистки может быть выполнен различными методами, включая промывку, центрифугирование, фильтрацию и химическую экстракцию [164].

1.10. Бактериальная целлюлоза как носитель для терапевтических агентов

В 1992 г. БЦ признана FDA «общепризнанным безопасным» (Generally recognized as safe, GRAS) материалом, который не оказывает неблагоприятного воздействия на окружающую среду и здоровье человека. БЦ стабильна в широком диапазоне температур, что делает её пригодной для термической стерилизации [165]. Концентрация эндотоксинов в БЦ после очистки может достигать менее 0,5 Ед/мл, что соответствует требованиям, предъявляемым к имплантатам [166].

Первые продукты на основе БЦ появились в конце 1980-х годов, когда бразильская компания зарегистрировала патенты на БЦ в качестве заменителей кожи (патенты WO 08602095, WO 08908148 и US 4912049, Biofill®), а компания Johnson & Johnson – патенты на повязки для ухода за ранами (патенты US 4588400 и US 4655758) [164].

БЦ и её композиты широко применяются для создания различных материалов для регенеративной терапии и тканевой инженерии. На основе БЦ было разработано несколько коммерческих продуктов. Biofill^{VR}, Bioprocess^{VR}, XCell^{VR}, SuperasorbX^{VR} и PrimaCelTM применяются для лечения ран, DermafillTM и Gengiflex^{VR} используются в качестве имплантируемого каркаса для регенерации тканей [17]. Повязки для ран на основе БЦ способствуют поддержанию влажной среды, теплоизоляции и эффективной циркуляции кислорода на поверхности раны, а также защиту от бактериального заражения и вторичных инфекций [167]. БЦ также широко применяется в косметической промышленности при изготовлении реологических агентов, загустителей, увлажнителей и масок [168].

Наряду с трансдермальными медицинскими изделиями, БЦ является одним из популярных материалов, применяемых при создании систем доставки лекарств.

БЦ привлекает внимание исследователей благодаря большой удельной площади поверхности, нанофибриллярной структуре, биосовместимости, нетоксичности, высокой механической прочности, способности к контролируемому высвобождению препаратов с определенной скоростью и высокой ёмкости загрузки [17]. Данные характеристики БЦ соответствуют основным требованиям к материалам, применяемым в системах доставки лекарств. В БЦ можно загружать различные виды фармацевтических активных ингредиентов, включая малые молекулы, большие молекулы и наночастицы [169]. БЦ сама по себе не способна вызывать цитотоксических эффектов, а также не препятствует действию лекарств [13]. По сравнению с традиционной таблетированной формой, БЦ может применяться для доставки лекарственных средств в гидратированной, частично гидратированной и лиофилизированной форме [16]. БЦ используется для разработки систем доставки анестетиков, антибиотиков, противоопухолевых препаратов, анальгетиков, ферментов, антител и вакцин [170]. Среди коммерческих систем для доставки лекарственных средств применяется БЦ с полигексаметиленбигуанидом (Suprasorb® X + полигексаметиленбигуанид) в качестве повязки для ран [171].

Существуют различные типы структур БЦ в зависимости от их размера в трёх измерениях. Среди данных типов можно выделить одномерные (1D, нанофибриллы; два измерения в наномасштабе, одно – в микромасштабе), двумерные (2D, композитные плёнки; одно измерение в наномасштабе, два – в микромасштабе) и трёхмерные (3D, композитные гидрогели, аэрогели; все три измерения в микромасштабе) структуры [172]. Например, нанофибриллы БЦ использовали для загрузки ибупрофена [173] и меченых антител [18]. Композитные плёнки БЦ/поли(Н-метакрилоилглицин) использовали для доставки диклофенака [174]. Гидрогели, имеющие в составе БЦ, применяли для загрузки модельных белков: бычьего сывороточного альбумина и люциферазы [175], а также ингибитора иммунных контрольных точек CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный антиген 4) [13].

Несмотря на существенные структурные различия загруженных лекарств в отношении размера, гидро-/липофильности и стабильности, стратегии загрузки

лекарств в БЦ ограничены. На эффективность загрузки лекарств влияет тип БЦ (нативная – гидратированная, полусухая или лиофилизированная, модифицированная) и используемый штамм бактерий. В основном на практике используют два подхода загрузки в БЦ: в процессе биосинтеза плёнки (*in situ*) и после (постсинтетическая загрузка, *ex situ*). Первый подход используется реже из-за частого подавления роста бактерий загружаемыми веществами. В случае постсинтетической загрузки лекарственные средства включаются в БЦ помощью методов сорбции в условиях погружения и перемешивания в течение 24–48 ч [176] или путём встряхивания (для белков). В некоторых случаях высушенная или полувывсушенная БЦ замачивается в растворах лекарственных средств, что позволяет расходовать меньшее количество лекарственного средства и приводит к более высокой эффективности загрузки. Во всех методах постсинтетической загрузки включение растворов лекарственных средств в БЦ происходит за счёт диффузии и капиллярных сил [171].

1.10.1. Системы доставки на основе бактериальной целлюлозы

БЦ используют в качестве носителя в трансдермальных, пероральных и инъекционных системах доставки лекарственных средств [177]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что БЦ является перспективным носителем особенно для трансдермальных систем доставки лекарств. Использование БЦ для систем доставки такого типа имеет преимущества: предотвращение испарения влаги, защита от внешнего загрязнения, поддержание тесного контакта с поражённой областью, отсутствие прилипания к коже. Трансдермальные системы доставки на основе БЦ также способствуют снижению пресистемного метаболизма (то есть, препятствуют метаболизации препаратов ферментами в коже) и систематических побочных эффектов, а также повышают эффективность дозировки за счёт контроля высвобождения препарата через кожу [178]. На сегодняшний день БЦ в основном используется в трансдермальных системах доставки лекарств для заживления ран и перевязочных материалах [179]. Были проведены клинические испытания эффективности местного применения масок для лица на основе БЦ, содержащих несколько биоактивных ингредиентов, таких как пептиды, натуральные экстракты, масла и биополимеры [180].

Материалы на основе БЦ применяются также для разработки пероральных систем доставки. В отличие от таблеток, БЦ может применяться в гидратированной, частично гидратированной или лиофилизированной форме для доставки лекарств и имеет несколько преимуществ, таких как трехмерная нанофибриллярная структура, прозрачность, высокая водоудерживающая способность, высокая пористость и площадь поверхности, отсутствие цитотоксичности [181]. Пероральный тип доставки исследовали для теофиллина [181], фамотидина и тизанидина [182] и ибупрофена [183]. Компанией Axcelon Dermacare Inc. была предпринята попытка использовать БЦ для создания пероральных вакцин против бактериальной инфекции *Helicobacter pylori* [184].

Использование БЦ в качестве системы доставки стоматологических лекарств способствует более длительному высвобождению лекарств в полости рта по сравнению с традиционными методами доставки [177]. В отличие от других носителей лекарств, у которых при набухании в воде изменяются свойства, при набухании БЦ сохраняется структурная целостность. При данном типе доставки БЦ часто применяется в составе композитов, которые обеспечивают адгезию, достаточную для длительного удержания лекарства [185]. Аналогично, окисление БЦ различными химическими агентами также используется для увеличения времени высвобождения препаратов с последующей деградацией БЦ [177].

БЦ использовался для разработки нескольких инъекционных систем доставки лекарств – для заживления ран кожи [186] и лечения опухолей [18]. Трёхмерная наноструктура БЦ обладает высокой стабильностью и может сохранять свою первоначальную форму после многократного сжатия, что обеспечивает ей достаточную гибкость при инъекции [186].

1.10.2. Бактериальная целлюлоза для контролируемого высвобождения препаратов

В настоящее время одним из направлений исследований, связанных с доставкой лекарственных средств, является создание носителей, с помощью которых лекарства высвобождаются с контролируемой скоростью и максимально возможной точностью. Высвобождение лекарственного средства регулируется набуханием носителя, на которое влияют его пористость, размер пор, плотность волокон и кристалличность. Контролируемое высвобождение способствует

поддержанию концентрации препарата в пределах терапевтического окна в течение определенного периода времени [187]. По сравнению с другими гидрогелями БЦ имеет ряд преимуществ благодаря вышеописанным физико-химическим свойствам, простоте получения, очистки и стерилизации [188]. Например, в исследовании БЦ в качестве системы доставки гидрохлорида берберина и сульфата берберина загрузка препаратов в БЦ могла продлить более чем 4 раза время высвобождения препаратов по сравнению с использованием существующих коммерческих систем доставки [189].

Загрузка и высвобождение лекарственного средства из БЦ регулируется различными параметрами, такими как пористость, размеры пор, удельная площадь поверхности, кристалличность и кинетика набухания БЦ. БЦ часто смешивают с другими материалами для получения композитов. Это приводит к снижению пористости и способности к набуханию БЦ, что помогает поддерживать контролируемое высвобождение лекарств. Свойства таких композитов можно изменять, что позволяет использовать их в широком спектре биомедицинских приложений [190].

Большинство систем доставки лекарств, имеющих в составе БЦ, обладают двухфазным высвобождением лекарства. Первая фаза характеризуется начальным быстрым высвобождением в течение первых 0,5–10 ч. Вторая фаза медленная и может длиться до 24 ч или несколько суток [177]. При использовании нативной формы БЦ обычно наблюдают быстрое высвобождение в течение первых 15 мин, а всё лекарственное средство высвобождается в течение 1 ч. Такой тип высвобождения актуален в случае лекарственных форм с относительно малой молекулярной массой – например, для диклофенака, октенидина, полигексанида, серицина шёлка и хлорида бензалкония [171]. Для замедленного высвобождения лекарств БЦ используется в виде пленкообразной матрицы и/или одно- и многослойной плёнки [191]. Кроме того, профиль высвобождения препарата из БЦ может изменяться в зависимости от методов высушивания БЦ, которые влияют на пористость и ёмкость загрузки препарата. Например, лиофильная сушка БЦ приводит к замедленному высвобождению, в то время как воздушная сушка БЦ может привести к быстрому высвобождению в зависимости от растворимости препарата [169]. Для достижения замедленного высвобождения лекарств также

были разработаны различные композиты БЦ с другими полимерами, такими как поли-н-изопропилакриламид [183] поливиниловый спирт, хитозан, альгинат натрия, зеин, желатин, пектин и другие [162]. Применение вышеописанных композитов позволило значительно уменьшить первоначальное «взрывное» высвобождение [162]. Композит, изготовленный из БЦ, полоксамера и антисептика октенидина для лечения ран позволил добиться замедленного высвобождения октенидина до одной недели [192]. Также был создан гидрогель из БЦ, альгината, хитозана и желатина, который использовался в качестве капсулы для доставки пробиотических бактерий с пролонгированным направленным высвобождением в средах, имитирующих условия желудочно-кишечного тракта человека [193].

На загрузку и высвобождение лекарств могут влиять размер и площадь поверхности БЦ, концентрации препарата, содержание воды в БЦ, скорость встряхивания и время инкубации с БЦ [194]. Для большинства водорастворимых препаратов и малых молекул характерна высокая скорость высвобождения из БЦ. Для более крупных гидрофильных препаратов характерно замедленное высвобождение из БЦ [176]. Продление высвобождения препарата в течение недель и месяцев или включение и транспортировка водонерастворимых препаратов требуют применения более сложных стратегий загрузки, таких как химические модификации БЦ, ковалентное связывание препаратов с БЦ или включение дополнительного диффузионного барьера или системы высвобождения [171].

1.10.3. Бактериальная целлюлоза для доставки противоопухолевых препаратов

На основе БЦ были разработаны системы доставки лекарств в различные опухоли. Основным преимуществом использования БЦ в качестве носителя противоопухолевых препаратов является способность локализованной доставки лекарств, что позволяет увеличить концентрацию лекарств в месте опухоли (Рис. 13) [139].

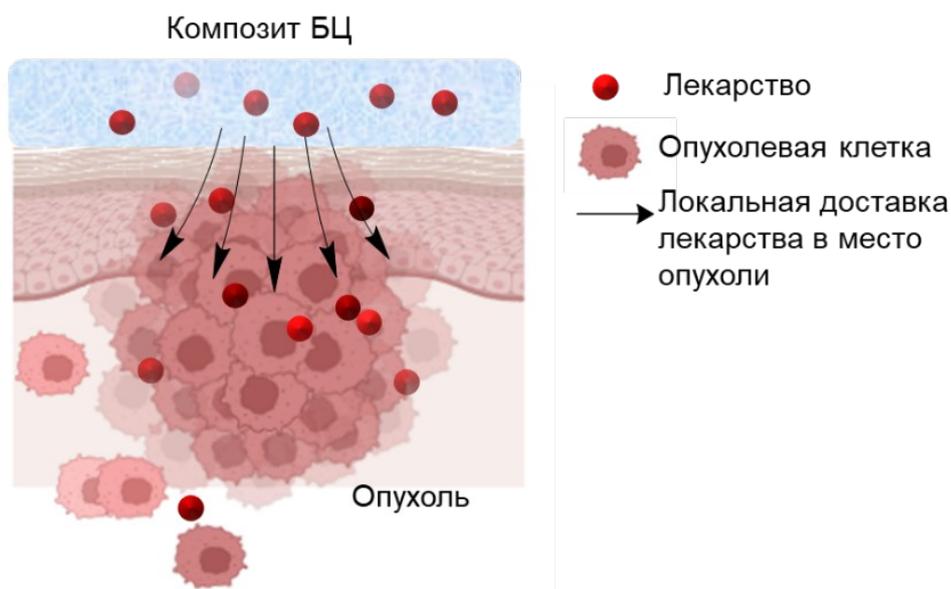


Рисунок 14. Локализованная доставка лекарств в опухоли с помощью композитов БЦ. Изображение получено с помощью программ BioRender, MS Power Point и Adobe Photoshop 2022.

Карбоксиметилированную и гидроксипропилированную БЦ использовали в качестве носителей для доставки паклитаксела и доксорубицина в перитонеально диссеминированные опухоли. При загрузке лекарств в модифицированные формы БЦ значительно уменьшался рост опухоли, увеличивалась выживаемость животных моделей и снижалась системная токсичность свободных препаратов [19]. Для адресной доставки доксорубицина был создан гибридный композит, сочетающий гидрогель БЦ и липидные наночастицы. В липидные наночастицы предварительно загружали доксорубицин в катионной и нейтральной форме. Далее смесь липидных наночастиц с доксорубицином загружали в БЦ и исследовали *in vivo* в качестве имплантата на ортотопической мышинной модели рака молочной железы. Через 36 дней значительно снижался размера опухоли, частота метастазов и местная токсичность препарата по сравнению с его свободной формой [20]. Композиты БЦ с доксорубицином, покрытым магнитными частицами Fe_3O_4 были разработаны для таргетной доставки в опухолевые клетки под воздействием статического магнитного поля и лазерного облучения с целью подавления роста опухоли [21]. Нанокompозит $\alpha\text{PD-1@AuNCs}$, состоящий из окисленной БЦ, тромбина и золотых наноклеток (AuNC), содержащих антитело против рецептора запрограммированной смерти 1 (PD-1, Programmed cell death protein 1),

имплантировали для послеоперационного лечения плоскоклеточного рака головы и шеи. Композит α PD-1@AuNCs индуцировал пироптоз под действием ближнего инфракрасного облучения, что активировало мощный противоопухолевый иммунный ответ за счёт увеличения инфильтрации Т-клеток и снижения иммуносупрессивных клеток в сочетании с локальным действием. Применение разработанного нанокompозита эффективно предотвращало рецидив опухоли в послеоперационной модели мышей с плоскоклеточным раком головы и шеи [195].

На основе БЦ были разработаны системы доставки для контролируемого высвобождения ингибиторов иммунных контрольных точек для иммунотерапии меланомы. Применение имплантируемого под кожу гидрогеля БЦ, содержащего антитело к CTLA-4, привело к длительному локальному высвобождению антитела к CTLA-4 в течение 24-48 ч и снижению системного распределения антител в сыворотке у мышей [13]. В другом исследовании была разработана инъекционная суспензия, где на БЦ были иммобилизованы антитела к α PD-L1 (лиганду программируемой клеточной смерти 1), меченные радиоактивным йодом (^{131}I), для таргетной доставки в клетки меланомы. Данная комбинация препаратов была выбрана для синергетического эффекта радио- и иммунотерапии. Композит ^{131}I - α PD-L1/БЦ продемонстрировал биосовместимость, длительное удержание антител и иммуностимулирующую активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Локальная инъекция ^{131}I - α PD-L1/БЦ не только эффективно ингибировала рост первичной опухоли, но и подавляла метастазирование и увеличивала продолжительность жизни мышей с опухолями [18].

1.11. Методы модификации бактериальной целлюлозы

Несмотря на многочисленные преимущества нативной формы БЦ, она часто не подходит для использования в системах доставки лекарственных средств из-за необратимой потери структуры после дегидратации, в процессе которой происходит испарение воды из межволоконных пространств. После дегидратации трехмерная полимерная сеть не способна регенерироваться, что снижает ее способность к повторному набуханию [157]. Кроме того, поскольку нативная БЦ имеет высокопористую структуру, она не способна противостоять свободному движению газов, растворителей и других малых молекул, поэтому имеет ряд ограничений для большинства систем контролируемой доставки лекарств. Поэтому

используют различные модификации БЦ, которые улучшают её физико-механические и поверхностные свойства [196].

Основными подходами для модификации БЦ являются *in situ* и *ex situ* модификации. При модификации *in situ* добавляются экзогенные молекулы в культуральную среду во время биосинтеза целлюлозы. В случае модификации *ex situ* включение материалов происходит после биосинтеза и очистки БЦ (Рис. 15) [197].

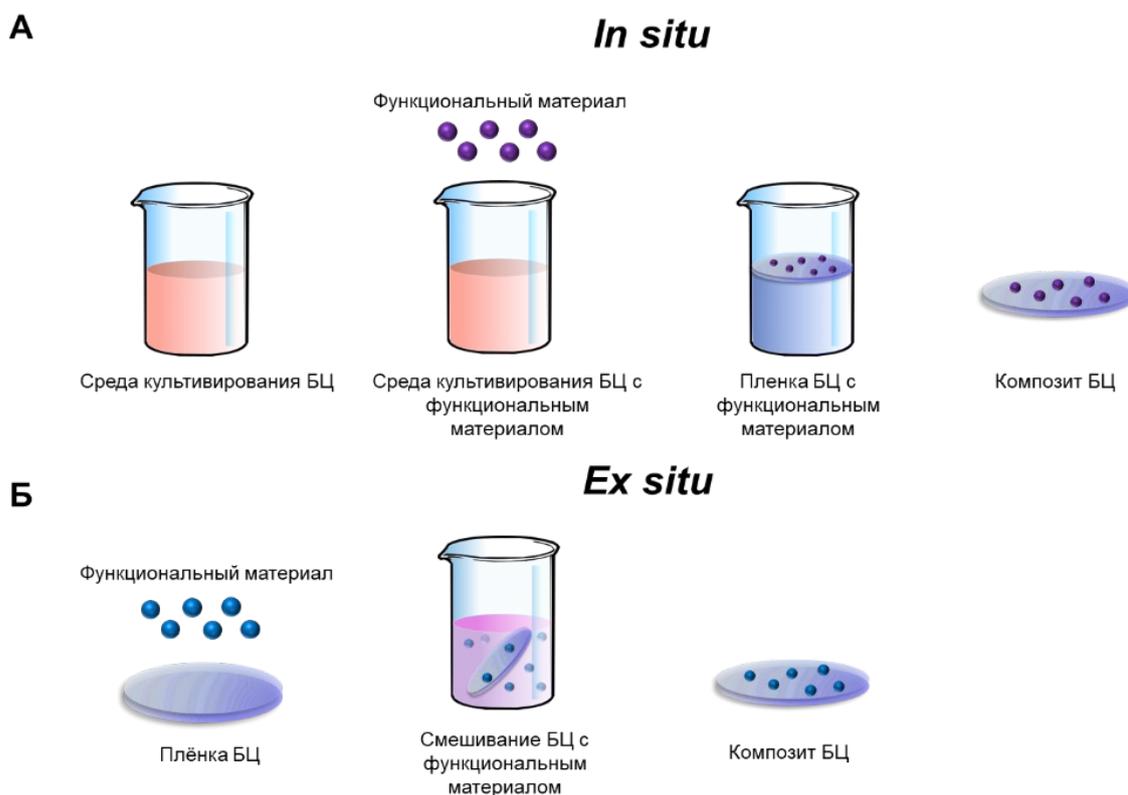


Рисунок 15. Модификации БЦ. (А) В модификации *in situ* к культуральной среде продуцента БЦ добавляются различные функциональные материалы. (Б) При модификации *ex situ* к уже выращенной БЦ добавляются химические вещества или полимеры.

1.11.1. *In situ* модификация бактериальной целлюлозы

Биосинтетическая (*in situ*) модификация БЦ представляет собой простой, экологически чистый метод, в ходе которого БЦ комбинируют с различными веществами, присутствующими в культуральном растворе. Эти вещества становятся частью сети фибрилл БЦ, в результате чего образуются композиты [198]. В процессе *in situ* модификации в БЦ можно добавлять различные наночастицы, биополимеры, синтетические материалы. Другой способ

модификации *in situ* заключается в замене источника углерода в процессе культивирования продуцента [177]. Преимуществами модификации *in situ* является простота методики выполнения, разнообразие добавляемых веществ и методов биосинтеза БЦ. Модификации *in situ* применяются для изменения пористости, увеличения механической прочности и повышения емкости БЦ для загрузки лекарств [164].

Для модификации *in situ* применяются как водорастворимые, так и не водорастворимые вещества для придания различных свойств БЦ. Включение в культуральную среду некоторых водорастворимых полимеров, таких как карбоксиметилцеллюлоза и метилцеллюлоза, привело к уменьшению кристалличности БЦ, увеличению размера пор и термостабильности. При добавлении хитина в среду у БЦ увеличивалась прочность на разрыв и повышалась антибактериальная активность по сравнению с не модифицированной формой [199]. Включение полиэтиленоксида, поликапролактона, полигидроксibuтирата, полигидроксibuтират-ковалериата, поливинилового спирта, Твин 80, гидроксипропилметилцеллюлозы и крахмала в питательную среду привело к изменению размера пор, степени полимеризации, кристалличности, диаметру волокон и механической прочности БЦ [200].

Композиты ПЭГ-БЦ использовали для быстрого высвобождения анальгетиков. Например, модификация *in situ* БЦ раствором ПЭГ2000 (4%) привела к увеличению пористости и размера пор БЦ, снижению способности к набуханию (172% для БЦ и 150% для БЦ-ПЭГ 2000) и снижению скорости набухания. При загрузке диклофенака в оба типа матриц происходило быстрое высвобождение в течение первого часа, которое было выше при загрузке в ПЭГ-БЦ (90%) по сравнению с нативной формой БЦ (70%) [200]. Для создания системы контролируемой доставки левофлоксацина в процессе культивирования к БЦ добавляли метоксилированный пектин, в результате чего в 2 раза увеличилось время высвобождения антибиотика [201]. Для доставки доксорубина в опухолевые клетки была разработана модификация *in situ* альгинатом натрия. Для полученных композитов было выявлено увеличение площади поверхности на 84% и увеличение объема пор более чем на 200% по сравнению с нативными пленками БЦ. Кроме того, композит БЦ-альгинат, содержащий доксорубин, показал

высокую цитотоксическую активность в отношении клеток колоректальной аденокарциномы человека HT-29 по сравнению со свободным доксорубицином в том же диапазоне концентраций [194].

Основными недостатками модификации БЦ *in situ* являются необходимость подбора условий роста продуцента, сложность включения соединений, нарушение структуры БЦ и уменьшение степени набухания полученной плёнки [177].

1.11.2. Ex situ модификация бактериальной целлюлозы

Существуют две формы модификации *ex situ*: химическая и физическая. Основные преимущества модификации БЦ *ex situ* – это широкий спектр методов синтеза композитов, возможность использования соединений различной природы и сохранение основных структурных характеристик БЦ [202]. БЦ имеет множество гидроксильных групп, которые обуславливают её способность к химической модификации для придания новых функций. Основными ограничениями *ex situ* модификаций являются размер и природа экзогенного соединения, а также его неравномерное распределение. Кроме того, при физической модификации БЦ взаимодействие между БЦ и экзогенным соединением слабее по сравнению с модификацией *in situ* [203].

1.11.2.1. Физическая модификация ex situ бактериальной целлюлозы

Физическая модификация является наиболее широко используемым методом среди *ex situ* модификаций БЦ [177] и применяется для доставки различных лекарств и при создании повязок для ран. Физическая модификация *ex situ* обычно достигается путём физической абсорбции различных веществ [178], в результате которой между гидроксильными группами БЦ и адсорбированными молекулами возникают сильные водородные связи [204]. Органические полимеры и неорганические материалы обычно используют в качестве поверхностного покрытия для защиты БЦ от внешних воздействий или улучшения свойств БЦ [205]. Например, для повышения загрузки и увеличения длительности высвобождения лекарств к БЦ добавляли ПЭГ, что приводило к увеличению размера пор и повышению водопоглощающей способности [206]. В работе Paradee и др. разработаны гидрогелевые композиты полипиррол-пектин-БЦ для трансдермальной доставки ибупрофена [207]. По сравнению с нативной БЦ у

разработанных композитов улучшились механические свойства и увеличивалось время высвобождения ибупрофена.

Другим методом физической модификации является сшивка БЦ при облучении электронным пучком, рентгеновским излучением или гамма-излучением. Этот подход основан на образовании свободных радикалов, которые приводят к образованию обратимой сшивки между гидроксильными группами соседних цепей БЦ [208]. В одной из работ БЦ, облученную гамма-лучами, использовали для доставки тетрациклина [209].

1.11.2.2. Химическая модификация *ex situ* бактериальной целлюлозы

В процессе химической модификации БЦ обрабатывается химическими реагентами для изменения её химической структуры и придания новых свойств. Химические модификации БЦ в основном происходят в аморфных областях и глюкопиранозиде [177]. В отличие от физической абсорбции, химическая модификация структуры БЦ приводит к постоянному высвобождению и более длительному действию лекарств [210]. Основными химическими модификациями БЦ для иммобилизации лекарственных препаратов являются сшивка, окисление, силанирование и аминирование.

Модификация БЦ путём сшивания возможна за счёт наличия гидроксильных функциональных групп в БЦ. При сшивании связываются либо две гидроксильные группы одной молекулы целлюлозы или две или более гидроксильных групп соседних молекул целлюлозы [211]. Сшивание волокон БЦ предотвращает разрушение её структуры в процессе сушки и улучшает поглощение воды, поэтому данную модификацию часто применяют для увеличения загрузки и пролонгирования действия различных лекарств. Сшивание БЦ может быть достигнуто с помощью физических и химических процессов, при этом необратимые связи образуются только в случае химической сшивки. В качестве сшивающих агентов для БЦ применяют те же сшивающие агенты, что и для растительной целлюлозы [149].

БЦ, сшитую лимонной кислотой в присутствии динатрийфосфат/бикарбоната натрия, применяли для доставки антисептика на основе октенидина [212]. Композит БЦ, сшитый альгинатом натрия, применяли для

доставки поли(гексаметиленбигуанид) гидрохлорида [213]. БЦ, графен оксид и желатин и сшивали тетраэтилортосиликатом для доставки куркумина [214].

Перспективной химической модификацией БЦ является окисление, с помощью которого на поверхность БЦ вводят карбоксильные или альдегидные функциональные группы [215]. Для окисления БЦ применяют перекись водорода, перйодат натрия, персульфаты, перманганаты, 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО), диоксид азота, диоксид хлора, фосфорные кислоты. В зависимости от типа окислителя, температуры, рН и продолжительности реакции могут быть получены новые физико-химические свойства окисленной БЦ. Установлено, что включение карбоксильных групп в целлюлозу увеличивает гидрофильность и улучшает способность удерживать лекарство [216]. Окисление БЦ смесью фосфорной, азотной кислот и нитрита натрия с последующей адсорбцией цефалексина применяли для создания антибактериального материала с длительным высвобождением [217]. Окисление БЦ перйодатом натрия применяли для иммобилизации на БЦ папаина [218] для обработки ран. Иммобилизованный папаин обладал повышенной термостабильностью и пролонгированным действием по сравнению с нативным ферментом. БЦ, окисленную ТЕМПО, применяли для загрузки сульфадиазина серебра [219] и хлорамфеникола [220] для получения композитов с высокой антибактериальной активностью.

Поскольку в БЦ отсутствуют аминогруппы, их необходимо вводить с помощью специальных методов. Один из подходов заключается в добавлении аminosилановых соединений, например, 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) или 3-глицидилоксипропилтриметоксисилана (GPTMS) для получения первичных аминогрупп в БЦ [221]. Аminosиланирование БЦ применяли для контролируемого высвобождения кетопрофена и ибупрофена. Модификация БЦ с помощью APTES привела к наибольшему высвобождению препаратов в растворе желудочного сока [222]. Силанирование и активацию полученных аминогрупп с помощью глутарового альдегида применяли для иммобилизации пероксидазы хрена, в результате чего относительная активность иммобилизованного фермента была на 90% выше, чем у свободного фермента [24].

Другим способом введения аминогрупп в БЦ являются реакции аминирования, достигаемые путём воздействия вторичных или третичных аминов

или соединений, вводящих аминогруппы, что облегчает конъюгацию БЦ с другими молекулами. Аминирование с помощью гидроксида аммония применяли для конъюгации БЦ с авидин-биотин β -галактозидазой для разработки направленной системы доставки препаратов в опухолевые клетки [223].

1.12. Методы иммобилизации белков на бактериальную целлюлозу

Материалы на основе БЦ имеют большие перспективы для улучшения фармакодинамики и фармакокинетики белков, а также повышения стабильности ферментов [177]. БЦ применяли в качестве носителя для иммобилизации белков для создания перевязочных материалов, каркасов в тканевой инженерии, доставки антител, иммобилизации ферментов [224].

Иммобилизация белков на БЦ может быть достигнута с помощью ряда физических методов (адсорбция, инкапсуляция) и химических методов (сшивание и ковалентное связывание) (Рис. 16). Обратимым методом является адсорбция, необратимыми – инкапсуляция, поперечная сшивка белка и ковалентное связывание [224]. Методы физической иммобилизации относительно просты и экономичны по сравнению с химическими методами иммобилизации, в то время как при ковалентном связывании достигается более устойчивое взаимодействие белков с носителем [225].

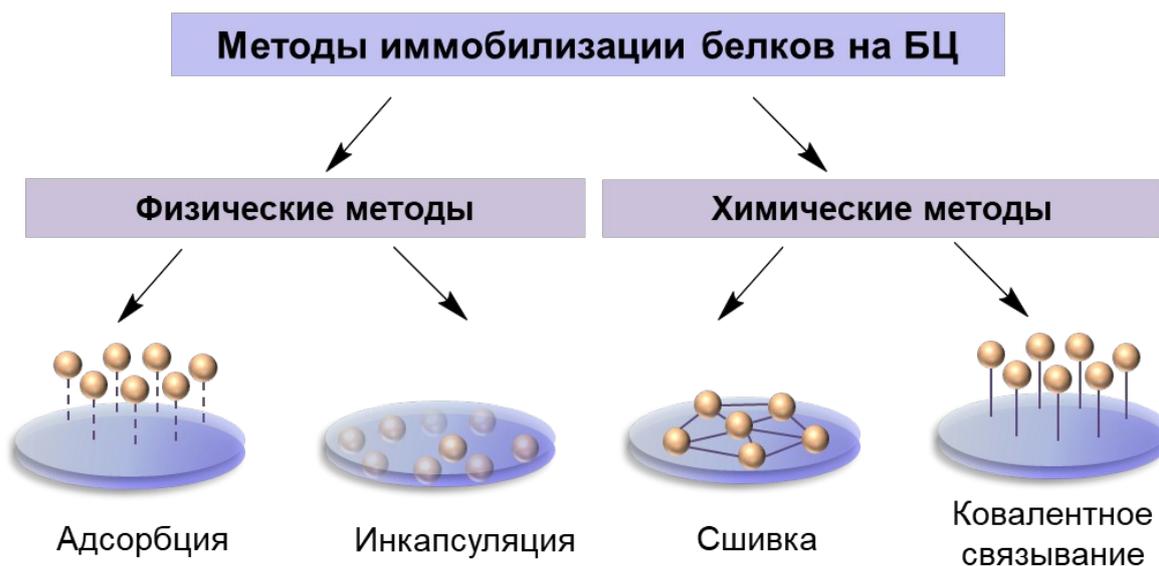


Рисунок 16. Методы иммобилизации белков на БЦ. Физические методы включают адсорбцию и инкапсуляцию. Химические методы включают ковалентное связывание и поперечную сшивку белка.

Адсорбция

Адсорбция белков на поверхности БЦ обычно осуществляется за счёт водородных связей, солевых мостиков, ван-дер-ваальсовых сил, электростатических и гидрофобных взаимодействий. При связывании с носителем при адсорбции нативная трехмерная структура белка не изменяется [226]. Степень адсорбции белков на БЦ зависит от характеристик физико-химических характеристик БЦ, на которые в свою очередь влияют время культивирования продуцента БЦ и состав среды [227]. Эффективность иммобилизации белков в БЦ может достигать более 93,5% при физической адсорбции [228].

Инкапсуляция

В отличие от адсорбции, в данном методе белки физически захватываются внутрь матрицы БЦ. Инкапсуляция защищает белки от неблагоприятных условий и повышает их стабильность [229]. На данный момент описан один случай инкапсулирования в БЦ белка соевого изолята и грибного белка для получения биокожи [230].

Сшивка

Иммобилизация белка путём сшивания заключается в химическом соединении групп белковых молекул, в результате которого образуется стабильная ковалентная связь [231]. Сшивание белков происходит посредством реакции со свободными аминогруппами остатков лизина на соседних молекулах ферментов. Это приводит к образованию олигомеров или полимеров посредством как меж-, так и внутримолекулярной альдольной конденсации, при этом конкретный тип сшивания зависит от pH [225]. Белок обычно адсорбируется на носителе, а затем сшивается с использованием бифункциональных или многофункциональных агентов. Этот метод повышает стабильность белка и снижает его десорбцию с носителя [232]. Одним из наиболее используемых сшивающих агентов для иммобилизации белков на БЦ является глутаровый альдегид благодаря его доступности и широкомасштабному использованию. С помощью данного метода на БЦ были иммобилизованы различные ферменты и желатин [233].

Ковалентное связывание

Иммобилизация белков с помощью ковалентного связывания более стабильна, чем физическая адсорбция, так как при таком подходе белки надежно

прикрепляются к поверхности ковалентными связями. Ковалентное связывание характеризуется высокой эффективностью загрузки белков и является наиболее эффективным подходом иммобилизации ферментов для увеличения стабильности. С другой стороны, при ковалентном связывании белков с носителем основной проблемой является сохранение нативной конформации и активности. В случае ферментов при ковалентном связывании иногда может возникнуть частичная потеря каталитической активности или инактивация фермента [234].

При ковалентном связывании белка с носителем происходит связывание остатков аминокислот ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) белка с функциональными группами носителя. Гидроксильные группы на поверхности целлюлозы могут не могут напрямую взаимодействовать с функциональными группами белков. Поэтому для иммобилизации белков добавляют химические агенты для активации гидроксильных групп целлюлозы. Существует два метода функционализации БЦ. Первый метод подразумевает добавление аминогрупп к поверхности целлюлозы, которые могли бы вступить в реакцию с карбоксильными (COO^-) группами. Второй подход предполагает введение альдегидной, карбоксильных или эпоксидных групп, которые могут вступать в реакцию с аминогруппой ($-\text{NH}_2$) [235]. В результате активированные группы целлюлозы (карбоксильная или альдегидная) могут взаимодействовать с аминогруппами белка. Основными методами, которые используются функционализации БЦ, являются окисление БЦ [215] и силанирование [24]. Ковалентное связывание применяли для иммобилизации на БЦ антител, ферментов и белков клеточного матрикса [224].

Подводя итог данной главы, следует отметить, что L-АСНаза является ключевым ферментом, используемым в качестве препарата первой линии для лечения ОЛЛ и ОМЛ, а также обладает клиническим потенциалом для лечения солидных опухолей. Однако клеточные линии солидных опухолей глиобластомы, аденокарциномы легких, карциномы печени, карциномы молочной железы, аденокарциномы простаты, карциномы желудка и меланомы также проявляют чувствительность к L-АСНазам *in vitro*, а трижды негативный рак молочной железы, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, карцинома печени – *in vivo*. Чаще всего высокая чувствительность к L-АСНазам связана с низким уровнем экспрессии АСНС, гиперметилированием промотора АСНС, воздействию на

ключевые пути регуляции клеточного роста и апоптоза, или ингибированию активности комплекса mTORC1. Применение L-АСНаз в свободной форме часто ограничено из-за их нестабильности, быстрой инактивации, высокой токсичности и побочных эффектов, а также присутствия механизмов резистентности у опухолевых клеток. Однако применение конъюгатов L-АСНаз показало большую эффективность *in vivo*. В связи с этим, разработка новых носителей для иммобилизации L-АСНаз, способных повысить стабильность и сохранить при этом цитотоксическую активность ферментов, имеет актуальное значение. БЦ характеризуется высокой биосовместимостью, отсутствием токсичности, высокой степенью чистоты и возможностью модификации различными методами. Иммобилизация ферментов на плёнках БЦ способствует увеличению их стабильности и защищает от быстрой инактивации различными денатурирующими факторами. Таким образом, БЦ можно рассматривать в качестве перспективного носителя для иммобилизации L-АСНаз для повышения их стабильности и повышения продолжительности действия.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Получение инокулята штамма-продуцента бактериальной целлюлозы

В качестве продуцента БЦ использовали штамм *Komagataeibacter hansenii* (*K. hansenii*, ранее известный как *Glucanacetobacter hansenii*), приобретенный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, регистрационный номер ВКПМ В-11239 и штамм *K. hansenii* GH-1/2008, регистрационный номер ВКПМ В-10547 во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, предоставленный Громовых Т.А (ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», г. Москва). В ампулу с лиофилизированным штаммом добавляли 0,4 мл среды Хестрина-Шрамма: 10 г/л глюкозы (Sigma-Aldrich, США), 5 г/л дрожжевого экстракта (PanReac Applichem, Испания), 5 г/л мясного пептона (Диам, Россия), 2,7 г/л Na_2HPO_4 (PanReac Applichem, Испания) и 1,15 г/л моногидрата лимонной кислоты (Merck Millipore, Германия). Клетки суспендировали и переносили в 5 мл среды Хестрина-Шрамма и инкубировали при температуре 27 °С в течение 3 дней.

Для получения колоний, синтезирующих БЦ, суспензию клеток, выращенных в течение 3 дней, переносили на чашки Петри с агаризированной средой Хестрина-Шрамма (концентрация агара 15 г/л) и выращивали при температуре 27 °С в течение 3 дней. Двадцать отдельных колоний, продуцирующих БЦ, помещали в 5 мл среды Хестрина-Шрамма и отдельно выращивали в 15 мл пробирках в статических условиях при 27 °С в течение 5 суток. После образования плёнок на поверхности среды пробирки с инокулятом переносили в холодильник на 4 °С и хранили в течение 3 месяцев.

2.2. Получение плёнок бактериальной целлюлозы

Нативные плёнки БЦ получали путём культивирования инокулята штаммов *K. hansenii* GH-1/2008 ВКПМ В-10547 или ВКПМ В-11239. Стационарное жидкофазное культивирование продуцентов БЦ *K. hansenii* проводили в среде Хестрина-Шрамма. Жидкие питательные среды (200 мл) разливали в плоскодонные

колбы объемом 1000 мл и стерилизовали автоклавированием при температуре 120 °С и давлении 101 кПа в течение 30 мин. После охлаждения в питательные среды добавляли 1 мл инокулята штамма-продуцента с титром $4,5-5 \times 10^8$ колониеобразующих единиц в мл (КОЕ/мл) и 1 мл 99% этилового спирта.

В каждую лунку 24-луночных планшетов добавляли по 2 мл полной среды с клетками и проводили культивирование в течение 24–180 ч при 25 °С в термостате до образования полимерной плёнки. Плёнки БЦ собирали каждые 12 ч для получения плёнок разной толщины. Для очистки бактерий от питательной среды плёнки БЦ промывали три раза в дистиллированной воде и инкубировали в буфере для очистки (150 мМ NaCl, 0,1% додецил сульфат натрия, рН 7,0) в течение 3 дней. Через 3 дня промывали 10 раз в дистиллированной воде и автоклавировали при температуре 120 °С и давлении 101 кПа в течение 30 мин. Плёнки хранили в стерильной дистиллированной воде при температуре 4 °С.

2.3. Оценка толщины плёнок бактериальной целлюлозы

Толщину плёнок измеряли с помощью цифрового микрометра INSIZE (INSIZE Co., Ltd., Китай) в десяти различных местах мембраны. Рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение толщины плёнок. Дополнительно для быстрой стандартизации выращенных плёнок БЦ определяли оптическую плотность (ОП), которую измеряли при длине волны $\lambda=500$ нм в 24-луночных планшетах с использованием планшетного ридера SuPerMax3000 (Spectrum Biotechnology, Китай). Для последующих экспериментов использовали плёнки БЦ со стандартным отклонением ОП менее 10%.

2.4. Лиофильное высушивание плёнок бактериальной целлюлозы

Лиофилизацию плёнок проводили для определения физических характеристик и химического состава плёнок. Плёнки предварительно замораживали при температуре -18 °С в течение 15 мин, переносили в жидкий азоте на 15 мин и затем лиофилизировали в течение 24 ч при температуре -50 °С и давлении 0,07 мбар в установке Alpha 2-4 LD Freeze Drier Type 101042 Lab (Christ, Германия).

2.5. Оценка содержания воды и адсорбционной ёмкости для нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы

Содержание воды в плёнках БЦ определяли по изменению их массы до и после лиофильного высушивания. Процентное содержание воды [236] в плёнках БЦ рассчитывали по уравнению:

$$\text{Содержание воды (\%)} = \frac{A - B}{A} \cdot 100\%$$

где А – масса влажной плёнки, В – масса лиофильно высушенной плёнки. Все результаты являлись средними значениями пяти образцов.

Адсорбционную ёмкость измеряли путём погружения плёнок БЦ в буфер 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновой кислоты (HEPES-Na, 0,05 М, рН 8,0) на 24 ч при 37 °С. Перед взвешиванием избыток влаги на поверхности плёнок БЦ удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Адсорбционную ёмкость рассчитывали по уравнению, как описано в работе [237]:

$$\text{Адсорбционная ёмкость (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%$$

где W_0 – масса лиофильно высушенной плёнки (г), W_t – масса той же плёнки (г) через 24 ч после инкубации в буфере HEPES-Na. Все результаты являлись средними значениями пяти образцов.

2.6. Иммобилизация L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* на нативные плёнки бактериальной целлюлозы

L-АСНаза EwA (595 МЕ/мг; молекулярная масса 37 кДа; 349 аминокислотных остатков; GenBank ID: AAR92666.3) была получена в лаборатории медицинской биотехнологии [44]. Чистота используемого фермента – 98,1%, изоэлектрическая точка – 8,1. Иммобилизацию L-АСНазы EwA проводили в 0,05 М буфере HEPES-Na (рН 8,0) асептически в ламинарном боксе. Влажные плёнки БЦ высушивали при 60 °С в течение 15 мин. Затем частично высушенные плёнки БЦ погружали в раствор фермента (0,05 мг/мл, 28 МЕ/мл) и инкубировали при 4 °С в течение 12 ч. Затем плёнки промывали в течение 2 мин в буфере для удаления избытка несвязанного фермента. Количество иммобилизованной L-АСНазы определяли с помощью спектрофотометрии (спектрофотометр Aquarius CE 7400,

Cecil Instruments Ltd., Великобритания) согласно Dawson и др. [238]. Эффективность иммобилизации L-АСНазы определяли как разницу между исходным количеством белка и количеством в супернатанте после 12 ч инкубации:

$$\text{Эффективность иммобилизации (\%)} = \frac{\text{Общая концентрация иммобилизованного фермента}}{\text{Общая концентрация загруженного фермента}} \cdot 100\%$$

Ёмкость загрузки фермента на плёнку БЦ оценивали по разнице начальной и конечной концентрации белка с учетом количества промывок. Ёмкость загрузки фермента (P_i) определяли как количество иммобилизованной L-АСНазы на грамм плёнки БЦ, используя следующее уравнение [239]:

$$P_i = \frac{m_i - (C_s \cdot V_s + C_w \cdot V_w)}{m}$$

где m_i – общее количество L-АСНазы (МЕ), добавленной к плёнке БЦ, C_s – концентрация L-АСНазы (МЕ/мл) в супернатанте после иммобилизации, C_w – концентрация L-АСНазы (МЕ/мл) в промывочном растворе, V_s – общий объем раствора (мл) на момент иммобилизации, а V_w – общий объем (мл) промывочного раствора, m – масса (г) плёнки БЦ.

2.7. Получение композита бактериальной целлюлозы и хитозана

Хитозан солянокислый (средняя молекулярная масса 7 кДа, степень деацелирования 80%; предоставлен Федеральным исследовательским центром «Основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия) растворяли в 1%-ном растворе CH_3COOH и выдерживали 20 мин до полного растворения. Затем готовили растворы хитозана в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5 или 1%. Влажные плёнки БЦ (продуцент *K. hansenii* ВКПМ В-11239) помещали в 24-луночный планшет и к ним добавляли по 1 мл растворов хитозана на 1, 2, 3 или 6 ч. Плёнки БЦ с хитозаном инкубировали на шейкере при 37 °С и постоянном перемешивании со скоростью 100 об/мин. Далее к плёнкам БЦ-хитозан добавляли 0,5 мл водного раствора 1% глутарового альдегида (рН 7,0) (неоFroxx, Германия) для сшивки молекул хитозана и инкубировали при 23 °С в течение 1, 2, 3 или 4 ч в статических условиях.

Иммобилизацию EwA (0,05 мг/мл, 28 МЕ/мл) проводили, как описано для нативных плёнок БЦ.

2.8. Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью ТЕМПО

Плёнки БЦ, используемые для окисления, были получены путём культивирования инокулята штамма *K. hansenii* ВКПМ В-11239. Для окисления плёнок БЦ с использованием 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксила (ТЕМПО, Рис. 17) их помещали в 19 мМ раствор ТЕМПО (Macklin, Китай) и 12 мМ KBr (Sigma-Aldrich, США), охлажденного до 4 °С и инкубировали при 4 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании со скоростью 750 об/мин.

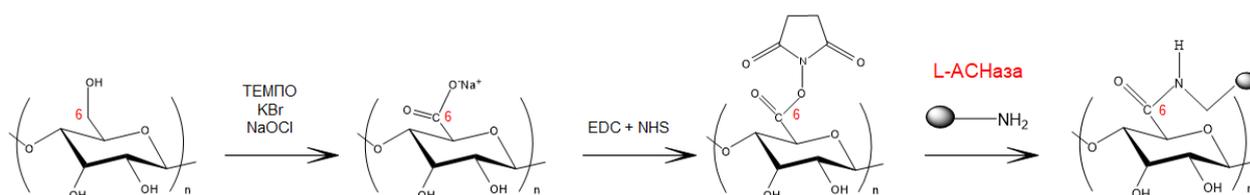


Рисунок 17. Схема реакции окисления БЦ с помощью ТЕМПО. Гидроксильные группы при атоме С6, окисленные ТЕМПО, показаны красным. L-ACНаза (показана в виде темного круга) связывается с окисленной целлюлозой своими аминогруппами, образуя ковалентную связь.

Затем в реакционную смесь медленно добавляли 5 мл 5 мМ NaClO₄ (Ленреактив, Россия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 80 мин, поддерживая pH на уровне 10,5. После этого окисленные плёнки промывали 96% этанолом в течение 1 мин и промывали водой в течение 1 ч на шейкере при скорости 150 об/мин. Далее плёнки переносили на 24-луночный планшет и предварительно инкубировали с 10 мМ буфером 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES-Na, Serva, Германия; pH 5,0) в течение 30 мин на шейкере при 150 об/мин при комнатной температуре. Затем карбоксильные группы плёнок БЦ, окисленных ТЕМПО (ТЕМПО-ОБЦ), активировали в реакции с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC, Macklin, Китай) и N-гидроксисукцинимидом (NHS, Macklin, Китай) [240] для последующей иммобилизации L-ACНазы. Плёнки инкубировали с раствором EDC/NHS (0,12 М/0,06 М) в свежем буфере MES (pH 5,0) в течение 1 ч и промывали водой. Затем

окисленные плёнки инкубировали с ферментом. Иммунизацию L-АСНазы EwA проводили по процедуре, описанной для нативных плёнок БЦ.

2.9. Окисление плёнок бактериальной целлюлозы с помощью NaIO_4

Реакцию окисления плёнок БЦ с использованием NaIO_4 проводили согласно схеме, представленной на рисунке 18 [241].

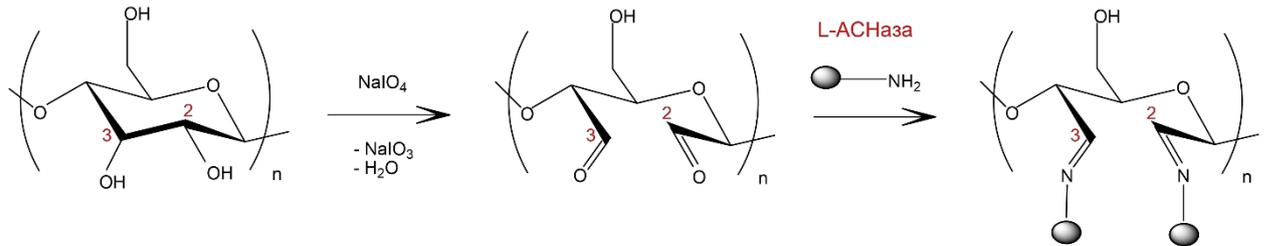


Рисунок 18. Схемa реакции окисления БЦ с помощью NaIO_4 . Гидроксильные группы при атомах C2 и C3, окисленные NaIO_4 , показаны красным. L-АСНаза (показана в виде темного круга) связывается с окисленной целлюлозой своими аминогруппами, образуя ковалентную связь.

Влажные плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч, погружали в 0,92 л раствора KCl/HCl (50 мМ раствора KCl + 0,2 М раствора HCl) при 25 °С на 24 ч. Далее образцы переносили в 200 мл свежего раствора KCl/HCl (50 мМ раствора KCl + 0,2 М раствора HCl), к которому добавляли NaIO_4 (Chemstore, Россия) до конечной концентрации 1% (w/v). Реакцию окисления проводили в темноте при 45 °С при постоянном перемешивании (105 об/мин) в течение 5 ч. После этого к реакционной смеси добавляли 14 мл этиленгликоля (Экос-1, Россия) для нейтрализации избытка NaIO_4 и инкубировали на шейкере в течение 1 ч с постоянным перемешиванием со скоростью 150 об/мин. Затем плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 (NaIO_4 -ОБЦ), промывали в течение 3 ч деионизированной водой и инкубировали с L-АСНазами. Иммунизацию L-АСНаз (0,05 мг/мл, 28 МЕ/мл), полученных в лаборатории медицинской биотехнологии, – EwA [44], *R. rubrum* [64], *Thermococcus sibiricus* (*T. sibiricus*) [242], а также коммерческого препарата *E. coli* («Веро-аспарагиназа») проводили по процедуре, описанной для нативных плёнок БЦ.

2.10. Инфракрасная спектроскопия нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы

Для анализа химического состава нативных и модифицированных плёнок БЦ была проведена инфракрасная (ИК) спектроскопия. Плёнки перед анализом были предварительно лиофилизированы. Спектры плёнок БЦ, БЦ-хитозан, ТЕМПО-ОБЦ, NaIO₄-ОБЦ и плёнок с иммобилизованным ферментом были записаны в диапазоне 800–4000 см⁻¹ с использованием спектрофотометра МИКРАН-3 (Simex, Россия). Спектральное разрешение составляло 4 см⁻¹ в режиме 40 сканирований.

2.11. Оценка морфологии нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы

Микрофотографии нативных и модифицированных плёнок БЦ были получены с помощью СЭМ. Плёнки были предварительно лиофилизированы. Плёнки покрывали золотым напылением и исследовали с помощью настольного электронного микроскопа Hitachi TM3030 (Hitachi Ltd., Япония). Изображения образцов были получены при ускоряющем напряжении 15 кВ и увеличении 500, 2500 и 5000.

2.12. Определение ферментативной активности L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* и подбор оптимального реакционного буфера

Ферментативную активность L-АСНазы EwA количественно определяли по скорости образования продукта реакции (ионов аммония) при заданных условиях. Одна международная единица фермента (МЕ) представляет собой количество фермента, необходимое для превращения 1 мкмоль L-аспарагина в 1 мкмоль L-аспарагиновой кислоты и 1 мкмоль NH₃ в минуту при 37 °С. Концентрацию определяли NH₃ с использованием колориметрического анализа в реакции нesslerизации [243]. Активность EwA, адсорбированной на нативные плёнки БЦ, измеряли в буферных растворах (все 50 мМ, рН 8,0): натрий-боратном, Трис-HCl, HEPES-Na, пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота) (PIPES-Na) и 3-(N-морфолино)пропансульфоновой кислоте (MOPS-Na) после инкубации в течение 20 мин при 37 °С в присутствии 40 мМ L-аспарагина.

2.13. Определение активности L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на нативные плёнки бактериальной целлюлозы, выращенные в течение различного времени

Исследование активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ путём физической адсорбции, проводили в течение 180 мин в присутствии 40 мМ L-аспарагина при 37 °С. Плёнки с иммобилизованным ферментом, выращенные в течение 48, 72 и 96 ч, инкубировали в 50 мл 0,05 М буфера HEPES-Na (рН 8,0). Каждые 10 мин отбирали 100 мкл буфера, в которых измеряли концентрацию аммиака. После каждого отбора проб в среду инкубации добавляли 100 мкл свежего буфера (Рис. 19А).

Способность иммобилизованной на нативные плёнки БЦ L-АСНазы EwA сохранять активность в присутствии субстрата оценивали при последовательной смене буфера. Плёнки БЦ с адсорбированным ферментом инкубировали в 10 мл буфера HEPES-Na (рН 8,0), содержащего 40 мМ L-аспарагина в течение 10 мин. Затем отбирали пробу объемом 100 мкл и измеряли в ней концентрацию аммиака, после чего плёнку с ферментом переносили в свежий буфер (Рис. 19Б).

Скорость высвобождения L-АСНазы EwA *in vitro* из нативных плёнок БЦ определяли путём инкубации плёнки с иммобилизованным ферментом в 50 мл 50 мМ буфера HEPES (рН 8,0) без L-аспарагина в течение 4 ч при 37 °С. Каждые 20 мин отбирали 600 мкл пробы, в которой определяли активность EwA, как описано выше. После каждого отбора проб в среду инкубации добавляли 600 мкл свежего буфера (Рис. 19В). По измерению активности EwA определяли скорость высвобождения фермента.

Для изучения поддержания скорости высвобождения EwA плёнки БЦ с иммобилизованной EwA инкубировали в 10 мл буфера без субстрата и каждые 20 мин переносили в свежий буфер. По изменению уровня активности EwA определяли скорость высвобождения фермента (Рис. 19Г).

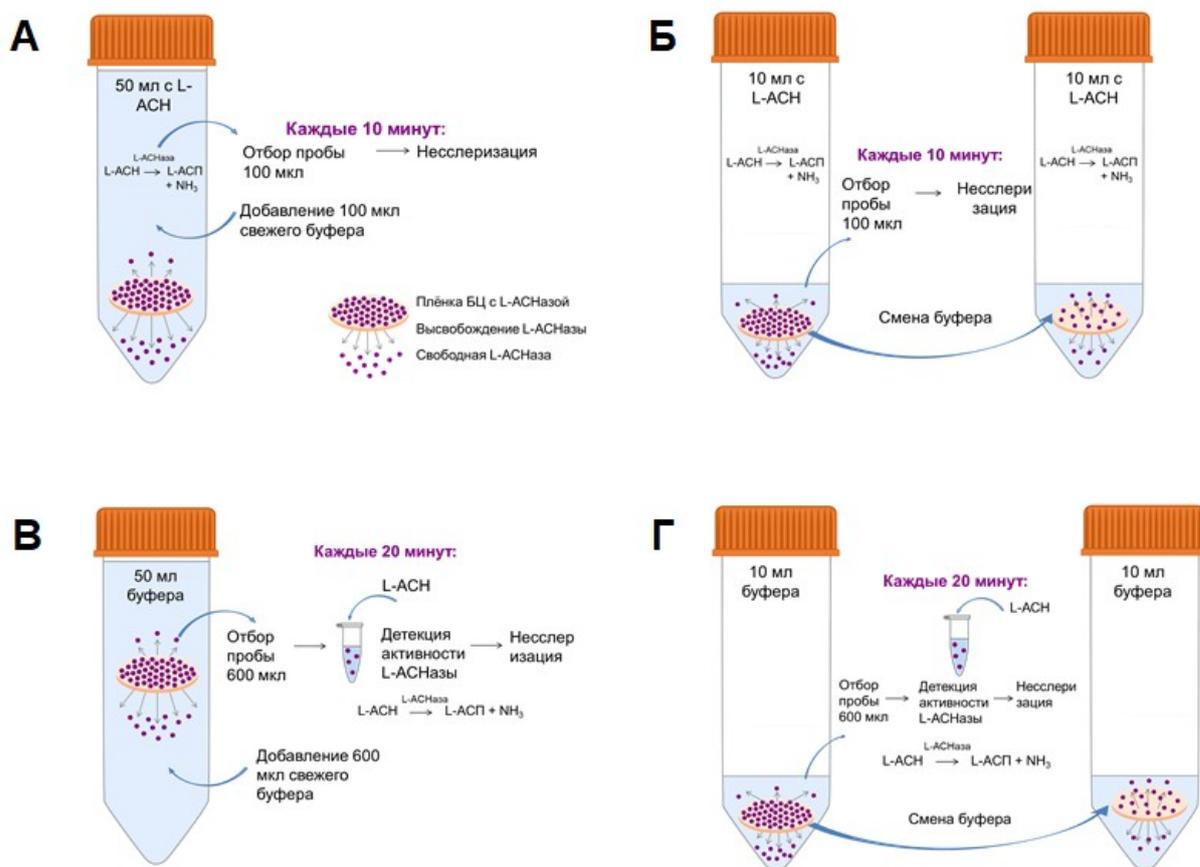


Рисунок 19. Схема определения активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ, выращенные в течение различного времени. (А) Схема эксперимента по определению общей активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной путём физической адсорбции на плёнки БЦ. (Б) Схема эксперимента по определению способности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ, сохранять активность в присутствии L-аспарагина. (В) Схема эксперимента по определению высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок БЦ по измерению её активности. (Г) Схема эксперимента по определению активности L-АСНазы EwA после высвобождения из плёнок БЦ.

2.14. Оценка скорости высвобождения L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном

Для оценки скорости высвобождения иммобилизованной L-АСНазы EwA из плёнок БЦ и БЦ–хитозан проводили следующий эксперимент. Плёнки с ферментом инкубировали в 25 мл буфера HEPES (50 мМ, рН 8,0) в течение 24 ч. Каждый час отбирали 300 мкл пробы, в которую добавляли L-аспарагин, инкубировали в

течение 5 мин, после чего определяли активность фермента методом прямой несслеризации (Рис. 20).

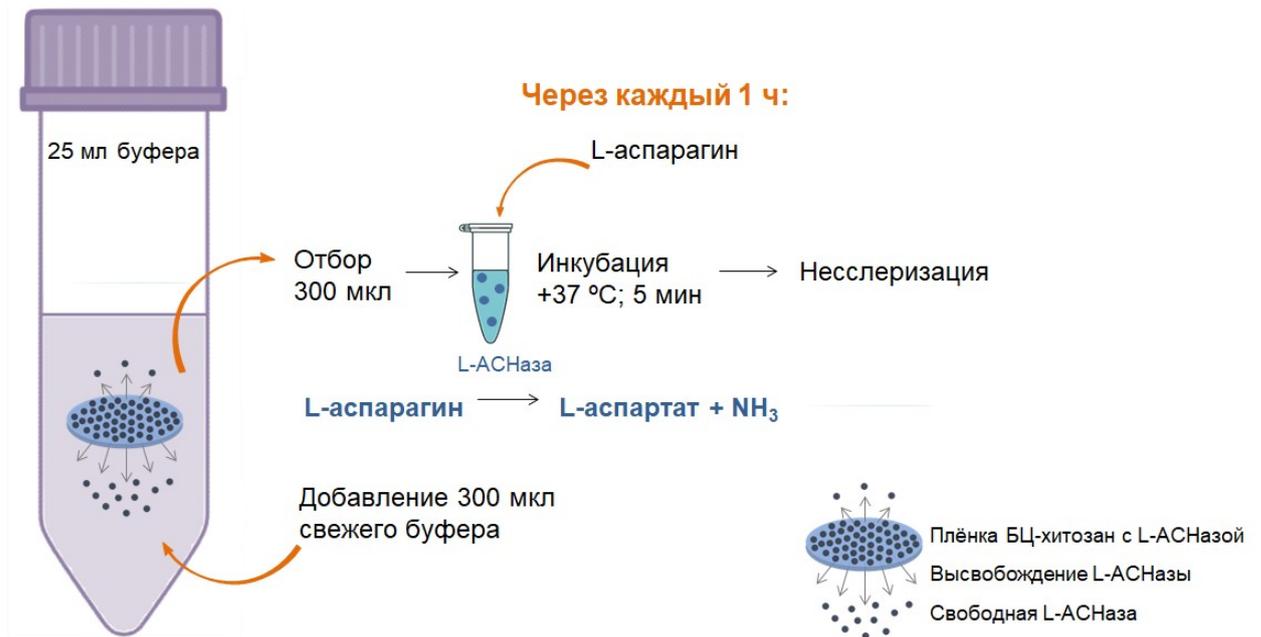


Рисунок 20. Схема определения высвобождения L-АСНазы из плёнок БЦ и БЦ-хитозан.

2.15. Кинетические модели высвобождения L-аспарагиназы из плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном

Данные о количестве L-АСНазы EwA, высвободившейся из плёнок БЦ и БЦ-хитозан, использовали для построения кинетических моделей высвобождения (Табл. 2) [244]. Для определения наиболее подходящей модели высвобождения L-АСНазы EwA для нативных плёнок БЦ и плёнок БЦ-хитозан был рассчитан коэффициент регрессии (R^2). Для описания механизма высвобождения EwA из плёнок определяли коэффициент диффузии (n), характеризующий различия в скорости высвобождения EwA из плёнок БЦ и БЦ-хитозан. Для расчёта n применяли модель Корсмейера–Пеппаса.

Таблица 2. Кинетические модели для оценки профиля высвобождения EwA

Кинетическая модель	Уравнение	Обозначения, используемые в уравнении
Нулевого порядка	$Q_t = Q_0 - K_0 \cdot t$	<p>Q_t – оставшееся количество лекарственного вещества в лекарственной форме в момент времени t;</p> <p>Q_0 – начальное количество препарата в лекарственной форме;</p> <p>K_0 – константа скорости высвобождения нулевого порядка.</p>
Первого порядка	$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{K_1}{2,303} t$	<p>Q_t – оставшееся количество лекарственного вещества в лекарственной форме в момент времени t;</p> <p>Q_0 – начальное количество препарата в лекарственной форме;</p> <p>K_1 – константа скорости высвобождения первого порядка.</p>
Хигучи	$Q_t = K_H \cdot t$	<p>Q_t – количество препарата, высвобождаемого во времени t;</p> <p>K_H – константа скорости высвобождения Хигучи.</p>
Корсмейера-Пеппаса	$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^N$	<p>M_t/M_∞ – доля препарата, высвобождаемая в момент времени t;</p> <p>K – кинетическая константа, которая включает структурную/геометрическую информацию о системе доставки и лекарственном средстве;</p> <p>N – показатель диффузионного высвобождения; предоставляет информацию о возможном механизме(ах) высвобождения лекарственного средства в действии.</p>

Хиксона-Кроуэлла	$Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = K_s \cdot t$	Q_t – оставшееся количество лекарственного вещества в лекарственной форме в момент времени t ; Q_0 – начальное количество препарата в лекарственной форме; K_s – константа скорости высвобождения, учитывающая соотношение «поверхность – объём».
------------------	---	---

2.16. Определение влияния денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы

Влияние повышенных температур на ферментативную активность L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ, исследовали в следующих диапазонах: EwA – 40–60 °С; *R. rubrum* – 50–70 °С; *E. coli* – 60–80 °С; *T. sibiricus* – 80–100 °С.

Ферменты, иммобилизованные на плёнки ОБЦ, помещали в 25 мл 50 мМ буфера НЕРЕС-Na (рН 8,0) и предварительно нагревали на водяной бане в течение 10–60 мин, после чего добавляли L-аспарагин до конечной концентрации 40 мМ. Активность L-АСНаз как в свободной форме, так и иммобилизованной на плёнки ОБЦ, измеряли методом несслеризации каждые 30 мин. Для этого отбирали 100 мкл образца, добавляли 100 мкл реактива Несслера и измеряли ОП на микропланшетном ридере при длине волны 540 нм (Рис. 21).

Для изучения влияния рН на активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, фермент инкубировали при 37 °С в течение 1,5 ч в 50 мл 15 мМ цитратно-фосфатно-боратного буфера (Na-цитрат, Na₂HPO₄, H₃BO₃-NaOH), содержащего 15 мМ L-аспарагина при рН от 4 до 11. Свободную форму L-АСНазы EwA инкубировали в течение 5 мин. Активность фермента определяли методом несслеризации.

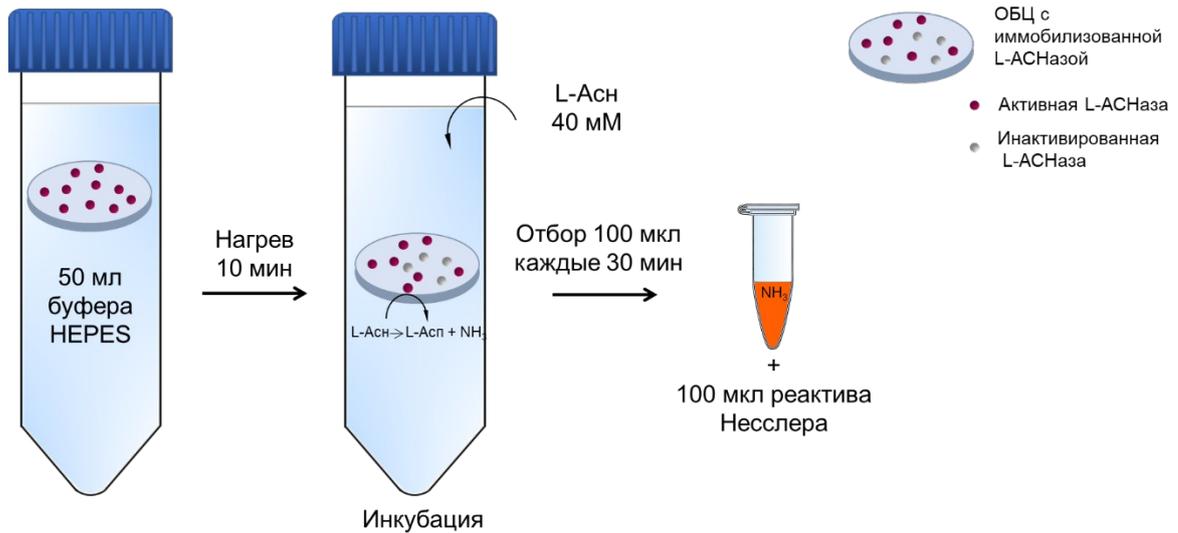


Рисунок 21. Схема эксперимента по определению температуры термоинактивации L-АСНазы. L-АСНазу, иммобилизованную на плёнки ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ, предварительно инкубировали при 40–60 °С в буфере НЕРЕС-Na в течение 10 мин, после чего добавляли 40 мМ L-аспарагина. Активность измеряли методом Несслера каждые 30 мин инкубации. Свободную форму L-АСНазы в той же концентрации использовали в качестве положительного контроля.

Влияние ионов металлов на активность иммобилизованной на ОБЦ L-АСНазы EwA изучали в 50 мл 0,5 мМ буфера НЕРЕС-Na (pH 8,0), содержащего 1 или 10 мМ ионов одного из металлов (Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺) и 40 мМ L-аспарагина. После 1,5-часового периода инкубации активность EwA определяли методом несслеризации.

Влияние мочевины на активность иммобилизованной L-АСНазы EwA определяли в 50 мМ буфере НЕРЕС-Na (pH 8,0) при 37 °С. Плёнки ОБЦ с иммобилизованным ферментом предварительно нагревали в 5 мл буфера в течение 10 мин при 37 °С. Затем добавляли 2,9 мл 6 М мочевины и инкубировали в течение 5–55 мин. Затем к раствору добавляли 5 мл 80 мМ L-аспарагина и инкубировали в течение 1,5 ч, после чего измеряли активность фермента методом несслеризации.

Эксперимент по влиянию трипсина на активность иммобилизованной на плёнки ОБЦ L-АСНазы проводили в 50 мМ буфера НЕРЕС (pH 8,0) при 37 °С. Для иммобилизации на ОБЦ готовили концентрированный раствор L-АСНазы (0,5 мг/мл, 280 МЕ/мл). Плёнки ОБЦ с иммобилизованным ферментом предварительно

инкубировали в течение 10 мин при 37 °С в 5 мл буфера, затем добавляли 100 мкл трипсина (21 МЕ/мл) и инкубировали в течение 5–125 мин. Затем к раствору добавляли 5 мл 80 мМ L-аспарагина и инкубировали в течение 1,5 ч, после чего измеряли активность EwA методом несслеризации.

2.17. Тест на возможность повторного использования L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Тест проводили путём измерения активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ в течение 8 последовательных инкубаций. Для этого плёнки ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ с иммобилизованной L-АСНазой инкубировали при 40 °С на водяной бане и каждые 45 мин переносили в свежий буфер HEPES (pH 8,0), содержащий 40 мМ L-аспарагина. В конце каждого цикла отбирали 100 мкл образца и измеряли активность фермента методом несслеризации. Затем ОБЦ с иммобилизованным ферментом извлекали из реакционной смеси и промывали в буфере HEPES (pH 8,0) в течение 5 мин и в 500 мл H₂O в течение 10 мин. Промытые плёнки ОБЦ помещали в свежий буфер HEPES (pH 8,0), содержащий 40 мМ L-аспарагина, и инкубировали повторно.

2.18. Определение кинетических параметров реакции L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки бактериальной целлюлозы

Для гидролиза L-аспарагина под действием свободной и иммобилизованной формы L-АСНазы EwA рассчитывали основные кинетические параметры K_m и V_{max}. Кинетические параметры определяли при 40 °С, в буфере HEPES (pH 8,0), содержащего L-аспарагин в концентрации 100–1000 мкМ и концентрации L-АСНазы EwA 0,017–0,046 МЕ/мг. Для оценки параметров K_m и V_{max} использовали уравнение Лайнуивера-Берка [245]:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Так как в системе реакции кроме фермента и субстрата присутствовали другие компоненты [246] (в нашем случае – плёнка БЦ), и система не является идеальной, для иммобилизованной L-АСНазы EwA мы оценивали кажущиеся значения K_m и V_{max} .

2.19. Определение цитотоксической активности L-аспарагиназ

Клеточные линии меланомы человека A375, A875, melKor, MelJuso и мыши B16F10, эпидермоидной карциномы A431, карциномы лёгких A549, колоректальной карциномы SW-620 и фибробласты WI-38 были получены из клеточной коллекции Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина (Москва, Россия). Клетки, за исключением WI-38, выращивали в полной среде RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭБС, Cargilorn scientific, Германия). Клетки WI-38 выращивали в полной среде DMEM с 15% ЭБС. Культивирование осуществляли при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂ и влажностью 95%. Для определения значения IC₅₀ клетки высевали в 96-луночный планшет (Wuxi NEST Biotechnology, Китай) с плотностью посева 10 000 клеток на лунку. На вторые сутки к клеткам добавляли свободный фермент EwA в диапазоне концентраций от 0,015 до 15 Ед/мл и культивировали в течение 72 ч, после чего оценивали цитотоксичность с помощью колориметрического метода – анализа с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромидом (МТТ). Расчёт значений IC₅₀ проводился в соответствии с установленными уравнениями для выживаемости клеток, зависящей от концентрации фермента. Для определения выживаемости клеток измеряли ОП формазана при длине волны 540 нм на планшетном ридере SuPerMax3000 (Flash Spectrum, Китай).

Для определения продолжительности действия L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки БЦ (БЦ-хитозан, ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ), а также L-АСНаз *E. coli*, *R. rubrum* и *T. sibiricus*, иммобилизованных на нативные и окисленные плёнки, клетки высевали в 24-луночный планшет (Kirgen, Хайкоу, Китай) с плотностью посева 50 000 клеток на лунку и выращивали в течение 24 ч. Затем в лунки с клетками помещали нативные и модифицированные плёнки с иммобилизованными L-АСНазами и инкубировали в течение 3 ч, после чего плёнки с ферментом переносили в новые лунки планшета. Цитотоксичность иммобилизованных L-АСНаз оценивали через 72 ч с помощью

МТТ-теста. Оптические изображения клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Biomed 3I (Биомед, Россия).

2.20. Статистическая обработка результатов

Среднее значение и стандартное отклонение рассчитывались для количественных данных с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 с пакетом XLSTAT. Измерения проводились в трёх или четырёх независимых повторах. Для оценки нормальности распределения применяли тест Шапиро-Уилка. Для статистической оценки различий между группами при сравнении двух условий использовали t-критерий Стьюдента; при сравнении трёх и более групп – однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим post hoc тестом Тьюки. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние времени культивирования продуцента бактериальной целлюлозы на толщину плёнок

При культивировании продуцента в 24-луночном планшете получены плёнки БЦ (Рис. 22А) диаметром 16 мм, которые затем были очищены от ростовой среды и бактерий (Рис. 22Б). Как и для других бактериальных штаммов, процесс роста продуцентов БЦ характеризуется лаг-фазой, логарифмической фазой, стационарной фазой и фазой гибели, при этом максимальный рост отмечается на 2–7 сутки [160]. Известно, что в процессе культивирования количество живых клеток продуцента БЦ уменьшается по мере того, как плёнка становится толще с течением времени [247].

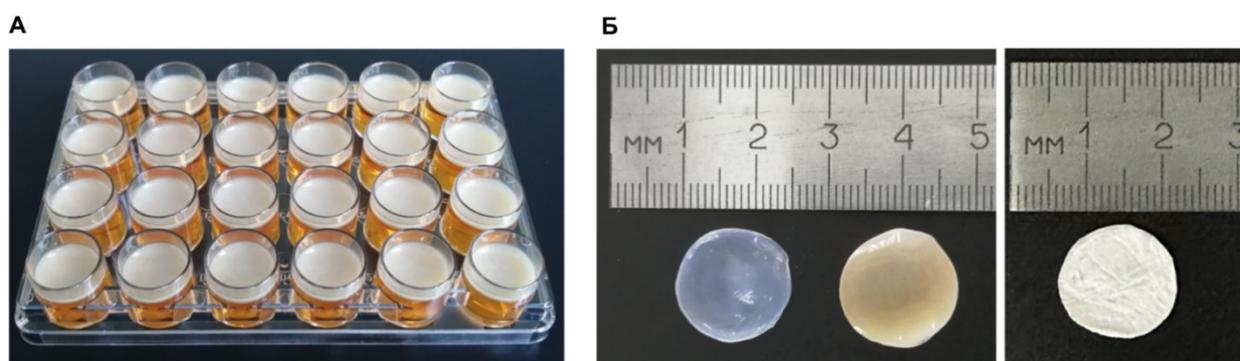


Рисунок 22. Фотографии плёнок БЦ. (А) Плёнки БЦ, растущие в 24-луночных планшетах. *K. hansenii* GH-1/2008 культивировали стационарно на среде Хестрина-Шрамма при 25 °С. (Б) Плёнка БЦ после очистки от бактерий и питательной среды (слева), до очистки (посередине) и очищенная лиофилизированная плёнка (справа).

В свою очередь, время культивирования и, следовательно, толщина плёнок БЦ могут влиять на пористость, содержание воды и способность адсорбировать и высвободить иммобилизованные препараты [248]. Для определения оптимальной толщины плёнок для иммобилизации L-АСНазы продуцент *K. hansenii* GH-1/2008 выращивали при статическом культивировании в течение 48–180 ч и оценивали толщину плёнок с помощью микрометра и измерения оптической плотности (ОП) в видимом спектре (Рис. 23, Рис. 24). Как и ожидалось, при выращивании *K. hansenii* GH-1/2008 в промежутке от 48 до 144 ч было характерно быстрое увеличение

толщины плёнок, и после 144 ч увеличение было незначительно (Рис. 24). Через 48 ч толщина плёнки БЦ составляла $0,61 \pm 0,02$ мм, а через 180 ч культивирования наблюдали максимальную толщину плёнок ($2,02 \pm 0,07$ мм). Увеличение ОП соответствовало увеличению времени культивирования штамма-продуцента (Рис. 24). Коэффициент корреляции (r) между ОП и толщиной плёнки составил $0,907$ ($p < 0,001$), что указывает на высокое соответствие результатов, полученных разными методами. Поэтому далее измерение ОП использовали для быстрой стандартизации плёнок БЦ.

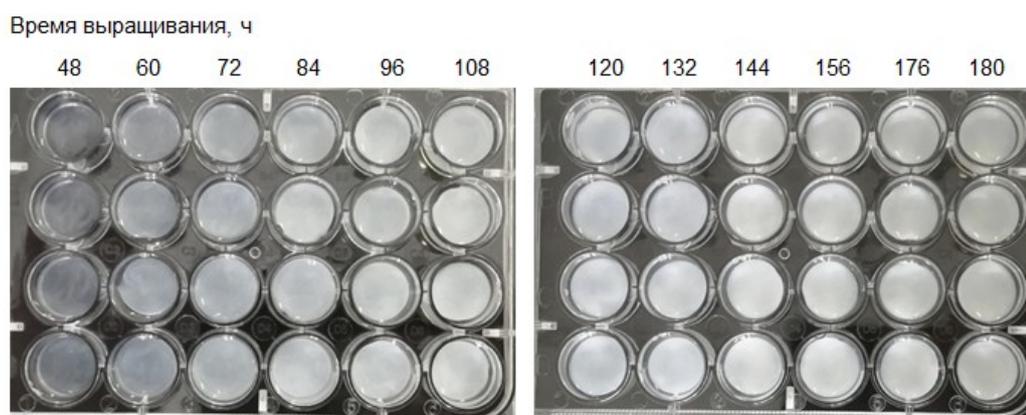


Рисунок 23. Фотографии плёнок БЦ, выращенных в течение 48–180 ч и очищенных от продуцента и питательной среды.

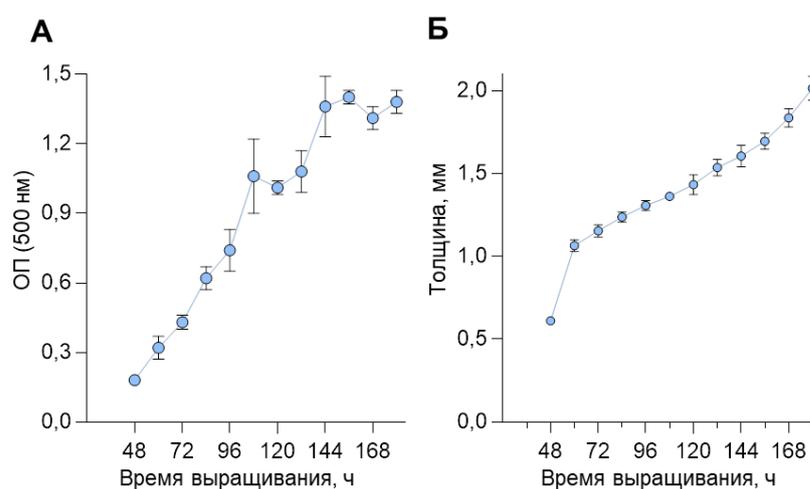


Рисунок 24. Влияние времени роста штамма-продуцента на толщину и ОП плёнок БЦ. (А) Толщина плёнок БЦ, измеренная с помощью цифрового микрометра. (Б) ОП плёнок, выращенных в течение 48–180 ч, измеренная при $\lambda=500$ нм. $N = 4$.

3.2. Влияние времени культивирования продуцента бактериальной целлюлозы на эффективность адсорбции L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*

Доступные гидроксильные группы на волокнах БЦ обеспечивают возможность иммобилизации различных ферментов за счёт слабых химических связей и электростатической адсорбции [249]. Эффективность иммобилизации L-АСНаз на плёнки БЦ зависит от pH среды, определяющей поверхностный заряд фермента. Активность L-АСНазы, иммобилизованной на БЦ путём физической адсорбции, была протестирована в буферах Гудса (HEPES, PIPES, MOPS), а также в борате натрия и Трис-HCl при 22 °C (все буферы имели pH 8,0). Для работы использовали буферы, имеющие максимальную буферную ёмкость в оптимальном диапазоне активности для L-АСНазы EwA (pH 8,0). Самая низкая активность L-АСНазы EwA наблюдалась в буфере MOPS ($0,669 \pm 0,030$ ME/мл), тогда как в HEPES активность была максимальной $1,827 \pm 0,143$ ME/мл (Рис. 25А). Ранее Vaicu и соавторы показали, что HEPES проявляет высокую буферную ёмкость при физиологических значениях pH [250]. Изoeлектрическая точка L-АСНазы EwA составляет 8,1 [44,251], поэтому для иммобилизации фермента путём физической адсорбции далее использовали именно буфер HEPES при pH 8,0.

Для получения плёнок БЦ, способных адсорбировать максимальное количество L-АСНазы, выращивали плёнки разной толщины и инкубировали их с ферментом. Для нативных плёнок БЦ, выращенных в течение 48 ч, количество адсорбированной L-АСНазы EwA составило $19,9 \pm 2,8\%$. Для плёнок БЦ, выращенных в течение 96 ч, количество адсорбированной L-АСНазы EwA увеличилось до $84,5 \pm 5,7\%$ (Рис. 25Б), на что могла повлиять более высокая толщина плёнок. Следует отметить, что эффективность иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч была выше, чем ранее описанные в литературе данные по иммобилизации L-АСНазы на наночастицы поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (PLGA) (4,8%) [252] и ПЭГ (48,6%) [253]. При этом количество иммобилизованной L-АСНазы не отличалось между плёнками, выращенными в течение 96 ч и 180 ч, что указывает на то, что способность плёнок адсорбировать фермент не зависит напрямую от времени культивирования продуцента БЦ.

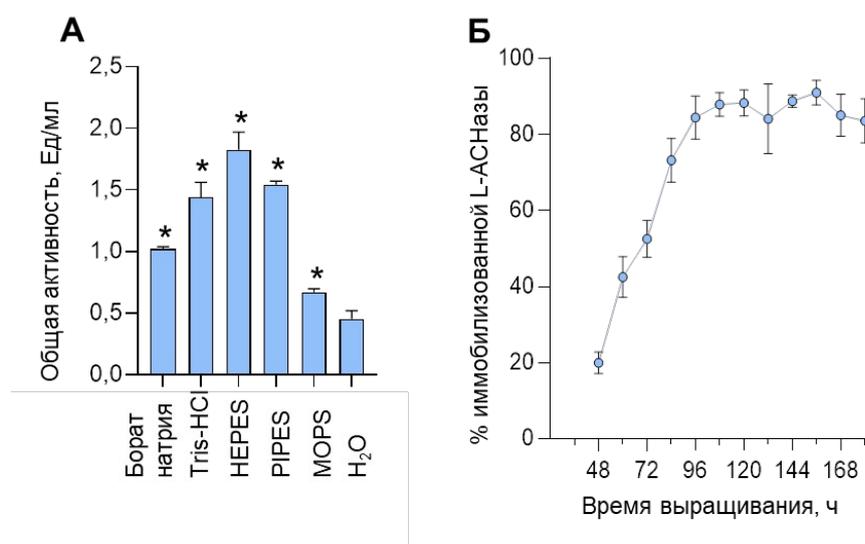


Рисунок 25. Активность адсорбированной L-АСНазы EwA в различных буферах и эффективность адсорбции L-АСНазы на плёнки различной толщины. (А) Общая активность EwA в различных буферах. Активность 0,1 мг фермента определяли по детекции ионов аммиака после инкубации в течение 3 мин в буферах (борат натрия, Tris-HCl, HEPES, PIPES, MOPS, pH 8,0) при 37 °С с помощью несслеризации. N = 4. * $p < 0,05$ относительно H₂O (one-way ANOVA с последующим тестом Тьюки). (Б) Процент адсорбированной L-АСНазы на нативные плёнки БЦ, выращенные в течение 48–184 ч.

3.3. Параметры плёнок бактериальной целлюлозы

Для плёнок БЦ, БЦ-хитозан, ТЕМПО-ОБЦ и NaIO₄-ОБЦ была проведена оценка основных характеристик плёнок (Табл. 4). При окислении плёнок ТЕМПО или NaIO₄ было выявлено, что окисление БЦ влияет на массу плёнок. Для окисленных плёнок наблюдали уменьшение массы на 18% и 20% по сравнению с массой нативных плёнок БЦ и БЦ-хитозан соответственно. Это соотносится с данными других авторов. Ранее процесс окисления был идентифицирован как потенциальный фактор, способствующий уплотнению слоёв в БЦ [241]. Наибольшая адсорбционная ёмкость была характерна для плёнок БЦ-хитозан и была в 1,6 раза выше, чем для нативных плёнок БЦ, в 2,1 раз выше, чем для плёнок ТЕМПО-ОБЦ и в 6,7 раз выше, чем для плёнок NaIO₄-ОБЦ. На увеличение адсорбционной ёмкости плёнок БЦ-хитозан могло повлиять увеличение количества

пор из-за сшивки молекул хитозана внутри плёнки БЦ.

В результате окисления БЦ, помимо массы и адсорбционной ёмкости, изменились значения ёмкости загрузки фермента в плёнки. По сравнению с нативными плёнками БЦ, ёмкость загрузки фермента увеличилась на 12% при иммобилизации на NaIO₄-ОБЦ и уменьшилась на 27% - при иммобилизации на ТЕМПО-ОБЦ. В то же время для плёнок БЦ-хитозан ёмкость загрузки изменилась незначительно, уменьшившись на 10%. Изменения внутренней структуры плёнок повлияли на эффективность иммобилизации фермента. Наибольшую эффективность иммобилизации 84,5 ± 5,7% наблюдали у нативных плёнок БЦ. Для плёнок, окисленных ТЕМПО и NaIO₄ эффективность иммобилизации снижалась на 29% и 15%, соответственно. Для плёнок БЦ-хитозан была характерна самая низкая эффективность иммобилизации фермента 52 ± 2%. Данное явление может быть связано с повышенной адсорбционной ёмкостью плёнок БЦ-хитозан (Табл. 4).

Таблица 4. Характеристики плёнок БЦ, БЦ-хитозан и ОБЦ.

Параметр	БЦ	БЦ-хитозан	ТЕМПО-ОБЦ	NaIO ₄ -ОБЦ
Масса влажной плёнки, мг	402,0 ± 0,9	401,8 ± 0,7	360 ± 8	328 ± 12
Диаметр, мм	16,00 ± 0,07	16,00 ± 0,07	16,00 ± 0,08	14,00 ± 0,08
Толщина, мм	10,0 ± 0,5	10,0 ± 0,4	9,0 ± 1,2	10,0 ± 0,8
Содержание воды, %	99,1 ± 0,1	98,7 ± 0,1	98,2 ± 0,2	97,2 ± 0,1
Адсорбционная ёмкость, %	1745 ± 630	2794 ± 341	1307 ± 23	420 ± 60
Ёмкость загрузки, МЕ/г	144 ± 10	130 ± 6	105 ± 15	161 ± 12
Эффективность иммобилизации, %	84,5 ± 5,7	52 ± 2	60 ± 3	72 ± 3

3.4. Исследование морфологии плёнок бактериальной целлюлозы

Тип пористой структуры гидрогелей, в том числе плёнок, определяет скорость высвобождения загруженных лекарственных средств [254], поэтому было важно оценить структуру плёнок БЦ до и после модификации. Морфология плёнок БЦ была проанализирована с помощью СЭМ. На рисунке 26 показаны микрофотографии внутренней структуры нативных плёнок БЦ, выращенных в течение 48, 72 и 96 ч.

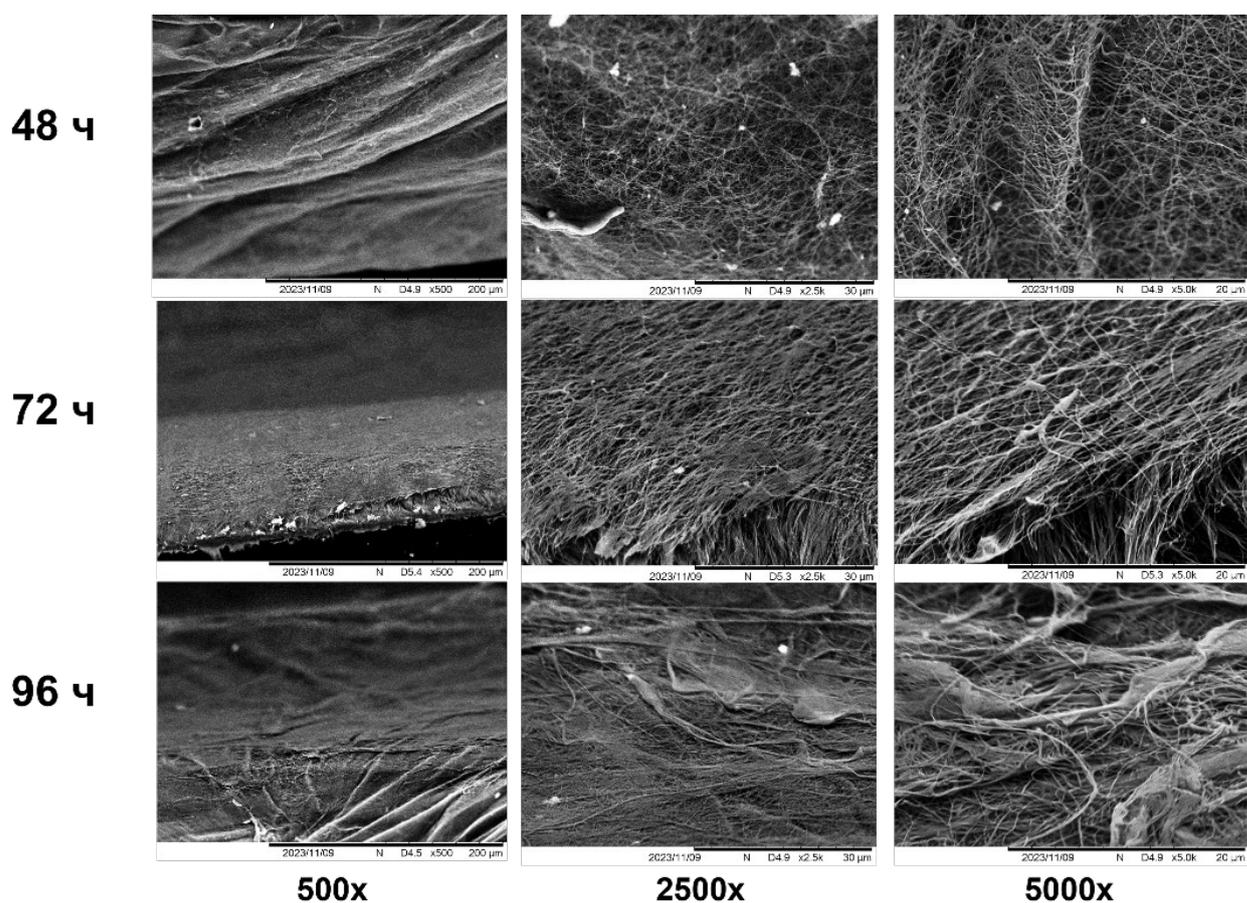


Рисунок 26. Микрофотографии СЭМ микроструктуры плёнок БЦ. Плёнки БЦ выращены в течение 48, 72 или 96 ч. Увеличение 500×, 2500× и 5000×.

Нативные плёнки БЦ обладали трёхмерной сетчатой структурой, как описано в литературе и обсуждалось ранее [160,255–257]. В плёнках БЦ наблюдали неравномерное распределение целлюлозных волокон. При этом нативные плёнки, выращенные в течение 48 ч, имели ячеистую структуру, тогда как плёнки, выращенные в течение 72 и 96 ч, имели более плотную волокнистую структуру. Наличие волокнистой структуры объясняет высокое водопоглощение и способность плёнок БЦ, выращенных в течение 72 и 96 ч адсорбировать большее количество L-АСНазы, чем плёнки, выращенные в течение 48 ч.

Микрофотографии плёнок БЦ после модификации хитозаном показаны на рисунке 27. В отличие от нативных плёнок, у плёнок БЦ-хитозан формировалась более плотная структура с меньшим размером пор (Рис. 27). Данное изменение могло повлиять на повышенную адсорбционную ёмкость плёнок БЦ-хитозан и сниженную эффективность иммобилизации (Табл. 4).

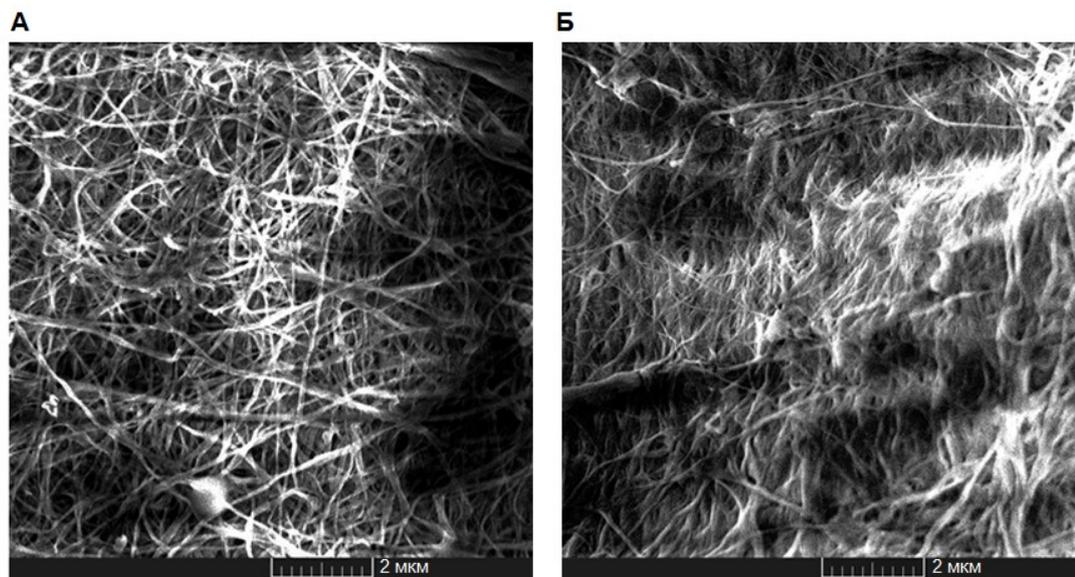


Рисунок 27. Морфология плёнок БЦ и БЦ–хитозан. (А) Микрофотографии СЭМ продольного среза нативных плёнок БЦ–хитозан. (Б) Микрофотографии СЭМ продольного среза плёнок БЦ–хитозан. Увеличение 20000×.

Для оценки изменений в структуре плёнок после окисления были получены изображения СЭМ. На рисунке 28 представлены микрофотографии поперечного среза плёнок БЦ до и после окисления ТЕМПО или NaIO_4 . До окисления на поперечном срезе нативных плёнок БЦ характерна сетчатая структура из трехмерных переплетающихся фибрилл (Рис. 28А). В отличие от нативных плёнок БЦ, плёнки, окисленные ТЕМПО, обладали пористой структурой в виде пластины или плоских лент (Рис. 28Б). Плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 (Рис. 28В), имели высокую степень агрегации фибрилл по сравнению с другими плёнками. Таким образом, при модификации БЦ путём окисления происходило значительное изменение их структуры, что влияло на свойства иммобилизованной L-АСНазы.

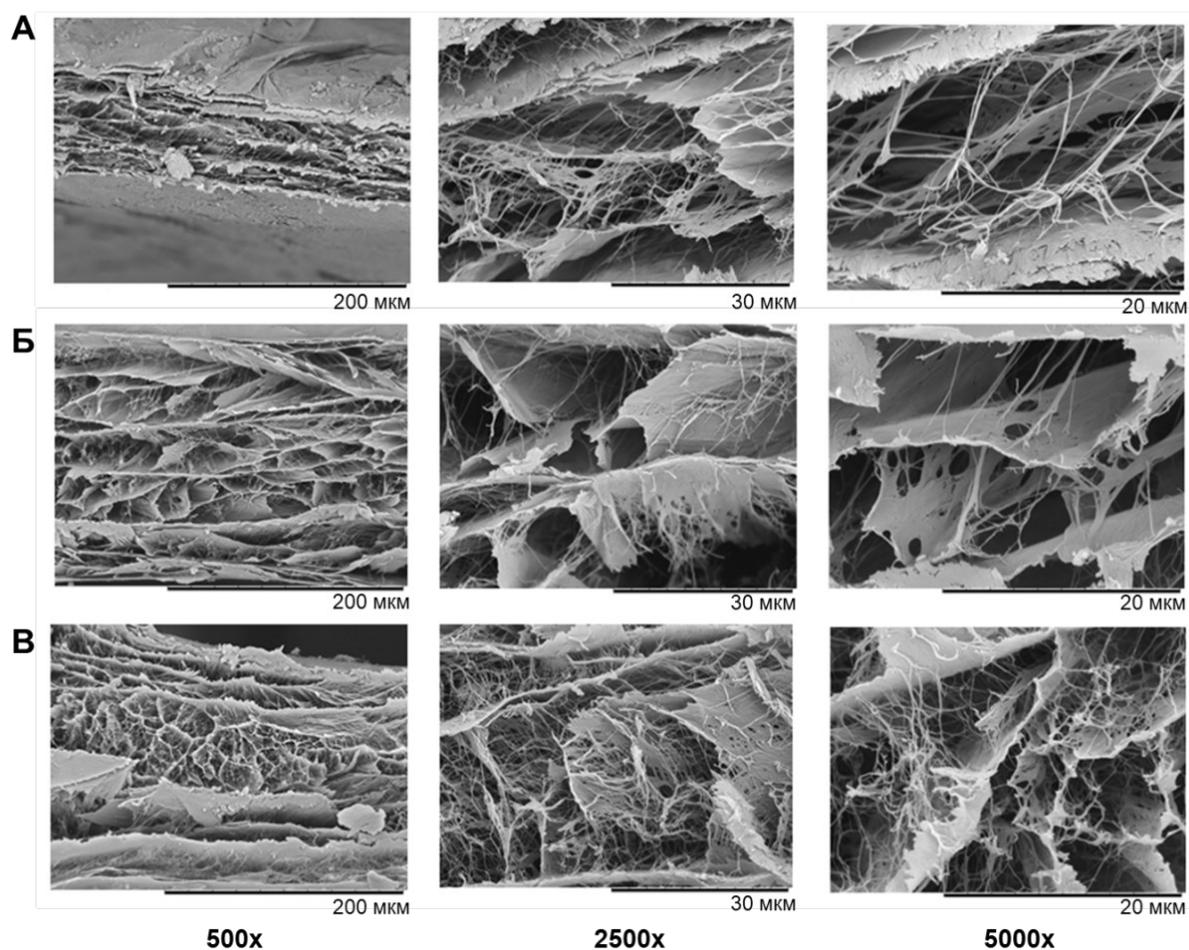


Рисунок 28. Морфология плёнок БЦ, ТЕМПО-ОБЦ и NaIO₄-ОБЦ. Микрофотографии СЭМ поперечного среза (А) нативной плёнки БЦ, (Б) плёнок ТЕМПО-ОБЦ, (В) плёнок NaIO₄-ОБЦ. Увеличение 500×, 2500× и 5000×.

3.5. Инфракрасная спектроскопия нативных и модифицированных плёнок бактериальной целлюлозы с иммобилизованной L-аспарагиназой

Для подтверждения химического состава нативных и модифицированных плёнок БЦ [258] и иммобилизации L-АСНазы была проведена ИК-спектроскопия. Для нативных плёнок БЦ были характерны следующие полосы: 1) полоса при 3341 см⁻¹, соответствующая валентным колебаниям ОН групп, 2) полоса при 2895 см⁻¹ (валентные колебания –СН₂– и –СН– групп), 3) полоса при 1203 см⁻¹ (деформационные колебания –СН– групп), 4) полоса при 1033 см⁻¹ (валентные колебания С–О-связи), 5) полосы 1060 см⁻¹ и 1103 см⁻¹ (валентные колебания С–О–С-связи), 6) полоса в районе 1452 см⁻¹, соответствующая деформационным колебаниям –СН₂– групп (Рис. 29А).

Для L-АСНазы были выявлены полосы амида I ($1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и амида II ($1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$), которые соответствуют поглощению амидных связей L-АСНазы (Рис. 29Б, Рис. 29В). При иммобилизации L-АСНазы на нативных плёнках БЦ, выращенных в течение 96 ч, наблюдали увеличение интенсивности полосы амида I по сравнению с плёнками, выращенными в течение 48 ч (Рис. 29А), что соответствует более высокой адсорбционной ёмкости плёнок БЦ, выращенных в течение 96 ч (Табл. 3).

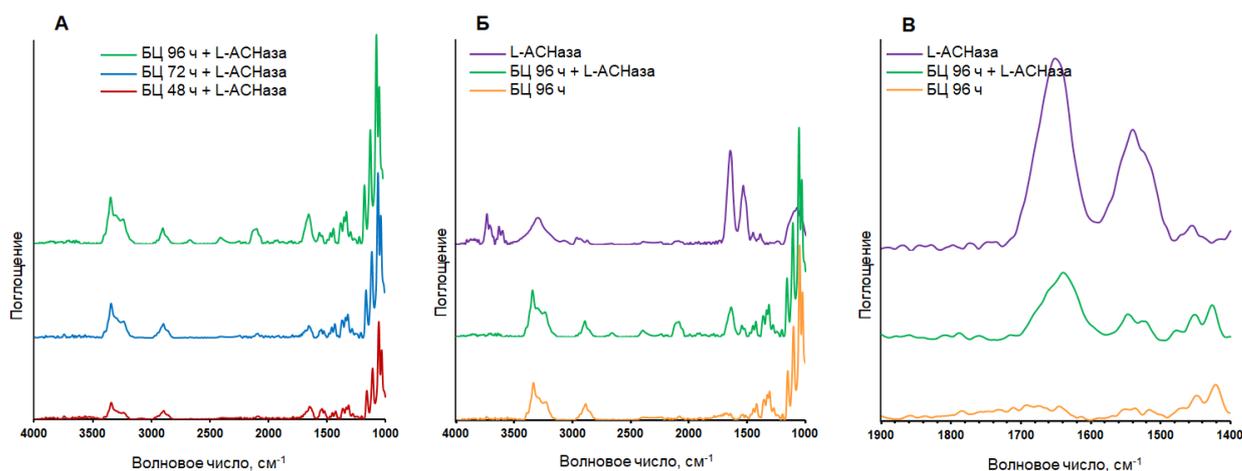


Рисунок 29. ИК-спектроскопия нативных плёнок БЦ с иммобилизованной путём физической адсорбции L-АСНазой. (А) ИК-спектры L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, выращенных в течение 48, 72 или 96 ч. (Б) ИК-спектры плёнок БЦ, выращенных в течение 96 ч, плёнок БЦ с иммобилизованной L-АСНазой и свободного фермента в диапазоне $1000\text{--}4000\text{ см}^{-1}$. (В) ИК-спектры плёнок БЦ, выращенных в течение 96 ч, плёнок БЦ с иммобилизованной L-АСНазой и свободного фермента в диапазоне $1400\text{--}1900\text{ см}^{-1}$.

ИК-спектры плёнок БЦ-хитозан представлены на рисунке 30А. Спектры БЦ-хитозан были подобны спектрам БЦ. Для плёнок БЦ и БЦ-хитозан были характерны следующие основные полосы: 1) полоса при 3335 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям ОН-групп; 2) полоса при 2876 см^{-1} , характерная для валентных колебаний $\text{--CH}_2\text{--}$ групп; 3) полоса при 1435 см^{-1} , соответствующая деформационным колебаниям --CH-- групп [79]. В спектре БЦ-хитозан присутствовали также новые полосы: 1) полоса первичного амина при 1589 см^{-1} , соответствующая NH-группам хитозана; 2) полоса основания Шиффа при 1682 см^{-1} , соответствующая --CH=N-- группе хитозана. При иммобилизации L-

АСНазы на плёнках БЦ-хитозан на спектре плёнок были видны характерные полосы для L-АСНаз: амид I ($1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) и амид II ($1500\text{--}1600\text{ см}^{-1}$).

На рисунке 30 (Б, В) представлены ИК-спектры плёнок ТЕМПО-ОБЦ и NaIO_4 -ОБЦ. У плёнок ТЕМПО-ОБЦ были выявлены следующие изменения в спектре (Рис. 30Б) по сравнению с нативными плёнками: 1) новые полосы при 1600 см^{-1} и 1400 см^{-1} , которые соответствуют валентным колебаниям --COOH -групп; 2) уменьшение полосы в области 3300 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям OH -групп. Изменения в спектре (Рис. 30В) были также выявлены для плёнок NaIO_4 -ОБЦ: 1) появление новой полосы в области 1650 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям C=O -групп; 2) полосы валентных колебаний OH - ($3000\text{--}3500\text{ см}^{-1}$) и --CH-- (2900 см^{-1}) групп стали узкими; 3) уменьшились полосы при 1380 см^{-1} и 1040 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям $\text{--CH}_2\text{--}$ и C--O--C -связей. Для L-АСНазы, иммобилизованной на обоих типах плёнок ОБЦ, также были выявлены новые полосы: амид I (1650 см^{-1}) и амид II (1535 см^{-1}). Таким образом, с помощью ИК-спектроскопии был подтверждён химический состав для всех типов плёнок БЦ и присутствие молекулы фермента.

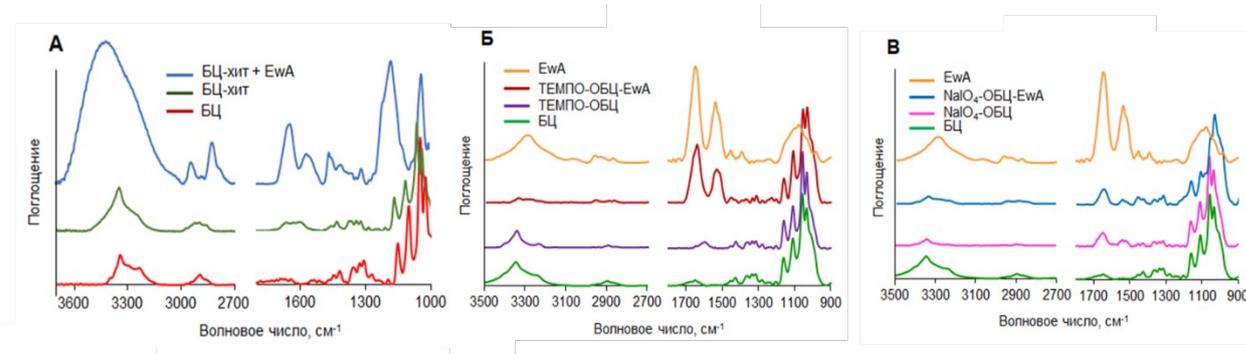


Рисунок 30. ИК-спектры нативных и модифицированных плёнок БЦ. (А) ИК-спектры плёнок БЦ-хитозан (БЦ-хит) и БЦ с L-АСНазой EwA, иммобилизованной путём физической адсорбции, в диапазоне $3700\text{--}2700\text{ см}^{-1}$ и $1800\text{--}1000\text{ см}^{-1}$. (Б) ИК-спектры EwA, нативной плёнки БЦ, плёнок ТЕМПО-ОБЦ и ТЕМПО-ОБЦ с иммобилизованной L-АСНазой в диапазоне $3500\text{--}2700\text{ см}^{-1}$ и $1700\text{--}900\text{ см}^{-1}$. (В) ИК-спектры EwA, нативной плёнки БЦ, плёнок NaIO_4 -ОБЦ и NaIO_4 -ОБЦ с иммобилизованной L-АСНазой в диапазоне $3500\text{--}2700\text{ см}^{-1}$ и $1700\text{--}900\text{ см}^{-1}$.

3.6. Ферментативная активность L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на нативных плёнках бактериальной целлюлозы

Для оценки активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ, плёнки с ферментом помещали в буфер с аспарагином и инкубировали в течение 180 мин (Рис. 19А). Количество L-АСНазы для иммобилизации на плёнках, выращенных в течение 48, 72 и 96 ч, предварительно нормировали с учётом ранее определённой эффективности иммобилизации (Рис. 25Б). L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки, выращенные в течение 48 ч, имела самую низкую активность ($2,22 \pm 0,04$ МЕ/мл) через 180 мин инкубации (Рис. 31А). Активность L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч, была выше и составляла $3,16 \pm 0,08$ МЕ/мл. Наибольшую активность L-АСНазы EwA ($5,14 \pm 0,14$ МЕ/мл) через 180 мин наблюдали при иммобилизации на плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч.

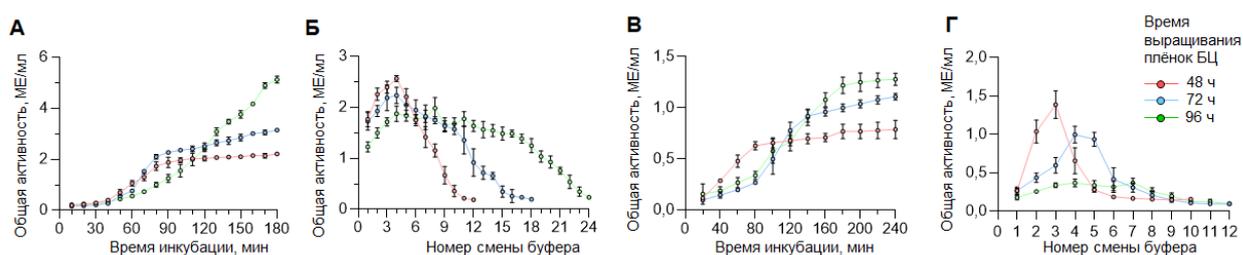


Рисунок 31. Активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ. Плёнки БЦ были выращены в течение 48, 72 и 96 ч. (А) Изменение активности L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, при инкубации с L-аспарагином в течение 180 мин. (Б) Изменение активности L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, при смене буфера, содержащего L-аспарагин. (В) Активность L-АСНазы при высвобождении из плёнок БЦ в течение 240 мин инкубации без L-аспарагина. (Г) Активность L-АСНазы при высвобождении из плёнок БЦ при смене буфера без L-аспарагина. N = 4.

Чтобы определить способность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ, сохранять активность в присутствии субстрата после нескольких инкубаций, плёнки каждые 10 мин переносили в новый буфер, содержащий свежий субстрат (Рис. 19Б). При иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки БЦ, выращенные в течение 48 ч, максимальную активность иммобилизованного

фермента ($2,57 \pm 0,06$ МЕ/мл) наблюдали после 4 смен буфера (Рис. 31Б), после чего происходило постепенное снижение активности вплоть до 12-й смены буфера. L-АСНаза, иммобилизованная на плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч, обладала максимальной активностью после 4-й смены буфера ($2,24 \pm 0,16$ МЕ/мл), после чего активность постепенно падала вплоть до 18-й смены буфера. Максимальную ферментативную активность для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки, выращенные в течение 96 ч, наблюдали после 8-й смены буфера ($1,99 \pm 0,21$ МЕ/мл). При этом при иммобилизации L-АСНазы на плёнки, выращенные в течение 96 ч, было показано наиболее длительное время сохранения активности фермента вплоть до 24-й смены буфера. Длительное сохранение ферментативной активности после нескольких инкубаций при иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч, может быть связано с большей толщиной и массой этих плёнок. Таким образом, активность иммобилизованной L-АСНазы EwA напрямую зависела от времени выращивания плёнок БЦ.

При длительной инкубации с субстратом L-АСНазы могут терять свою активность вследствие накопления продуктов реакции, закисления буфера или денатурации белка. В связи с этим был проведён эксперимент, в котором оценивали скорость высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок БЦ, инкубируя плёнки с адсорбированным ферментом в течение 4 ч в отсутствие субстрата (Рис. 19В). Каждые 20 мин отбирали пробу, в которой оценивали ферментативную активность L-АСНазы, и по изменению ферментативной активности судили о скорости высвобождения фермента. Наиболее быструю скорость высвобождения L-АСНазы EwA наблюдали при иммобилизации на плёнки БЦ, выращенные в течение 48 ч. Максимальную скорость высвобождения фермента наблюдали через 80 мин инкубации, когда активность фермента достигла $0,63 \pm 0,04$ МЕ/мл, после чего выходила на плато (Рис. 31В). Плёнки, выращенные в течение 72 ч, показали умеренную скорость высвобождения L-АСНазы: наибольшую скорость высвобождения наблюдали через 140 мин, когда активность EwA в реакционной смеси достигала $0,92 \pm 0,06$ МЕ/мл. Наиболее медленную скорость высвобождения L-АСНазы наблюдали при иммобилизации на плёнках БЦ, выращенных в течение 96 ч. Максимальную скорость высвобождения в данном случае наблюдали через

180 мин, когда активность фермента в реакционной смеси достигала $1,22 \pm 0,08$ МЕ/мл.

Для изучения поддержания скорости высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ, плёнки с ферментом каждые 20 мин переносили в свежий буфер без L-аспарагина (Рис. 19Г). L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки БЦ, выращенные в течение 48 ч, показала наиболее быструю скорость высвобождения. При 3-й смене буфера (Рис. 31Г) её активность достигала максимума $1,39 \pm 0,18$ МЕ/мл, после чего происходило быстрое снижение активности фермента вплоть до 6-й смены буфера. Для L-АСНазы, иммобилизованной на плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч, наблюдали среднюю скорость высвобождения. Максимальную активность L-АСНазы $1,00 \pm 0,11$ МЕ/мл наблюдали при 4-й смене буфера, после чего активность фермента снижалась и наблюдалась до 9-й смены буфера. При иммобилизации L-АСНазы на плёнки, выращенные в течение 96 ч, наблюдали наиболее длительное постепенное время высвобождения. Максимальную активность иммобилизованной L-АСНазы наблюдали с 3 до 9-й смены буфера, после чего активность снижалась вплоть до 11-й смены буфера. Таким образом, скорость высвобождения иммобилизованной L-АСНазы EwA также напрямую зависела от толщины пленок БЦ.

3.7. Подбор оптимальных условий для получения композита бактериальной целлюлозы и хитозана

Несмотря на преимущества БЦ, у нативных плёнок есть ряд недостатков, связанных с высокой пористостью и степенью набухания. Высвобождение лекарственных агентов из такого типа матрицы часто происходит с высокой скоростью, в связи с чем может происходить локальное высокое накопление препарата, вызывающее токсические эффекты в нормальных тканях [212]. Поэтому БЦ подвергают различным модификациям для длительного высвобождения лекарственного средства, например органическими полимерами [259]. Нами предложена модификация БЦ низкомолекулярным хитозаном для физической адсорбции L-АСНаз. Ранее данная модификация БЦ не использовалась для иммобилизации ферментов. Для создания композита БЦ-хитозан плёнки БЦ инкубировали с хитозаном, а затем молекулы хитозана сшивали с помощью

глутарового альдегида. Известно, что сшивка сети полимеров предотвращает преждевременную протеолитическую деградацию иммобилизованных препаратов, благодаря повышению плотности поперечных связей, что, в свою очередь, способствует увеличению времени полужизни препаратов в крови [90].

Для создания композита БЦ-хитозан проведены следующие эксперименты по подбору следующих условий: 1) времени культивирования плёнок БЦ; 2) концентрации хитозана; 3) времени сшивки хитозана глутаровым альдегидом; 4) времени инкубации хитозана с БЦ. При этом оптимальным считали такое условие, при котором не наблюдали значительной потери активности через 24 ч L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ-хитозан по сравнению с ферментом, иммобилизованным на нативные плёнки БЦ.

Модификация плёнок БЦ полимерами изменяет структуру плёнок и кинетику высвобождения иммобилизованных препаратов [203]. Динамика высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок БЦ-хитозан представлена на рисунке 32. Максимальной скоростью высвобождения фермента обладали плёнки БЦ, выращенные в течение 72 ч (Рис. 32А), в то время как скорость высвобождения с плёнок БЦ, выращенных в течение 48 ч и 96 ч, была в 2 раза ниже. Данный результат можно объяснить различием внутренней структуры плёнок БЦ после модификации хитозаном (Рис. 27) и адсорбционной ёмкости плёнок, выращенных в течение различного времени. Данные плёнки далее использовали для дальнейших модификаций.

При подборе оптимальной концентрации хитозана наибольшую активность L-АСНазы наблюдали при иммобилизации фермента на плёнки с концентрацией хитозана 0,05% (Рис. 32Б). Оптимальное время инкубации плёнок БЦ и хитозана составляло 2 ч (Рис. 32В). При инкубации плёнок БЦ и хитозана в течение 1 ч активность иммобилизованной L-АСНазы EwA снижалась на 8%, в течение 3 ч – на 29%, в течение 6 ч – в 12 раз. Ранее было показано, что наибольшее количество хитозана проникает в плёнки БЦ при инкубации в интервале 5–20 ч [237,260,261]. При инкубации плёнок БЦ с хитозаном в течение 6 ч, также, вероятно, адсорбировалось максимальное количество хитозана. В свою очередь, длительная инкубация плёнок БЦ с хитозаном могла снижать эффективность иммобилизации и скорость высвобождения L-АСНазы.

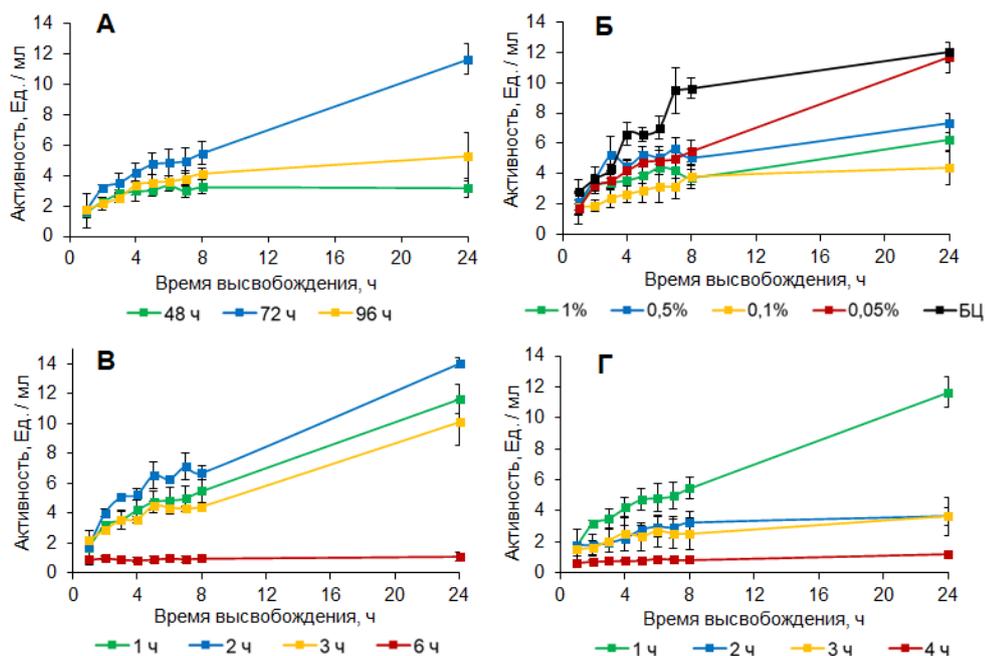


Рисунок 32. Влияние состава и условий разработки композита БЦ-хитозан на высвобождение L-АСНазы EwA в течение 24 ч. (А) Время выращивания БЦ (48, 72 или 96 ч); (Б) Концентрация хитозана (0,05; 0,1; 0,5 или 1%); (В) Время инкубации БЦ с хитозаном (1, 2, 3 или 6 ч); (Г) Время инкубации БЦ-хитозан с глутаровым альдегидом (1, 2, 3 или 4 ч). N = 4.

Оптимальное время инкубации плёнок БЦ-хитозан и глутарового альдегида составило 1 ч (Рис. 32Г). При увеличении времени инкубации до 2–3 ч активность иммобилизованной L-АСНазы EwA через 24 ч снижалась более чем в 3,5 раза, а при увеличении времени инкубации до 4 ч – активность снижалась более чем в 11 раз. Исходя из этого, можно сделать вывод, что длительная инкубация с глутаровым альдегидом, как и в случае с хитозаном, препятствует эффективной иммобилизации и последующему высвобождению L-АСНазы. В то же время короткая инкубация плёнок БЦ-хитозан с глутаровым альдегидом способствует сохранению активности иммобилизованной L-АСНазы. Подбранное нами время инкубации (1 ч при комнатной температуре и нейтральном pH) плёнок БЦ-хитозан с глутаровым альдегидом согласуется с данными Monteiro Jr. и соавт. для чистого хитозана, где эти условия были также оптимальными для сшивки [262].

После подбора условий получения композитов БЦ-хитозан было установлено, что оптимальное время выращивания плёнок БЦ составляет 72 ч, концентрация хитозана – 0,05%, время инкубации с хитозаном – 2 ч, время

инкубации БЦ–хитозан с глутаровым альдегидом – 1 ч. С данными плёнками БЦ–хитозан проводили дальнейшие эксперименты.

3.8. Высвобождение L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* из нативных плёнок бактериальной целлюлозы и бактериальной целлюлозы, модифицированной хитозаном

Для сравнения скорости высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной путём физической адсорбции, на нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ-хитозан, оценивали изменение активности иммобилизованной L-АСНазы в буфере в течение 24 ч. Скорость высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок нативной БЦ была выше, чем с плёнок БЦ-хитозан. Обычно для препаратов, загруженных в БЦ, характерно двухфазное высвобождение с быстрой первой фазой в течение нескольких часов [177,263]. В первые 8 ч L-АСНаза EwA высвобождалась в 2 раза быстрее из нативных плёнок БЦ, чем из плёнок БЦ-хитозан (Рис. 32Б). Это говорит о том, что модификация плёнок БЦ хитозаном позволяет избежать резкого скачка высвобождения L-АСНазы в первые часы. Через 24 ч скорость высвобождения с плёнок БЦ и БЦ-хитозан была практически одинаковой. Данный результат можно объяснить тем, что вторая фаза высвобождения лекарств из плёнок БЦ медленная [177,263]. Различие в скорости высвобождения L-АСНазы EwA можно объяснить также разной адсорбционной ёмкостью плёнок до и после модификации хитозаном. Более высокая адсорбционная ёмкость плёнок БЦ-хитозан [68] способствовала более длительному высвобождению L-АСНазы. Кроме того, при сшивке хитозана глутаровым альдегидом образуется новая сетчатая трехмерная структура внутри композита БЦ-хитозан (Рис. 27) с порами меньшего размера.

Тем самым, при иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки БЦ-хитозан, характерно более медленное высвобождение фермента, чем при иммобилизации на нативные плёнки БЦ. Эти данные согласуются с другим исследованием, в котором время высвобождения другого фермента – липазы, иммобилизованной на композитные гидрогелевые шарики БЦ-хитозан, увеличилось более чем в три раза [264].

Данные о скорости высвобождения EwA (Рис. 32Б) из плёнок БЦ и БЦ-хитозан использовали для построения кинетических моделей высвобождения фермента (Рис. 33).

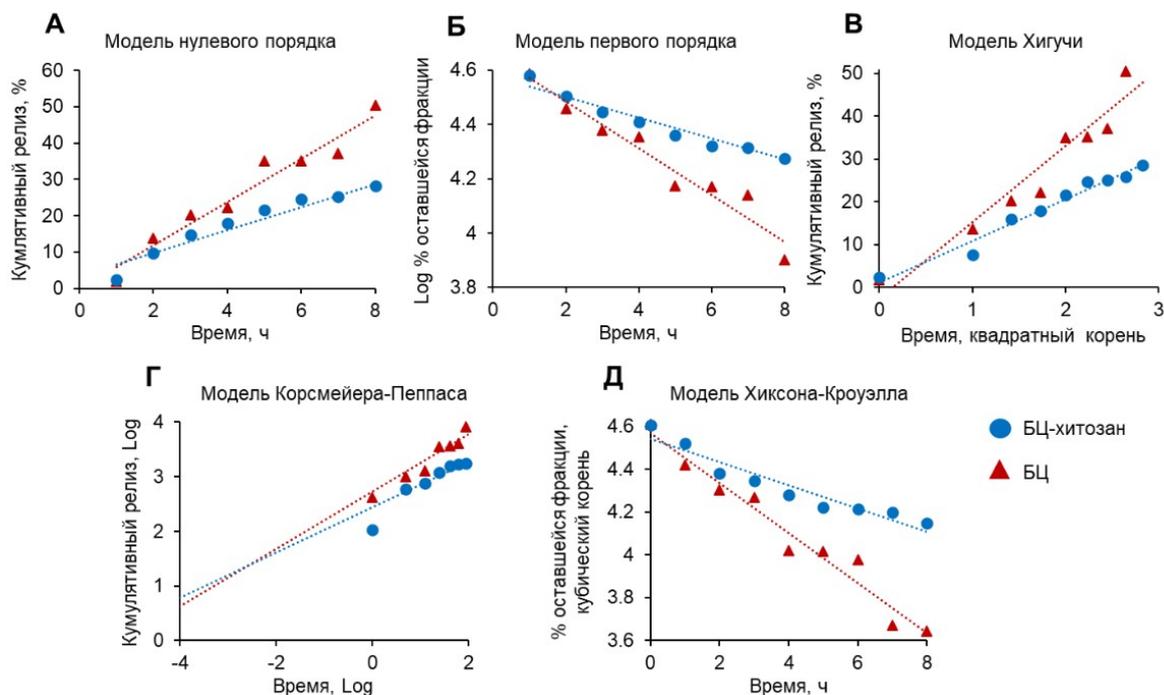


Рисунок 33. Кинетические модели высвобождения L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнке БЦ-хитозан или БЦ. Модель (А) нулевого порядка; (Б) первого порядка; (В) Хигучи; (Д) Корсмейера-Пеппаса; (Е) Хиксона-Кроуэлла.

Высвобождение L-АСНазы EwA из композита БЦ-хитозан соответствовало кинетической модели Хигучи (Рис. 33В, Табл. 5), в то время как высвобождение из нативных плёнок БЦ – кинетической модели Корсмейера-Пеппаса (Рис. 33Г, Табл. 5).

Таблица 5. Коэффициенты регрессии (R^2) для кинетических моделей высвобождения L-АСНазы EwA в течение 8 ч из плёнок БЦ и БЦ-хитозан

Кинетическая модель	БЦ	БЦ-хитозан
Нулевого порядка	0,960	0,928
Первого порядка	0,959	0,948
Хигучи	0,937	0,971
Хиксона-Кроуэлла	0,962	0,915
Корсмейера-Пеппаса	0,985	0,961

Для модели Хигучи высвобождение препарата определяется диффузией и зависит от концентрации загруженного препарата [265], а в случае модели Корсмейера-Пеппаса – зависит от свойств матрицы (процессов релаксации и перестройки при высвобождении загруженного препарата) [266].

Анализ механизма высвобождения L-АСНазы EwA из плёнок БЦ и БЦ-хитозан проводили с использованием модели Корсмейера-Пеппаса. Для этого брали значения Mt/M_∞ до 0,6. При высвобождении L-АСНазы из плёнок БЦ-хитозан была характерна диффузия, которая подчинялась закону Фика ($n < 0,45$). В то же время для высвобождения фермента из нативных плёнок БЦ была характерна не-Фиковская диффузия ($0,45 < n < 0,89$). При диффузии по закону Фика время релаксации матрицы намного превышает время диффузии растворителя в отличие от не-Фиковской диффузии, где это время примерно одинаковое. Поэтому при иммобилизации L-АСНазы на плёнки БЦ-хитозан происходило медленное высвобождение фермента в течение 24 ч.

3.9. Влияние иммобилизации на кинетические параметры реакции, катализируемой L-аспарагиназой *Erwinia carotovora*

Для оценки K_m , V_{max} и удельной активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на нативные и модифицированные плёнки БЦ, оценивали кажущиеся кинетические параметры, так как при иммобилизации ферментов на носителе на K_m и V_{max} значительно могут влиять такие факторы как диффузия, ограничивающая доступ к субстрату [267], сопротивление массопереносу матрицы носителя [268], метод иммобилизации и микроокружение фермента [269].

Кажущаяся K_m линейно зависит от диффузионных ограничений и в случае пренебрежимо малой диффузии приближается к истинному значению K_m . Кажущаяся V_{max} определяется по изменению глобальной скорости реакции в зависимости от концентрации субстрата в твердой/жидкой фазе [268]. Кинетические кривые гидролиза L-аспарагина L-АСНазой EwA представлены на рисунке 34А. Рассчитанные кажущиеся удельная активность, K_m и V_{max} для иммобилизованной L-АСНазы представлены в Табл. 6.

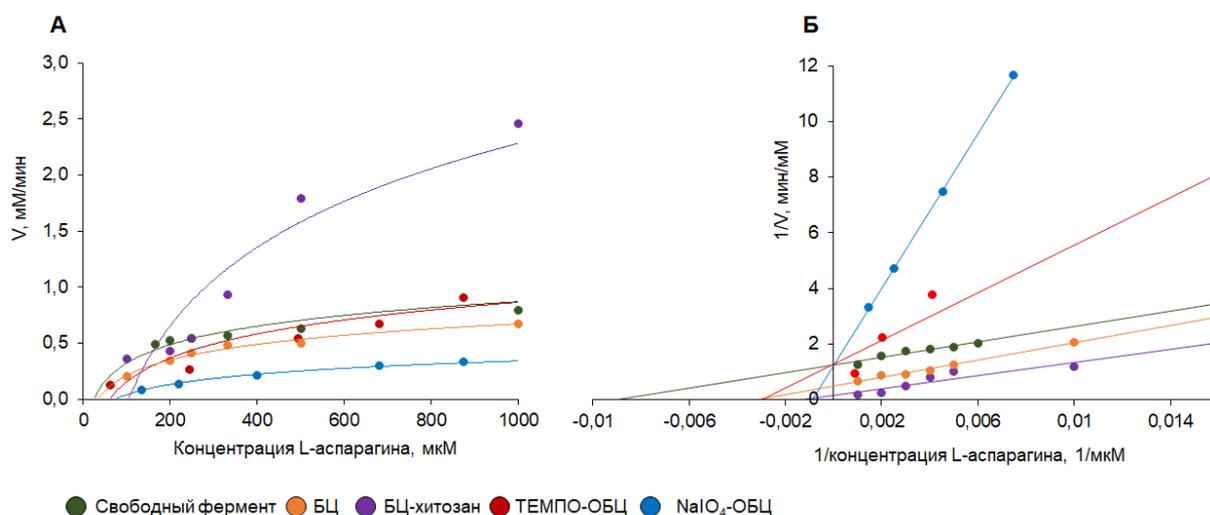


Рисунок 34. Графики зависимости скорости реакции свободной L-АСНазы и её иммобилизованных форм от концентрации субстрата (L-аспарагина), используемые для определения K_m и V_{max} . (А) Кривая Михаэлиса для нативной и иммобилизованной L-АСНазы; (Б) Линеаризация кривой Михаэлиса в виде графика Лайнуивера-Берка. Показаны исходные данные экспериментов, без учёта количества использованного фермента и времени инкубации.

Таблица 6. Кажущиеся кинетические параметры реакций, катализируемых L-АСНазой EwA в свободной и иммобилизованной формах.

Параметр	Свободная форма	БЦ-EwA	БЦ-хитозан-EwA	ТЕМПО-ОБЦ-EwA	NaIO ₄ -ОБЦ-EwA
K_m , мкМ	110	315	719	336	1131
V_{max} , мМ/мин *	7,3	2,42	3,61	0,78	0,69
Удельная активность, МЕ/мг	595	342	433	474	322

* Представлены данные после пересчёта на 1 МЕ фермента.

По сравнению со свободной формой L-АСНазы EwA значения кажущейся K_m при иммобилизации на нативные плёнки БЦ были выше в 2,9 раз, в 3,0 раза – при иммобилизации на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, в 6,5 раза – при иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан и в 10,3 раза – при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ.

Таким образом, в случае иммобилизации EwA на плёнки БЦ-хитозан и NaIO₄-ОБЦ наблюдали наиболее значительное повышение кажущейся K_m , а при иммобилизации на нативные плёнки БЦ и ТЕМПО-ОБЦ – наименее значительное повышение кажущейся K_m .

Значения кажущейся V_{max} при иммобилизации фермента на нативные плёнки БЦ снижались в 3,0 раза по сравнению со свободным ферментом, в 2,0 раза – при иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан, в 9,4 раза – при иммобилизации на плёнки ТЕМПО-ОБЦ и в 10,6 раз – при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ. Кажущаяся удельная активность для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на все типы плёнок БЦ, незначительно снижалась по сравнению с нативной формой EwA.

Изменение кинетических параметров реакции для иммобилизованных L-АСНаз можно объяснить тем, что по сравнению со свободными ферментами, иммобилизованные ферменты часто проявляют сниженную активность из-за ограниченного доступа субстрата [270], что приводит к повышению у ферментов значений K_m и снижению V_{max} . В других работах при иммобилизации L-АСНаз на различные носители также увеличивались значения кажущейся K_m по сравнению со свободным ферментом. Например, кажущаяся K_m для пэгилированной L-АСНазы EгA (150 мкМ, [125]) была выше в три раза по сравнению со свободным ферментом (48 мкМ, [67]). В одной из работ при иммобилизации L-АСНазы на нейлоновых трубках также было выявлено значительное увеличение кажущейся K_m , которая была выше на три порядка K_m для свободной L-АСНазы [269]. Кроме того, при ковалентной иммобилизации других ферментов (липазы В [271], лакказы [272] протеазы [273] и т.д.) на различные носители, также возрастали значения K_m и снижались значения V_{max} .

3.10. Влияние денатурирующих факторов на стабильность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнках окисленной бактериальной целлюлозы

Одним из ключевых факторов эффективного применения терапевтических ферментов является их долговременная стабильность при различных физико-химических условиях. Немодифицированные ферменты, как правило, не обладают оптимальными характеристиками для использования *in vivo* вследствие низкой

стабильности в организме человека [77]. Известно, что связывание ферментов с носителями может способствовать стабилизации их структуры и обеспечить длительное сохранение активности в неоптимальных условиях [274]. Активность при повышенных температурах, изменении рН, в присутствии различных ионов металлов и протеаз, а также других денатурирующих факторов является важным критерием для характеристики стабильности L-АСНаз. Денатурация может привести к полной потере активности L-АСНаз из-за диссоциации субъединиц фермента [275], в связи с чем исследование устойчивости L-АСНаз к действию различных денатурирующих факторов рассматривается как показатель их потенциальной стабильности *in vivo*. L-АСНаза EwA обладает низкой стабильностью при повышенных температурах (температура инактивации 45 °С), действии трипсина (инактивация происходит через 20 мин) [129] и коротким временем полужизни (4 ч). Ранее было показано, что при иммобилизации различных ферментов на ОБЦ может значительно увеличиться стабильность ферментов в растворе – например, лакказы [22] и липазы [23]. Поэтому в данной работе для увеличения стабильности L-АСНаз использовали ковалентную иммобилизацию на плёнки БЦ, окисленные ТЕМПО или NaIO₄. Модификацию, при которой наблюдали наибольшую стабильность L-АСНазы EwA, далее использовали для иммобилизации L-АСНаз *E. coli*, *T. sibiricus* и *R. rubrum* и последующей оценки их стабильности при термоинактивации и протеолитическом действии трипсина. Также оценивали цитотоксическую активность иммобилизованных ферментов в отношении клеток, обладающих низкой чувствительностью к действию L-АСНаз.

3.10.1. Влияние температуры на активность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Считается, что ковалентная иммобилизация может привести к образованию более жесткой структуры ферментов. Особенно повышается стабильность ферментов при многоточечной ковалентной иммобилизации на жёстких матрицах с короткой спейсерной связью. Все группы фермента, участвующие при таком типе иммобилизации, сохраняют своё относительное расположение при действии денатурирующих факторов, так как одна группа не может двигаться независимо от

других. В результате этого предотвращаются конформационные изменения в структуре фермента при денатурации [276].

Ранее также была показана зависимость между термостабильностью L-АСНаз и их цитотоксичностью [44], поэтому актуальным является исследование термостабильности L-АСНаз. Для определения термостабильности свободной и иммобилизованной на плёнки ОБЦ L-АСНазы EwA, фермент предварительно инкубировали при температуре 40–60 °С в течение 10 мин в буфере HEPES (pH 8,0) без L-аспарагина, а затем в присутствии L-аспарагина (Рис. 21).

Максимальную активность свободного фермента EwA при 40 °С наблюдали через 50 мин после инкубации с субстратом (Рис. 35А). При инкубации при 45 °С и выше L-АСНаза EwA в свободной форме не сохраняла активность (Рис. 35 Б–Д) даже после добавления субстрата. Полученные результаты хорошо соотносятся с ранее опубликованными данными о температуре инактивации фермента при 45 °С [44,94]. Несмотря на то, что иммобилизация на плёнки ОБЦ приводила к снижению активности L-АСНазы EwA, термостабильность фермента увеличивалась и температура термоинактивации иммобилизованного фермента статистически значимо отличалась от свободной формы ($p < 0,05$). Максимальную активность EwA, иммобилизованной на плёнках ТЕМПО-ОБЦ, наблюдали через 90 мин после инкубации при 40 °С (Рис. 35А), а EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO₄-ОБЦ, – через 120 мин инкубации при 55 °С (Рис. 35Г).

При 45 °С активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, практически не различалась. Повышение температуры до 55 °С приводило к снижению активности EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ более чем в три раза, при этом активность EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO₄-ОБЦ сохранялась. Кроме того, EwA, иммобилизованная на плёнках NaIO₄-ОБЦ, сохраняла активность ($32,4 \pm 3,3\%$ от максимальной) даже при инкубации при 60 °С.

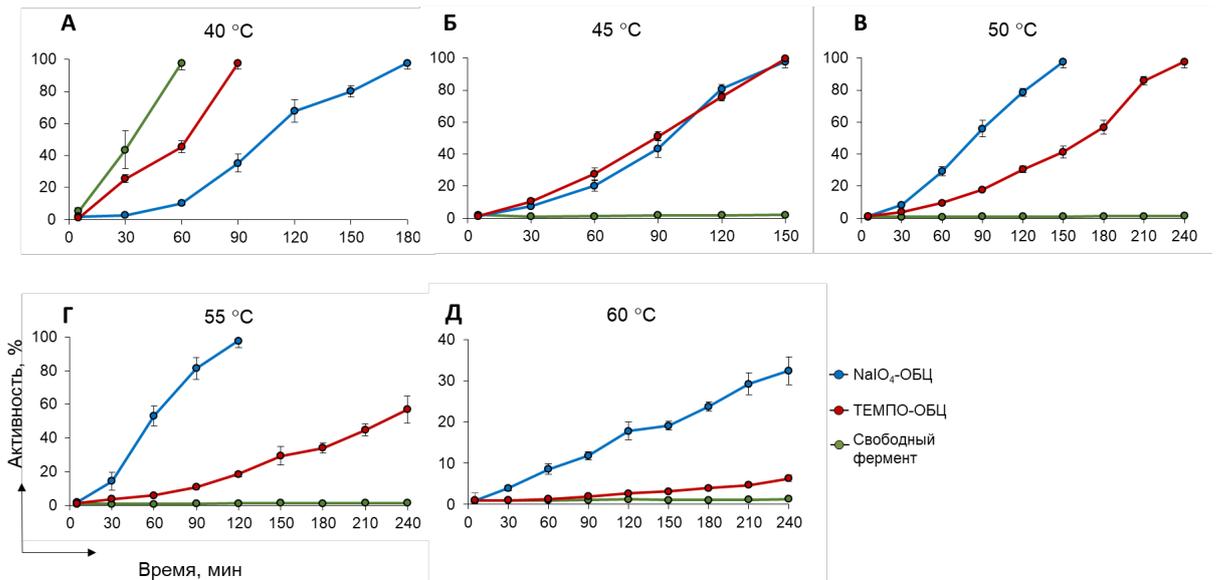


Рисунок 35. Влияние температуры на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ. Плёнки ОБЦ с ферментом погружали в буфер без L-аспарагина на 10 мин и инкубировали при температуре (А) 40 °С, (Б) 45 °С, (В) 50 °С, (Г) 55 °С или (Д) 60 °С. Затем к плёнкам добавляли раствор L-аспарагина (40 мМ) и инкубировали при температуре 40–60 °С в течение 5–240 мин. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Активность EwA, иммобилизованной на плёнки TEMPO-ОБЦ и NaIO₄-ОБЦ, также сохранялась после предварительного нагревания при 40–55 °С в течение 30 и 60 мин в отсутствии субстрата (Рис. 36). При инкубации при 50 °С без аспарагина в течение 30 и 60 мин активность L-АСНазы, иммобилизованной на плёнках NaIO₄-ОБЦ, составляла 100% и 80%, соответственно (Рис. 36А). В этих же условиях активность L-АСНазы, иммобилизованной на плёнках TEMPO-ОБЦ, составляла 90% и 75% соответственно (Рис. 36Б). Остаточную активность L-АСНазы при инкубации 55 °С в течение 30 и 60 мин без аспарагина наблюдали только при иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ. При этом активность EwA снижалась до 30% (инкубация 30 мин) и 8% (инкубация 60 мин) от максимальной активности, соответственно. Инкубация при 60 °С в течение 30 и 60 мин приводила к полной потере активности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на оба типа плёнок ОБЦ.

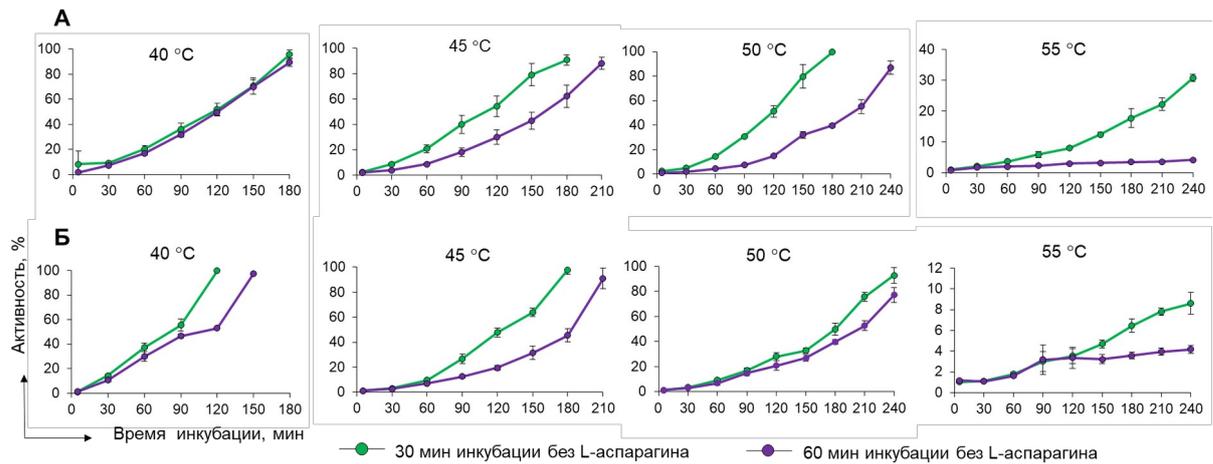


Рисунок 36. Влияние длительной инкубации при повышенных температурах на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ. Активность EwA, иммобилизованной на плёнки (А) NaIO₄-ОБЦ и (Б) ТЕМПО-ОБЦ. Плёнки ОБЦ с ферментом погружали в буфер без L-аспарагина на 30 мин (зелёная линия) или 60 мин (фиолетовая линия) и инкубировали при температуре 40–60 °С. Затем к плёнкам добавляли раствор L-аспарагина (40 мМ) и инкубировали при температуре 40–60 °С в течение 5–240 мин. Активность иммобилизованной L-АСНазы измеряли для плёнок, инкубированных при 40 °С, 45 °С, 50 °С, 55 °С или 60 °С. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Таким образом, иммобилизация L-АСНазы EwA на плёнки ОБЦ приводит к повышению термостабильности фермента, при этом наибольшей термостабильностью обладает EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ. Повышение термостабильности EwA при иммобилизации на ОБЦ, вероятно, обусловлено конформационным изменениям в структуре EwA при ковалентном связывании с целлюлозой [94]. Иммобилизация ферментов на БЦ, окисленных NaIO₄, может ограничивать конформационную гибкость ферментов, потенциально увеличивая энергию активации, необходимую для связывания субстрата и стабильность фермента при повышенных температурах [277]. Иммобилизация EwA на пленках NaIO₄-ОБЦ, вероятно, ограничивала гибкость молекулы иммобилизованного фермента и приводила к повышению термостабильности EwA.

При иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, напротив, снижалась устойчивость фермента к действию температур выше 45 °С. Данный результат мог быть обусловлен тем, что при иммобилизации EwA на плёнки ТЕМПО-ОБЦ увеличивалось расстояние между молекулой фермента и поверхностью ОБЦ за счёт введения связывающего звена EDS/NHS, что могло повлиять на частичное сохранение гибкости структуры фермента, и, следовательно, снижение термостабильности EwA (Рис. 35, Рис. 36) [23].

Так как при иммобилизации L-АСНазы EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ наблюдали значительное повышение термостабильности фермента, плёнки NaIO₄-ОБЦ далее использовали для иммобилизации других L-АСНаз (*E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*) для оценки влияния иммобилизации на термостабильность. Температуры инактивации свободных форм L-АСНаз составили 73 °С (*E. coli*), 63 °С (*R. rubrum*) и 100 °С (*T. sibiricus*) после 10 мин инкубации (Табл. 7).

Таблица 7. Активность L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ, после воздействия температуры инактивации.

L-АСНаза	Температура инактивации свободного фермента, °С	Активность NaIO ₄ -ОБЦ-L-АСНазы (%) при температуре инактивации свободного фермента
<i>E. coli</i>	73	91,3 ± 4,4
<i>T. sibiricus</i>	100	97,7 ± 3,9
<i>R. rubrum</i>	63	90,4 ± 2,4

При инкубации L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ при температуре инактивации, для свободных форм было показано, что все три L-АСНазы (*E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*) сохраняли свою активность. Вероятно, иммобилизация различных L-АСНаз на плёнки NaIO₄-ОБЦ стабилизирует их структуру, что, в свою очередь, предотвращает агрегацию и сохраняет функциональность ферментов. Например, известно, что максимальная активность L-АСНазы *T. sibiricus* в свободной форме наблюдается при 90 °С и при длительном воздействии данной температуры (более 2 ч) данная L-АСНаза способна агрегировать, образуя амилоидоподобные структуры [278].

3.10.2. Влияние pH на активность L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Одним из отличительных признаков рака являются закисление внеклеточной среды (низкий pH) и внутриклеточное ощелачивание цитоплазмы, при этом у нормальных клеток значение pH внеклеточной среды около 7,4, а для раковых клеток обычно может варьироваться от 6,7 до 7,1 [279]. L-АСНаза EwA в свободной форме обладает оптимальной активностью при значениях pH 7–9. В более кислой внеклеточной среде опухоли активность EwA может быть снижена, что потенциально ограничивает её внеклеточную эффективность. При иммобилизации L-АСНаз часто наблюдается сохранение активности в более широком диапазоне pH [280], поэтому было проведено определение диапазона действия pH EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ.

Влияние pH среды на активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках ОБЦ, определяли в диапазоне pH от 4 до 11. Результаты представлены на рисунке 37. Как и ожидалось [44], при pH 8 свободный фермент обладал максимальной активностью. При ковалентной иммобилизации EwA на плёнки ОБЦ смещался оптимум фермента в щелочную сторону pH (8–9), что могло быть связано с накоплением продуктов реакции в связи с ограничением диффузии из плёнок [281]. Ковалентная иммобилизация L-АСНазы EwA на ОБЦ приводила к значительному расширению диапазона pH, при котором сохранялась высокая ферментативная активность L-АСНазы EwA. Для EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, наблюдали сохранение более 80% активности при pH 6. В диапазоне pH от 7 до 9 активность EwA, иммобилизованной на оба типа ОБЦ, находилась в диапазоне 79,0–97,7%. При pH 10 и 11 активность EwA, иммобилизованной на оба типа ОБЦ, сохранялась на уровне более 70%, что в три раза выше, чем у свободного фермента. При pH меньше 6 не было различий между активностью иммобилизованного и свободного фермента.

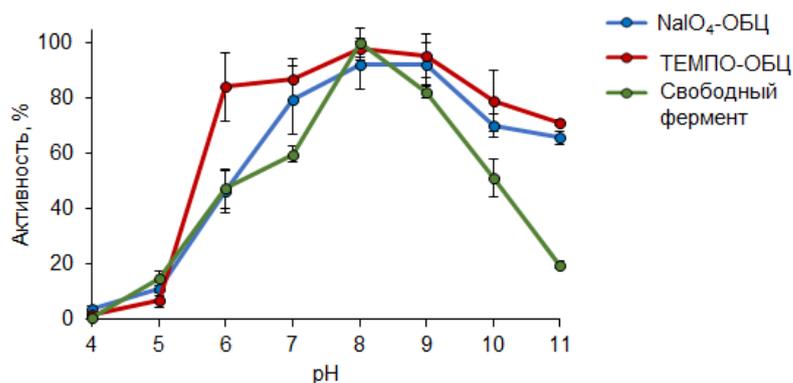


Рисунок 37. Зависимость активности EwA от pH. L-АСНазу, иммобилизованную на плёнки ОБЦ и фермент в свободной форме инкубировали при различных значениях pH (4–11) в цитратно-фосфатно-боратном буфере (15 мМ), содержащем 15 мМ L-аспарагина в при 37 °С. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Расширение диапазона pH действия L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, в щелочную сторону могло быть связано с тем, что на поверхности иммобилизованного белка увеличивалось соотношение положительно заряженных и отрицательно заряженных остатков [282], например, лизина, расположенных на поверхности, которые влияют на стабильность ферментов [283] за счёт различных взаимодействий, включая водородные связи, ионные взаимодействия и взаимодействия с молекулами воды [284]. Мы предполагаем, что уменьшение количества заряженных аминокислотных остатков, прежде всего, лизинов на поверхности L-АСНазы вследствие иммобилизации на плёнки ОБЦ приводило к повышению устойчивости EwA к действию pH в щелочном диапазоне. Таким образом, для EwA, иммобилизованной на оба типа ОБЦ, диапазон pH, при котором сохранялась высокая активность фермента, был шире (6–11), чем для свободного фермента (7–9).

3.10.3. Влияние ионов металлов на ферментативную активность L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Ионы металлов играют важную роль в формировании структуры фермента и поддержании его активности [285], поэтому мы исследовали влияние ионов металлов на ферментативную активность свободной и иммобилизованной на плёнки ОБЦ L-АСНазы. Повышение активности свободной формы EwA наблюдали в присутствии Mg^{2+} : при увеличении концентрации соли до 10 мМ активность увеличивалась на 20% (Табл. 8).

Таблица 8. Активность EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, в присутствии ионов металлов и 40 мМ L-аспарагина при 37 °С. N = 4.

	Свободная форма EwA		ТЕМПО-ОБЦ-EwA		NaIO ₄ -ОБЦ-EwA	
	1 мМ	10 мМ	1 мМ	10 мМ	1 мМ	10 мМ
Концентрация соли металла						
MgCl ₂	93,6 ± 4,9	119,5 ± 5,8	103,8 ± 5,5	98,5 ± 2,4	96,1 ± 10,8	119,0 ± 2,2
CaCl ₂	75,1 ± 2,0	59,9 ± 2,8	97,2 ± 3,7	95,1 ± 6,5	89,5 ± 5,4	103,0 ± 11,4
CuSO ₄	22,2 ± 1,6	6,9 ± 0,3	11,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1	84,8 ± 0,2	9,9 ± 1,3
NiCl ₂	41,7 ± 5,5	7,8 ± 0,9	36,4 ± 10,6	4,3 ± 0,3	64,4 ± 4,9	21,1 ± 1,3
FeCl ₃	29,2 ± 1,6	8,8 ± 1,9	12,5 ± 4,6	5,7 ± 0,3	99,1 ± 15,3	27,1 ± 1,2
ZnSO ₄	45,3 ± 2,8	6,2 ± 0,2	37,3 ± 2,1	6,0 ± 1,9	92,9 ± 6,0	29,6 ± 5,3

Также небольшое увеличение ферментативной активности в присутствии Mg^{2+} наблюдали для EwA, иммобилизованной на обеих модификациях плёнок ОБЦ. Таким образом, присутствие Mg^{2+} оказывало положительное влияние на активность всех форм EwA. Присутствие Ca^{2+} в буфере в концентрации 1 мМ приводило к снижению активности свободной формы EwA на 25%, а в концентрации 10 мМ – на 40%. В то же время активность фермента, иммобилизованного на плёнки ОБЦ, в присутствии Ca^{2+} оставалась практически неизменной. Известно, что Ca^{2+} в высокой концентрации (>1%) могут значительно снижать активность некоторых ферментов за счёт разрушения связи между аминокислотными остатками Асп и

Глу [286]. В нашем случае Ca^{2+} снижали активность EwA только в свободной форме и практически не влияли на активность EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ. Данное явление, вероятно, связано с ограниченным доступом отрицательно заряженных аминокислотных остатков на поверхности L-АСНазы при иммобилизации на плёнки ОБЦ.

Присутствие ионов металлов никеля, меди, железа и цинка значительно ингибировало активность свободной формы фермента и EwA, иммобилизованной на ТЕМПО-ОБЦ. Активность свободного фермента снижалась на 55 и 59% в присутствии 1 мМ ионов цинка и никеля, на 71 и 78% – в присутствии ионов железа и меди. Для EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ, активность снижалась почти на 90% в присутствии 1 мМ ионов меди или железа и на 65% в присутствии 10 мМ ионов никеля и цинка. Для EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO_4 -ОБЦ, активность снижалась примерно на 10% в присутствии 1 мМ ионов меди, цинка и железа и на 35% в присутствии 1 мМ ионов никеля. Таким образом, L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO_4 -ОБЦ, обладает повышенной устойчивостью ко всем ионам металлов (кроме никеля) в концентрации 1 мМ по сравнению со свободной формой EwA и EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ. Присутствие в буфере ионов меди, никеля, цинка или железа в концентрации 10 мМ приводило к снижению активности свободной формы EwA на 90% и EwA, иммобилизованной на плёнки ТЕМПО-ОБЦ. Активность EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO_4 -ОБЦ, снижалась на 70–80% в присутствии 10 мМ ионов никеля, цинка и железа и на 90% в присутствии меди. Эти данные согласуются с известным ингибирующим и токсическим действием тяжелых металлов на ферменты [287]. Таким образом, добавление ионов металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+}) в концентрации 10 мМ приводило к значительному ингибированию активности L-АСНазы, как в свободном состоянии, так и при иммобилизации на плёнках ОБЦ.

3.10.4. Влияние мочевины на активность L-аспарагиназы *Erwinia carotovora*, иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Широко используемым методом изучения фолдинга, стабильности белков и их четвертичной структуры является химическая денатурация белков с

использованием мочевины [288], поэтому было проведено определение влияния мочевины на активность свободной и иммобилизованной L-АСНазы EwA. При инкубации свободной формы EwA в буфере, содержащем 2,5 М мочевины, происходило снижение активности фермента до $20,1 \pm 5,3\%$ через 15 мин инкубации; через 55 мин активность не превышала $6,2 \pm 1,8\%$ (Рис. 38). Снижение активности при инкубации с мочевиной также наблюдали для EwA, иммобилизованной на плёнке ТЕМПО-ОБЦ. Активность снижалась до $80,4 \pm 3,4\%$ через 15 мин инкубации и достигала $38,7 \pm 7,7\%$ через 55 мин. Наибольшую стабильность показала EwA, иммобилизованная на плёнке NaIO₄-ОБЦ, активность которой сохранялась на уровне 100% в течение первых 45 мин инкубации с мочевиной, и к 55 минуте снижалась до $80,1 \pm 2,1\%$.

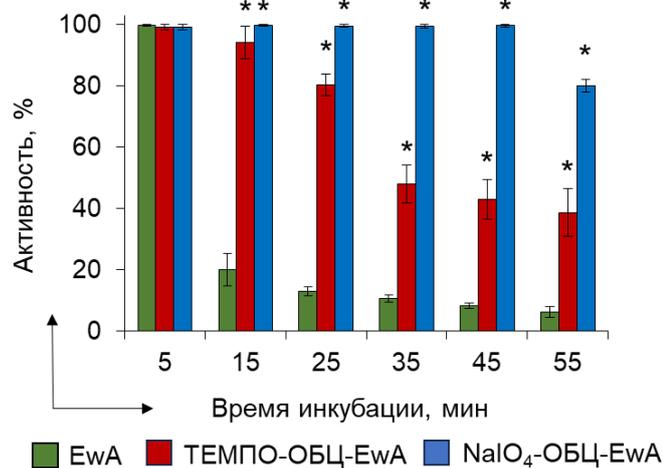


Рисунок 38. Влияние мочевины на ферментативную активность EwA, иммобилизованной на ОБЦ. EwA инкубировали с 2,5 М мочевины в течение 55 мин с последующим измерением активности. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Ранее было показано, что L-АСНаза EwA, в отличие от EcAII, полностью теряет активность после 1 ч инкубации с 2 М мочевины даже в присутствии L-аспарагина [44]. В процессе денатурации белка мочевины способна образовывать прочные водородные связи с положительно заряженными группами белка, а также сильные дисперсионные взаимодействия с основной и боковыми цепями и влиять

на гидрофобную область белка [289,290], что приводит к его диссоциации [291]. Вероятно, иммобилизация L-АСНазы EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ могла способствовать сохранению четвертичной структуры и активности L-АСНазы благодаря появлению конформационных ограничений, возникающих при её иммобилизации на носителе [138]. Таким образом, иммобилизация L-АСНазы EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ приводит к повышению устойчивости фермента к действию 2,5 М мочевины.

3.10.5. Влияние трипсина на активность L-аспарагиназ, иммобилизованных на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

Присутствие трипсиноподобных протеаз в кровотоке вызывает деградацию L-АСНаз и приводит к их инактивации и быстрому выведению из организма [292]. Устойчивость фермента к трипсинолизу напрямую связана с доступностью поверхности L-АСНазы для факторов плазмы крови. При введении нативной L-АСНазы *E. coli* в сыворотку здорового человека в конечной концентрации 1 МЕ/мл, через 30 мин происходит снижение активности фермента на 70% за счёт действия протеолитических ферментов [275].

Для изучения устойчивости L-АСНазы EwA (в свободной и иммобилизованной на ОБЦ формах) к трипсиноподобным протеазам [293] проводили трипсинолиз в течение 5-125 мин (Рис. 39). Активность EwA в свободной форме снижалась после 35 мин инкубации с трипсином почти на 90%, после чего сохранялась на очень низком уровне ($\leq 5\%$ от исходной активности). L-АСНаза EwA, иммобилизованная на пленках ТЕМПО-ОБЦ, сохраняла высокую активность вплоть до 85 мин инкубации, после чего постепенно снижалась и через 125 мин составляла $44,2 \pm 1,62\%$ от исходной активности. EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ не была подвержена воздействию трипсина и сохраняла 100% активность в течение 125 мин инкубации с трипсином в отсутствие L-аспарагина (Рис. 39).

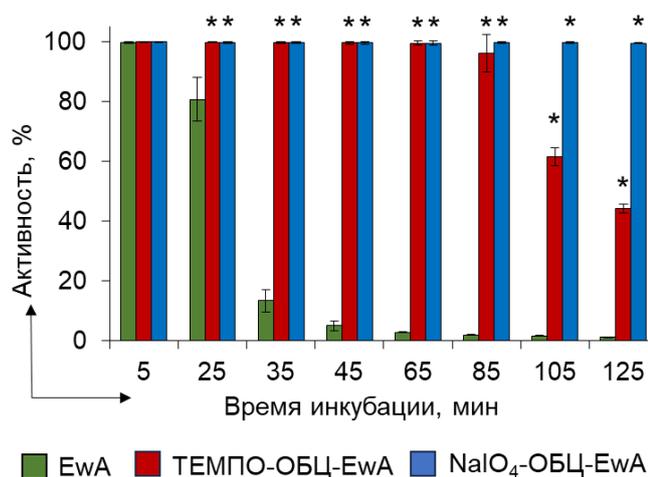


Рисунок 39. Влияние трипсина на ферментативную активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках ОБЦ. EwA инкубировали с 21 МЕ/мл трипсина в течение 5-125 мин, затем добавляли 80 мМ L-аспарагин и через 1,5 ч измеряли активность фермента. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. *Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

В нескольких исследованиях было показано, что иммобилизация EwA на различные носители может повышать устойчивость фермента к протеолизу. Трипсин – сериновая протеаза, гидролизующая пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы остатков аминокислот Арг и Лиз [280]. Kotzia и соавт. обнаружили, что в ходе протеолиза EwA трипсином сначала расщепляется пептидная связь между Лиз53 и Гли54, а затем между Арг206 и Сер207 [77], которые могут быть первоначальными сайтами узнавания трипсина. Замена аминокислотного остатка Арг206 в EwA и последующее ковалентное присоединение ПЭГ-NHS привели к повышению термостабильности и устойчивости EwA к действию трипсина [77,120]. В другом исследовании было показано, что ковалентная модификация EwA сополимерами хитозана также повышает устойчивость к трипсинолизу [127]. Следовательно, иммобилизация L-АСНазы EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ могла оказать аналогичное действие на сайты трипсинолиза фермента, приводя к повышению устойчивости к трипсину.

Для того, что определить устойчивость к трипсину других L-АСНаз, иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ, провели эксперимент, в котором на плёнки NaIO₄-ОБЦ были также иммобилизованы L-АСНазы из *E. coli*, *T. sibiricus* и *R. rubrum*. Были использованы концентрации трипсина, увеличенные в 2 и 10 раз, чтобы сравнить дозо-зависимый эффект трипсина на активность L-АСНаз в свободной форме и иммобилизованных на плёнки NaIO₄-ОБЦ (Рис. 40).

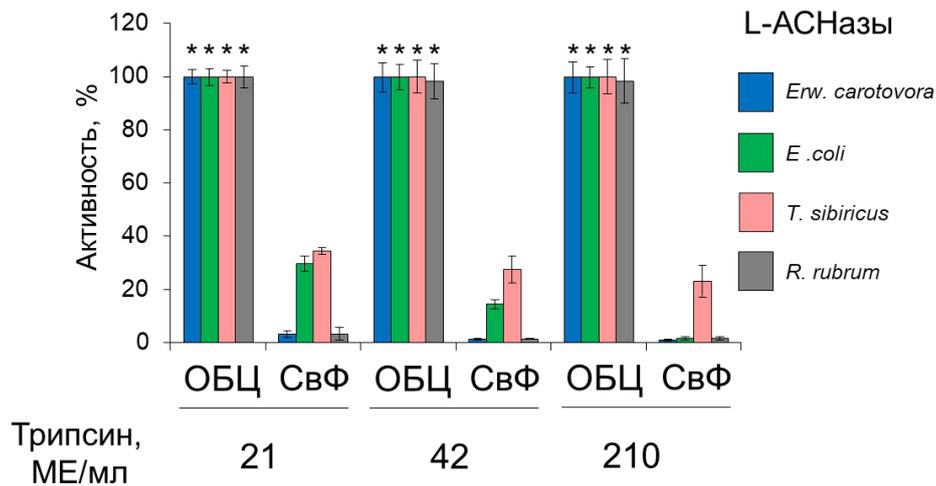


Рисунок 40. Влияние трипсина на ферментативную активность свободных L-АСНаз и L-АСНаз, иммобилизованных на плёнках NaIO₄-ОБЦ. L-АСНазы (*Erw. carotovora*, *E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*) инкубировали с 21–210 МЕ/мл трипсина в течение 125 мин, после чего добавляли 80мМ L-аспарагин и через 1,5 ч измеряли активность. СвФ – свободный фермент (контроль). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки. Значимость считали при $p < 0,05$ относительно контроля (свободной L-АСНазой).

При добавлении даже низких концентраций трипсина (21 МЕ/мл) активность всех L-АСНаз в свободной форме значительно снижалась, при этом остаточная активность после 125 мин инкубации с трипсином сохранялось только у L-АСНаз *E. coli* (29%) и *T. sibiricus* (34%). При добавлении трипсина (210 МЕ/мл) остаточная активность также сохранялась только у L-АСНазы *T. sibiricus* (23%). В то же время активность иммобилизованных L-АСНаз не снижалась даже при добавлении очень высокой концентрации трипсина (210 МЕ/мл). Похожие результаты получены и в

других исследованиях, где протеолитическая стабильность L-АСНаз также улучшалась при иммобилизации на различные носители: P(ННРМА-МРЕГА), наногель bisCD, инулин, Ecoflex®, фиброин шёлка и другие [129,280,294]. Повышение протеолитической стабильности иммобилизованных L-АСНаз обычно связано со стерическими препятствиями, возникающими при конъюгации фермента с полимером [280]. Тем не менее, следует отметить, что при иммобилизации L-АСНаз на плёнки NaIO₄-ОБЦ наблюдали сохранение 100% активности, которое ранее не было получено в других исследованиях. Таким образом, можно сделать вывод о том, что иммобилизация на плёнки NaIO₄-ОБЦ приводит к повышению устойчивости L-АСНаз к действию трипсина.

3.10.6. Возможность повторного использования L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* иммобилизованной на плёнки окисленной бактериальной целлюлозы

С прикладной точки зрения важной особенностью иммобилизованного фермента является его способность к многократному использованию без существенной потери активности [23]. Для оценки возможности повторного использования иммобилизованных L-АСНаз проводили 8 последовательных 45-минутных инкубаций плёнок ОБЦ с ферментом в присутствии L-аспарагина. Для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках ТЕМПО-ОБЦ, было выявлено постепенное снижение активности: после 8 последовательных инкубаций активность фермента составляла $70,9 \pm 6,7\%$ от исходной (Рис. 41). Это снижение может быть связано как с десорбцией L-АСНазы из плёнок ТЕМПО-ОБЦ, так и с ингибированием её активности продуктом реакции – аммиаком.

Для L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO₄-ОБЦ, наблюдали повышенную стабильность: даже после 8 циклов инкубации активность фермента не отличалась от исходной активности. Ранее возможность повторного использования ферментов, иммобилизованных на БЦ, окисленном NaIO₄, была исследована для лакказы [22] и липазы [23]. В этих исследованиях максимальная активность иммобилизованных ферментов достигалась лишь в первом цикле инкубации с субстратом, а затем снижалась до 50–60% от исходной активности. Следовательно, иммобилизация L-АСНазы на плёнки БЦ, окисленные NaIO₄,

является эффективной стратегией, позволяющей сохранить активность фермента для повторного использования.

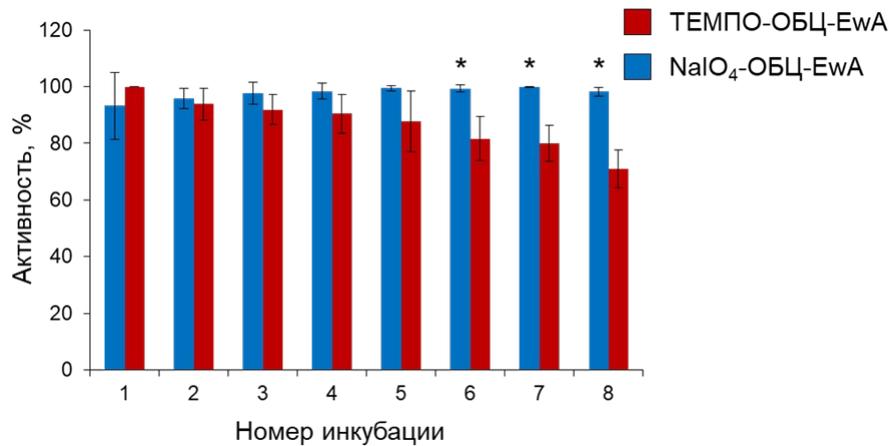


Рисунок 41. Активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки ОБЦ, в течение 8 последовательных инкубаций. Каждые 45 мин плёнки ОБЦ с иммобилизованным ферментом инкубировали в буфере и затем измеряли активность фермента. После этого плёнки отмывали и переносили в новый буфер с L-аспарагином. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки. Значимость считали при * $p < 0,05$ относительно контроля (свободной L-АСНазой).

3.11. Цитотоксическое действие иммобилизованных L-аспарагиназ на клетки опухолей

Эффективность L-АСНаз показана на некоторых клеточных линиях солидных опухолей, что детально описано в главе 1.7. Тем не менее, для этих L-АСНаз было выявлено несколько недостатков. L-АСНазы в свободной форме обычно обладают низкой стабильностью. Пэгилированные формы L-АСНазы могут вызывать реакции гиперчувствительности и образование антител против L-АСНазы [39,97]. Для L-АСНазы, инкапсулированной в эритроциты, на момент регистрации было недостаточно данных, что привело к тому, что препарат впоследствии не был одобрен [148], поэтому поиск новых L-АСНаз и их формуляций, повышение их стабильности и эффективности против опухолей с низкой чувствительностью (то есть, с высокими значениями IC₅₀) к ферменту является актуальным.

В нашем исследовании мы использовали иммобилизацию EwA на плёнках БЦ путём физической адсорбции или ковалентного связывания для увеличения цитотоксического действия на клетки различных линий солидных опухолей. Для оценки чувствительности опухолевых клеток к действию L-АСНазы EwA в свободной форме протестировали несколько клеточных линий. Значения IC_{50} для клеточных линий после обработки EwA представлены в таблице 9.

Таблица 9. Значения IC_{50} для клеточных линий после обработки EwA.

Клеточная линия	IC_{50} , МЕ/мл
A375	0,35
B16F10	0,25
MelKor	0,20
MelJuso	0,13
A431	0,18
SW620	0,21
A549	0,10
A875	0,03
WI-38	8,22

Следует отметить, что по данным компании-производителя, концентрация L-аспарагина в среде RPMI 1640 составляет 380 мкМ. Учитывая значение K_m свободного фермента равную 110 мкМ (Табл. 9), эту концентрацию можно считать насыщающей для фермента, и реакция гидролиза L-аспарагина будет идти с максимальной скоростью. Наиболее чувствительной опухолевой клеточной линией к действию L-АСНазы EwA была A875 ($IC_{50} = 0,03$ МЕ/мл), а наиболее резистентной – линия A375 ($IC_{50} = 0,35$ МЕ/мл). Все остальные клеточные линии обладали средней чувствительностью к действию L-АСНазы. Далее линию клеток A875 инкубировали с ферментом, иммобилизованным путём физической адсорбции на нативные плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч. Выживаемость клеток A875 снижалась каждые 24 ч (Рис. 42, 43) и через 72 ч составляла $6,09 \pm 2,47\%$ от контроля.

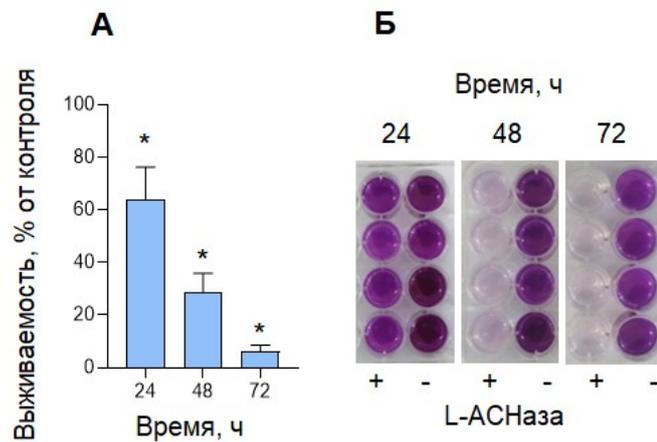


Рисунок 42. Цитотоксическая активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ, выращенных в течение 96 ч, в отношении клеточной линии A875. Клетки инкубировали в 24-луночных планшетах с плёнками БЦ с иммобилизованным ферментом (L-АСНаза +) или без него (L-АСНазы -). МТТ-тесты проводили каждые 24 ч. (А) Выживаемость клеток после 24, 48 или 72 ч инкубации. (Б) Репрезентативная фотография МТТ-теста для клеток после 72 ч инкубации с L-АСНазой EwA. Контролем были клетки, инкубированные с нативными плёнками БЦ без L-АСНазы. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. N = 4. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем по t-критерию Стьюдента.

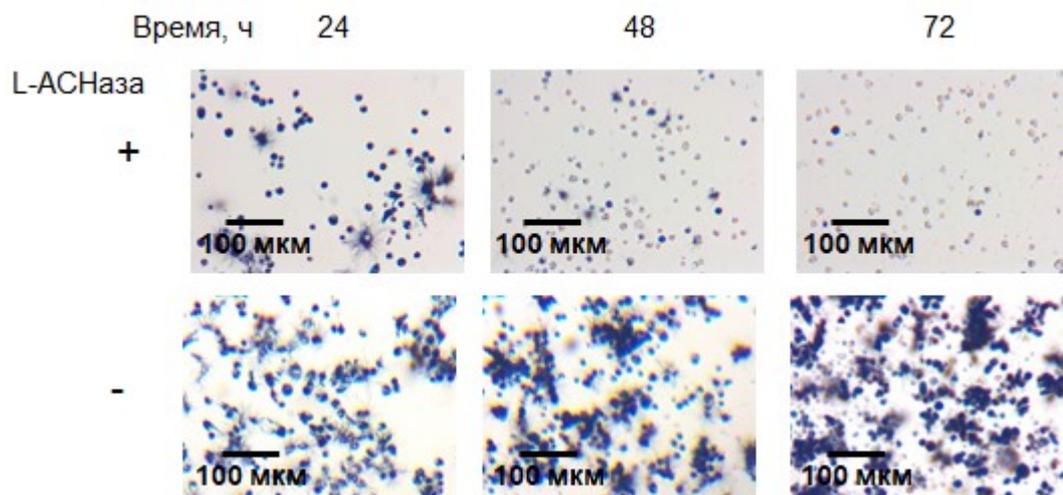


Рисунок 43. Фотографии клеток A875 после МТТ-теста, демонстрирующие цитотоксическое действие L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ.

В ряде работ плёнки БЦ ранее использовали для иммобилизации противоопухолевых препаратов – доксорубицина, паклитаксела, куркумина, ингибиторов контрольных точек и ферментов – преимущественно методом физической адсорбции. Это обеспечивало их контролируемую доставку к опухолевым клеткам как *in vitro*, так и *in vivo* [13]. Такой тип иммобилизации, как физическая адсорбция, обеспечивает пролонгированное действие препарата, не требует частого введения фермента и не влияет на активность ферментов. Кроме этого, физически адсорбированные ферменты защищены от агрегации, протеолиза и контакта с гидрофобными поверхностями [295]. Несмотря на то, что некоторые клетки меланомы чувствительны к некоторым L-АСНам, использование этих терапевтических ферментов в свободной форме ограничено физическим барьером кожи, который препятствует диффузии лекарств внутрь. Кроме того, многие солидные опухоли обладают адаптационными механизмами, которые запускаются при истощении L-аспарагина во внеклеточной среде [109]. Таким образом, при физической адсорбции L-АСНазы на плёнки БЦ сохраняется цитотоксическая активность фермента. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной применимости БЦ для целевой доставки L-АСНазы к опухолевым клеткам, чувствительным к её действию.

Для сравнения продолжительности действия L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки БЦ или БЦ-хитозан, плёнки последовательно переносили каждые 3 ч в новые ячейки с клетками меланомы A875 или фибробластами WI-38 (Рис. 44, Рис. 45). Как и при длительной инкубации в буфере (Рис. 32Б), при инкубации с клетками L-АСНаза, иммобилизованная на плёнки БЦ-хитозан, высвобождалась медленнее, чем из нативных плёнок БЦ. При иммобилизации на нативные плёнки БЦ L-АСНаза не сохраняла цитотоксическую активность в отношении клеток A875 уже после первого переноса, поэтому через 3 ч выживаемость клеток A875, инкубированных с иммобилизованной L-АСНазой, была на уровне контрольных клеток, так как фермент в течение первых часов полностью диффундировал с плёнок. И, напротив, L-АСНаза, иммобилизованная на плёнки БЦ-хитозан, обладала пролонгированной в 2 раза цитотоксической активностью на клетки A875 (Рис. 44А), так как фермент диффундировал с плёнок медленнее и поэтому, вероятно, медленнее расщеплялся протеазами в

культуральной среде, в которой росли клетки.

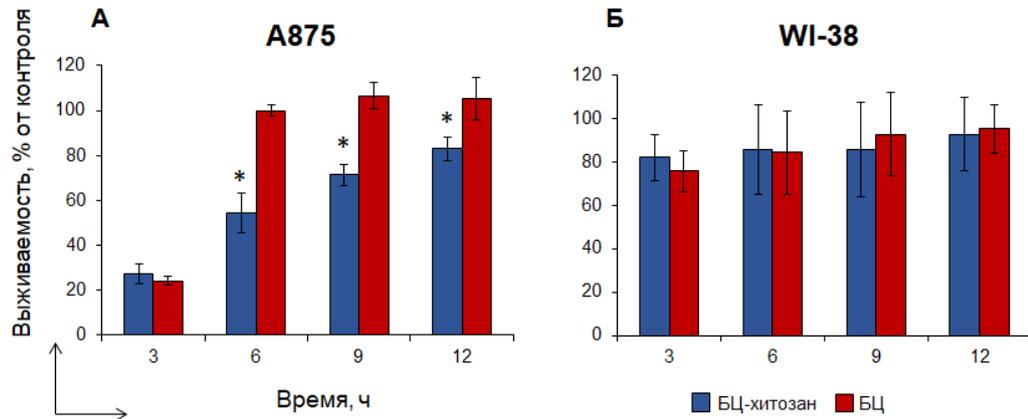


Рисунок 44. Цитотоксическая активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ-хитозан и БЦ в отношении клеточных линий меланомы A875 и фибробластов WI-38. Плёнки с адсорбированным ферментом инкубировали по 3 ч с опухолевыми клетками, после чего переносили в новые ячейки 24-луночного планшета. Через 72 ч оценивали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста. (А) Выживаемость клеток A875 после инкубации с L-АСНазой, иммобилизованной на плёнки БЦ-хитозан и БЦ. (Б) Выживаемость клеток WI-38 после инкубации с L-АСНазой, иммобилизованной на плёнки БЦ-хитозан и БЦ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. N = 3. *p < 0,05 по сравнению с контролем (нативными плёнками БЦ с иммобилизованной L-АСНазой) по t-критерию Стьюдента.

После 2 последовательных инкубаций (6 ч) выживаемость опухолевых клеток составляла около 50%, а после четырех последовательных инкубаций с клетками (12 ч) – 80%. Эти результаты согласуются с данными другого исследования, где EwA, конъюгированная с ПЭГ-хитозаном, проявляла в 3–5 раз большую цитотоксичность по сравнению с нативным ферментом и структура конъюгатов существенно влияла на цитотоксичность в отношении резистентных к EwA опухолевых клеток [296]. L-АСНаза EwA, иммобилизованная путём физической адсорбции на плёнки БЦ и БЦ-хитозан, не обладала цитотоксической активностью в отношении фибробластов WI-38 (Рис. 44Б). Это, вероятно, связано с низкой чувствительностью этих клеток к действию L-АСНазы ($IC_{50} = 8,22$) и высокой экспрессией АСНС [3], что позволяло им быстро восполнить внутриклеточные запасы аспарагина, расщеплённого ферментом. Тем самым,

иммобилизация L-АСНазы на плёнки БЦ-хитозан приводит к увеличению продолжительности цитотоксического действия фермента на опухолевые клетки и не влияет на выживаемость нормальных клеток.

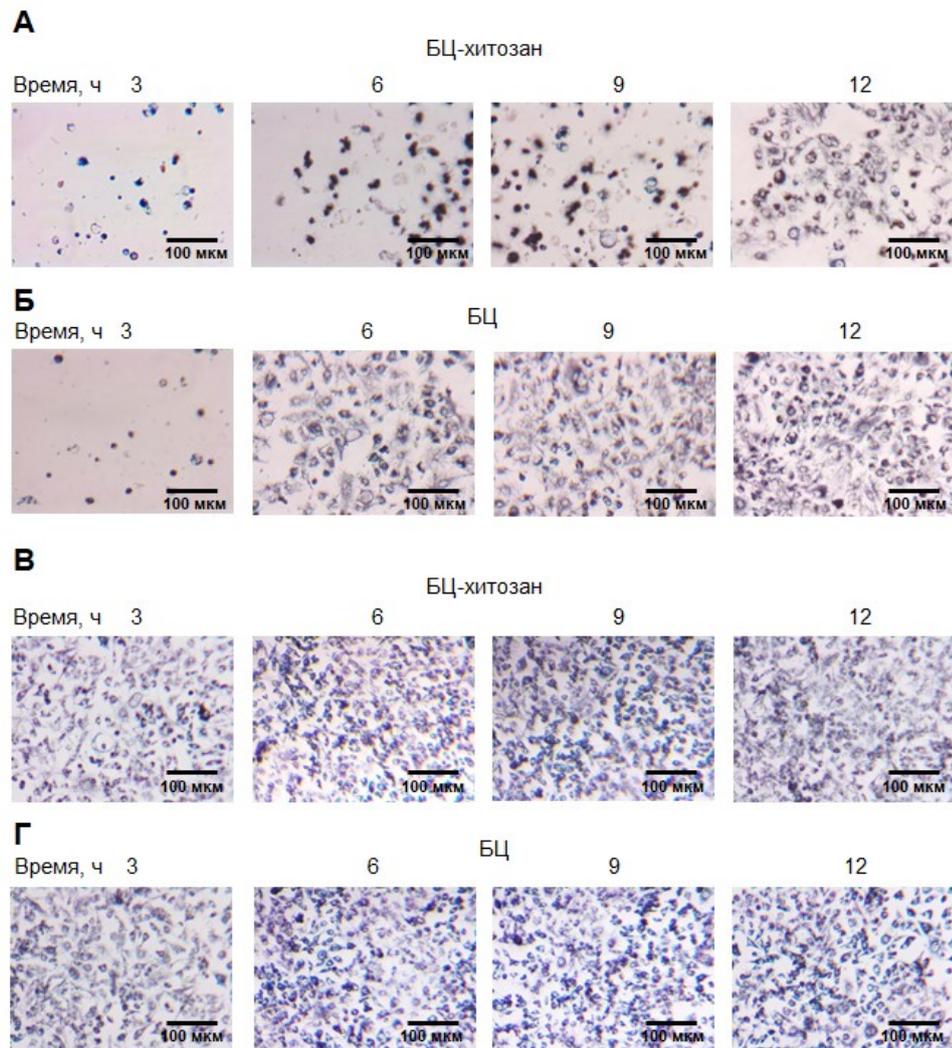


Рисунок 45. Фотографии клеток после обработки реактивом МТТ, демонстрирующие цитотоксическую активность L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ-хитозан или БЦ. (А, Б) Клетки меланомы линии А875. (В, Г) Фибробласты WI-38.

Для оценки цитотоксической активности L-АСНазы EwA, ковалентно иммобилизованной на плёнки ОБЦ, проведено пять последовательных инкубаций плёнок с опухолевыми клетками (А875, А375, А431, А549 и SW-620) и фибробластами WI-38 по 3 ч. L-АСНаза EwA, иммобилизованная на плёнки NaIO₄-ОБЦ, показала наиболее выраженную цитотоксическую активность в отношении различных клеточных линий опухолей, в том числе наиболее резистентной к L-

АСНазе А375 (Рис. 45, Рис. 46, Табл. 9). После пятой инкубации выживаемость опухолевых клеток составляла от 16,6% (клеточная линия А375) до 45,8% (клеточная линия А875). L-АСНаза ЕwА, иммобилизованная на плёнке ТЕМПО-ОБЦ, показала значительно более низкую цитотоксичность. После пятой инкубации выживаемость опухолевых клеток составила от 56,3% (клеточная линия А549) до более 90% (клеточные линии А375, А431, SW-620).

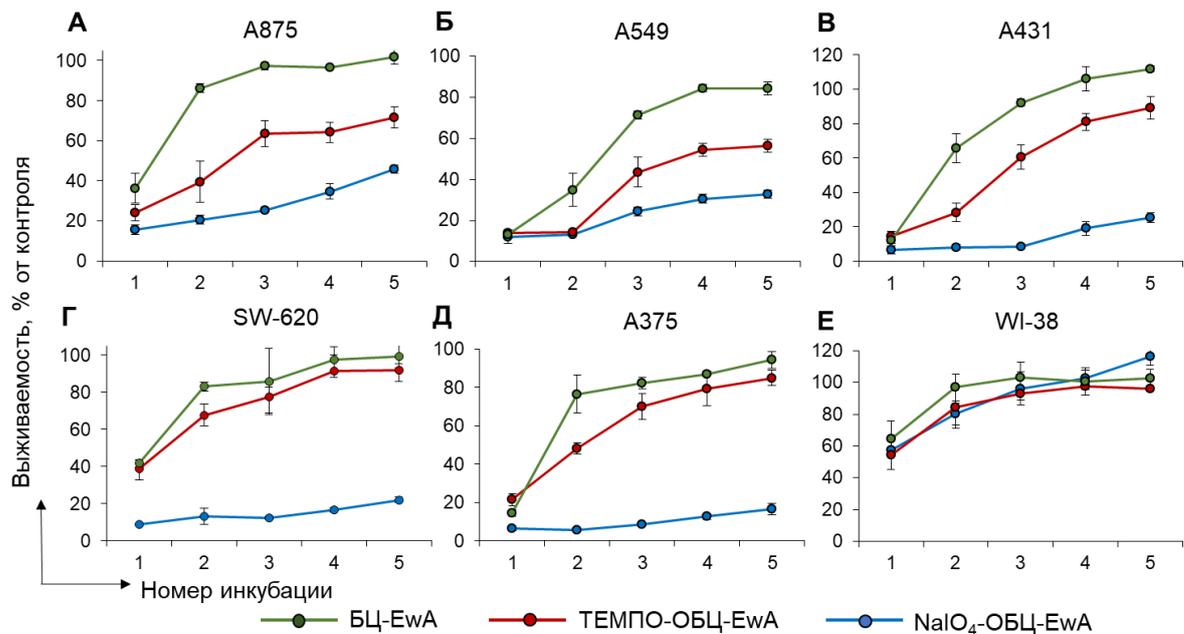


Рисунок 45. Цитотоксическая активность L-АСНазы ЕwА, иммобилизованной на плёнках БЦ, ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ, в отношении клеточных линий солидных опухолей человека и фибробластов. Плёнки инкубировали с клетками в 24-луночной планшете, а затем переносили в новые лунки с интервалом 3 ч. Выживаемость клеток измеряли через 72 ч с помощью МТТ-теста. (А) Меланома А875; (Б) Карцинома лёгкого А549; (В) Меланома А431; (Г) Колоректальный рак SW-620; (Д) Меланома А375; (Е) Фибробласты WI-38. Контрольные клетки инкубировали с плёнками ОБЦ без L-АСНазы. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения. N = 4. Различия между группами оценивали с помощью one-way ANOVA с последующим множественным сравнением по тесту Тьюки; значимыми считали различия при p < 0,05 по сравнению с контролем (свободной L-АСНазой).

Для L-АСНазы ЕwА, иммобилизованной на нативных плёнках БЦ, наблюдали наиболее быструю потерю цитотоксичности. После второй инкубации с данными плёнками наблюдали существенное увеличение выживаемости

большинства клеточных линий. Фибробласты WI-38 проявили чувствительность к L-АСНазе EwA, иммобилизованной на всех типах БЦ, только при первых двух инкубациях (Рис. 45Е). Таким образом, EwA, иммобилизованная на плёнке NaIO₄-ОБЦ, обладала самой высокой цитотоксической активностью в отношении всех линий опухолевых клеток по сравнению с L-АСНазой EwA, иммобилизованной на другие модификации плёнок БЦ. Значительное различие в цитотоксической активности EwA, нековалентно иммобилизованной на нативные плёнки БЦ и ковалентно иммобилизованной на плёнки NaIO₄-ОБЦ может быть обусловлено ограничением конформационной гибкости L-АСНазы и появлению более жёсткой структуры вследствие ковалентной иммобилизации, в то время как из нативных плёнок фермент быстро инактивировался вследствие диффузии. Поэтому при ковалентной иммобилизации EwA на плёнки NaIO₄-ОБЦ сохраняется каталитически активная конформация фермента [44]. Кроме того, во время иммобилизации EwA могли модифицироваться сайты узнавания трипсиноподобных протеаз – как и при иммобилизации на ПЭГ L-АСНазы с близкой аминокислотной последовательностью [77].

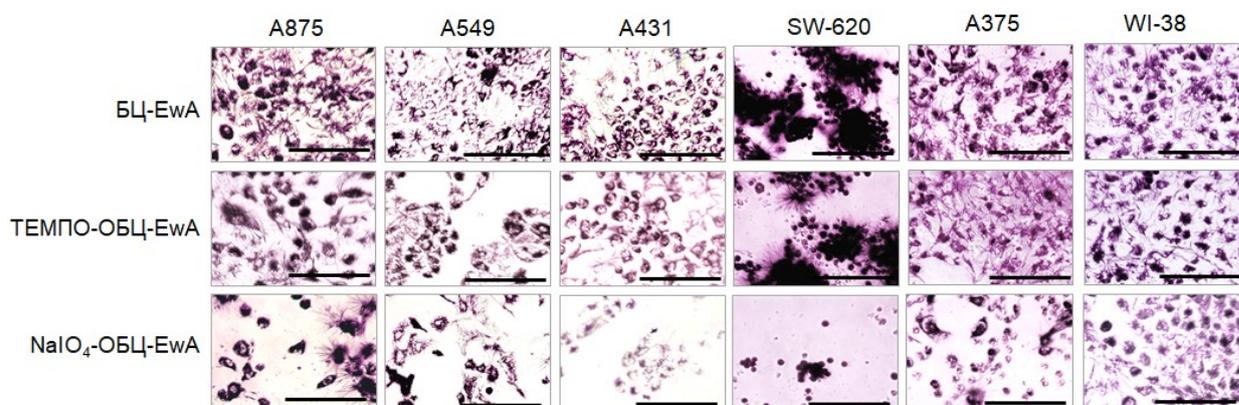


Рисунок 46. Фотографии клеток, инкубированных с реактивом МТТ, после пятой инкубации с L-АСНазой EwA, иммобилизованной на плёнках БЦ, ТЕМПО-ОБЦ или NaIO₄-ОБЦ. Размер масштабной линии 100 мкм.

Таким образом, иммобилизация EwA на пленках NaIO₄-ОБЦ, вероятно, стабилизирует структуру фермента и защищает от действия протеолитических ферментов в культуральной среде. Это обеспечивает постоянное истощение L-аспарагина в среде и блокировку метаболических путей, ответственных за восполнение запасов аспарагина у опухолевых клеток. Поэтому все исследуемые

линии проявляли повышенную чувствительность к L-АСНазе EwA, иммобилизованной на данный тип плёнок БЦ.

Чтобы проверить влияние иммобилизации на плёнки NaIO₄-ОБЦ на цитотоксическую активность других L-АСНаз (*E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*), был проведен эксперимент, аналогичный вышеописанному. В качестве клеточной линии выбрали наиболее устойчивую к действию EwA (Табл. 8) линию меланомы А375. При оценке цитотоксичности вышеперечисленных L-АСНаз была выявлена значительная разница для выживаемости опухолевых клеток после 2 переноса в зависимости от типа добавленной L-АСНазы (Рис. 47).

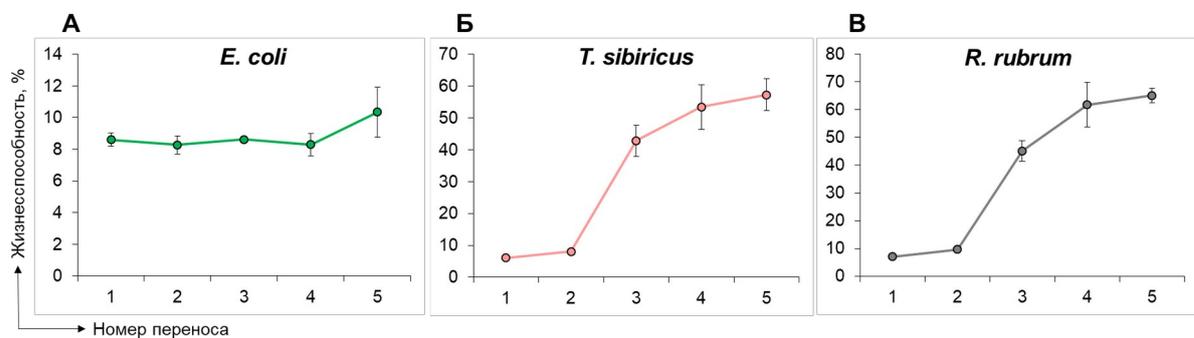


Рисунок 47. Цитотоксическая активность L-АСНаз, иммобилизованных на плёнках NaIO₄-ОБЦ, в отношении клеточной линии меланомы А375. (А) *E. coli*; (Б) *T. sibiricus*; (В) *R. rubrum*. Плёнки инкубировали с клетками в 24-луночном планшете, а затем переносили в новые лунки с интервалом 3 ч. Выживаемость клеток измеряли через 72 ч с помощью МТТ-теста. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

Наибольшей цитотоксичностью обладала L-АСНаза *E. coli*, вызывая гибель ~ 90% опухолевых клеток даже после 5 инкубации (Рис. 47). В то же время, L-АСНазы *T. sibiricus* и *R. rubrum* обладали меньшей цитотоксичностью, вызывая гибель 43% и 35% опухолевых клеток А375, соответственно. Известно, что L-АСНазы EwA и *E. coli* обладают высокой гомологичностью между собой и обладают тетрамерной структурой [44]. Различия в цитотоксичности иммобилизованных L-АСНаз EwA и *E. coli* по сравнению с L-АСНазами *T. sibiricus* и *R. rubrum* могут быть связаны с особенностями структуры ферментов и различным механизмом действия на опухолевые клетки. Например, свободная L-АСНаза *T. sibiricus* отличается от L-АСНаз EwA и *E. coli* расположением активного

центра, конформацией гибких петель, С-концевого участка и междоменного линкера, а также тем, что активна не тетрамерной, а димерной форме [242]. L-АСНаз *R. rubrum* также активна в димерной форме и в отличие от большинства L-АСНаз имеет очень короткую последовательность (172 аминокислоты) и может напрямую проникать в опухолевые клетки [242]. В связи с этим при иммобилизации структура и расположение активного центра L-АСНаз *T. sibiricus* и *R. rubrum* могли изменяться иначе, чем у L-АСНаз EwA и *E. coli*. Кроме того, в отличие от L-АСНаз EwA и *E. coli*, ферменты *T. sibiricus* [57] и *R. rubrum* [242] обладают пониженной аспарагиназой (K_m для аспарагина 0,22 мМ и 2,8 мМ, соответственно) и глутаминазой активностью (5% и 0,1% от аспарагиназой активности, соответственно). Поэтому вклад в противоопухолевый эффект L-АСНаз *T. sibiricus* и *R. rubrum* аспарагиназой и глутаминазой активности после иммобилизации был минимален. При этом L-АСНаз *R. rubrum* обладала наименьшей среди всех представленных L-АСНаз противоопухолевой активностью, что можно объяснить её особым механизмом противоопухолевого действия, связанным с проникновением внутрь опухолевых клеток [64]. Таким образом, несмотря на то, что иммобилизация L-АСНаз на плёнки NaIO₄-ОБЦ повышает их стабильность и пролонгирует ферментативную активность, цитотоксическая активность L-АСНаз также определяется источником их происхождения, четвертичной структурой, расположением активного центра и механизмом действия на опухолевые клетки [15].

Следует отметить несколько ограничений настоящей работы. Оценка цитотоксической активности иммобилизованных L-АСНаз проводилась только на клеточных линиях опухолей. Для подтверждения противоопухолевой активности необходимы исследования *in vivo*. Также, несмотря на наличие общего основного механизма действия (гидролиз L-аспарагина) L-АСНаз, их первичные аминокислотные последовательности различаются, что может влиять на их каталитические свойства и эффективность иммобилизации. Таким образом, стратегии иммобилизации лучше подбирать в зависимости от структуры фермента. Кроме того, не все типы раковых клеток восприимчивы к L-АСНазам, иммобилизованным на плёнках ОБЦ, так как могут иметь различные механизмы резистентности. Данное исследование проводилось на клеточных линиях с низкой

чувствительностью к свободной форме L-АСНаз, а токсичность достигалась, вероятно, за счет пролонгирования каталитической активности ферментов посредством структурной стабилизации и низкой экспрессии АСНС.

С точки зрения будущих перспектив и потенциального применения, иммобилизацию L-АСНаз на плёнках NaIO_4 -ОБЦ можно считать многообещающей стратегией для терапии поверхностных опухолей (например, меланом), оставшихся после хирургического удаления. Такой подход был использован в мышинных моделях, где опухоли удалялись хирургическим путем, а затем наносились пленки, содержащие лекарственное средство, для устранения любых оставшихся остатков опухоли после операции [297]. В других исследованиях авторы использовали окрашенные пластыри, предназначенные для целенаправленной локальной доставки лекарств в меланому [298]. Также было проведено исследование на людях (64 пациента), в котором на окисленную целлюлозу в виде салфеток был нековалентно иммобилизован цисплатин для интраоперационной локальной химиотерапии больных раком головы и шеи. Данный подход позволил уменьшить рецидив по сравнению с контрольной группой: после лечения через 3 года 3 месяца рецидивы отсутствовали у 54,7% и 38,9% пациентов, соответственно [299].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БЦ является перспективным носителем для доставки различных препаратов благодаря биосовместимости, нетоксичности и возможности непрерывной локализованной доставки в опухоль. Ранее плёнки БЦ не использовались для иммобилизации L-АСНаз, однако, многие противоопухолевые препараты были иммобилизованы на БЦ. В данной работе впервые для увеличения стабильности и пролонгирования действия L-АСНаз были использованы плёнки БЦ и разработаны четыре модификации плёнок. Для нековалентной иммобилизации L-АСНаз использовали нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ-хитозан. Впервые показано, что иммобилизованная на нативные плёнки L-АСНаза EwA сохраняла ферментативную активность и обладала высокой цитотоксичностью в отношении линии клеток меланомы человека A875. При иммобилизации на плёнки БЦ-хитозан фермент обладал пролонгированной в 2 раза цитотоксической активностью на клетки меланомы A875 по сравнению с L-АСНазой, иммобилизованной на нативные плёнки БЦ. Для ковалентной иммобилизации L-АСНаз плёнки БЦ были окислены TEMPO или NaIO_4 . По сравнению со свободной формой фермента, при иммобилизации на плёнки NaIO_4 -ОБЦ L-АСНазы (EwA, *E. coli*, *T. sibiricus*, *R. rubrum*) обладали повышенной термостабильностью и были устойчивы к действию трипсина. При оценке цитотоксичности L-АСНазы EwA, иммобилизованной на плёнки NaIO_4 -ОБЦ выявлено, что фермент сохраняет цитотоксическую активность даже после пяти последовательных инкубаций на всех линиях опухолевых клеток, в том числе изначально мало чувствительных к действию фермента. На нормальные клетки L-АСНаза EwA, иммобилизованная как на все типы плёнок не оказывала цитотоксического воздействия. Эти результаты расширяют возможности потенциального применения L-АСНаз не только для лечения ОЛЛ, и подчеркивают, что плёнки ОБЦ являются перспективной платформой для иммобилизации L-АСНаз для лечения солидных опухолей. Плёнка ОБЦ с ковалентно иммобилизованной L-АСНазой может быть перспективным вариантом для уничтожения оставшихся опухолевых клеток после операции. В будущем планируется продолжение исследований формуляции NaIO_4 -ОБЦ, где ОБЦ будет гомогенизирована, и будут изучены различные пути доставки L-АСНазы, иммобилизованной на NaIO_4 -ОБЦ *in vivo*.

ВЫВОДЫ

- 1) Плёнки БЦ, выращенные в течение 96 ч, способны адсорбировать наибольшее количество L-АСНазы при сохранении наибольшей ферментативной активности и наибольшего времени высвобождения.
- 2) Модификация плёнок БЦ хитозаном приводит к формированию более упорядоченной пористой структуры плёнок, увеличивает их адсорбционную ёмкость и понижает скорость высвобождения фермента в два раза.
- 3) Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 , увеличивает температуру инактивации фермента до 60 °С, расширяет диапазон pH действия фермента до 6–11, повышает устойчивость к действию мочевины в 8 раз и приводит к устойчивости к действию трипсина.
- 4) L-АСНазы, иммобилизованные на нативные плёнки БЦ и плёнки БЦ, модифицированные хитозаном, сохраняют активность в отношении клеток солидных опухолей. Ковалентная иммобилизация L-АСНаз на плёнки БЦ, окисленные NaIO_4 , пролонгирует активность ферментов и вызывает гибель клеток, изначально слабо чувствительных к действию свободных форм L-АСНаз.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы научному руководителю, заведующему лабораторией медицинской биотехнологии ИБМХ, д.б.н., доценту Жданову Дмитрию Дмитриевичу, а также коллективу лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ.

Автор выражает искреннюю благодарность за предоставление плёнок штамма *K. hansenii* GH-1/2008 д.б.н., профессору кафедры «ХимБиотех» факультета химической технологии и биотехнологии Московского Политехнического Университета Громовых Татьяне Ильиничне.

Автор выражает искреннюю благодарность за лиофилизацию плёнок БЦ ведущему инженеру лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ Козлову Андрею Фёдоровичу.

Автор выражает искреннюю признательность за предоставление ИК-спектров плёнок БЦ коллективу НИЛ кинетики и механики ферментативных процессов химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автор выражает искреннюю признательность за получение микрофотографий сканирующей электронной микроскопии ведущему инженеру лаборатории № 5 «Институт нефтехимического синтеза имени А.В. Топчиева» Солопову Алексею Борисовичу.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ала – аланин;
Арг – аргинин;
Асн – аспарагин;
АСНС – аспарагинсинтетаза;
Асп – аспарагиновая кислота;
АСТ – аспартагттрансаминаза;
АФК – активные формы кислорода;
БСА – бычий сывороточный альбумин;
БЦ – бактериальная целлюлоза;
ГК – глюкокиназа;
Гли – глицин;
Глн – глутамин;
Глу – глутаминовая кислота;
Лиз – лизин;
МЕ – международная единица;
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз;
ОП – оптическая плотность;
Про – пролин;
ПЭГ – полиэтиленгликоль;
ПЭИ – полиэтиленимин;
Сер – серин;
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
Тир – тирозин;
Т-ОЛЛ - Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз;
Тре – треонин;
УДФ – уридилдифосфат;
УДФГ – уридилдифосфатглюкоза;
УФДГФ – УФДГ фосфорилаза;
ФГМ – фосфоглюкомутаза;
Цис – цистеин;
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот;

ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка;

ЭР – эндоплазматический ретикулум;

AAR (Amino acid response) – механизм, запускаемый в клетках млекопитающих в результате истощения аминокислот;

АКТ – RAC-альфа серин/треонин-протеинкиназа, кодируемая человеческим геном АКТ3;

aPD-1 (Programmed cell Death protein 1) – антитело к белку запрограммированной клеточной гибели 1;

APC (Adenomatous polyposis coli) – ген аденоматозного полипоза толстой кишки;

APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) – 3-аминопропилтриэтоксисилан;

ATF4 (Activating transcription factor 4) – активирующий фактор транскрипции 4;

BCL-2 (B-cell lymphoma-2) – белок В-клеточной лимфомы-2;

BMP-2 (Bone morphogenetic protein 2) – костный морфогенетический белок 2;

BRAF – серин/треониновая протеинкиназа B-raf;

BsA – L-аспарагиназа *Bacillus subtilis*;

c-MYC (cellular myelocytomatosis oncogene) – протоонкоген, представитель семейства белков MYC, главный фактор транскрипции для пролиферации клеток;

СрА - L-аспарагиназа *Cavia porcellus*;

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) – цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный антиген 4;

С-ди-ГМФ (cyclic diguanilate) – циклическая дигуановая кислота;

DSPE (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин;

E. coli – *Escherichia coli*;

EcA – L-аспарагиназа *Escherichia coli*;

eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2) – фактор инициации эукариот 2;

ErA – L-аспарагиназа *Erwinia chrysanthemi*;

ERK (Extracellular signal-regulated kinase) – активируемая внеклеточными сигналами киназа;

EwA – L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*;

FDA (Food and Drug Administration) – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США;

GCN2 – недерепрессируемая 2-киназа общего контроля;

GPTMS (3-glycidioxypropyltrimethoxysilane) – глицидилоксипропилтриметоксисилан;

GRAS (Generally Recognized As Safe) – общепризнанный как безопасный;

GSK3 (glycogen synthase kinase 3-dependent protein) – гликогенсинтаза киназо-3-зависимый белок;

GSK3- β (glycogen synthase kinase-3 beta) – гликогенсинтаза киназа-3 бета;

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HpA – L-аспарагиназа *Helicobacter pylori*;

HsA – L-аспарагиназа *Homo sapiens*;

IFN- γ (interferon gamma) – интерферон-гамма;

IVKAV (isoleucine-lysine-valine-alanine-valine) – пептид изолейцин-лизин-валин-аланин-валин

Kcat – каталитическая константа, показывающая число оборотов фермента;

Km – константа Михаэлиса;

KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) - протоонкоген, представитель семейства белков Ras;

LC3 II (Light Chain 3 II) – мембраносвязанная форма белка LC3, ассоциированного с аутофагосомой;

LjNSE – L-аспарагиназа *Lotus japonicas*;

LlA – L-аспарагиназа *Lupinus luteus*;

L-АСНаза – L-аспарагиназа;

МАРК (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа;

МСМ-41 (Mobil Composition of Matter No. 41) – азотсодержащий упорядоченный мезопористый углерод со структурой МСМ-41;

МЕК (МАРК/ERK, mitogen-activated protein kinase kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа киназа;

MOPS 3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень действия рапамицина у млекопитающих;

mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) – мишень действия рапамицинового комплекса 1 у млекопитающих;

NHS (N-hydroxysuccinimide) – N-гидроксисукцинимид;

Ntn (N-terminal nucleophile) гидролазы – суперсемейство N-концевых нуклеофильных гидролаз;

PD-1 (Programmed cell death protein 1) – рецептор программируемой клеточной смерти 1;

PD-L1 (Program death ligand 1) – лиганд программируемой клеточной смерти 1;

PEDOT (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)) – поли(3,4-этилендиокситиофен);

PERK (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) - PKR-подобная киназа эндоплазматического ретикулума;

PIPES – пиперазин-N, N'-бис(2-этансульфоновая кислота);

PfA – L-аспарагиназа *Pyrococcus furiosus*;

PhA – L-аспарагиназа *Pyrococcus horikoshii*;

PLGA – поли(молочная-со-гликолевая кислота);

Ppy (полипиррол) – полипиррол;

PvA – L-аспарагиназа *Phaseolus vulgaris*;

PVDMA (polyvinyl dimethylazlactone) – поли(2-винил-4,4-диметилазлактон);

RagB (Ras-related GTP-binding protein B) – Ras-родственный ГТФ-связывающий белок B;

Ras (Rat sarcoma virus) – суперсемейство генов и кодируемых ими белков, которые относятся к малым G-белкам (малым ГТФамам);

ReA – L-аспарагиназа *Rhizobium etli*;

RrA – L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*;

RTK (Receptor tyrosine kinase) – рецепторная тирозинкиназа;

SOX12 (sex-determining region Y (SRY)-box) – транскрипционный фактор SRY-box 12;

ТЕМПО – 2, 2, 6, 6-тетраметилпиперидин-1-оксил;

UPR (Unfolded protein response) – развернутый белковый ответ;

VcA – L-аспарагиназа *Vibrio cholerae*;

Vmax – максимальная скорость реакции;

WsA – L-аспарагиназа *Wolinella succinogenes*;

YpA – L-аспарагиназа *Yersinia pestis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N., Zhdanov D.D. Molecular Analysis of L-Asparaginases for Clarification of the Mechanism of Action and Optimization of Pharmacological Functions // *Pharmaceutics*. — 2022. — V. 14. — P. 599.
2. Tosta Pérez M., Herrera Belén L., Letelier P., Calle Y., Pessoa A., Farías J.G. l-Asparaginase as the gold standard in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review // *Med Oncol*. — 2023. — V. 40. — P. 150.
3. Yuan Q., Yin L., He J., Zeng Q., Liang Y., Shen Y., Zu X. Metabolism of asparagine in the physiological state and cancer // *Cell Commun Signal*. — 2024. — V. 22. — P. 163.
4. Bertuccio S.N., Serravalle S., Astolfi A., Lonetti A., Indio V., Leszl A., Pession A., Melchionda F. Identification of a cytogenetic and molecular subgroup of acute myeloid leukemias showing sensitivity to L-Asparaginase // *Oncotarget*. — 2017. — V. 8. — P. 109915—109923.
5. Ali U., Naveed M., Ullah A., Ali K., Shah S.A., Fahad S., Mumtaz A.S. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL // *Eur J Pharmacol. Netherlands*. — 2016. — V. 771. — P. 199—210.
6. Van Trimpont M., Peeters E., De Visser Y., Schalk A.M., Mondelaers V., De Moerloose B., Lavie A., Lammens T., Goossens S., Van Vlierberghe P. Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy // *Cancers (Basel)*. — 2022. — V. 14. — P. 902.
7. Fonseca M.H.G., Fiúza T. da S., Morais S.B. de, Souza T. de A.C.B. de, Trevizani R. Circumventing the side effects of L-asparaginase // *Biomed Pharmacother. France*. — 2021. — V. 139. — P. 111616.
8. Modi T., Gervais D. Improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of a novel PEGylated native *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase // *Invest New Drugs*. — 2022. — V. 40. — P. 21—29.
9. Maggi M., Mittelman S.D., Parmentier J.H., Colombo G., Meli M., Whitmire J.M., Merrell D.S., Whitelegge J., Scotti C. A protease-resistant *Escherichia coli*

asparaginase with outstanding stability and enhanced anti-leukaemic activity in vitro // *Sci Rep.* — 2017. — V. 7. — P. 14479.

10. Talluri V.P., Mutaliyeva B., Sharipova A., Ulaganathan V., Lanka S.S., Aidarova S., Suigenbayeva A., Tleuova A. L-Asparaginase delivery systems targeted to minimize its side-effects // *Adv Colloid Interface Sci.* — 2023. — V. 316. — P. 102915.

11. Khan M.R. Immobilized enzymes: a comprehensive review // *Bull Natl Res Cent.* — 2021. — V. 45. — P. 207.

12. Wu S.-C., Lia Y.-K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization // *J Mol Catal B Enzym.* — 2008. — V. 54. — P. 103—108.

13. Chung C.K., Beekmann U., Kralisch D., Bierau K., Chan A., Ossendorp F., Cruz L.J. Bacterial Cellulose as Drug Delivery System for Optimizing Release of Immune Checkpoint Blocking Antibodies // *Pharmaceutics.* — 2022. — V. 14. — P. 1351.

14. Almeida M.R., Cristóvão R.O., Barros M.A., Nunes J.C.F., Boaventura R.A.R., Loureiro J.M., Faria J.L., Neves M.C., Freire M.G., Santos-Ebinuma V.C., Tavares A.P.M., Silva C.G. Superior operational stability of immobilized l-asparaginase over surface-modified carbon nanotubes // *Sci Rep.* — 2021. — V. 11. — P. 21529.

15. Кисляк И.А., Покровская М.В., Жантурина Д.Ю., Покровский В.С. Применение препаратов L-аспарагиназы для лечения солидных опухолей: данные экспериментальных и клинических исследований // *Российский онкологический журнал.* — 2023. — Т. 28. — С. 79—94.

16. Liu W., Du H., Zhang M., Liu K., Liu H., Xie H., Zhang X., Si C. Bacterial Cellulose-Based Composite Scaffolds for Biomedical Applications: A Review // *ACS Sustain Chem Eng.* — 2020. — V. 8. — P. 7536—7562.

17. Emre Oz Y., Keskin-Erdogan Z., Safa N., Esin Hames Tuna E. A review of functionalised bacterial cellulose for targeted biomedical fields // *J Biomater Appl.* — 2021. — V. 36. — P. 648—681.

18. Qi Z., Pei P., Zhang Y., Chen H., Yang S., Liu T., Zhang Y., Yang K. 131I- α PD-L1 immobilized by bacterial cellulose for enhanced radio-immunotherapy of cancer // *J Control Release.* — 2022. — V. 346. — P. 240—249.

19. Akagi S., Ando H., Fujita K., Shimizu T., Ishima Y., Tajima K., Matsushima T., Kusano T., Ishida T. Therapeutic efficacy of a paclitaxel-loaded nanofibrillated

bacterial cellulose (PTX/NFBC) formulation in a peritoneally disseminated gastric cancer xenograft model // *Int J Biol Macromol.* — 2021. — V. 174. — P. 494—501.

20. Cacicedo M.L., Islan G.A., León I.E., Álvarez V.A., Chourpa I., Allard-Vannier E., García-Aranda N., Díaz-Riascos Z.V., Fernández Y., Schwartz S., Abasolo I., Castro G.R. Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2018. — V. 170. — P. 596—608.

21. Zhang L.-K., Du S., Wang X., Jiao Y., Yin L., Zhang Y., Guan Y.-Q. Bacterial cellulose based composites enhanced transdermal drug targeting for breast cancer treatment // *Chem Eng J.* — 2019. — V. 370. — P. 749—759.

22. Li G., Nandgaonkar A.G., Wang Q., Zhang J., Krause W.E., Wei Q., Lucia L.A. Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation // *J Memb Sci.* — 2017. — V. 525. — P. 89—98.

23. Drozd R., Szymańska M., Rakoczy R., Junka A., Szymczyk P., Fijałkowski K. Functionalized Magnetic Bacterial Cellulose Beads as Carrier for Lecitase® Ultra Immobilization // *Appl Biochem Biotechnol.* — 2019. — V. 187. — P. 176—193.

24. Yu B., Cheng H., Zhuang W., Zhu C., Wu J., Niu H., Liu D., Chen Y., Ying H. Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose // *Process Biochem.* — 2019. — V. 79. — P. 40—48.

25. Brumano L.P., da Silva F.V.S., Costa-Silva T.A., Apolinário A.C., Santos J.H.P.M., Kleingesinds E.K., Monteiro G., Rangel-Yagui C. de O., Benyahia B., Junior A.P. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles // *Front Bioeng Biotechnol.* — 2018. — V. 6. — P. 212.

26. da Cunha M.C., dos Santos Aguilar J.G., de Melo R.R., Nagamatsu S.T., Ali F., de Castro R.J.S., Sato H.H. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications // *Food Res Int.* — 2019. — V. 126. — P. 108658.

27. Lefin N., Miranda J., Beltrán J.F., Belén L.H., Effer B., Pessoa A., Farias J.G., Zamorano M. Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems // *Front Pharmacol.* — 2023. — V. 14. — P. 1208277.

28. Zielezinski A., Loch J.I., Karlowski W.M., Jaskolski M. Massive annotation of bacterial l-asparaginases reveals their puzzling distribution and frequent gene transfer events // *Sci Rep.* — 2022. — V. 12. — P. 15797.

29. Michalska K., Jaskolski M., Michalska K., Jaskolski M., Michalska K., Jaskolski M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations // *Acta Biochim Pol. Poland.* — 2006. — V. 53. — P. 627—640.

30. Loch J.I., Jaskolski M. Structural and biophysical aspects of l-asparaginases: a growing family with amazing diversity // *IUCrJ.* — 2021. — V. 8. — P. 514—531.

31. Lubkowski J., Wlodawer A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase // *FEBS J. England.* — 2021. — V. 288. — P. 4183—4209.

32. Dumina M., Zhgun A. Thermo-L-Asparaginases: From the Role in the Viability of Thermophiles and Hyperthermophiles at High Temperatures to a Molecular Understanding of Their Thermoactivity and Thermostability // *Int J Mol Sci.* — 2023. — V. 24. — P. 2674.

33. Credali A., Díaz-Quintana A., García-Calderón M., De la Rosa M.A., Márquez A.J., Vega J.M. Structural analysis of K⁺ dependence in l-asparaginases from *Lotus japonicus* // *Planta.* — 2011. — V. 234. — P. 109—122.

34. Andjelkovic M., Zinovjev K., Ramos-Guzmán C.A., Ruiz- Pernía J.J., Tuñón I. Elucidation of the Active Form and Reaction Mechanism in Human Asparaginase Type III Using Multiscale Simulations // *J Chem Inf Model.* — 2023. — V. 63. — P. 5676—5688.

35. Loch J.I., Imiolczyk B., Sliwiak J., Wantuch A., Bejger M., Gilski M., Jaskolski M. Crystal structures of the elusive *Rhizobium etli* l-asparaginase reveal a peculiar active site // *Nat Commun.* — 2021. — V. 12. — P. 6717.

36. Lopes A.M., Oliveira-Nascimento L. de, Ribeiro A., Tairum C.A.J., Breyer C.A., Oliveira M.A. de, Monteiro G., Souza-Motta C.M. de, Magalhães P. de O., Avendaño J.G.F., Cavaco-Paulo A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C. de O., Sette L.D., Converti A., Pessoa A. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond // *Crit Rev Biotechnol. England.* — 2017. — V. 37. — P. 82—99.

37. Nunes J.C.F., Cristóvão R.O., Freire M.G., Santos-Ebinuma V.C., Faria J.L., Silva C.G., Tavares A.P.M. Recent Strategies and Applications for l-Asparaginase Confinement // *Molecules.* — 2020. — V. 25. — P. 5827.

38. Chakravarty N., Priyanka, Singh J., Singh R.P. A potential type-II L-asparaginase from marine isolate *Bacillus australimaris* NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural modeling // *Int J Biol Macromol.* — 2021. — V. 174. — P. 527—539.
39. Tsegaye K., Tsehai B.A., Getie B. Desirable L-asparaginases for treating cancer and current research trends // *Front Microbiol.* — 2024. — V. 15. — P. 1269282.
40. Chand S., Mahajan R. V., Prasad J.P., Sahoo D.K., Mihooliya K.N., Dhar M.S., Sharma G. A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications // *Biotechnol Appl Biochem.* — 2020. — V. 67. — P. 619—647.
41. Karamitros C.S., Konrad M. Fluorescence-Activated Cell Sorting of Human l-asparaginase Mutant Libraries for Detecting Enzyme Variants with Enhanced Activity // *ACS Chem Biol. United States.* — 2016. — V. 11. — P. 2596—2607.
42. Schalk A.M., Lavie A. Structural and kinetic characterization of guinea pig L-asparaginase type III // *Biochemistry.* — 2014. — V. 53. — P. 2318—2328.
43. Khalifah R.G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase I Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C // *J Biol Chem.* — 1971. — V. 246. — P. 2561—2573.
44. Papageorgiou A.C., Posypanova G.A., Andersson C.S., Sokolov N.N., Krasotkina J. Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase // *FEBS J. England.* — 2008. — V. 275. — P. 4306—4316.
45. Maggi M., Meli M., Colombo G., Scotti C. Revealing *Escherichia coli* type II l-asparaginase active site flexible loop in its open, ligand-free conformation // *Sci Rep.* — 2021. — V. 11. — P. 18885.
46. Jaskólski M., Kozak M., Lubkowski J., Palm G., Wlodawer A. Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups // *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* — 2001. — V. 57. — P. 369—377.
47. Maggi M., Scotti C. Structural Aspects of *E coli* Type II Asparaginase in Complex with Its Secondary Product L-Glutamate // *Int J Mol Sci.* — 2022. — V. 23. — P. 5942.

48. Nomme J., Su Y., Lavie A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human L-asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis // *J Mol Biol.* — 2014. — V. 426. — P. 2471—2485.

49. Loch J.I., Klonecka A., Kądziołka K., Bonarek P., Barciszewski J., Imiolczyk B., Brzezinski K., Gilski M., Jaskolski M. Structural and biophysical studies of new L-asparaginase variants: lessons from random mutagenesis of the prototypic *Escherichia coli* Ntn-amidohydrolase // *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol.* — 2022. — V. 78. — P. 911—926.

50. Hosseini K., Zivari-Ghader T., Akbarzadehlaleh P., Ebrahimi V., Sharafabad B.E., Dilmaghani A. A Comprehensive Review of L-Asparaginase: Production, Applications and Therapeutic Potential in Cancer Treatment // *Appl Biochem Microbiol.* — 2024. — V. 60. — P. 599—613.

51. Loch J.I., Worsztynowicz P., Sliwiak J., Grzechowiak M., Imiolczyk B., Pokrywka K., Chwastyk M., Gilski M., Jaskolski M. *Rhizobium etl* has two L-asparaginases with low sequence identity but similar structure and catalytic center // *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol.* — 2023. — V. 79. — P. 775—791.

52. Lubkowski J., Wlodawer A. Geometric considerations support the double-displacement catalytic mechanism of L-asparaginase // *Protein Sci.* — 2019. — V. 28. — P. 1850—1864.

53. Schalk A.M., Antansijevic A., Caffrey M., Lavie A. Experimental Data in Support of a Direct Displacement Mechanism for Type I/II L-Asparaginases // *J Biol Chem.* — 2016. — V. 291. — P. 5088—5100.

54. Lubkowski J., Vanegas J., Chan W.-K., Lorenzi P.L., Weinstein J.N., Sukharev S., Fushman D., Rempe S., Anishkin A., Wlodawer A. Mechanism of Catalysis by l-Asparaginase // *Biochemistry.* — 2020. — V. 59. — P. 1927-1945.

55. Zhou R., Liang T., Li T., Huang J., Chen C. Possible mechanism of metabolic and drug resistance with L-asparaginase therapy in childhood leukaemia // *Front Oncol.* — 2023. — V. 13. — P. 1070069.

56. Кисляк И.А., Соколова Д.В., Бурова О.С., Хан И.И., Жданов Д.Д., Покровский В.С. Зависимость чувствительности клеток меланомы кожи человека к L-аспарагиназе от уровня экспрессии генов аспарагинсинтетазы и

глутаминсинтетазы // Российский онкологический журнал. — 2025. — Т. 30. — №3. — С. 259-268.

57. Nguyen H.A., Durden D.L., Lavie A. The differential ability of asparagine and glutamine in promoting the closed/active enzyme conformation rationalizes the *Wolinella succinogenes* L-asparaginase substrate specificity // *Sci Rep.* — 2017. — V. 7. — P. 41643.

58. Blachier J., Cleret A., Guerin N., Gil C., Fanjat J.-M., Tavernier F., Vidault L., Gallix F., Rama N., Rossignol R., Piedrahita D., Andrivon A., Châlons-Cottavoz M., Aguera K., Gay F., Horand F., Laperrousaz B. L-asparaginase anti-tumor activity in pancreatic cancer is dependent on its glutaminase activity and resistance is mediated by glutamine synthetase // *Exp Cell Res.* — 2023. — V. 426. — P. 113568.

59. Meleshina A. V., Cherkasova E.I., Shirmanova M. V., Klementieva N. V., Kiseleva E. V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Zagaynova E. V Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo // *Stem Cell Res Ther.* — 2015. — V. 6. — P. 15.

60. Knott S.R. V., Wagenblast E., Khan S., Kim S.Y., Soto M., Wagner M., Turgeon M.-O., Fish L., Erard N., Gable A.L., Maceli A.R., Dickopf S., Papachristou E.K., D'Santos C.S., Carey L.A., Wilkinson J.E., Harrell J.C., Perou C.M., Goodarzi H., Poulogiannis G., Hannon G.J. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer // *Nature.* — 2018. — V. 554. — P. 378—381.

61. Hermanova I., Arruabarrena-Aristorena A., Valis K., Nuskova H., Alberich-Jorda M., Fiser K., Fernandez-Ruiz S., Kavan D., Pecinova A., Niso-Santano M., Zaliova M., Novak P., Houstek J., Mracek T., Kroemer G., Carracedo A., Trka J., Starkova J. Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of l-asparaginase in childhood ALL cells // *Leukemia.* — 2016. — V. 30. — P. 209—218.

62. Karpel-Massler G., Ramani D., Shu C., Halatsch M.-E., Westhoff M.-A., Bruce J.N., Canoll P., Siegelin M.D. Metabolic reprogramming of glioblastoma cells by L-asparaginase sensitizes for apoptosis in vitro and in vivo // *Oncotarget.* — 2016. — V. 7. — P. 33512—33528.

63. Покровский В.С., Комарова М.В., Александрова С.С., Покровская М.В., Калишьян М.С., Каршиева С.Ш., Трещалина Е.М. Роль ферментативной активности в реализации антипролиферативного эффекта L-аспарагиназ //

Клиническая онкогематология Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2015. — Т. 8. — С. 120—128.

64. Plyasova A.A., Pokrovskaya M. V., Lisitsyna O.M., Pokrovsky V.S., Alexandrova S.S., Hilal A., Sokolov N.N., Zhdanov D.D. Penetration into cancer cells via clathrin-dependent mechanism allows l-asparaginase from *rhodospirillum rubrum* to inhibit telomerase // *Pharmaceuticals*. — 2020. — V. 13. — P. 1—18.

65. Batool T., Makky E.A., Jalal M., Yusoff M.M. A Comprehensive Review on l-Asparaginase and Its Applications // *Appl Biochem Biotechnol*. — 2016. — V. 178. — P. 900—923.

66. Shrivastava A., Khan A.A., Khurshid M., Kalam M.A., Jain S.K., Singhal P.K. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent // *Crit Rev Oncol Hematol*. — 2016. — V. 100. — P. 1—10.

67. Александрова С.С., Гладилина Ю.А., Покровская М.В., Соколов Н.Н., Жданов Д.Д. Механизмы развития побочных эффектов и лекарственной устойчивости к аспарагиназам и пути их преодоления // *Биомедицинская химия*. — 2022. — Т. 68. — С. 104—116.

68. Dinndorf P.A., Gootenberg J., Cohen M.H., Keegan P., Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) // *Oncologist*. — 2007. — V. 12. — P. 991—998.

69. Beckett A., Gervais D. What makes a good new therapeutic L-asparaginase? // *World J Microbiol Biotechnol. Germany*. — 2019. — V. 35. — P. 152.

70. Thomas X., Le Jeune C. Erythrocyte Encapsulated L-Asparaginase (Graspa) in Acute Leukemia // *Int J Hematol Oncol*. — 2016. — V. 5. — P. 11—25.

71. Nguyen H.A., Su Y., Zhang J.Y., Antanasijevic A., Caffrey M., Schalk A.M., Liu L., Rondelli D., Oh A., Mahmud D.L., Bosland M.C., Kajdacsy-Balla A., Peirs S., Lammens T., Mondelaers V., De Moerloose B., Goossens S., Schlicht M.J., Kabirov K.K., Lyubimov A. V., Merrill B.J., Sauntharajah Y., Van Vlierberghe P., Lavie A. A Novel l-Asparaginase with low l-Glutaminase Coactivity Is Highly Efficacious against Both T- and B-cell Acute Lymphoblastic Leukemias In Vivo // *Cancer Res*. — 2018. — V. 78. — P. 1549—1560.

72. Aghaeepoor M., Akbarzadeh A., Mirzaie S., Hadian A., Jamshidi Aval S., Dehnavi E. Selective reduction in glutaminase activity of l-Asparaginase by asparagine

248 to serine mutation: A combined computational and experimental effort in blood cancer treatment // *Int J Biol Macromol.* — 2018. — V. 120. — P. 2448—2457.

73. Wernerman J. Plasma Glutamine and Its Levels in Metabolic Stress / J. Wernerman. — New York: NY Springer New York, 2015. — P. 143—152.

74. Emadi A., Zokaee H., Sausville E.A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies // *Cancer Chemother Pharmacol.* — 2014. — V. 73. — P. 875—883.

75. Pieters R., Hunger S.P., Boos J., Rizzari C., Silverman L., Baruchel A., Goekbuget N., Schrappe M., Pui C. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia // *Cancer.* — 2011. — V. 117. — P. 238—249.

76. Cooper S.L., Young D.J., Bowen C.J., Arwood N.M., Poggi S.G., Brown P.A. Universal premedication and therapeutic drug monitoring for asparaginase-based therapy prevents infusion-associated acute adverse events and drug substitutions // *Pediatr Blood Cancer.* — 2019 — V. 66. — P. e27797.

77. Kotzia G.A., Lappa K., Labrou N.E. Tailoring structure-function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage // *Biochem J.* — 2007. — V. 404. — P. 337—343.

78. Faret M., de Morais S.B., Zanchin N.I.T., de Souza T. de A.C.B. l-Asparaginase from *Erwinia carotovora*: insights about its stability and activity // *Mol Biol Rep.* — 2019. — V. 46. — P. 1313—1316.

79. Darvishi F., Jahanafrooz Z., Mokhtarzadeh A. Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2022. — V. 106. — P. 5335—5347.

80. Heo Y.-A., Syed Y.Y., Keam S.J. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia // *Drugs.* — 2019. — V. 79. — P. 767—777.

81. Asselin B.L., Whitin 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. — V. 11. — P. 1780—1786.

82. Avramis V.I., Sencer S., Periclou A.P., Sather H., Bostrom B.C., Cohen L.J., Ettinger A.G., Ettinger L.J., Franklin J., Gaynon P.S., Hilden J.M., Lange B., Majlessipour F., Mathew P., Needle M., Neglia J., Reaman G., Holcenberg J.S. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol

conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study // *Blood*. — 2002. — V. 99. — P. 1986—1994.

83. Place A.E., Stevenson K.E., Vrooman L.M., Harris M.H., Hunt S.K., O'Brien J.E., Supko J.G., Asselin B.L., Athale U.H., Clavell L.A., Cole P.D., Kelly K.M., Laverdiere C., Leclerc J.-M., Michon B., Schorin M.A., Welch J.J.G., Lipshultz S.E., Kutok J.L., Blonquist T.M., Neuberg D.S., Sallan S.E., Silverman L.B. Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* l-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial // *Lancet Oncol.* — 2015. — V. 16. — P. 1677—1690.

84. Li R.-J., Jin R., Liu C., Cao X., Manning M.L., Di X.M., Przepiora D., Namuswe F., Deisseroth A., Goldberg K.B., Blumenthal G.M., Pazdur R. FDA Approval Summary: Calaspargase Pegol-mknl For Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Young Adults // *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* — 2020. — V. 26. — P. 328—331.

85. Angiolillo A.L., Schore R.J., Devidas M., Borowitz M.J., Carroll A.J., Gastier-Foster J.M., Heerema N.A., Keilani T., Lane A.R., Loh M.L., Reaman G.H., Adamson P.C., Wood B., Wood C., Zheng H.W., Raetz E.A., Winick N.J., Carroll W.L., Hunger S.P. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Calaspargase Pegol *Escherichia coli* L-Asparaginase in the Treatment of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From Children's Oncology Group Study AALL07P4 // *J Clin Oncol.* — 2014. — V. 32. — P. 3874—3882.

86. Wemyss C., Jones E., Stentz R., Carding S.R. Acute Myeloid Leukaemia and Acute Lymphoblastic Leukaemia Classification and Metabolic Characteristics for Informing and Advancing Treatment // *Cancers.* — 2024. — V. 16. — P. 4136.

87. Akahane K., Kimura S., Miyake K., Watanabe A., Kagami K., Yoshimura K., Shinohara T., Harama D., Kasai S., Goi K., Kawai T., Hata K., Kiyokawa N., Koh K., Imamura T., Horibe K., Look A.T., Minegishi M., Sugita K., Takita J., Inukai T. Association of allele-specific methylation of the ASNS gene with asparaginase sensitivity and prognosis in T-ALL // *Blood Adv.* — 2022. — V. 6. — P. 212—224.

88. Qin C., Yang X., Zhan Z. High Expression of Asparagine Synthetase Is Associated with Poor Prognosis of Breast Cancer in Chinese Population // *Cancer Biother Radiopharm.* — 2020. — V. 35. — P. 581—585.

89. Shen Y., Wang H., Guo D., Liu J., Sun J., Chen N., Song H., Ji X. Dual asparagine-depriving nanoparticles against solid tumors // *Nat Commun.* — 2025. — V. 16. — P. 5675.

90. Abd El-Baky H.H., El-Baroty G.S. Spirulina maxima L-asparaginase: Immobilization, Antiviral and Antiproliferation Activities // *Recent Pat Biotechnol.* — 2020. — V. 14. — P. 154—163.

91. Zhang B., Fan J., Zhang X., Shen W., Cao Z., Yang P., Xu Z., Ju D. Targeting asparagine and autophagy for pulmonary adenocarcinoma therapy // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2016. — V. 100. — P. 9145—9161.

92. Purwaha P., Lorenzi P.L., Silva L.P., Hawke D.H., Weinstein J.N. Targeted metabolomic analysis of amino acid response to L-asparaginase in adherent cells // *Metabolomics.* — 2014. — V. 10. — P. 909—919.

93. Apfel V., Begue D., Cordo' V., Holzer L., Martinuzzi L., Buhles A., Kerr G., Barbosa I., Naumann U., Piquet M., Ruddy D., Weiss A., Ferretti S., Almeida R., Bonenfant D., Tordella L., Galli G.G. Therapeutic Assessment of Targeting ASNS Combined with L-Asparaginase Treatment in Solid Tumors and Investigation of Resistance Mechanisms // *ACS Pharmacol Transl Sci.* — 2021. — V. 4. — P. 327—337.

94. Мелик-Нубаров Н.С., Гроздова И.Д., Ломакина Г.Ю., Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Гришин Д.В., Соколов Н.Н. Пэгилированная рекомбинантная L-аспарагиназа *Erwinia carotovora*: получение, свойства и перспективы использования // *Appl Biochem Mi Прикладная биохимия и микробиология.* — 2017. — Т. 53. — С. 164—172.

95. Li H., Ning S., Ghandi M., Kryukov G. V., Gopal S., Deik A., Souza A., Pierce K., Keskula P., Hernandez D., Ann J., Shkoza D., Apfel V., Zou Y., Vazquez F., Barretina J., Pagliarini R.A., Galli G.G., Root D.E., Hahn W.C., Tsherniak A., Giannakis M., Schreiber S.L., Clish C.B., Garraway L.A., Sellers W.R. The landscape of cancer cell line metabolism // *Nat Med.* — 2019. — V. 25. — P. 850—860.

96. Covini D., Tardito S., Bussolati O., Chiarelli L.R., Paschetto M. V, Digilio R., Valentini G., Scotti C. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase // *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* — 2012. — V. 7. — P. 4—13.

97. Van Trimpont M., Schalk A.M., Hofkens K., Peeters E., T'Sas S., Vandemeulebroecke K., Su Y., De Loera A., Garcia A., Chen H., Lammens T., Van Vlierberghe P., Goossens S., Lavie A. A human-like glutaminase-free asparaginase is highly efficacious in ASNS^{low} leukemia and solid cancer mouse xenograft models // *Cancer Lett.* — 2025. — V. 611. — P. 217404.

98. Nishikawa G., Kawada K., Hanada K., Maekawa H., Itatani Y., Miyoshi H., Taketo M.M., Obama K. Targeting Asparagine Synthetase in Tumorigenicity Using Patient-Derived Tumor-Initiating Cells // *Cells.* — 2022. — V. 11. — P. 3273.

99. Dufour E., Gay F., Aguera K., Scoazec J.-Y., Horand F., Lorenzi P.L., Godfrin Y. Pancreatic Tumor Sensitivity to Plasma L-Asparagine Starvation // *Pancreas.* — 2012. — V. 41. — P. 940—948.

100. Chiu M., Tardito S., Pillozzi S., Arcangeli A., Armento A., Uggeri J., Missale G., Bianchi M.G., Barilli A., Dall'Asta V., Campanini N., Silini E.M., Fuchs J., Armeanu-Ebinger S., Bussolati O. Glutamine depletion by crisantaspase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts // *Br J Cancer.* — 2014. — V. 111. — P. 1159—1167.

101. Lopez C.D., Kardosh A., Chen E.Y., Pegna G., Guimaraes A., Foster B., Brinkerhoff B., Goodyear S.M., Lim J.-Y., Taber E., Rajagopalan B., Edmerson E., Vo J., Nelson K., Jackson A., Gingerich T., Fahlman A., Lessenich C., Fennell F., Ventura D., Roy P., Keith D., Sheppard B., Brody J.R., Mills G.B., Ronai Z.A., Sears R.C. CASPER: A Phase I trial combining calaspargase pegol-mnkl and cobimetinib in pancreatic cancer // *Futur Oncol.* — 2024. — V. 20. — P. 2915—2925.

102. Jazz Pharmaceuticals A JZP341 Study in Adult Participants With Advanced or Metastatic Solid Tumors [электронный ресурс]. — 2024. — Режим доступа: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05631327>.

103. Hanada K., Kawada K., Obama K. Targeting Asparagine Metabolism in Solid Tumors // *Nutrients.* — 2025. — V. 17. — P. 179.

104. Jiang J., Batra S., Zhang J. Asparagine: A Metabolite to Be Targeted in Cancers // *Metabolites.* — 2021. — V. 11. — P. 402.

105. Harding H.P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D. Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells // *Mol Cell*. — 2000. — V. 6. — P. 1099—1108.
106. Lomelino C.L., Andring J.T., McKenna R., Kilberg M.S. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease // *J Biol Chem*. — 2017. — V. 292. — P. 19952—19958.
107. Pathria G., Lee J.S., Hasnis E., Tandoc K., Scott D.A., Verma S., Feng Y., Larue L., Sahu A.D., Topisirovic I., Ruppin E., Ronai Z.A. Translational reprogramming marks adaptation to asparagine restriction in cancer // *Nat Cell Biol*. — 2019. — V. 21. — P. 1590—1603.
108. Gopalakrishnan R., Kannan K., Gunasekaran R., Ramachandran P., Ganapathy D., Sivaperumal P. Marine-derived L-asparaginase: unlocking marine power in anti-tumor therapeutics // *Front Immunol*. — 2025. — V. 16. — P. 1710780.
109. Pathria G., Verma S., Yin J., Scott D.A., Ronai Z.A. MAPK signaling regulates c-MYC for melanoma cell adaptation to asparagine restriction // *EMBO Rep*. — 2021. — V. 22. — P. e51436.
110. Zhang S., Gong L., Sun Y., Zhang F., Gao W. An ultra-long-acting L-asparaginase synergizes with an immune checkpoint inhibitor in starvation-immunotherapy of metastatic solid tumors // *Biomaterials*. — 2025. — V. 312. — P. 122740.
111. Gwinn D.M., Lee A.G., Briones-Martin-del-Campo M., Conn C.S., Simpson D.R., Scott A.I., Le A., Cowan T.M., Ruggero D., Sweet-Cordero E.A. Oncogenic KRAS Regulates Amino Acid Homeostasis and Asparagine Biosynthesis via ATF4 and Alters Sensitivity to L-Asparaginase // *Cancer Cell*. — 2018. — V. 33. — P. 91-107.e6.
112. Shen X., Jain A., Aladelokun O., Yan H., Gilbride A., Ferrucci L.M., Lu L., Khan S.A., Johnson C.H. Asparagine, colorectal cancer, and the role of sex, genes, microbes, and diet: A narrative review // *Front Mol Biosci*. — 2022. — V. 9. — P. 958666.
113. Hinze L., Labrosse R., Degar J., Han T., Schatoff E.M., Schreek S., Karim S., McGuckin C., Sacher J.R., Wagner F., Stanulla M., Yuan C., Sicinska E., Giannakis M., Ng K., Dow L.E., Gutierrez A. Exploiting the Therapeutic Interaction of WNT

Pathway Activation and Asparaginase for Colorectal Cancer Therapy // *Cancer Discov.* — 2020. — V. 10. — P. 1690—1705.

114. Hanada K., Kawada K., Nishikawa G., Toda K., Maekawa H., Nishikawa Y., Masui H., Hirata W., Okamoto M., Kiyasu Y., Honma S., Ogawa R., Mizuno R., Itatani Y., Miyoshi H., Sasazuki T., Shirasawa S., Taketo M.M., Obama K., Sakai Y. Dual blockade of macropinocytosis and asparagine bioavailability shows synergistic anti-tumor effects on KRAS-mutant colorectal cancer // *Cancer Lett.* — 2021. — V. 522. — P. 129—141.

115. Song P., Ye L., Fan J., Li Y., Zeng X., Wang Z., Wang S., Zhang G., Yang P., Cao Z., Ju D. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells // *Oncotarget.* — 2015. — V. 6. — P. 3861-3873.

116. Ulu A., Ates B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review // *Bioconjug Chem.* — 2017. — V. 28. — P. 1598—1610.

117. 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. — V. 42. — P. 1020—1025.

118. Uren J.R., Hargis B.J., Beardsley P. Immunological and pharmacological characterization of poly-DL-alanyl-modified *Erwinia carotovora* L-asparaginase // *Cancer Res.* — 1982. — V. 42. — P. 4068—4071.

119. Gebauer M., Skerra A. Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action // *Bioorg Med Chem.* — 2018. — V. 26. — P. 2882—2887.

120. Harris J.M., Chess R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals // *Nat Rev Drug Discov.* — 2003. — V. 2. — P. 214—221.

121. Radadiya A., Zhu W., Coricello A., Alcaro S., Richards N.G.J. Improving the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia // *Biochemistry.* — 2020. — V. 59. — P. 3193—3200.

122. Ramirez-Paz J., Saxena M., Delinois L.J., Joaquín-Ovalle F.M., Lin S., Chen Z., Rojas-Nieves V.A., Griebenow K. Thiol-maleimide poly(ethylene glycol) crosslinking of L-asparaginase subunits at recombinant cysteine residues introduced by mutagenesis // *PLoS One.* — 2018. — V. 13. — P. e0197643.

123. Meneguetti G.P., Santos J.H.P.M., Obreque K.M.T., Barbosa C.M.V., Monteiro G., Farsky S.H.P., Marim de Oliveira A., Angeli C.B., Palmisano G., Ventura S.P.M., Pessoa-Junior A., de Oliveira Rangel-Yagui C. Novel site-specific PEGylated L-asparaginase // *PLoS One*. — 2019. — V. 14. — P. e0211951.
124. Chien W.-W., Allas S., Rachinel N., Sahakian P., Julien M., Le Beux C., Lacroix C.-E., Abribat T., Salles G. Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase // *Invest New Drugs*. — 2014. — V. 32. — P. 795—805.
125. Torres-Obreque K., Meneguetti G.P., Custódio D., Monteiro G., Pessoa-Junior A., de Oliveira Rangel-Yagui C. Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase // *Biotechnol Appl Biochem*. — 2019. — V. 66. — P. 281—289.
126. 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. — V. 23. — P. 221—226.
127. Dobryakova N. V., Zhdanov D.D., Sokolov N.N., Aleksandrova S.S., Pokrovskaya M. V., Kudryashova E. V. Rhodospirillum rubrum L-Asparaginase Conjugates with Polyamines of Improved Biocatalytic Properties as a New Promising Drug for the Treatment of Leukemia // *Appl Sci*. — 2023. — V. 13. — P. 3373.
128. Ha W., Meng X.-W., Li Q., Fan M.-M., Peng S.-L., Ding L.-S., Tian X., Zhang S., Li B.-J. Self-assembly hollow nanosphere for enzyme encapsulation // *Soft Matter*. — 2010. — V. 6. — P. 1405.
129. Sukhoverkov K. V, Kudryashova E. V PEG-chitosan and glycol-chitosan for improvement of biopharmaceutical properties of recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora* // *Biochemistry (Mosc)*. — 2015. — V. 80. — P. 113—119.
130. Ulu A., Koytepe S., Ates B. Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for l -asparaginase immobilization // *Carbohydr Polym*. — 2016. — V. 153. — P. 559—572.
131. Ulu A., Koytepe S., Ates B. Synthesis and characterization of biodegradable pHEMA-starch composites for immobilization of L-asparaginase // *Polym Bull*. — 2016. — V. 73. — P. 1891—1907.
132. Cruz M.E.M., Gaspar M.M., Lopes F., Jorge J.S., Perez-Soler R. Liposomal l-asparaginase: in vitro evaluation // *Int J Pharm*. — 1993. — V. 96. — P. 67—77.

133. Anindita de. Design and evaluation of liposomal delivery system for L-Asparaginase // *J Appl Pharm Sci.* — 2012. — P. 112—117.
134. Wan S., He D., Yuan Y., Yan Z., Zhang X., Zhang J. Chitosan-modified lipid nanovesicles for efficient systemic delivery of l-asparaginase // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2016. — V. 143. — P. 278—284.
135. Do T.T., Do T.P., Nguyen T.N., Nguyen T.C., Vu T.T.P., Nguyen T.G.A. Nanoliposomal L-Asparaginase and Its Antitumor Activities in Lewis Lung Carcinoma Tumor-Induced BALB/c Mice // *Adv Mater Sci Eng.* — 2019. — V. 2019. — P. 1—8.
136. Nel J., Elkhoury K., Velot É., Bianchi A., Acherar S., Francius G., Tamayol A., Grandemange S., Arab-Tehrany E. Functionalized liposomes for targeted breast cancer drug delivery // *Bioact Mater.* — 2023. — V. 24. — P. 401—437.
137. Balcão V.M., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Malcata F.X., Guisán J.M. Structural and Functional Stabilization of L-Asparaginase via Multisubunit Immobilization onto Highly Activated Supports // *Biotechnol Prog.* — 2001. — V. 17. — P. 537—542.
138. Mu X., Qiao J., Qi L., Dong P., Ma H. Poly(2-Vinyl-4,4-dimethylazlactone)-Functionalized Magnetic Nanoparticles as Carriers for Enzyme Immobilization and Its Application // *ACS Appl Mater Interfaces.* — 2014. — V. 6. — P. 21346—21354.
139. Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabir R., Mokarram A.R., Goodarzi M.T., Saidijam M. Preparation and nanoencapsulation of l-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study // *Nanoscale Res Lett.* — 2014. — V. 9. — P. 340.
140. Uygun M., Jurado-Sánchez B., Uygun D.A., Singh V.V., Zhang L., Wang J. Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells // *Nanoscale.* — 2017. — V. 9. — P. 18423—18429.
141. Orhan H., Aktaş Uygun D. Immobilization of L-Asparaginase on Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment // *Appl Biochem Biotechnol.* — 2020. — V. 191. — P. 1432—1443.
142. Ates B., Ulu A., Köytepe S., Ali Noma S.A., Kolat V.S., Izgi T. Magnetic-propelled Fe₃O₄—chitosan carriers enhance l-asparaginase catalytic activity: a promising strategy for enzyme immobilization // *RSC Adv.* — 2018. — V. 8. — P. 36063—36075.

143. Mohaghegh S., Tarighatnia A., Omidi Y., Barar J., Aghanejad A., Adibkia K. Multifunctional magnetic nanoparticles for MRI-guided co-delivery of erlotinib and L-asparaginase to ovarian cancer // *J Microencapsul.* — 2022. — V. 39. — P. 394—408.
144. Ortac I., Simberg D., Yeh Y., Yang J., Messmer B., Trogler W.C., Tsien R.Y., Esener S. Dual-Porosity Hollow Nanoparticles for the Immunoprotection and Delivery of Nonhuman Enzymes // *Nano Lett.* — 2014. — V. 14. — P. 3023—3032.
145. Cristóvão R.O., Almeida M.R., Barros M.A., Nunes J.C.F., Boaventura R.A.R., Loureiro J.M., Faria J.L., Neves M.C., Freire M.G., Ebinuma-Santos V.C., Tavares A.P.M., Silva C.G. Development and characterization of a novel l-asparaginase/MWCNT nanobioconjugate // *RSC Adv.* — 2020. — V. 10. — P. 31205—31213.
146. Hunault-Berger M., Leguay T., Huguet F., Leprêtre S., Deconinck E., Ojeda-Uribe M., Bonmati C., Escoffre-Barbe M., Bories P., Himmerlin C., Chevallier P., Rousselot P., Reman O., Boulland M., Lissandre S., Turlure P., Bouscary D., Sanhes L., Legrand O., Lafage-Pochitaloff M., Béné M.C., Liens D., Godfrin Y., Ifrah N., Dombret H. A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA/2-2008 study // *Am J Hematol.* — 2015. — V. 90. — P. 811—818.
147. Hammel P., Bachet J.-B., Portales F., Mineur L., Metges J.-P., de la Fouchardiere C., Louvet C., El Hajbi F., Faroux R., Guimbaud R., Tougeron D., Volet J., Lecomte T., Tournigand C., Rebischung C., Berlier W., Gupta A., Cros J., André T., El-Hariry I. A phase 2b of eryaspase in combination with gemcitabine or FOLFOX as second-line therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma (NCT02195180) // *J Clin Oncol.* — 2017. — V. 35. — e15718.
148. Graspа [электронный ресурс]. — Режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/graspa-0#news-on>.
149. Almeida A.P.C., Saraiva J.N., Cavaco G., Portela R.P., Leal C.R., Sobral R.G., Almeida P.L. Crosslinked bacterial cellulose hydrogels for biomedical applications // *Eur Polym J.* — 2022. — V. 177. — P. 111438.

150. Prilepskii A., Nikolaev V., Klaving A. Conductive bacterial cellulose: From drug delivery to flexible electronics // *Carbohydr Polym.* — 2023. — V. 313. — P. 120850.
151. Ye D., Rongpipi S., Kiemle S.N., Barnes W.J., Chaves A.M., Zhu C., Norman V.A., Liebman-Peláez A., Hexemer A., Toney M.F., Roberts A.W., Anderson C.T., Cosgrove D.J., Gomez E.W., Gomez E.D. Preferred crystallographic orientation of cellulose in plant primary cell walls // *Nat Commun.* — 2020. — V. 11. — P. 4720.
152. Mauro F., Corrado B., De Gregorio V., Lagreca E., Di Natale C., Vecchione R., Netti P.A. Exploring the evolution of bacterial cellulose precursors and their potential use as cellulose-based building blocks // *Sci Rep.* — 2024. — V. 14. — P. 11613.
153. Vadanán S.V., Basu A., Lim S. Bacterial cellulose production, functionalization, and development of hybrid materials using synthetic biology // *Polym J.* — 2022. — V. 54. — P. 481—492.
154. Singhania R.R., Patel A.K., Tsai M.-L., Chen C.-W., Di Dong C. Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications // *Bioengineered.* — 2021. — V. 12. — P. 6793—6807.
155. Alarcón-Guijo P., Garcés V., González A., Delgado-López J.M., Ullah R., Bansal V., Dominguez-Vera J.M. Bacterial Cellulose as a UVB Filter to Protect the Skin Microbiota // *Macromol Biosci.* — 2025. — V. 25. — P. e2400269.
156. Киселёва О.И., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Пигалева М.А., Рубина М.С., Громовых Т.И. Структура популяции of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода // *Вестник Томского Государственного Университета, Биология.* — 2021. — Т. 53. — С. 22—46.
157. Bento H.B.S., Paiva G.B., Almeida M.R., Silva C.G., Carvalho P.J., Tavares A.P.M., Pedrolli D.B., Santos-Ebinuma V.C. *Aliivibrio fischeri* L-Asparaginase production by engineered *Bacillus subtilis*: a potential new biopharmaceutical // *Bioprocess Biosyst Eng.* — 2022. — V. 45. — P. 1635—1644.
158. Mir I.S., Riaz A., Fréchet J., Roy J.S., Mcelhinney J., Pu S., Balakrishnan H.K., Greener J., Dumée L.F., Messaddeq Y. Bacterial cellulose-graphene oxide

composite membranes with enhanced fouling resistance for bio-effluents management // *npj Clean Water*. — 2024. — V. 7. — P. 111.

159. Abeer M.M., Mohd Amin M.C.I., Martin C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects // *J Pharm Pharmacol*. — 2014. — V. 66. — P. 1047—1061.

160. Lahiri D., Nag M., Dutta B., Dey A., Sarkar T., Pati S., Edinur H.A., Abdul Kari Z., Mohd Noor N.H., Ray R.R. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent // *Int J Mol Sci*. — 2021. — V. 22. — P. 12984.

161. de Medeiros A.D.M., da Silva Junior C.J.G., de Amorim J.D.P., do Nascimento H.A., Converti A., Costa A.F. de S., Sarubbo L.A. Biocellulose for Treatment of Wastewaters Generated by Energy Consuming Industries: A Review // *Energies*. — 2021. — V. 14. — P. 5066.

162. Adepu S., Bodrothu S., Khandelwal M. Bacterial Cellulose for Drug Delivery: Current Status and Opportunities // Springer. *New Horizons in Metallurgy, Materials and Manufacturing Indian Institute of Metals Series*. Singapore Springer. — 2023. — P. 137—157.

163. Römling U., Galperin M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions // *Trends Microbiol*. — 2015. — V. 23. — P. 545—557.

164. Stumpf T.R., Yang X., Zhang J., Cao X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering // *Mater Sci Eng C*. — 2018. — V. 82. — P. 372—383.

165. Torgbo S., Sukyai P. Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications // *Polym Degrad Stab*. — 2020. — V. 179. — P. 109232.

166. Girard V., Chaussé J., Borduas M., Dubuc É., Iorio-Morin C., Brisebois S., Vermette P. In Vitro and In Vivo Biocompatibility of Bacterial Cellulose // *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. — 2024. — V. 112. — P. e35488.

167. Zharikov A.N., Orlova O.V., Aliev A.R. Bacterial cellulose-based materials in medicine // *Med Technol Assess Choice*. — 2025. — P. 84.

168. Lima N.F., Maciel G.M., Lima N.P., Fernandes I. de A.A., Haminiuk C.W.I. Bacterial cellulose in cosmetic innovation: A review // *Int J Biol Macromol.* — 2024. — V. 275. — P. 133396.
169. Jantararat C., Muenraya P., Srivaro S., Nawakitransan A., Promsornpason K. Comparison of drug release behavior of bacterial cellulose loaded with ibuprofen and propranolol hydrochloride // *RSC Adv.* — 2021. — V. 11. — P. 37354—37365.
170. Cao P., Amiralian N., Wang J., Sun B., Popat A., Xie F., Xu Z.P., Li Y., Li L. Engineering nano-cellulose bio-composites to improve protein delivery for oral vaccination // *Biomater Adv.* — 2023. — V. 149. — P. 213400.
171. Pöttinger Y., Kralisch D., Fischer D. Bacterial Nanocellulose: The Future of Controlled Drug Delivery? // *Ther Deliv.* — 2017. — V. 8. — P. 753—761.
172. Gusain R., Kumar N., Seyedin S., Jiang Y. Composites of 2D Materials and Bacterial Cellulose for Sustainable Energy Storage and Environmental Remediation // *Adv Sustain Syst.* — 2024. — V. 8. — P. 2400341.
173. Shi X., Zheng Y., Wang G., Lin Q., Fan J. pH- and electro-response characteristics of bacterial cellulose nanofiber/sodium alginate hybrid hydrogels for dual controlled drug delivery // *RSC Adv.* — 2014. — V. 4. — P. 47056—47065.
174. Saïdi L., Vilela C., Oliveira H., Silvestre A.J.D., Freire C.S.R. Poly(N-methacryloyl glycine)/nanocellulose composites as pH-sensitive systems for controlled release of diclofenac // *Carbohydr Polym.* — 2017. — V. 169. — P. 357—365.
175. Madkour L.H. Classification of Nanostructured Materials / L.H. Madkour // *Nanoelectronic Materials. Adv Struct Mater.* — Cham: Springer, 2019. — (Advanced Structured Materials; V. 116). — P. 269—307.
176. Wiegand C., Moritz S., Hessler N., Kralisch D., Wesarg F., Müller F.A., Fischer D., Hipler U.-C. Antimicrobial functionalization of bacterial nanocellulose by loading with polihexanide and povidone-iodine // *J Mater Sci Mater Med.* — 2015. — V. 26. — P. 245.
177. Liang S. Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials // *Front Bioeng Biotechnol.* — 2023. — V. 11. — P. 1252706.
178. Mohammadi S., Jabbari F., Babaeipour V. Bacterial cellulose-based composites as vehicles for dermal and transdermal drug delivery: A review // *Int J Biol Macromol.* — 2023. — V. 242. — P. 124955.

179. Balistreri G.N., Campbell I.R., Li X., Amorim J., Zhang S., Nance E., Roumeli E. Bacterial cellulose nanoparticles as a sustainable drug delivery platform for protein-based therapeutics // *RSC Appl Polym.* — 2024 — V. 2. — P. 172—183.
180. Perugini P., Bleve M., Redondi R., Cortinovia F., Colpani A. In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin // *J Cosmet Dermatol.* — 2020. — V. 19. — P. 725—735.
181. Pandey M., Mohamad N., Amin M.C.I.M. Bacterial Cellulose/Acrylamide pH-Sensitive Smart Hydrogel: Development, Characterization, and Toxicity Studies in ICR Mice Model // *Mol Pharm.* — 2014. — V. 11. — P. 3596—3608.
182. Badshah M., Ullah H., Khan S.A., Park J.K., Khan T. Preparation, characterization and in-vitro evaluation of bacterial cellulose matrices for oral drug delivery // *Cellulose.* — 2017. — V. 24. — P. 5041—5052.
183. Mohd Amin M.C.I., Ahmad N., Pandey M., Jue Xin C. Stimuli-responsive bacterial cellulose-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogels for oral controlled release drug delivery // *Drug Dev Ind Pharm.* — 2014. — V. 40. — P. 1340—1349.
184. Zhong C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose // *Front Bioeng Biotechnol.* — 2020. — V. 8. — P. 605374.
185. Singh J., Tan N.C.S., Mahadevaswamy U.R., Chanchareonsook N., Steele T.W.J., Lim S. Bacterial cellulose adhesive composites for oral cavity applications // *Carbohydr Polym.* — 2021. — V. 274. — P. 118403.
186. Cao S., Zhang K., Li Q., Zhang S., Chen J. Injectable and photothermal antibacterial bacterial cellulose cryogel for rapid hemostasis and repair of irregular and deep skin wounds // *Carbohydr Polym.* — 2023. — V. 320. — P. 121239.
187. Busari H., Mefford O.T., Vaughn M.A. Engineering long-term controlled drug release from biodegradable devices 3D printed with vat polymerization // *J Mater Chem B.* — 2025. — V. 13. — P. 6456—6468.
188. Müller A., Ni Z., Hessler N., Wesarg F., Müller F.A., Kralisch D., Fischer D. The Biopolymer Bacterial Nanocellulose as Drug Delivery System: Investigation of Drug Loading and Release using the Model Protein Albumin // *J Pharm Sci.* — 2013. — V. 102. — P. 579—592.

189. Huang L., Chen X., Nguyen T.X., Tang H., Zhang L., Yang G. Nanocellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers // *J Mater Chem B*. — 2013. — V. 1. — P. 2976.
190. Adepur S., Khandelwal M. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism // *Carbohydr Polym*. — 2020. — V. 249. — P. 116816.
191. Ullah H., Badshah M., Mäkilä E., Salonen J., Shahbazi M.-A., Santos H.A., Khan T. Fabrication, characterization and evaluation of bacterial cellulose-based capsule shells for oral drug delivery // *Cellulose*. — 2017. — V. 24. — P. 1445—1454.
192. Alkhatib Y., Dewaldt M., Moritz S., Nitzsche R., Kralisch D., Fischer D. Controlled extended octenidine release from a bacterial nanocellulose/Poloxamer hybrid system // *Eur J Pharm Biopharm*. — 2017. — V. 112. — P. 164—176.
193. Патент №2775231С1, Российская Федерация, МПК А61К 9/48; А61К 35/74; А61К 47/36; А61К 47/42 (2022.05). Способ получения капсул на основе гидрогелей бактериальной целлюлозы: № 2021138512: заявл. 23.12.2021: опубл.: 28.06.2022 / Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назарова Н.Б., Богатырева А.О., Упыркина Е.С.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва". — 9 с.: ил.
194. Cacicedo M.L., León I.E., Gonzalez J.S., Porto L.M., Alvarez V. A., Castro G.R. Modified bacterial cellulose scaffolds for localized doxorubicin release in human colorectal HT-29 cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. — 2016. — V. 140. — P. 421—429.
195. Revin V.V., Liyaskina E.V., Parchaykina M.V., Kurgaeva I.V., Efremova K.V., Novokuptsev N. V. Production of Bacterial Exopolysaccharides: Xanthan and Bacterial Cellulose // *Int J Mol Sci*. — 2023. — V. 24. — P. 14608.
196. Badshah M., Ullah H., Khan A.R., Khan S., Park J.K., Khan T. Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery // *Int J Biol Macromol*. — 2018. — V. 113. — P. 526—533.

197. Silva I.G.R., Pantoja B.T., Almeida G.H.D.R., Carreira A.C.O., Miglino M.A. Bacterial Cellulose and ECM Hydrogels: An Innovative Approach for Cardiovascular Regenerative Medicine // *Int J Mol Sci.* — 2022. — V. 23. — P. 3955.
198. Saibuatong O., Phisalaphong M. Novo aloe vera—bacterial cellulose composite film from biosynthesis // *Carbohydr Polym.* — 2010. — V. 79. — P. 455—460.
199. Butchosa N., Brown C., Larsson P.T., Berglund L.A., Bulone V., Zhou Q. Nanocomposites of bacterial cellulose nanofibers and chitin nanocrystals: fabrication, characterization and bactericidal activity // *Green Chem.* — 2013. — V. 15. — P. 3404.
200. Adepu S., Khandelwal M. Drug release behaviour and mechanism from unmodified and in situ modified bacterial cellulose // *Proc Indian Natl Sci Acad.* — 2021. — V. 87. — P. 110—120.
201. Cacicedo M.L., Islan G.A., Drachemberg M.F., Alvarez V.A., Bartel L.C., Bolzán A.D., Castro G.R. Hybrid bacterial cellulose—pectin films for delivery of bioactive molecules // *New J Chem.* — 2018. — V. 42. — P. 7457—7467.
202. Ul-Islam M., Khan T., Park J.K. Nanoreinforced bacterial cellulose—montmorillonite composites for biomedical applications // *Carbohydr Polym.* — 2012. — V. 89. — P. 1189—1197.
203. Horue M., Silva J.M., Berti I.R., Brandão L.R., Barud H. da S., Castro G.R. Bacterial Cellulose-Based Materials as Dressings for Wound Healing // *Pharmaceutics.* — 2023. — V. 15. — P. 424.
204. Chang S.-T., Chen L.-C., Lin S.-B., Chen H.-H. Nano-biomaterials application: Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking // *Food Hydrocoll.* — 2012. — V. 27. — P. 137—144.
205. Huang J., Zhao M., Hao Y., Wei Q. Recent Advances in Functional Bacterial Cellulose for Wearable Physical Sensing Applications // *Adv Mater Technol.* — 2022. — V. 7. — P. 412.
206. Beekmann U., Schmölz L., Lorkowski S., Werz O., Thamm J., Fischer D., Kralisch D. Process control and scale-up of modified bacterial cellulose production for tailor-made anti-inflammatory drug delivery systems // *Carbohydr Polym.* — 2020. — V. 236. — P. 116062.

207. Krathumkhet N., Imae T., Paradee N. Electrically controlled transdermal ibuprofen delivery consisting of pectin-bacterial cellulose/polypyrrole hydrogel composites // *Cellulose*. — 2021. — V. 28. — P. 11451—11463.
208. Alven S., Aderibigbe B.A. Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management // *Int J Mol Sci*. — 2020. — V. 21. — P. 9656.
209. Stoica-Guzun A., Stroescu M., Tache F., Zaharescu T., Grosu E. Effect of electron beam irradiation on bacterial cellulose membranes used as transdermal drug delivery systems // *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms*. — 2007. — V. 265. — P. 434—438.
210. Poverenov E., Shemesh M., Gulino A., Cristaldi D.A., Zakin V., Yefremov T., Granit R. Durable contact active antimicrobial materials formed by a one-step covalent modification of polyvinyl alcohol, cellulose and glass surfaces // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. — 2013. — V. 112. — P. 356—361.
211. Qi H., Huang Y., Ji B., Sun G., Qing F., Hu C., Yan K. Anti-crease finishing of cotton fabrics based on crosslinking of cellulose with acryloyl malic acid // *Carbohydr Polym*. — 2016. — V. 135. — P. 86—93.
212. Ciecholewska-Juśko D., Junka A., Fijałkowski K. The cross-linked bacterial cellulose impregnated with octenidine dihydrochloride-based antiseptic as an antibacterial dressing material for highly-exuding, infected wounds // *Microbiol Res*. — 2022. — V. 263. — P. 127125.
213. Sulaeva I., Hettegger H., Bergen A., Rohrer C., Kostic M., Konnerth J., Rosenau T., Potthast A. Fabrication of bacterial cellulose-based wound dressings with improved performance by impregnation with alginate // *Mater Sci Eng C*. — 2020. — V. 110. — P. 110619.
214. Khan M.U.A., Stojanović G.M., Rehman R.A., Moradi A.-R., Rizwan M., Ashammakhi N., Hasan A. Graphene Oxide-Functionalized Bacterial Cellulose—Gelatin Hydrogel with Curcumin Release and Kinetics: In Vitro Biological Evaluation // *ACS Omega*. — 2023. — V. 8. — P. 40024—40035.
215. Zhou L., Ke K., Yang M.-B., Yang W. Recent progress on chemical modification of cellulose for high mechanical-performance Poly(lactic acid)/Cellulose composite: A review // *Compos Commun*. — 2021. — V. 23. — P. 100548.

216. Xie F., De Wever P., Fardim P., Van den Mooter G. TEMPO-Oxidized Cellulose Beads as Potential pH-Responsive Carriers for Site-Specific Drug Delivery in the Gastrointestinal Tract // *Molecules*. — 2021. — V. 26. — P. 1030.

217. Solomevich S.O., Dmitruk E.I., Aharodnikau U.E., Salamevich D.A., Bychkovsky P.M., Golub N. V., Yurkshtovich T.L. Characterization of H₃PO₄/HNO₃—NaNO₂ oxidized bacterial cellulose and its usage as a carrier for the controlled release of cephalexin // *Cellulose*. — 2021. — V. 28. — P. 9425—9439.

218. Vasconcelos N.F., Cunha A.P., Ricardo N.M.P.S., Freire R.S., Vieira L. de A.P., Brígida A.I.S., Borges M. de F., Rosa M. de F., Vieira R.S., Andrade F.K. Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds // *Int J Biol Macromol*. — 2020. — V. 165. — P. 3065—3077.

219. Khattak S., Qin X.-T., Wahid F., Huang L.-H., Xie Y.-Y., Jia S.-R., Zhong C. Permeation of Silver Sulfadiazine Into TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose as an Antibacterial Agent // *Front Bioeng Biotechnol*. — 2021. — V. 8. — P. 616467.

220. Кобер Д.Д., Рубина М.С., Эльманович И.В., Гребенщиков Д.П., Громовых Т.И. Сорбционная способность гель-плёнок функционализированной бактериальной целлюлозы по отношению к хлорамфениколу // *Вестник Томского Государственного Университета. Биология*. — 2022. — Т. 59. — С. 64—84.

221. Roque-Borda C.A., Carnero Canales C.S., Primo L.M.D.G., Colturato V.M.M., Polinário G., Di Filippo L.D., Duarte J.L., Chorilli M., da Silva Barud H., Pavan F.R. Cellulose from bacteria as a delivery system for improved treatment of infectious diseases: A review of updates and prospects // *Int J Biol Macromol*. — 2024. — V. 277. — P. 133831.

222. Nascimento A.M. da S.S., Silva J.M., de Lima I.S., Furtini J.A.O., Ribeiro S.J.L., Muniz E.C., da Silva Barud H., Silva-Filho E.C. Effect of Ex Situ Modification of Bacterial Cellulose with Organosilane Coupling Agent on Drug Delivery Properties // *J Polym Environ*. — 2024. — V. 32. — P. 4422—4439.

223. Chantereau G., Brown N., Dourges M.A., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Sebe, G., Coma, V. Silylation of bacterial cellulose to design membranes with intrinsic anti-bacterial properties // *Carbohydr Polym*. — 2019. — V. 220. — P. 71—78.

224. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T.R., Asare E., Orlando I., Raghavendran V., Roy I. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // *Mater Sci Eng R Reports*. — 2021. — V. 145. — P. 100623.

225. Al-Sakkaf M.K., Basfer I., Iddrisu M., Bahadi S.A., Nasser M.S., Abussaud B., Drmosh Q.A., Onaizi S.A. An Up-to-Date Review on the Remediation of Dyes and Phenolic Compounds from Wastewaters Using Enzymes Immobilized on Emerging and Nanostructured Materials: Promises and Challenges // *Nanomaterials*. — 2023. — V. 13. — P. 2152.

226. Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review // *Adsorption*. — 2014. — V. 20. — P. 801—821.

227. Drozd R., Szymańska M., Przygodzka K., Hoppe J., Leniec G., Kowalska U. The Simple Method of Preparation of Highly Carboxylated Bacterial Cellulose with Ni- and Mg-Ferrite-Based Versatile Magnetic Carrier for Enzyme Immobilization // *Int J Mol Sci*. — 2021. — V. 22. — P. 8563.

228. Wu S., Wu S., Su F. Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption // *J Chem Technol Biotechnol*. — 2017. — V. 92. — P. 109—114.

229. Pandey D., Daverey A., Arunachalam K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization // *J Clean Prod*. — 2020. — V. 255. — P. 120267.

230. Kim H., Song J.E., Kim H.R. Comparative study on the physical entrapment of soy and mushroom proteins on the durability of bacterial cellulose bio-leather // *Cellulose*. — 2021. — V. 28. — P. 3183—3200.

231. Velasco-Lozano S. Immobilization of Enzymes as Cross-Linked Enzyme Aggregates: General Strategy to Obtain Robust Biocatalysts // *Methods Mol Biol*. — 2020. — V. 2100. — P. 345—361.

232. Jackson E., Correa S., Betancor L. Cellulose-Based Nanosupports for Enzyme Immobilization // Springer. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Cham Springer. — 2019. — P. 1235—1253.

233. Huang Y., Wang J., Yang F., Shao Y., Zhang X., Dai K. Modification and evaluation of micro-nano structured porous bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering // *Mater Sci Eng C*. — 2017. — V. 75. — P. 1034—1041.
234. Prabhakar T., Giaretta J., Zulli R., Rath R.J., Farajikhah S., Talebian S., Dehghani F. Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective // *Chem Eng J*. — 2025. — V. 503. — P. 158054.
235. Jadczyk K., Ochędzan-Siodłak W. Bacterial cellulose: Biopolymer with novel medical applications // *J Biomater Appl*. — 2023. — V. 38. — P. 51—63.
236. Zheng Q.-Z., Wang P., Yang Y.-N., Cui D.-J. The relationship between porosity and kinetics parameter of membrane formation in PSF ultrafiltration membrane // *J Memb Sci*. — 2006. — V. 286. — P. 7—11.
237. Li G., Nandgaonkar A.G., Habibi Y., Krause W.E., Wei Q., Lucia L.A. An environmentally benign approach to achieving vectorial alignment and high microporosity in bacterial cellulose/chitosan scaffolds // *RSC Adv*. — 2017. — V. 7. — P. 13678—13688.
238. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for biochemical research / R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, K.M. Jones. — Oxford: Clarendon Press. 3rd ed. Oxford Clarendon Press. — 1989. — 592 p.
239. Zhou W., Rao Y., Zhuang W., Ge L., Lin R., Tang T., Wu J., Li M., Yang P., Zhu C., Wang H., Ying H. Improved enzymatic activity by oriented immobilization on graphene oxide with tunable surface heterogeneity // *Compos Part B Eng*. — 2021. — V. 216. — P. 108788.
240. Orelma H., Filpponen I., Johansson L.-S., Österberg M., Rojas O.J., Laine J. Surface Functionalized Nanofibrillar Cellulose (NFC) Film as a Platform for Immunoassays and Diagnostics // *Biointerphases*. — 2012. — V. 7. — P. 61.
241. Vasconcelos N.F., Andrade F.K., Vieira L. de A.P., Vieira R.S., Vaz J.M., Chevallier P., Mantovani D., Borges M. de F., Rosa M. de F. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features // *Cellulose*. — 2020. — V. 27. — P. 3055—3083.
242. Dumina M. V., Zhdanov D.D., Veselovsky A. V., Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S.S., Minyaev M.E., Varfolomeeva L.A., Matyuta I.O., Boyko K.M., Zhgun A.A. Hyperthermophilic L-Asparaginase from *Thermococcus sibiricus* and Its

Double Mutant with Increased Activity: Insights into Substrate Specificity and Structure // *Int J Mol Sci.* — 2025. — V. 26. — P. 5437.

243. Cooney D.A., Capizzi R.L., Handschumacher R.E. Evaluation of L-asparagine metabolism in animals and man // *Cancer Res.* — 1970. — V. 30. — P. 925—935.

244. Dave P.N., Macwan P.M., Kamaliya B. Biodegradable Gg-cl-poly(NIPAm-co-AA)/-o-MWCNT based hydrogel for combined drug delivery system of metformin and sodium diclofenac: in vitro studies // *RSC Adv.* — 2023. — V. 13. — P. 22875—22885.

245. Tuzimski T., Sugajski M. Inhibitory Effects of Bisphenol Z on 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 and In Silico Molecular Docking Analysis // *Molecules.* — 2025. — V. 30. — P. 3941.

246. Синицына Р.В., Верхов Д.Г. Некоторые вопросы химической энзимологии и кинетики ферментативного катализа: учебное пособие / Р.В. Синицына, Д.Г. Верхов. — Саратов: Саратовский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, 2014. — 55 с.

247. Rackov N., Janßen N., Akkache A., Drotleff B., Beyer B., Scoppola E., Vrana N.E., Hengge R., Bidan C.M., Hathroubi S. Bacterial cellulose: Enhancing productivity and material properties through repeated harvest // *Biofilm.* — 2025. — V. 9. — P. 100276.

248. Guan F., Guo C.F. Flexible, high-strength, and porous nano-nano composites based on bacterial cellulose for wearable electronics: a review // *Soft Sci.* — 2022. — V. 2. — P. 16.

249. Arola S., Tammelin T., Setälä H., Tullila A., Linder M.B. Immobilization—Stabilization of Proteins on Nanofibrillated Cellulose Derivatives and Their Bioactive Film Formation // *Biomacromolecules.* — 2012. — V. 13. — P. 594—603.

250. Baicu S.C., Taylor M.J. Acid—base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency // *Cryobiology.* — 2002. — V. 45. — P. 33—48.

251. Krasotkina J., Borisova A.A., Gervaziev Y.V., Sokolov N.N. One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia carotovora* // *Biotechnol Appl Biochem.* — 2004. — V. 39. — P. 215—221.

252. Brito A.E.M. de, Pessoa Jr A., Converti A., Rangel-Yagui C. de O., Silva J.A. da, Apolinário A.C. Poly (lactic-co-glycolic acid) nanospheres allow for high l-asparaginase encapsulation yield and activity // *Mater Sci Eng C*. — 2019. — V. 98. — P. 524—534.
253. Schrecker S.T., Gostomski P.A. Determining the Water Holding Capacity of Microbial Cellulose // *Biotechnol Lett*. — 2005. — V. 27. — P. 1435—1438.
254. Shoukat H., Buksh K., Noreen S., Pervaiz F., Maqbool I. Hydrogels as potential drug-delivery systems: network design and applications // *Ther Deliv*. — 2021. — V. 12. — P. 375—396.
255. Krasteva P.V., Bernal-Bayard J., Travier L., Martin F.A., Kaminski P.-A., Karimova G., Fronzes R., Ghigo J.-M. Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system // *Nat Commun*. — 2017. — V. 8. — P. 2065.
256. Feng X., Ge Z., Wang Y., Xia X., Zhao B., Dong M. Production and characterization of bacterial cellulose from kombucha-fermented soy whey // *Food Prod Process Nutr*. — 2024. — V. 6. — P. 20.
257. Wu Z., Chen S., Li J., Wang B., Jin M., Liang Q., Zhang D., Han Z., Deng L., Qu X., Wang H. Insights into Hierarchical Structure—Property—Application Relationships of Advanced Bacterial Cellulose Materials // *Adv Funct Mater*. — 2023. — V. 33. — P. 2214327.
258. Wang S.-S., Han Y.-H., Ye Y.-X., Shi X.-X., Xiang P., Chen D.-L., Li M. Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter* sp strain W1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production // *RSC Adv*. — 2017. — V. 7. — P. 45145—45155.
259. Pandey A., Singh M.K., Singh A. Bacterial cellulose: A smart biomaterial for biomedical applications // *J Mater Res*. — 2023. — P. 1—17.
260. Ul-Islam M., Khan T., Park J.K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification // *Carbohydr Polym*. — 2012. — V. 88. — P. 596—603.
261. Li Y., Jiang H., Zheng W., Gong N., Chen L., Jiang X., Yang G. Bacterial cellulose—hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair // *J Mater Chem B*. — 2015. — V. 3. — P. 3498—3507.

262. Monteiro O.A., Airoidi C. Some studies of crosslinking chitosan—glutaraldehyde interaction in a homogeneous system // *Int J Biol Macromol.* — 1999. — V. 26. — P. 119—128.
263. Weyell P., Beekmann U., Küpper C., Dederichs M., Thamm J., Fischer D., Kralisch D. Tailor-made material characteristics of bacterial cellulose for drug delivery applications in dentistry // *Carbohydr Polym.* — 2019. — V. 207. — P. 1—10.
264. Kim H.J., Jin J.N., Kan E., Kim K.J., Lee S.H. Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization // *Biotechnol Bioprocess.* — 2017. — V. 22. — P. 89—94.
265. Ojagh S.M.A., Vahabzadeh F., Karimi A. Synthesis and characterization of bacterial cellulose-based composites for drug delivery // *Carbohydr Polym.* — 2021. — V. 273. — P. 118587.
266. Bayer I.S. Controlled Drug Release from Nanoengineered Polysaccharides // *Pharmaceutics.* — 2023. — V. 15. — P. 1364.
267. Ivanauskas F., Kaunietis I., Laurinavičius V., Razumienė J., Šimkus R. Apparent Michaelis constant of the enzyme modified porous electrode // *J Math Chem.* — 2008. — V. 43. — P. 1516—1526.
268. Blais S., Lortie R. Determination of the intrinsic Michaelis constant of immobilized alpha-chymotrypsin // *J Biol Chem.* — 1993. — V. 268. — P. 18637—18639.
269. Bunting P.S., Laidler K.J. Flow kinetics of L-asparaginase attached to nylon tubing // *Biotechnol Bioeng.* — 1974. — V. 16. — P. 119—134.
270. Homaei A.A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R. Enzyme immobilization: an update // *J Chem Biol.* — 2013. — V. 6. — P. 185—205.
271. Liu X., Fang Y., Yang X., Li Y., Wang C. Electrospun epoxy-based nanofibrous membrane containing biocompatible feather polypeptide for highly stable and active covalent immobilization of lipase // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* — 2018. — V. 166. — P. 277—285.
272. Mohammadi M., As'habi M.A., Salehi P., Yousefi M., Nazari M., Brask J. Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds // *Int J Biol Macromol.* — 2018. — V. 109. — P. 443—447.

273. Kumari A., Kaur B., Srivastava R., Sangwan R.S. Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties // *Biochem Biophys Reports*. — 2015. — V. 2. — P. 108—114.
274. van de Velde F., Lourenco N.D., Pinheiro H.M., Bakker M. Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilization Techniques // *ChemInform*. — 2003. — V. 34. — P. 815—835.
275. Soares A.L., Guimarães G.M., Polakiewicz B., Pitombo R.N. de M., Abrahão-Neto J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E coli* l-asparaginase // *Int J Pharm*. — 2002. — V. 237. — P. 163—170.
276. Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R., Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization // *Chem Soc Rev*. — 2013. — V. 42. — P. 6290—6307.
277. Mazlan S.Z., Hanifah S.A. Effects of Temperature and pH on Immobilized Laccase Activity in Conjugated Methacrylate-Acrylate Microspheres // *Int J Polym Sci*. — 2017. — V. 2017. — P. 1—8.
278. Dobryakova N.V., Dumina M.V., Zhgun A.A., Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S.S., Zhdanov D.D., Kudryashova E.V. L-Asparaginase Conjugates from the Hyperthermophilic Archaea *Thermococcus sibiricus* with Improved Biocatalytic Properties // *Int J Mol Sci*. — 2024. — V. 25. — P. 4174.
279. Ward C., Meehan J., Gray M.E., Murray A.F., Argyle D.J., Kunkler I.H., Langdon S.P. The impact of tumour pH on cancer progression: strategies for clinical intervention // *Explor Target Anti-tumor Ther*. — 2020. — V. 1. — P. 71—100.
280. Monajati M., Tamaddon A.M., Abolmaali S.S., Yousefi G., Borandeh S., Dinarvand R. Enhanced L-asparaginase stability through immobilization in supramolecular nanogels of PEG-grafted poly HPMA with bis(α -cyclodextrin) // *Biochem Eng J*. — 2023. — V. 191. — P. 108802.
281. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* / H. Bisswanger. — Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH Federal Republic of Germany, 2002. — 268 p.

282. Wu X., Zhang Q., Zhang L., Liu S., Chen G., Zhang H., Wang L. Insights Into the Role of Exposed Surface Charged Residues in the Alkali-Tolerance of GH11 Xylanase // *Front Microbiol.* — 2020. — V. 11. — P. 872.
283. Hassani L., Nourozi R. Modification of Lysine Residues of Horseradish Peroxidase and Its Effect on Stability and Structure of the Enzyme // *Appl Biochem Biotechnol.* — 2014. — V. 172. — P. 3558—3569.
284. Ahmad N.N., Ahmad Kamarudin N.H., Leow A.T.C., Rahman R.N.Z.R.A. The Role of Surface Exposed Lysine in Conformational Stability and Functional Properties of Lipase from Staphylococcus Family // *Molecules.* — 2020. — V. 25. — P. 3858.
285. Gomes C.M., Stafshede P.W. Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology and Disease / C.M. Gomes, P.W. Stafshede. — Boca Raton, Florida: Taylor & Francis, CRC Press, 2010. — 308 p.
286. Zeng J., Gao X., Dai Z., Tang B., Tang X.-F. Effects of Metal Ions on Stability and Activity of Hyperthermophilic Pyrolysins and Further Stabilization of This Enzyme by Modification of a Ca²⁺-Binding Site // *Appl Environ Microbiol.* — 2014. — V. 80. — P. 2763—2772.
287. Gilski M., Maurya M.R., Nocek B., Brzezinski K. The Influence of Metal Ions and their Complexes on the Function and Structure of Biological Macromolecules // *Front Chem.* — 2025. — V. 13. — P. 1563537.
288. Stumpe M.C., Grubmüller H. Polar or Apolar—The Role of Polarity for Urea-Induced Protein Denaturation // *PLoS Comput Biol.* — 2008. — V. 4. — P. e1000221.
289. Das A., Mukhopadhyay C. Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View // *J Phys Chem B.* — 2009. — V. 113. — P. 12816—12824.
290. O'Brien E.P., Dima R.P., Brooks B., Thirumalai D. Interactions between Hydrophobic and Ionic Solutes in Aqueous Guanidinium Chloride and Urea Solutions: Lessons for Protein Denaturation Mechanism // *J Am Chem Soc.* — 2007. — V. 129. — P. 7346—7353.
291. Shifrin S., Luborsky S.W., Grochowski B.J. L-Asparaginase from *Escherichia coli* B Physicochemical studies of the dissociation process // *J Biol Chem.* — 1971. — V. 246. — P. 7708—7714.

292. Dobryakova N.V., Zhdanov D.D., Sokolov N.N., Aleksandrova S.S., Pokrovskaya M.V., Kudryashova E.V. Improvement of Biocatalytic Properties and Cytotoxic Activity of L-Asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* by Conjugation with Chitosan-Based Cationic Polyelectrolytes // *Pharmaceuticals*. — 2022. — V. 15. — P. 406.
293. Sannikova E.P., Bulushova N. V, Cheperegin S.E., Gubaydullin I.I., Chestukhina G.G., Ryabichenko V. V, Zalunin I.A., Kotlova E.K., Konstantinova G.E., Kubasova T.S., Shtil A.A., Pokrovsky V.S., Yarotsky S. V, Efremov B.D., Kozlov D.G. The Modified Heparin-Binding L-Asparaginase of *Wolinella succinogenes* // *Mol Biotechnol*. — 2016. — V. 58. — P. 528—539.
294. Tabandeh M.R., Aminlari M. Synthesis, physicochemical and immunological properties of oxidized inulin—l-asparaginase bioconjugate // *J Biotechnol*. — 2009. — V. 141. — P. 189—195.
295. Ahmad R., Sardar M. Immobilization of cellulase on TiO₂ nanoparticles by physical and covalent methods: a comparative study // *Indian J Biochem Biophys*. — 2014. — V. 51. — P. 314—320.
296. Суховерков К.В., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Соколов Н.Н., Кудряшова Е.В. Увеличение каталитической эффективности и противоопухолевой активности рекомбинантной L-аспарагиназы *Erwinia carotovora* при образовании конъюгатов с сополимерами ПЭГ-хитозана // *Вест. Моск. Ун-та, Сер. 2. Химия*. — 2016. — Т. 57. — С. 96—102.
297. Zhou J.-J., Li X.-H., He P.-Y., Qi F.-Y., Ullah M.W., Li S.-J., Liu Y.-T., Bu L.-L., Yang G., Sun Z.-J. Implantable versatile oxidized bacterial cellulose membrane for postoperative HNSCC treatment via photothermal-boosted immunotherapy // *Nano Res*. — 2023. — V. 16. — P. 951—963.
298. Liu C., Ma Y., Guo S., He B., Jiang T. Topical delivery of chemotherapeutic drugs using nano-hybrid hydrogels to inhibit post-surgical tumour recurrence // *Biomater Sci*. — 2021. — V. 9. — P. 4356—4363.
299. Ваккер А.В., Юркштович Т.Л., Бычкова П.М. Интраоперационная локальная химиотерапия больных раком головы и шеи пролонгированным препаратом «Цисплацел» // *Сибирский онкологический журнал*. — 2010. — Т. 6. — С. 48—51.