

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco562802>

# Применение препаратов L-аспарагиназы для лечения солидных опухолей: данные экспериментальных и клинических исследований

И.А. Кисляк<sup>1</sup>, М.В. Покровская<sup>2</sup>, Д.Ю. Жантурина<sup>1</sup>, В.С. Покровский<sup>1, 3</sup><sup>1</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Российская Федерация;<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Российская Федерация;<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

Лекарственная терапия — один из основных видов лечения онкологических заболеваний. L-аспарагиназа — фермент, гидролизующий аспарагин — более 50 лет назад вошла в схемы лечения острого лимфобластного лейкоза и других гемобластозов, однако её применение для терапии солидных опухолей пока крайне ограничено. В данном обзоре проанализированы экспериментальные данные по чувствительности клеточных линий и ксенографтов солидных опухолей к L-аспарагиназе, рассмотрены результаты клинических исследований. Среди механизмов цитотоксического действия L-аспарагиназы на опухолевые клетки обсуждаются такие процессы, как истощение аспарагиновой и глутаминовой кислот, влияние на внутренний и внешний пути апоптоза, ингибирование клеточных процессов через снижение активности белка mTOR, а также ослабление экспрессии гена теломеразы. Отдельно рассмотрены молекулярные маркёры, по которым можно предположить эффективность будущей терапии L-аспарагиназой солидных опухолей. К таким маркёрам можно отнести уровни экспрессии генов аспарагинсинтетазы и глутаминсинтетазы, степень метилирования промоторной области гена аспарагинсинтетазы, активность белка PTEN и аутофагии, костномозговое окружение опухолевых клеток, а также экспрессию генов, ассоциированных с резистентностью к аспарагиназе (таких как ген опиоидного рецептора  $\mu 1$  и ген ассоциированного с хантингином белка 1).

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа; аспарагинсинтетаза; солидные опухоли; клеточная линия; ксенографт; лекарственная устойчивость.

## Как цитировать:

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, № 1. С. 79–94.

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco562802>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco562802>

# The use of L-asparaginase for the treatment of solid tumors: data from experimental studies and clinical trials

Il'ya A. Kislyak<sup>1</sup>, Marina V. Pokrovskaya<sup>2</sup>, Darya Yu. Zhanturina<sup>1</sup>, Vadim S. Pokrovsky<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

Drug therapy is one of the main strategies of cancer treatment. L-asparaginase, the enzyme that hydrolyzes asparagine, has been included in the treatment regimens for acute lymphoblastic leukemia and other hematological malignancies since more than 50 years ago, but its use for the treatment of solid tumors is still extremely limited. This review analyzes experimental data on the sensitivity of cell lines and xenografts of solid tumors to L-asparaginase, examines the results of clinical trials. Among the mechanisms of the cytotoxic effect of L-asparaginase on tumor cells, such processes as depletion of aspartic and glutamic acids, influence on the internal and external pathways of apoptosis, inhibition of cellular processes through a decrease in the activity of the mTOR protein, and weakening of the expression of the telomerase gene are discussed. Separately, molecular markers are considered, which can be used to suggest the effectiveness of future therapy with L-asparaginase in solid tumors. These markers include expression levels of asparagine synthetase and glutamine synthetase genes, degree of methylation of the *ASNS* gene promoter region, PTEN protein activity and autophagy, bone marrow environment of tumor cells, as well as expression of genes associated with asparaginase resistance (such as the  $\mu 1$  opioid receptor gene and the huntingtin-associated protein 1 gene).

**Keywords:** asparaginase; aspartate-ammonia ligase; ASNS protein; neoplasms; cell line; heterografts; drug resistance.

## To cite this article:

Kislyak IA, Pokrovskaya MV, Zhanturina DYu, Pokrovsky VS. The use of L-asparaginase for the treatment of solid tumors: data from experimental studies and clinical trials. *Russian Journal of Oncology*. 2023;28(1):79–94. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco562802>

## ВВЕДЕНИЕ

L-аспарагиназа (код фермента 3.5.1.1) — фермент, гидролизующий аспарагин до аспарагиновой кислоты и аммиака (и в меньшей мере — глутамин до глутаминовой кислоты и аммиака). В течение многих лет она применяется для лечения острых лимфобластных лейкозов и других видов гемобластозов [1–6]. Эффективность применения аспарагиназы связана с особенностями метаболизма опухолевых клеток, часто не способных обеспечивать себя необходимыми для жизнедеятельности аминокислотами, по сравнению с нормальными клетками.

Несмотря на длительное использование этого фермента для терапии заболеваний относительно узкой этиологической группы, спектр его применения постепенно расширяется. Например, аспарагиназа включена в стандарты лечения экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы и других редких видов лимфом, значительно отличающихся по биологии опухолевого роста от острых лимфобластных лейкозов [7, 8].

За последние 70 лет препараты L-аспарагиназы выделены и охарактеризованы из десятков бактериальных источников [9–15], а также получены оптимизированные лекарственные формы «классической» аспарагиназы *Escherichia coli* II типа: пэгилированная, полисиалированная, инкапсулированная в эритроциты и др. [16–22].

В настоящем обзоре литературы мы рассматриваем опубликованные данные экспериментальных и клинических исследований эффективности препаратов аспарагиназы для лечения солидных опухолей, а также приводим возможные обоснования выбора моделей для изучения аспарагиназы в эксперименте.

### Эффективность препаратов L-аспарагиназы на моделях солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*

Несмотря на то, что большая часть опубликованных экспериментальных данных получена на клетках лейкозов и лимфом, существует немало работ, в которых показана значительная цитотоксическая активность аспарагиназы на культурах клеток солидных опухолей.

#### L-аспарагиназа *Escherichia coli* II типа

Наибольший пул данных получен для аспарагиназы *Escherichia coli* II типа, которая была использована для создания лекарственных препаратов. В работах P.L. Logenzi и соавт. [23, 24] исследовались культуры клеток рака яичников. Чувствительность 19 клеточных линий к L-аспарагиназе варьировала в широких пределах (концентрация полумаксимального ингибирования — IC50 — составила от 0,18 до 7,71 МЕ/мл), свидетельствуя о том, что рак яичников является весьма гетерогенной группой по чувствительности к аспарагиназе.

Четыре линии клеток аденокарциномы поджелудочной железы показали высокую чувствительность к L-аспарагиназе: IC50 составила ~0,2 МЕ/мл для трёх линий (AsPC-1, MIA PaCa-2, PANC-1) и 0,07 МЕ/мл для четвёртой (SW1990) [25].

Особый интерес представляет исследование E.H. Panosyan и соавт. [26], в котором изучалось действие L-аспарагиназы на клеточные линии опухолей головного мозга: глиобластомы (GBM-ES и U87), медуллобластомы (DAOY), а также глиомы мыши (GL-261). Действие L-аспарагиназы было различным, наиболее чувствительной оказалась клеточная линия DAOY, а наименее чувствительной — GBM-ES. В работе G. Karpel-Massler и соавт. [27], выполненной на клеточных линиях глиобластомы и глиомы, также подтверждена различная чувствительность клеток к действию L-аспарагиназы, при этом IC50 составляла от 0,16 до >5 МЕ/мл.

Сопоставимые результаты были получены в работе K. Okuda и соавт. [28] на линиях клеток гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Линии SNU387 и SNU398 оказались чувствительными к L-аспарагиназе (IC50 — 1,92 и 0,9 МЕ/мл соответственно), в то время как для линий Huh7 и HepG2 значения IC50 составили 51,15 и 25,07 МЕ/мл соответственно. Клетки линии Huh6 вообще не продемонстрировали чувствительности к аспарагиназе (IC50 >100 МЕ/мл). Исследование B. Zhang и соавт. [29], также проведённое на клеточных линиях ГЦК, подтверждает разную чувствительность к L-аспарагиназе линий опухолевых клеток. Кроме того, в 1970 году была обнаружена чувствительность к L-аспарагиназе у клеток меланомы [30].

#### Другие бактериальные источники L-аспарагиназы

По мере получения очищенных ферментов из других источников, их цитотоксическая активность была исследована на широкой панели опухолевых клеток, в том числе солидных.

Как было показано в исследовании O.Ю. Абакумова и соавт. [31], L-аспарагиназа, выделенная из *Yersinia pseudotuberculosis*, продемонстрировала высокую антипролиферативную активность, не уступающую активности аспарагиназы *Escherichia coli*. При этом клетки аденокарциномы молочной железы (линия MCF-7) были даже более чувствительными, чем лейкозные. В этой же работе было показано, что L-аспарагиназа из *Erwinia carotovora* (*Dickeya dadantii*) обладает более низкой цитотоксической активностью по сравнению с L-аспарагиназой *Y. pseudotuberculosis*.

Исследование M.C. Wu и соавт. [32], проведённое на клетках MIA PaCa-2, демонстрирует, что L-аспарагиназа из *Vibrio succinogenes* обладает меньшей антипролиферативной активностью по сравнению с аспарагиназой *Escherichia coli*.

В работе D.B. Darwesh и соавт. [33] было продемонстрировано, что аспарагиназа, выделенная из *Burkholderia pseudomallei*, оказывает цитотоксический эффект

на клетки HepG2 с IC50=1,53 МЕ/мл, а на клетки MCF-7 — с IC50=18 МЕ/мл.

Линия колоректального рака Caco-2, а также трижды негативная линия рака молочной железы MDA-MB-231 показали значительные различия в чувствительности к аспарагиназе из *Pseudomonas aeruginosa* (IC50 — 68,28 и 3,1 МЕ/мл соответственно) [34].

На клеточных линиях опухоли желудка было показано, что L-аспарагиназа из *Helicobacter pylori* обладает большей антипролиферативной активностью по сравнению с аспарагиназой *Escherichia coli* [35]. Например, для линии AGS IC50 для L-аспарагиназы *H. pylori* равна 1,3 МЕ/мл, а для *E. coli* — 95,6 МЕ/мл.

Клеточные линии Hela (эпителиоидный рак шейки матки) и HepG2 показали высокую чувствительность к аспарагиназе из *Streptomyces rochei*: полученные значения IC50 для них равны 2,16 и 2,54 МЕ/мл соответственно [36].

Выделенная из *Sarcina maxima* L-аспарагиназа показала антипролиферативную активность в отношении линий A549 (аденокарцинома лёгкого, IC50=0,05 МЕ/мл), HepG2 (IC50=0,05 МЕ/мл) и PC3 (аденокарцинома простаты, IC50=0,13 МЕ/мл) [37]. L-аспарагиназа из *Bacillus licheniformis* тоже показала активность против линии HepG2 (IC50=0,42 МЕ/мл), а также против линий MCF-7 (IC50=0,52 МЕ/мл) и HCT-116 (колоректальная карцинома, IC50=0,61 МЕ/мл) [38].

#### L-аспарагиназы архей и грибов

Помимо исследований с использованием бактериальных ферментов, известны работы с применением аспарагиназ архей и грибов.

Так, L-аспарагиназа из архейного микроорганизма *Pyrococcus abyssi* показала высокую цитотоксическую активность против линий FB, Caco-2 и HepG2: IC50 для них находилась в пределах от 5 до 7,5 МЕ/мл [39].

При этом клеточные линии A549 и Caco-2 оказались по-разному чувствительными к L-аспарагиназе, выделенной из *P. furiosus*: IC50 для них составили 1,78 и 30 МЕ/мл соответственно [40].

В исследовании D.H. El-Ghonemy и соавт. [41] линии клеток подвергались действию L-аспарагиназы гриба *Trichoderma viride*, при этом IC50 для линии HepG2 оказалось равным 21,2 г/мл, а для линии MCF-7 — 34,2 г/мл.

Аспарагиназа, выделенная из *Colletotrichum gloeosporioides*, оказала заметный эффект на клетки карциномы полости рта H103 (IC50 ~32 МЕ/мл) [42], а L-аспарагиназа гриба *Rhizopus oryzae* AM16 оказалась эффективной против линий HepG2 (IC50=23,4 мкг/мл), MCF-7 (IC50=72,4 мкг/мл), HCT-116 (IC50=23,6 мкг/мл) и A549 (IC50=28,6 мкг/мл) [43].

В исследовании M. El-Gendy и соавт. [44] была изучена чувствительность ряда клеточных линий к действию L-аспарагиназы, выделенной из *Fusarium equiseti* AHMF4: Hela (IC50=0,98 МЕ/мл), Hep-2 (эпидермоидная карцинома гортани, IC50=2,44 МЕ/мл), HepG2 (IC50=6,05 МЕ/мл), HCT-116 (IC50=4,03 МЕ/мл) и MCF-7 (IC50=11,13 МЕ/мл).

Таким образом, многие клетки солидных опухолей демонстрировали чувствительность к изменению содержания субстратов (снижение концентрации аспарагина, глутамина, повышение концентрации аммиака, аспарагиновой и глутаминовой кислот и т.д.), вызванному появлением чужеродных аспарагиназ (табл. 1) в среде культивирования.

#### Чувствительность к L-аспарагиназе ксенографтов солидных опухолей человека у иммунодефицитных мышей

Небольшое количество опубликованных работ посвящено исследованиям чувствительности к аспарагиназе ксенографтов солидных опухолей человека у иммунодефицитных мышей.

**Таблица 1.** Значения IC50 L-аспарагиназ, полученных из различных источников, исследуемых на ряде клеточных линий

**Table 1.** IC50 values of L-asparaginases obtained from various sources, studied on several cell lines

Источник L-аспарагиназы	IC50, МЕ/мл					
	HepG2	MCF-7	HCT-116	A549	Caco-2	Hela
<i>Escherichia coli</i>	25,07	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1,53	18	н/д	н/д	н/д	н/д
<i>Trichoderma viride</i>	21,2	34,2	н/д	н/д	н/д	н/д
<i>Pyrococcus abyssi</i>	~6,25	н/д	н/д	н/д	~6,25	н/д
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	н/д	н/д	н/д	н/д	68,28	н/д
<i>Fusarium equiseti</i>	6,05	11,13	4,03	н/д	н/д	0,98
<i>Pyrococcus furiosus</i>	н/д	н/д	н/д	1,78	30	н/д
<i>Streptomyces rochei</i>	2,54	н/д	н/д	н/д	н/д	2,16
<i>Sarcina maxima</i>	0,05	н/д	н/д	н/д	н/д	0,05
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,42	0,52	0,61	н/д	н/д	н/д

Примечание: н/д — нет данных.

Note: н/д — no information.

В работе E. Dufour и соавт. [25] наиболее чувствительная к L-аспарагиназе *E. coli* линия аденокарциномы поджелудочной железы (SW1990) была также исследована на мышах BALB/c nude. На 35-й день после трансплантации (28-й день лечения) объём опухоли, подвергшейся лечению L-аспарагиназой, инкапсулированной в эритроциты, был равен 607 мм<sup>3</sup>, в то время как объём опухоли в двух контрольных группах достигал 1076 и 1336 мм<sup>3</sup>.

Аналогично, в работе E.H. Panosyan и соавт. [26] была выбрана для исследования *in vivo* (мышь SCID) наиболее чувствительная к аспарагиназе линия медуллобластомы DAOY, однако эффективность терапии L-аспарагиназой не показала достоверных отличий в сравнении с контрольной группой. Тем не менее, темозоломид в комбинации с L-аспарагиназой дал более выраженный эффект по сравнению с монотерапией темозоломидом.

В исследовании G. Karpel-Massler и соавт. [27] была выбрана линия глиобластомы MGPP-3, чувствительность к L-аспарагиназе *in vitro* для которой составляла 1,55 МЕ/мл. Регресс ксенографтов, полученных из клеток MGPP-3, достигался только в комбинации L-аспарагиназы с ABT263\* (навитоклак\*), при этом размер опухоли уменьшился на 45,24%. Монотерапия L-аспарагиназой или ABT263\* не приводила к регрессу опухоли, хотя и незначительно снижала её рост по сравнению с контролем.

В исследовании Q. Chen и соавт. [45] L-аспарагиназа, выделенная из *Erwinia chrysanthemi*, совместно с ингибитором аутофагии хлорохином замедляла рост ксенотрансплантатов глиобластомы U87MG у мышей BALB/c nude, в отличие от терапии без хлорохина.

Исследование K. Okuda и соавт. [28] на ксенографтах линии ГЦК Huh6 (мышь BALB/c nude) показало аналогичную картину: комбинированная терапия L-аспарагиназой с ленватинибом значительно уменьшала объём опухоли по сравнению с контролем, хотя и монотерапия указанными препаратами приводила к такому эффекту, но в меньшей степени.

На ксенографтах линии MHCCLM3 (ГЦК) было показано, что различные ксенотрансплантаты обладают разной чувствительностью к L-аспарагиназе [29]. Исследование M. Chiu и соавт. [46] показало, что рост ксенографтов ГЦК (линия HepG2) полностью подавляется при совместном применении L-аспарагиназы (крисантаспаза) и ингибитора глутаминсинтетазы, но и по отдельности эти препараты оказывали выраженное действие на опухоль (уменьшение размеров опухолей на 51% и 60% при терапии крисантаспазой и глутаминсинтетазой соответственно). Ксенографт линии HC-AFW1 оказался чувствителен только к комбинированному лечению.

С использованием ксенографтов колоректального рака (HC17T) в работе G. Nishikawa и соавт. [47] на мышах KSN/slc nude было показано, что различные

ксенографты этой линии показывали разный ответ на терапию L-аспарагиназой. Похожие результаты были получены и для клеточных сфероидов, которых использовали для трансплантации мышам.

В работе K. Toda и соавт. [48] на ксенографте колоректального рака было продемонстрировано подавление роста при совместном применении L-аспарагиназы и сиролимуса, ни один из которых в монорежиме не оказывал такого эффекта.

### **Клиническое применение препаратов L-аспарагиназы для лечения солидных опухолей**

Описания использования аспарагиназы для лечения солидных опухолей в клинической практике немногочисленны, однако некоторые работы известны ещё с последней трети XX века. Так, в исследованиях H.Y. Yip и G.N. Hortobagyi и соавт. [49, 50] изучалось применение аспарагиназы для лечения рака молочной железы совместно с метотрексатом и другими противоопухолевыми препаратами. И, хотя наблюдался ответ на терапию у 30% пациентов, имели место побочные эффекты высокой частоты и степени тяжести.

В работе 2001 года было показано, что L-аспарагиназа в максимальной дозе 2000 МЕ/м<sup>2</sup> при внутримышечной инъекции каждые 2 недели значительно снижает уровень аспарагина в крови у пациентов с различными солидными опухолями, при этом наблюдались побочные эффекты I и II степеней тяжести, такие как слабость, тошнота, рвота и потеря веса [51].

Несколько недавних клинических исследований касаются изучения возможности терапии аденокарциномы поджелудочной железы с помощью препарата L-аспарагиназы, инкапсулированной в эритроциты, — эриаспазы\* (ERY-ASP). Первым из них является исследование J.B. Bachet и соавт. [52] (номер в реестре National Clinical Trials в базе ClinicalTrials.gov — NCT01523808, фаза I), в котором отмечалась хорошая переносимость ERY-ASP в диапазоне доз 25–150 МЕ/кг, в связи с чем авторы рекомендовали дальнейшее изучение данного препарата. В фазе IIb этого исследования, проведённого P. Hammel и соавт. [53] (NCT02195180), ERY-ASP применялась совместно с другими препаратами: гемцитабином или mFOLFOX6 (комбинация фторурацила, лейковорина® и оксалиплатина). Наблюдалось увеличение общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования, независимо от уровня экспрессии гена аспарагинсинтетазы (ASNS). Кроме того, тяжесть побочных эффектов, которые по большей части заключались в повышении уровня γ-глутамилтрансферазы, нейтропении и ухудшении самочувствия, была значительно ниже, чем в других исследованиях [49–51]. В фазе III (NCT03665441) ERY-ASP использовалась совместно с гемцитабином и паклитакселом (+альбумин) или с иринотеканом, фторурацилом и лейковорином®. Наблюдалось небольшое увеличение общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования по сравнению с группами без ERY-ASP. Кроме того, была

\* ЛС не зарегистрировано в РФ

увеличена частота объективного ответа опухоли и снижена его продолжительность. Однако применение ERY-ASP не снижало частоту и тяжесть побочных эффектов по сравнению с контрольными группами.

В настоящее время проводится I фаза клинического исследования (NCT05034627) по применению каласпаргазы пэгол-мкнл\* совместно с кобиметинибом для терапии аденокарциномы поджелудочной железы.

### Молекулярно-генетические и биохимические механизмы чувствительности/резистентности опухолевых клеток к L-аспарагиназе

Опухолевые клетки, как известно, обладают специфическим профилем метаболизма: у них значительно снижено аэробное окисление, а энергию клетки получают преимущественно путём анаэробного окисления глюкозы и аминокислот. Как было показано ранее, во многих опухолевых клетках снижен уровень экспрессии *ASNS*. Этот фермент осуществляет синтез аспарагина из аспарагиновой кислоты. Находясь в сыворотке крови, L-аспарагиназа истощает запасы аспарагина. При этом, если нормальные клетки способны синтезировать аспарагин благодаря достаточной экспрессии гена *ASNS*, то опухолевые клетки не могут этого сделать из-за сниженной экспрессии. В результате в них уменьшается количество аспарагина, доступного для синтеза белков. Кроме того, аспарагиназа обладает также глутаминазой активностью, из-за чего снижается количество глутамина, необходимого для синтеза аспарагина из аспартата.

В исследовании G. Karpel-Massler и соавт. [27] было продемонстрировано, что L-аспарагиназа способна активировать как внутренний, так и внешний пути апоптоза. Влияние на внутренний путь заключалось в уменьшении количества антиапоптотических факторов и увеличении проапоптотических, однако с помощью различных механизмов. L-аспарагиназа усиливала апоптотический эффект TRAIL (внешний путь), при этом наблюдалось усиленное расщепление прокаспаз 3 и 8.

Дополнительный механизм цитотоксического действия L-аспарагиназы был показан в исследовании I. Hermanova и соавт. [54]. Аспарагиназа, проникая в клетку, способна ингибировать белок RagB, который является одним из активаторов белка mTOR. Белок mTOR выполняет множество функций, среди которых усиление биосинтеза белков, транспорта глюкозы в клетку и активности гликолиза. Таким образом, ингибируя RagB, L-аспарагиназа снижает активность этих процессов (рис. 1).

Кроме того, в ряде работ было показано, что некоторые мутантные формы L-аспарагиназы из *Rhodospirillum rubrum* (RrA) способны ингибировать клеточную пролиферацию, проникая в клетку путём клатрин-зависимого эндоцитоза и воздействуя на ген теломеразы [55–58]. Выяснилось, что эти формы RrA способны снижать экспрессию

субъединицы теломеразы hTERT, что приводит к укорочению теломер, репликативному старению и апоптозу.

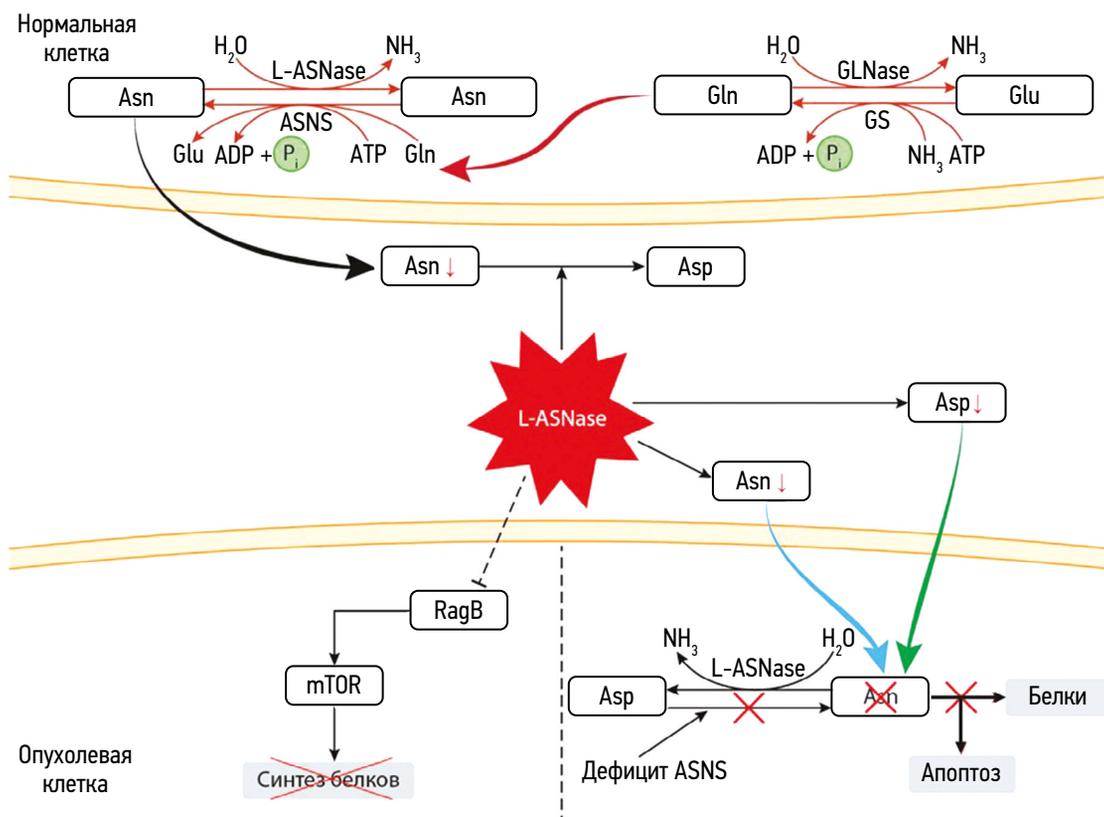
### Резистентность к L-аспарагиназе

Устойчивость опухолевых клеток к действию L-аспарагиназы может быть обусловлена повышенным (по тем или иным причинам) уровнем экспрессии в них гена *ASNS*, что подтверждено многочисленными исследованиями. Кроме того, было показано, что степень метилирования промоторной области гена *ASNS* влияет на интенсивность его транскрипции. *ASNS* является частью сигнального пути GCN2-eIF2-ATF4, активирующегося при дефиците аминокислот [59, 60]. В частности, при недостатке аспарагина в результате активации указанного пути фактор ATF4 связывается с промотором гена *ASNS* и активирует его транскрипцию. Однако, как выяснилось, связывание ATF4 требует гипометилированного состояния промотора *ASNS* [61]. Следовательно, экспрессия гена возможна только в том случае, если активирован фактор ATF4 и промотор гена гипометилирован. Результаты исследования J. Jiang и соавт. [62] согласуются с этими наблюдениями: промотор в гиперметилированном состоянии не способен связывать ATF4. Позже эти выводы были подтверждены в когортном исследовании K. Akahane и соавт. [63], в котором выяснилось, что устойчивость к L-аспарагиназе связана с гипометилированным статусом промоторной области *ASNS*. Кроме того, в работе A. Touzart и соавт. [64] было показано, что чувствительные к L-аспарагиназе клетки имеют низкий уровень экспрессии и гиперметилирование промоторной области *ASNS*.

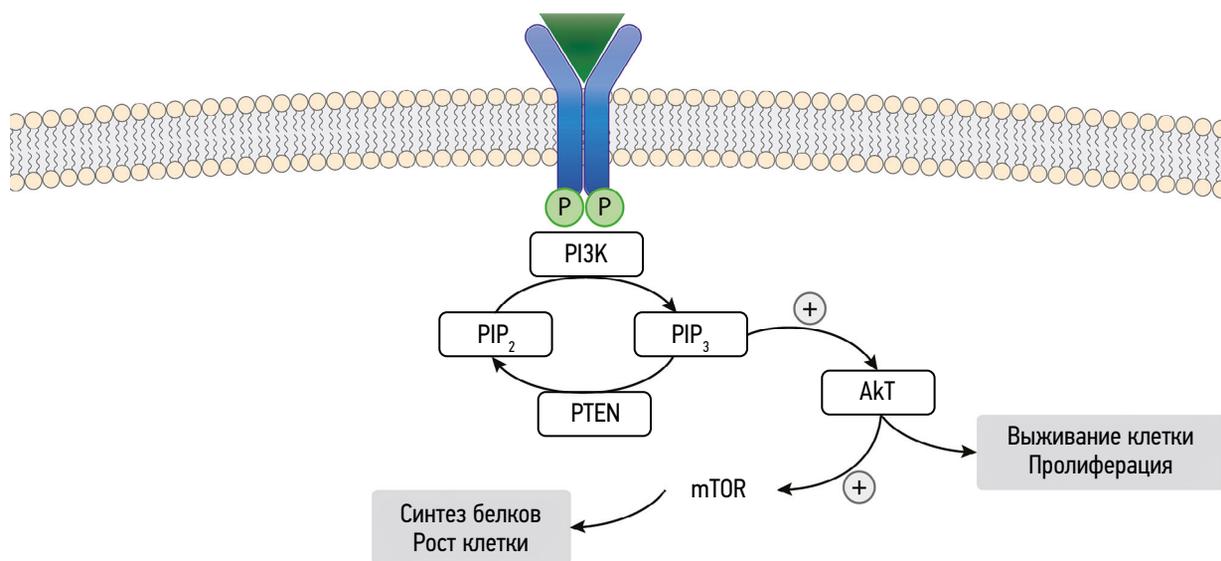
Несколько исследований показали, что устойчивость к L-аспарагиназе также может быть связана с дефицитом белка PTEN [65–67]. PTEN ингибирует активность сигнального пути PI3K-Akt-mTOR, дефосфорилируя PIP<sub>3</sub> до PIP<sub>2</sub> и, таким образом, снижая активность mTOR (рис. 2). В клетках, дефицитных по PTEN, происходит гиперактивация mTOR, что, по-видимому, является антагонистическим процессом по отношению к действию L-аспарагиназы, которая ослабляет активность mTOR через ингибирование RagB, благодаря чему опухолевые клетки приобретают резистентность к действию L-аспарагиназы. Впрочем, устойчивость PTEN-дефицитных клеток к ней может быть снижена с помощью ингибиторов Akt [68].

В ряде работ было выяснено, что недостаток аминокислот активирует аутофагию, которая считается механизмом защиты в опухолевых клетках [69–71]. Кроме того, было показано, что применение L-аспарагиназы вызывает повреждение митохондрий и активацию аутофагии через ингибирование mTOR, при этом происходит утилизация повреждённых митохондрий и снижение выработки активных форм кислорода [54, 72–74]. Вместе с тем ингибирование аутофагии усиливает противоопухолевую активность L-аспарагиназы. Таким образом, активация аутофагии является одним из механизмов резистентности

\* ЛС не зарегистрировано в РФ



**Рис. 1.** Механизмы противоопухолевого действия L-аспарагиназы (L-ASNase).  
**Fig. 1.** Mechanisms of the antitumor action of L-asparaginase (L-ASNase).



**Рис. 2.** Участие PTEN в сигнальном пути PI3K–Akt–mTOR.  
**Fig. 2.** Involvement of PTEN in the PI3K–Akt–mTOR signaling pathway.

опухолевых клеток к данному ферменту, однако механизмы данного явления нуждаются в уточнении.

В результате исследований была прояснена роль костномозгового микроокружения лейкозных клеток в устойчивости к L-аспарагиназе [75–77]. Опухолевые клетки способны взаимодействовать с окружающими их

мезенхимальными стволовыми клетками, при этом последние могут транспортировать лейкозным клеткам аспарагин. Кроме того, в адипоцитах костного мозга в ответ на терапию L-аспарагиназой может увеличиваться экспрессия глутаминсинтетазы. Избыточные количества глутамина могут защищать опухолевые клетки от действия L-аспарагиназы.

Были обнаружены гены, ассоциированные с резистентностью к аспарагиназе. Низкая экспрессия генов опиоидного рецептора  $\mu 1$  (*OPRM1*) [78] и *HAP1* (ген ассоциированного с хантингином белка 1) [79] коррелирует с устойчивостью к L-аспарагиназе.

Кроме того, в работе [80] показано, что при активации пути Wnt происходило увеличение чувствительности опухолевых клеток к действию аспарагиназы. Сенсibilизация была опосредована Wnt-зависимой стабилизацией белков, которая ингибирует их GSK3-зависимое убиквитинирование и протеасомную деградацию, являющуюся катаболическим источником аспарагина (рис. 3). Фармакологическое ингибирование GSK3 сенсibilизировало устойчивые к L-аспарагиназе лейкозы. Таким образом, в резистентных опухолевых клетках происходит блокирование Wnt-пути, в результате чего происходит деградация белков с высвобождением необходимого аспарагина.

### Чувствительность к L-аспарагиназе

Как отмечалось ранее, в работах P.L. Lorenzi и соавт. [23, 24] были исследованы клеточные линии рака яичников. Чувствительность клеток к L-аспарагиназе слабо коррелировала с количеством мРНК гена *ASNS*, однако была обнаружена более сильная взаимосвязь с концентрацией белка аспарагинсинтетазы. Путём РНК-интерференции удалось добиться снижения концентрации аспарагинсинтетазы в опухолевых клетках, что увеличило их чувствительность к L-аспарагиназе в 4–5 раз, а у линии

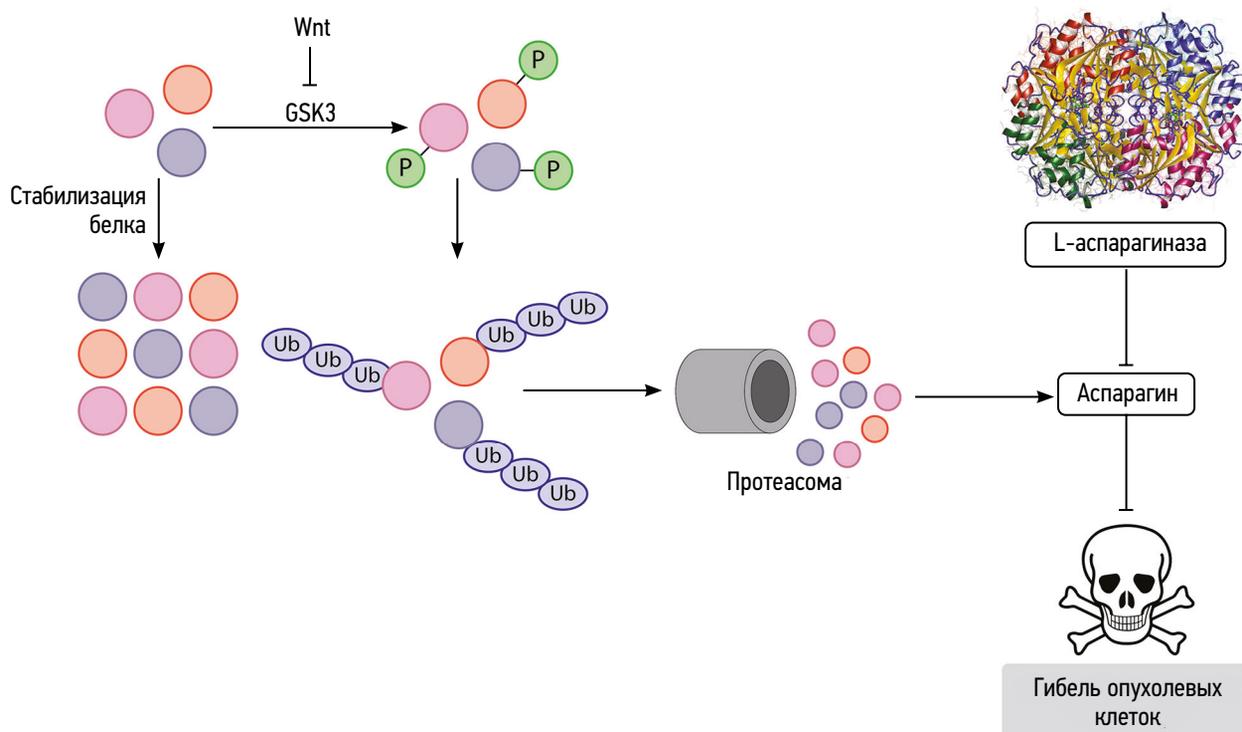
с минимальной экспрессией *ASNS* — более чем в 500 раз, причём такой эффект был и у клеточных линий, приобретших множественную лекарственную устойчивость.

Клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы также показали зависимость эффективности действия L-аспарагиназы от уровня экспрессии *ASNS* [25]. Опухолевые клетки желудка, для которых было характерно гиперметилированное состояние промотора *ASNS* и низкая экспрессия этого гена, показали высокую чувствительность к L-аспарагиназе [81].

На клеточных линиях и ксенографтах опухолей головного мозга было обнаружено, что наиболее чувствительная к L-аспарагиназе линия DAOY имела самый низкий уровень экспрессии *ASNS*, а в менее чувствительных линиях происходило увеличение экспрессии [26].

На моделях ГЦК было выяснено, что L-аспарагиназа ингибирует рост клеток с низким уровнем экспрессии глутаминсинтетазы, но с высоким уровнем аспарагинсинтетазы. Комбинированное применение аспарагиназы и леватиниба ингибирует рост клеток, но оказывается неэффективным для клеток, экспрессирующих ген транспортера глутамин [28].

Интересные результаты были получены в исследовании В. Zhang и соавт. [29] на клетках ГЦК. Было обнаружено, что для этих клеток сохраняется общая тенденция зависимости чувствительности к L-аспарагиназе от уровня экспрессии *ASNS*: чем меньше уровень экспрессии, тем больше чувствительность. Однако выяснилось, что низкая экспрессия *ASNS* также связана со злокачественными



**Рис. 3.** Ингибирование GSK3 (киназы гликогенсинтазы 3) сенсibilизирует лейкозные клетки к действию аспарагиназы.  
**Fig. 3.** Inhibition of GSK3 (glycogen synthase kinase 3) sensitizes leukemic cells to the action of asparaginase.

клинико-патологическими особенностями течения заболевания: высокой пролиферативной и миграционной способностями опухолевых клеток, их склонностью к метастазированию. Эти данные согласуются с наблюдениями тех же авторов о том, что низкий уровень экспрессии *ASNS* связан с плохой общей выживаемостью пациентов. Введение L-аспарагиназы снижало агрессивность тех опухолей, в которых была выявлена низкая экспрессия *ASNS*. Работа С.У. Lin и соавт. [82], хотя в ней и не исследуется ответ на введение L-аспарагиназы, также подтверждает худшую выживаемость и низкую эффективность химиолучевой терапии при низкой экспрессии *ASNS* в клетках рака прямой кишки.

В то же время результаты ряда исследований противоречат выводам о том, что низкая экспрессия *ASNS* связана с большей злокачественностью. Например, К. Fang и соавт. [83] выяснили, что в клетках плоскоклеточного рака пищевода при дефиците глюкозы повышение экспрессии *ASNS* коррелирует с увеличением агрессивности опухолевых клеток: увеличиваются их пролиферация и инвазия. А в исследовании Q. Yu и соавт. [84] было обнаружено, что низкая экспрессия *ASNS* сочетается с низкой пролиферацией клеток рака желудка; тот же результат был получен и для клеток рака молочной железы [85]. Каstrationно-резистентный рак предстательной железы также показал зависимость интенсивности роста от экспрессии *ASNS*: РНК-интерференция снизила пролиферацию опухолевых клеток [86]. Таким же образом, методом РНК-интерференции, Н. Li и соавт. [87] выяснили, что такие агрессивные опухоли, как меланома (линия A375) и эпидермоидная карцинома кожи (линия A431), аналогично показали замедление роста и остановку клеточного цикла: снижались уровни CDK4, CDK6 и циклина D1, а уровень p21 был повышен.

Таким образом, можно сказать, что вопрос о влиянии уровня экспрессии *ASNS* на степень злокачественности опухолевых клеток пока остаётся открытым. По всей видимости, для разных видов опухолей, разных стадий и разных клинических ситуаций можно прогнозировать разнонаправленные зависимости.

Выше упоминалось исследование Н. Li и соавт. [81], в котором изучались опухоли желудка. Помимо моделей *in vitro*, авторы изучили поведение этих опухолей на мышах. Две линии с различным уровнем экспрессии *ASNS* по-разному реагировали на введение L-аспарагиназы: рост ксенографтов опухоли с низкой экспрессией значительно снизился, в отличие от ксенографтов с высоким уровнем экспрессии *ASNS*.

С использованием ксенотрансплантатов колоректального рака в работе G. Nishikawa и соавт. [47] было показано, что ксенографты с нокадаун *ASNS* были чувствительны к L-аспарагиназе, однако контрольные ксенографты с высоким уровнем экспрессии *ASNS* были устойчивы к ней. Похожие результаты были получены и для клеточных сфероидов, которых использовали для трансплантации мышам: низкие дозы аспарагиназы значительно ингибировали рост

клеток с нокадаун *ASNS* и ограниченно ингибировали рост контрольных сфероидов. В работе K. Toda и соавт. [48] на ксенотрансплантате колоректального рака с мутацией в гене *KRAS* было продемонстрировано, что подавление экспрессии *ASNS* повышает чувствительность опухолей к действию L-аспарагиназы.

Недавнее исследование на меланоме A2058 показало, что эта опухоль чувствительна к L-аспарагиназе при нокадауне *ASNS in vitro*, однако *in vivo* этот эффект не был обнаружен, аналогично как не фиксировалось ответа на терапию этой опухоли L-аспарагиназой в клинической практике [88]. Авторы выяснили, что в таком случае запускаются компенсаторные механизмы, помогающие опухолевым клеткам противостоять истощению аспарагина. К таким механизмам относятся активация пути GCN2-eIF2-ATF4 (см. выше) и увеличение содержания MAP2K1 и Bcl-xL, что усиливает пролиферацию и ингибирует апоптоз.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, чувствительность многих солидных опухолей к аспарагиназе подтверждает перспективность её применения для лечения широкого круга злокачественных заболеваний, а определение предиктивных маркёров, помогающих предсказывать чувствительность опухолевых клеток, позволяет отбирать пациентов, у которых применение аспарагиназы может быть наиболее эффективным.

Суммируя изложенные выше экспериментальные данные, можно обобщить ключевые характеристики экспериментальных моделей солидных опухолей, на которых эффективность L-аспарагиназы ожидается более высокой:

- низкий уровень экспрессии аспарагинсинтетазы;
- низкий уровень экспрессии глутаминсинтетазы;
- высокая активность сигнального пути Wnt.

С учётом изученных в экспериментальных и клинических исследованиях типов опухолей, можно предполагать значимую чувствительность к L-аспарагиназе у клеток рака толстой кишки, рака молочной железы и ГЦК. Особенно ценными являются наблюдения, которые могут обосновать использование препаратов L-аспарагиназы при труднокурабельных опухолях, таких как рак поджелудочной железы и меланома. Кроме того, выяснение молекулярных механизмов и маркёров чувствительности различных опухолей к L-аспарагиназе может помочь в выборе тактики лечения после определения предположительной чувствительности опухоли к аспарагиназе.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

№ 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006) «Поиск эффективных и безопасных фармакологических пар на основе низкомолекулярных соединений и ферментов с противоопухолевой активностью» (рег. номер 1022040600928-8-1.6.4;1.6.5;3.1.5;3.1.6 от 2022 г.).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Кисляк И.А. — поиск литературных источников, написание черновика рукописи, редактирование статьи; Покровская М.В. — редактирование статьи; Жантурина Д.Ю. — создание рисунков; Покровский В.С. — разработка структуры статьи и её редактирование.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bender C., Maese L., Carter-Febres M., Verma A. Clinical Utility of Pegaspargase in Children, Adolescents and Young Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Review // *Blood and Lymphatic Cancer*. 2021. Vol. 11. P. 25–40. doi: 10.2147/BLCTT.S245210
2. Juluri K.R., Siu C., Cassaday R.D. Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Current Evidence and Place in Therapy // *Blood and Lymphatic Cancer*. 2022. Vol. 12. P. 55–79. doi: 10.2147/BLCTT.S342052
3. Maese L., Rau R.E. Current Use of Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma // *Front Pediatr*. 2022. Vol. 10. P. 902117. doi: 10.3389/fped.2022.902117
4. Tosta Perez M., Herrera Belen L., Letelier P., et al. L-Asparaginase as the gold standard in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review // *Medical Oncology*. 2023. Vol. 40, N 5. doi: 10.1007/s12032-023-02014-9
5. Tse E., Zhao W.L., Xiong J., Kwong Y.L. How we treat NK/T-cell lymphomas // *Journal of Hematology & Oncology*. 2022. Vol. 15, N 1. P. 74. doi: 10.1186/s13045-022-01293-5
6. Wang N., Ji W., Wang L., et al. Overview of the structure, side effects, and activity assays of l-asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia // *RSC Medicinal Chemistry*. 2022. Vol. 13, N 2. P. 117–128. doi: 10.1039/d1md00344e
7. Pokrovsky V.S., Vinnikov D. L-Asparaginase for newly diagnosed extra-nodal NK/T-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis // *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2017. Vol. 17, N 8. P. 759–768. doi: 10.1080/14737140.2017.1344100
8. Pokrovsky V.S., Vinnikov D. Defining the toxicity of current regimens for extranodal NK/T cell lymphoma: a systematic review and meta-proportion // *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2019. Vol. 19, N 1. P. 93–104. doi: 10.1080/14737140.2019.1549992
9. Думина М.В., Эльдаров М.А., Жданов Д.Д., Соколов Н.Н. L-аспарагиназы экстремофильных микроорганизмов в биомедицине // *Биомедицинская химия*. 2020. Т. 66, № 2. С. 105–123. doi: 10.18097/PBMC2020602105
10. Ghasemian A., Al-Marzoqi A.H., Al-Abodi H.R., et al. Bacterial l-asparaginases for cancer therapy: Current knowledge and future

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** The study was financially supported within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. 075-01551-23-00 (FSSF-2023-0006) «Search for effective and safe pharmacological pairs based on low molecular weight compounds and enzymes with antitumor activity» (reg. number 1022040600928-8-1.6.4;1.6.5;3.1.5;3.1.6 dated 2022).

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. Kislyak IA — search for literary sources, writing the manuscript, editing the article; Pokrovskaya MV — editing the article; Zhanturina DYU — creating drawings; Pokrovsky VS — development of the structure of the article and its editing.

perspectives // *Journal of Cellular Physiology*. 2019. Vol. 234, N 11. P. 19271–19279. doi: 10.1002/jcp.28563

11. Krishnapura P.R., Belur P.D., Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases // *Critical Reviews in Microbiology*. 2016. Vol. 42, N 5. P. 720–737. doi: 10.3109/1040841X.2015.1022505

12. Loch J.I., Jaskolski M. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity // *IUCrJ*. 2021. Vol. 8(Pt 4). P. 514–531. doi: 10.1107/S2052252521006011

13. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Покровская М.В., и др. Бактериальные рекомбинантные L-аспарагиназы: свойства, строение и антипролиферативная активность // *Биомедицинская химия*. 2015. Т. 61, № 3. С. 312–324. doi: 10.18097/PBMC20156103312

14. 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 // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, N 1. P. 15797. doi: 10.1038/s41598-022-19689-1

15. Sidoruk K.V., Pokrovsky V.S., Borisova A.A., et al. Creation of a producer, optimization of expression, and purification of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011. Vol. 152, N 2. P. 219–223. doi: 10.1007/s10517-011-1493-7

16. de Souza Guimaraes M., Cachumba J.J.M., Bueno C.Z., et al. Peg-Grafted Liposomes for L-Asparaginase Encapsulation // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, N 9. doi: 10.3390/pharmaceutics14091819

17. Menegueti G.P., Santos J., Obreque K.M.T., et al. Novel site-specific PEGylated L-asparaginase // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, N 2. P. e0211951. doi: 10.1371/journal.pone.0211951

18. Riley D.O., Schlefman J.M., Vitzthum Von Eckstaedt V.H., et al. Pegaspargase in Practice: Minimizing Toxicity, Maximizing Benefit // *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2021. Vol. 16, N 3. P. 314–324. doi: 10.1007/s11899-021-00638-0

19. Villanueva-Flores F., Zarate-Romero A., Torres A.G., Huerta-Saquer A. Encapsulation of Asparaginase as a Promising Strategy to Improve In Vivo Drug Performance // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, N 11. doi: 10.3390/pharmaceutics13111965

20. Wang Y., Xu W., Wu H., et al. Microbial production, molecular modification, and practical application of L-Asparaginase: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 186. P. 975–983. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.107
21. Gregoriadis G., Fernandes A., Mital M., McCormack B. Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000. Vol. 57, N 13–14. P. 1964–1969. doi: 10.1007/PL00000676
22. Monajati M., Tamaddon A.M., Abolmaali S.S., et al. L-asparaginase immobilization in supramolecular nanogels of PEG-grafted poly HPMA and bis(alpha-cyclodextrin) to enhance pharmacokinetics and lower enzyme antigenicity // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023. Vol. 225. P. 113234. doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113234
23. Lorenzi P.L., Reinhold W.C., Rudelius M., et al. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. Vol. 5, N 11. P. 2613–2623. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0447
24. Lorenzi P.L., Llamas J., Gunsior M., et al. Asparagine synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008. Vol. 7, N 10. P. 3123–3128. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0589
25. Dufour E., Gay F., Aguera K., et al. Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation // *Pancreas*. 2012. Vol. 41, N 6. P. 940–948. doi: 10.1097/MPA.0b013e318247d903
26. Panosyan E.H., Wang Y., Xia P., et al. Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors // *Molecular Cancer Research*. 2014. Vol. 12, N 5. P. 694–702. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0576
27. Karpel-Massler G., Ramani D., Shu C., et al. Metabolic reprogramming of glioblastoma cells by L-asparaginase sensitizes for apoptosis in vitro and in vivo // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, N 23. P. 33512–33528. doi: 10.18632/oncotarget.9257
28. Okuda K., Umemura A., Kataoka S., et al. Enhanced Antitumor Effect in Liver Cancer by Amino Acid Depletion-Induced Oxidative Stress // *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11. P. 758549. doi: 10.3389/fonc.2021.758549
29. Zhang B., Dong L.W., Tan Y.X., et al. Asparagine synthetase is an independent predictor of surgical survival and a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma // *British Journal of Cancer*. 2013. Vol. 109, N 1. P. 14–23. doi: 10.1038/bjc.2013.293
30. Alexander P., Fairley G.H., Hunter-Craig I.D., et al. Inhibition by L-asparaginase from *E. coli* of human malignant melanoma cells growing in vitro // *Recent Results in Cancer Research*. 1970. Vol. 33. P. 151–154. doi: 10.1007/978-3-642-99984-0\_17
31. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., и др. Противоопухолевая активность L-аспарагиназы из *Yersinia pseudotuberculosis* // *Биомедицинская химия*. 2008. Т. 54, № 6. С. 712–719.
32. Wu M.C., Arimura G.K., Yunis A.A. Mechanism of sensitivity of cultured pancreatic carcinoma to asparaginase // *International Journal of Cancer*. 1978. Vol. 22, N 6. P. 728–733. doi: 10.1002/ijc.2910220615
33. Darwesh D.B., Al-Awthani Y.S., Elfaki I., et al. Anticancer Activity of Extremely Effective Recombinant L-Asparaginase from *Burkholderia pseudomallei* // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 32, N 5. P. 551–563. doi: 10.4014/jmb.2112.12050
34. Saeed H., Hemida A., Abdel-Fattah M., et al. *Pseudomonas aeruginosa* recombinant L-asparaginase: Large scale production, purification, and cytotoxicity on THP-1, MDA-MB-231, A549, Caco2 and HCT-116 cell lines // *Protein Expression and Purification*. 2021. Vol. 181. P. 105820. doi: 10.1016/j.pep.2021.105820
35. Cappelletti D., Chiarelli L.R., Paschetto M.V., et al. *Helicobacter pylori*-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 377, N 4. P. 1222–1226. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.118
36. El-Naggar N.E., El-Shweihy N.M. Bioprocess development for L-asparaginase production by *Streptomyces rochei*, purification and in-vitro efficacy against various human carcinoma cell lines // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, N 1. P. 7942. doi: 10.1038/s41598-020-64052-x
37. Abd El-Baky H.H., El-Baroty G.S. *Spirulina maxima* L-asparaginase: Immobilization, Antiviral and Antiproliferation Activities // *Recent Patents on Biotechnology*. 2020. Vol. 14, N 2. P. 154–163. doi: 10.2174/1872208313666191114151344
38. Alrumman S.A., Mostafa Y.S., Al-Izran K.A., et al. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, N 1. P. 3756. doi: 10.1038/s41598-019-40512-x
39. Nadeem M.S., Khan J.A., Al-Ghamdi M.A., et al. Studies on the recombinant production and anticancer activity of thermostable L-asparaginase I from *Pyrococcus abyssi* // *Brazilian Journal of Biology*. 2021. Vol. 82. P. e244735. doi: 10.1590/1519-6984.244735
40. Saeed H., Hemida A., El-Nikhely N., et al. Highly efficient *Pyrococcus furiosus* recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity: Expression, purification, functional characterization, and cytotoxicity on THP-1, A549 and Caco-2 cell lines // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 156. P. 812–828. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.080
41. El-Ghonemy D.H., Ali S.A., Abdel-Megeed R.M., Elshafei A.M. Therapeutic impact of purified *Trichoderma viride* L-asparaginase in murine model of liver cancer and in vitro Hep-G2 cell line // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 21, N 1. P. 38. doi: 10.1186/s43141-023-00493-x
42. Yap L.S., Lee W.L., Ting A.S.Y. Bioprocessing and purification of extracellular L-asparaginase produced by endophytic *Colleto-trichum gloeosporioides* and its anticancer activity // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2022. Vol. 53, N 6. P. 653–671. doi: 10.1080/10826068.2022.2122064
43. Othman S.I., Mekawey A.A.I., El-Metwally M.M., et al. *Rhizopus oryzae* AM16; a new hyperactive L-asparaginase producer: Semi solid-state production and anticancer activity of the partially purified protein // *Biomed Rep*. 2022. Vol. 16, N 3. P. 15. doi: 10.3892/br.2022.1498
44. El-Gendy M., Awad M.F., El-Shenawy F.S., El-Bondkly A.M.A. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4 // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021. Vol. 28, N 4. P. 2540–2548. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.01.058
45. Chen Q., Ye L., Fan J., et al. Autophagy suppression potentiates the anti-glioblastoma effect of asparaginase in vitro and in vivo // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, N 53. P. 91052–91066. doi: 10.18632/oncotarget.19409
46. Chiu M., Tardito S., Pillozzi S., et al. Glutamine depletion by crisantaspase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts // *British Journal of Cancer*. 2014. Vol. 111, N 6. P. 1159–1167. doi: 10.1038/bjc.2014.425

47. Nishikawa G., Kawada K., Hanada K., et al. Targeting Asparagine Synthetase in Tumorigenicity Using Patient-Derived Tumor-Initiating Cells // *Cells*. 2022. Vol. 11, N 20. doi: 10.3390/cells11203273
48. Toda K., Kawada K., Iwamoto M., et al. Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase // *Neoplasia*. 2016. Vol. 18, N 11. P. 654–665. doi: 10.1016/j.neo.2016.09.004
49. Yap H.Y., Benjamin R.S., Blumenschein G.R., et al. Phase II study with sequential L-asparaginase and methotrexate in advanced refractory breast cancer // *Cancer Treat Rep*. 1979. Vol. 63, N 1. P. 77–83.
50. Hortobagyi G.N., Yap H.Y., Wiseman C.L., et al. Chemoimmunotherapy for metastatic breast cancer with 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide, methotrexate, L-asparaginase, *Corynebacterium parvum*, and *Pseudomonas vaccine* // *Cancer Treat Rep*. 1980. Vol. 64, N 1. P. 157–159.
51. Taylor C.W., Dorr R.T., Fanta P., et al. A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors // *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001. Vol. 47, N 1. P. 83–88. doi: 10.1007/s002800000207
52. Bachet J.B., Gay F., Marechal R., et al. Asparagine Synthetase Expression and Phase I Study With L-Asparaginase Encapsulated in Red Blood Cells in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma // *Pancreas*. 2015. Vol. 44, N 7. P. 1141–1147. doi: 10.1097/MPA.0000000000000394
53. Hammel P., Fabienne P., Mineur L., et al. Erythrocyte-encapsulated asparaginase (eryaspase) combined with chemotherapy in second-line treatment of advanced pancreatic cancer: An open-label, randomized Phase IIb trial // *European Journal of Cancer*. 2020. Vol. 124. P. 91–101. doi: 10.1016/j.ejca.2019.10.020
54. Hermanova I., Arruabarrena-Aristorena A., Valis K., et al. Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells // *Leukemia*. 2016. Vol. 30, N 1. P. 209–218. doi: 10.1038/leu.2015.213
55. Покровская М.В., Жданов Д.Д., Эльдаров М.А., и др. Подавление активности теломеразы лейкозных клеток мутантными формами L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* // *Биомедицинская химия*. 2017. Т. 63, № 1. С. 62–74. doi: 10.18097/PBMC20176301062
56. Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., et al. *Rhodospirillum rubrum*-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Vol. 492, N 2. P. 282–288. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.078
57. Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., et al. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4+ T lymphocytes // *Cancer Med*. 2017. Vol. 6, N 11. P. 2697–2712. doi: 10.1002/cam4.1218
58. Plyasova A.A., Pokrovskaya M.V., Lisitsyna O.M., et al. Penetration into Cancer Cells via Clathrin-Dependent Mechanism Allows L-Asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to Inhibit Telomerase // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020. Vol. 13, N 10. doi: 10.3390/ph13100286
59. Balasubramanian M.N., Butterworth E.A., Kilberg M.S. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013. Vol. 304, N 8. P. E789–799. doi: 10.1152/ajpendo.00015.2013
60. Kilberg M.S., Balasubramanian M., Fu L., Shan J. The transcription factor network associated with the amino acid response in mammalian cells // *Adv Nutr*. 2012. Vol. 3, N 3. P. 295–306. doi: 10.3945/an.112.001891
61. Ren Y., Roy S., Ding Y., et al. Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein // *Oncogene*. 2004. Vol. 23, N 22. P. 3953–3961. doi: 10.1038/sj.onc.1207498
62. Jiang J., Srivastava S., Seim G., et al. Promoter demethylation of the asparagine synthetase gene is required for ATF4-dependent adaptation to asparagine depletion // *J Biol Chem*. 2019. Vol. 294, N 49. P. 18674–18684. doi: 10.1074/jbc.RA119.010447
63. Akahane K., Kimura S., Miyake K., et al. Association of allele-specific methylation of the ASNS gene with asparaginase sensitivity and prognosis in T-ALL // *Blood Adv*. 2022. Vol. 6, N 1. P. 212–224. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004271
64. Touzart A., Lengline E., Latiri M., et al. Epigenetic Silencing Affects L-Asparaginase Sensitivity and Predicts Outcome in T-ALL // *Clin Cancer Res*. 2019. Vol. 25, N 8. P. 2483–2493. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1844
65. Fruman D.A., Chiu H., Hopkins B.D., et al. The PI3K Pathway in Human Disease // *Cell*. 2017. Vol. 170, N 4. P. 605–635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029
66. Hlozkova K., Pecinova A., Alquezar-Artieda N., et al. Metabolic profile of leukemia cells influences treatment efficacy of L-asparaginase // *BMC Cancer*. 2020. Vol. 20, N 1. P. 526. doi: 10.1186/s12885-020-07020-y
67. Martelli A.M., Paganelli F., Fazio A., et al. The Key Roles of PTEN in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Development, Progression, and Therapeutic Response // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, N 5. doi: 10.3390/cancers11050629
68. Hlozkova K., Hermanova I., Safrhansova L., et al. PTEN/PI3K/Akt pathway alters sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia to L-asparaginase // *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, N 1. P. 4043. doi: 10.1038/s41598-022-08049-8
69. Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis // *Cancer Cell*. 2006. Vol. 10, N 1. P. 51–64. doi: 10.1016/j.ccr.2006.06.001
70. Garcia Ruiz O., Sanchez-Maldonado J.M., Lopez-Nevot M.A., et al. Autophagy in Hematological Malignancies // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14, N 20. doi: 10.3390/cancers14205072
71. Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. Vol. 8, N 9. P. 741–752. doi: 10.1038/nrm2239
72. Ajoalabady A., Aghanejad A., Bi Y., et al. Enzyme-based autophagy in anti-neoplastic management: From molecular mechanisms to clinical therapeutics // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020. Vol. 1874, N 1. P. 188366. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188366
73. Polak R., Bierings M.B., van der Leije C.S., et al. Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia // *Haematologica*. 2019. Vol. 104, N 4. P. 738–748. doi: 10.3324/haematol.2018.193631
74. Takahashi H., Inoue J., Sakaguchi K., et al. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells // *Oncogene*. 2017. Vol. 36, N 30. P. 4267–4276. doi: 10.1038/onc.2017.59
75. Chiu M., Franchi-Gazzola R., Bussolati O., et al. Asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy // *Pediatr Blood Cancer*. 2013. Vol. 60, N 11. P. 1915. doi: 10.1002/pbc.24663

**76.** Iwamoto S., Mihara K., Downing J.R., et al. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase // *J Clin Invest.* 2007. Vol. 117, N 4. P. 1049–1057. doi: 10.1172/JCI30235

**77.** Steiner M., Hochreiter D., Kasper D.C., et al. Asparagine and aspartic acid concentrations in bone marrow versus peripheral blood during Berlin-Frankfurt-Munster-based induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leuk Lymphoma.* 2012. Vol. 53, N 9. P. 1682–1687. doi: 10.3109/10428194.2012.668681

**78.** Kang S.M., Rosales J.L., Meier-Stephenson V., et al. Genome-wide loss-of-function genetic screening identifies opioid receptor mu1 as a key regulator of L-asparaginase resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia // *Oncogene.* 2017. Vol. 36, N 42. P. 5910–5913. doi: 10.1038/ncr.2017.211

**79.** Lee J.K., Kang S., Wang X., et al. HAP1 loss confers L-asparaginase resistance in ALL by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway // *Blood.* 2019. Vol. 133, N 20. P. 2222–2232. doi: 10.1182/blood-2018-12-890236

**80.** Hinze L., Pfirrmann M., Karim S., et al. Synthetic Lethality of Wnt Pathway Activation and Asparaginase in Drug-Resistant Acute Leukemias // *Cancer Cell.* 2019. Vol. 35, N 4. P. 664–676 e7. doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.004

**81.** Li H., Ning S., Ghandi M., et al. The landscape of cancer cell line metabolism // *Nat Med.* 2019. Vol. 25, N 5. P. 850–860. doi: 10.1038/s41591-019-0404-8

**82.** Lin C.Y., Sheu M.J., Li C.F., et al. Deficiency in asparagine synthetase expression in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy:

negative prognostic impact and therapeutic relevance // *Tumour Biol.* 2014. Vol. 35, N 7. P. 6823–6830. doi: 10.1007/s13277-014-1895-z

**83.** Fang K., Chu Y., Zhao Z., et al. Enhanced expression of asparagine synthetase under glucose-deprived conditions promotes esophageal squamous cell carcinoma development // *Int J Med Sci.* 2020. Vol. 17, N 4. P. 510–516. doi: 10.7150/ijms.39557

**84.** Yu Q., Wang X., Wang L., et al. Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells // *Scand J Gastroenterol.* 2016. Vol. 51, N 10. P. 1220–1226. doi: 10.1080/00365521.2016.1190399

**85.** Yang H., He X., Zheng Y., et al. Down-regulation of asparagine synthetase induces cell cycle arrest and inhibits cell proliferation of breast cancer // *Chem Biol Drug Des.* 2014. Vol. 84, N 5. P. 578–584. doi: 10.1111/cbdd.12348

**86.** Sircar K., Huang H., Hu L., et al. Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer // *Am J Pathol.* 2012. Vol. 180, N 3. P. 895–903. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.030

**87.** Li H., Zhou F., Du W., et al. Knockdown of asparagine synthetase by RNAi suppresses cell growth in human melanoma cells and epidermoid carcinoma cells // *Biotechnol Appl Biochem.* 2016. Vol. 63, N 3. P. 328–333. doi: 10.1002/bab.1383

**88.** Apfel V., Begue D., Cordo V., et al. Therapeutic Assessment of Targeting ASNS Combined with L-Asparaginase Treatment in Solid Tumors and Investigation of Resistance Mechanisms // *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2021. Vol. 4, N 1. P. 327–337. doi: 10.1021/acspstsci.0c00196

## REFERENCES

**1.** Bender C, Maese L, Carter-Febres M, Verma A. Clinical Utility of Pegaspargase in Children, Adolescents and Young Adult Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Review. *Blood and Lymphatic Cancer.* 2021;11:25–40. doi: 10.2147/BLCTT.S245210

**2.** Juluri KR, Siu C, Cassaday RD. Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Current Evidence and Place in Therapy. *Blood and Lymphatic Cancer.* 2022;12:55–79. doi: 10.2147/BLCTT.S342052

**3.** Maese L, Rau RE. Current Use of Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma. *Front Pediatr.* 2022;10:902117. doi: 10.3389/fped.2022.902117

**4.** Tosta Perez M, Herrera Belen L, Letelier P, et al. L-Asparaginase as the gold standard in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review. *Medical Oncology.* 2023;40(5). doi: 10.1007/s12032-023-02014-9

**5.** Tse E, Zhao WL, Xiong J, Kwong YL. How we treat NK/T-cell lymphomas. *Journal of Hematology & Oncology.* 2022;15(1):74. doi: 10.1186/s13045-022-01293-5

**6.** Wang N, Ji W, Wang L, et al. Overview of the structure, side effects, and activity assays of l-asparaginase as a therapy drug of acute lymphoblastic leukemia. *RSC Medicinal Chemistry.* 2022;13(2):117–128. doi: 10.1039/d1md00344e

**7.** Pokrovsky VS, Vinnikov D. L-Asparaginase for newly diagnosed extra-nodal NK/T-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2017;17(8):759–768. doi: 10.1080/14737140.2017.1344100

**8.** Pokrovsky VS, Vinnikov D. Defining the toxicity of current regimens for extranodal NK/T cell lymphoma: a systematic review and

metaproportion. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2019;19(1):93–104. doi: 10.1080/14737140.2019.1549992

**9.** Dumina MV, Eldarov MA, Zdanov DD, Sokolov NN. L-asparaginases of extremophilic microorganisms in biomedicine. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2020;66(2):105–123. (In Russ). doi: 10.18097/PBMC20206602105

**10.** Ghasemian A, Al-Marzoqi AH, Al-Abodi HR, et al. Bacterial l-asparaginases for cancer therapy: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234(11):19271–19279. doi: 10.1002/jcp.28563

**11.** Krishnapura PR, Belur PD, Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Critical Reviews in Microbiology.* 2016;42(5):720–737. doi: 10.3109/1040841X.2015.1022505

**12.** Loch JI, Jaskolski M. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity. *IUCrJ.* 2021;8(Pt 4):514–531. doi: 10.1107/S2052252521006011

**13.** Sokolov NN, Eldarov MA, Pokrovskaya MV, et al. Bacterial recombinant L-asparaginases: properties, structure and anti-proliferative activity. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2015;61(3):312–324. (In Russ). doi: 10.18097/PBMC20156103312

**14.** Zielezinski A, Loch JI, Karlowski WM, Jaskolski M. Massive annotation of bacterial L-asparaginases reveals their puzzling distribution and frequent gene transfer events. *Scientific Reports.* 2022;12(1):15797. doi: 10.1038/s41598-022-19689-1

**15.** Sidoruk KV, Pokrovsky VS, Borisova AA, et al. Creation of a producent, optimization of expression, and purification of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase.

- Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;152(2):219–223. doi: 10.1007/s10517-011-1493-7
- 16.** de Souza Guimaraes M, Cachumba JJM, Bueno CZ, et al. Peg-Grafted Liposomes for L-Asparaginase Encapsulation. *Pharmaceutics*. 2022;14(9). doi: 10.3390/pharmaceutics14091819
- 17.** Meneguetti GP, Santos J, Obreque KMT, et al. Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211951. doi: 10.1371/journal.pone.0211951
- 18.** Riley DO, Schlefman JM, Vitzthum Von Eckstaedt VH, et al. Pegaspargase in Practice: Minimizing Toxicity, Maximizing Benefit. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2021;16(3):314–324. doi: 10.1007/s11899-021-00638-0
- 19.** Villanueva-Flores F, Zarate-Romero A, Torres AG, Huerta-Saquerro A. Encapsulation of Asparaginase as a Promising Strategy to Improve In Vivo Drug Performance. *Pharmaceutics*. 2021;13(11). doi: 10.3390/pharmaceutics13111965
- 20.** Wang Y, Xu W, Wu H, et al. Microbial production, molecular modification, and practical application of L-Asparaginase: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;186:975–983. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.107
- 21.** Gregoriadis G, Fernandes A, Mital M, McCormack B. Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000;57(13-14):1964–1969. doi: 10.1007/PL00000676
- 22.** Monajati M, Tamaddon AM, Abolmaali SS, et al. L-asparaginase immobilization in supramolecular nanogels of PEG-grafted poly HPMA and bis(alpha-cyclodextrin) to enhance pharmacokinetics and lower enzyme antigenicity. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2023;225:113234. doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113234
- 23.** Lorenzi PL, Reinhold WC, Rudelius M, et al. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(11):2613–2623. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0447
- 24.** Lorenzi PL, Llamas J, Gunsior M, et al. Asparagine synthetase is a predictive biomarker of L-asparaginase activity in ovarian cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008;7(10):3123–3128. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0589
- 25.** Dufour E, Gay F, Aguera K, et al. Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. *Pancreas*. 2012;41(6):940–948. doi: 10.1097/MPA.0b013e318247d903
- 26.** Panosyan EH, Wang Y, Xia P, et al. Asparagine depletion potentiates the cytotoxic effect of chemotherapy against brain tumors. *Molecular Cancer Research*. 2014;12(5):694–702. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0576
- 27.** Karpel-Massler G, Ramani D, Shu C, et al. Metabolic reprogramming of glioblastoma cells by L-asparaginase sensitizes for apoptosis in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(23):33512–33528. doi: 10.18632/oncotarget.9257
- 28.** Okuda K, Umemura A, Kataoka S, et al. Enhanced Antitumor Effect in Liver Cancer by Amino Acid Depletion-Induced Oxidative Stress. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:758549. doi: 10.3389/fonc.2021.758549
- 29.** Zhang B, Dong LW, Tan YX, et al. Asparagine synthetase is an independent predictor of surgical survival and a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2013;109(1):14–23. doi: 10.1038/bjc.2013.293
- 30.** Alexander P, Fairley GH, Hunter-Craig ID, et al. Inhibition by L-asparaginase from *E. coli* of human malignant melanoma cells growing in vitro. *Recent Results in Cancer Research*. 1970;33:151–154. doi: 10.1007/978-3-642-99984-0\_17
- 31.** Abakumova OYu, Podobed OV, Borisova AA, et al. Antitumor activity of L-asparaginase from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2008;54(6):712–719. (In Russ).
- 32.** Wu MC, Arimura GK, Yunis AA. Mechanism of sensitivity of cultured pancreatic carcinoma to asparaginase. *International Journal of Cancer*. 1978;22(6):728–733. doi: 10.1002/ijc.2910220615
- 33.** Darwesh DB, Al-Awthan YS, Elfaki I, et al. Anticancer Activity of Extremely Effective Recombinant L-Asparaginase from *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022;32(5):551–563. doi: 10.4014/jmb.2112.12050
- 34.** Saeed H, Hemida A, Abdel-Fattah M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* recombinant L-asparaginase: Large scale production, purification, and cytotoxicity on THP-1, MDA-MB-231, A549, Caco2 and HCT-116 cell lines. *Protein Expression and Purification*. 2021;181:105820. doi: 10.1016/j.pep.2021.105820
- 35.** Cappelletti D, Chiarelli LR, Paschetto MV, et al. *Helicobacter pylori*-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;377(4):1222–1226. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.10.118
- 36.** El-Naggar NE, El-Shweihy NM. Bioprocess development for L-asparaginase production by *Streptomyces rochei*, purification and in-vitro efficacy against various human carcinoma cell lines. *Scientific Reports*. 2020;10(1):7942. doi: 10.1038/s41598-020-64052-x
- 37.** Abd El-Baky HH, El-Baroty GS. *Spirulina maxima* L-asparaginase: Immobilization, Antiviral and Antiproliferation Activities. *Recent Patents on Biotechnology*. 2020;14(2):154–163. doi: 10.2174/1872208313666191114151344
- 38.** Alrumman SA, Mostafa YS, Al-Izran KA, et al. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3756. doi: 10.1038/s41598-019-40512-x
- 39.** Nadeem MS, Khan JA, Al-Ghamdi MA, et al. Studies on the recombinant production and anticancer activity of thermostable L-asparaginase I from *Pyrococcus abyssi*. *Brazilian Journal of Biology*. 2021;82:e244735. doi: 10.1590/1519-6984.244735
- 40.** Saeed H, Hemida A, El-Nikhely N, et al. Highly efficient *Pyrococcus furiosus* recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity: Expression, purification, functional characterization, and cytotoxicity on THP-1, A549 and Caco-2 cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;156:812–828. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.080
- 41.** El-Ghonemy DH, Ali SA, Abdel-Megeed RM, Elshafei AM. Therapeutic impact of purified *Trichoderma viride* L-asparaginase in murine model of liver cancer and in vitro Hep-G2 cell line. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2023;21(1):38. doi: 10.1186/s43141-023-00493-x
- 42.** Yap LS, Lee WL, Ting ASY. Bioprocessing and purification of extracellular L-asparaginase produced by endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* and its anticancer activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2022;53(6):653–671. doi: 10.1080/10826068.2022.2122064
- 43.** Othman SI, Mekawey AAI, El-Metwally MM, et al. *Rhizopus oryzae* AM16; a new hyperactive L-asparaginase producer: Semi solid-state production and anticancer activity of the partially purified protein. *Biomed Rep*. 2022;16(3):15. doi: 10.3892/br.2022.1498
- 44.** El-Gendy M, Awad MF, El-Shenawy FS, El-Bondkly AMA. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative

- activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(4):2540–2548. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.01.058
45. Chen Q, Ye L, Fan J, et al. Autophagy suppression potentiates the anti-glioblastoma effect of asparaginase in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(53):91052–91066. doi: 10.18632/oncotarget.19409
46. Chiu M, Tardito S, Pillozzi S, et al. Glutamine depletion by crisantaspase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts. *British Journal of Cancer*. 2014;111(6):1159–1167. doi: 10.1038/bjc.2014.425
47. Nishikawa G, Kawada K, Hanada K, et al. Targeting Asparagine Synthetase in Tumorigenicity Using Patient-Derived Tumor-Initiating Cells. *Cells*. 2022;11(20). doi: 10.3390/cells11203273
48. Toda K, Kawada K, Iwamoto M, et al. Metabolic Alterations Caused by KRAS Mutations in Colorectal Cancer Contribute to Cell Adaptation to Glutamine Depletion by Upregulation of Asparagine Synthetase. *Neoplasia*. 2016;18(11):654–665. doi: 10.1016/j.neo.2016.09.004
49. Yap HY, Benjamin RS, Blumenschein GR, et al. Phase II study with sequential L-asparaginase and methotrexate in advanced refractory breast cancer. *Cancer Treat Rep*. 1979;63(1):77–83.
50. Hortobagyi GN, Yap HY, Wiseman CL, et al. Chemoimmunotherapy for metastatic breast cancer with 5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide, methotrexate, L-asparaginase, *Corynebacterium parvum*, and *Pseudomonas vaccine*. *Cancer Treat Rep*. 1980;64(1):157–159.
51. Taylor CW, Dorr RT, Fanta P, et al. A phase I and pharmacodynamic evaluation of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001;47(1):83–88. doi: 10.1007/s002800000207
52. Bachet JB, Gay F, Marechal R, et al. Asparagine Synthetase Expression and Phase I Study With L-Asparaginase Encapsulated in Red Blood Cells in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2015;44(7):1141–1147. doi: 10.1097/MPA.0000000000000394
53. Hammel P, Fabienne P, Mineur L, et al. Erythrocyte-encapsulated asparaginase (eryaspase) combined with chemotherapy in second-line treatment of advanced pancreatic cancer: An open-label, randomized Phase IIb trial. *European Journal of Cancer*. 2020;124:91–101. doi: 10.1016/j.ejca.2019.10.020
54. Hermanova I, Arruabarrena-Aristorena A, Valis K, et al. Pharmacological inhibition of fatty-acid oxidation synergistically enhances the effect of L-asparaginase in childhood ALL cells. *Leukemia*. 2016;30(1):209–218. doi: 10.1038/leu.2015.213
55. Pokrovskaya MV, Zhdanov DD, Eldarov MA, et al. Suppression of telomerase activity leukemic cells by mutant forms of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2017;63(1):62–74. (In Russ). doi: 10.18097/PBMC20176301062
56. Zhdanov DD, Pokrovsky VS, Pokrovskaya MV, et al. *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;492(2):282–288. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.078
57. Zhdanov DD, Pokrovsky VS, Pokrovskaya MV, et al. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase in cancer Jurkat cell line and normal human CD4+ T lymphocytes. *Cancer Med*. 2017;6(11):2697–2712. doi: 10.1002/cam4.1218
58. Plyasova AA, Pokrovskaya MV, Lisitsyna OM, et al. Penetration into Cancer Cells via Clathrin-Dependent Mechanism Allows L-Asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to Inhibit Telomerase. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(10). doi: 10.3390/ph13100286
59. Balasubramanian MN, Butterworth EA, Kilberg MS. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(8):E789–799. doi: 10.1152/ajpendo.00015.2013
60. Kilberg MS, Balasubramanian M, Fu L, Shan J. The transcription factor network associated with the amino acid response in mammalian cells. *Adv Nutr*. 2012;3(3):295–306. doi: 10.3945/an.112.001891
61. Ren Y, Roy S, Ding Y, et al. Methylation of the asparagine synthetase promoter in human leukemic cell lines is associated with a specific methyl binding protein. *Oncogene*. 2004;23(22):3953–3961. doi: 10.1038/sj.onc.1207498
62. Jiang J, Srivastava S, Seim G, et al. Promoter demethylation of the asparagine synthetase gene is required for ATF4-dependent adaptation to asparagine depletion. *J Biol Chem*. 2019;294(49):18674–18684. doi: 10.1074/jbc.RA119.010447
63. Akahane K, Kimura S, Miyake K, et al. Association of allele-specific methylation of the ASNS gene with asparaginase sensitivity and prognosis in T-ALL. *Blood Adv*. 2022;6(1):212–224. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004271
64. Touzart A, Lengline E, Latiri M, et al. Epigenetic Silencing Affects L-Asparaginase Sensitivity and Predicts Outcome in T-ALL. *Clin Cancer Res*. 2019;25(8):2483–2493. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1844
65. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017;170(4):605–635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029
66. Hlozkova K, Pecinova A, Alquezar-Artieda N, et al. Metabolic profile of leukemia cells influences treatment efficacy of L-asparaginase. *BMC Cancer*. 2020;20(1):526. doi: 10.1186/s12885-020-07020-y
67. Martelli AM, Paganelli F, Fazio A, et al. The Key Roles of PTEN in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Development, Progression, and Therapeutic Response. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5). doi: 10.3390/cancers11050629
68. Hlozkova K, Hermanova I, Safrhansova L, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway alters sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia to L-asparaginase. *Scientific Reports*. 2022;12(1):4043. doi: 10.1038/s41598-022-08049-8
69. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51–64. doi: 10.1016/j.ccr.2006.06.001
70. Garcia Ruiz O, Sanchez-Maldonado JM, Lopez-Nevot MA, et al. Autophagy in Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(20). doi: 10.3390/cancers14205072
71. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):741–752. doi: 10.1038/nrm2239
72. Ajoollabady A, Aghanejad A, Bi Y, et al. Enzyme-based autophagy in anti-neoplastic management: From molecular mechanisms to clinical therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1874(1):188366. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188366
73. Polak R, Bierings MB, van der Leije CS, et al. Autophagy inhibition as a potential future targeted therapy for ETV6-RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2019;104(4):738–748. doi: 10.3324/haematol.2018.193631
74. Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, et al. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*. 2017;36(30):4267–4276. doi: 10.1038/onc.2017.59

- 75.** Chiu M, Franchi-Gazzola R, Bussolati O, et al. Asparagine levels in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia during asparaginase therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(11):1915. doi: 10.1002/psc.24663
- 76.** Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, et al. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1049–1057. doi: 10.1172/JCI30235
- 77.** Steiner M, Hochreiter D, Kasper DC, et al. Asparagine and aspartic acid concentrations in bone marrow versus peripheral blood during Berlin-Frankfurt-Munster-based induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(9):1682–1687. doi: 10.3109/10428194.2012.668681
- 78.** Kang SM, Rosales JL, Meier-Stephenson V, et al. Genome-wide loss-of-function genetic screening identifies opioid receptor mu1 as a key regulator of L-asparaginase resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 2017;36(42):5910–5913. doi: 10.1038/onc.2017.211
- 79.** Lee JK, Kang S, Wang X, et al. HAP1 loss confers L-asparaginase resistance in ALL by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway. *Blood*. 2019;133(20):2222–2232. doi: 10.1182/blood-2018-12-890236
- 80.** Hinze L, Pfirrmann M, Karim S, et al. Synthetic Lethality of Wnt Pathway Activation and Asparaginase in Drug-Resistant Acute Leukemias. *Cancer Cell*. 2019;35(4):664–676 e7. doi: 10.1016/j.ccell.2019.03.004
- 81.** Li H, Ning S, Ghandi M, et al. The landscape of cancer cell line metabolism. *Nat Med*. 2019;25(5):850–860. doi: 10.1038/s41591-019-0404-8
- 82.** Lin CY, Sheu MJ, Li CF, et al. Deficiency in asparagine synthetase expression in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy: negative prognostic impact and therapeutic relevance. *Tumour Biol*. 2014;35(7):6823–6830. doi: 10.1007/s13277-014-1895-z
- 83.** Fang K, Chu Y, Zhao Z, et al. Enhanced expression of asparagine synthetase under glucose-deprived conditions promotes esophageal squamous cell carcinoma development. *Int J Med Sci*. 2020;17(4):510–516. doi: 10.7150/ijms.39557
- 84.** Yu Q, Wang X, Wang L, et al. Knockdown of asparagine synthetase (ASNS) suppresses cell proliferation and inhibits tumor growth in gastric cancer cells. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(10):1220–1226. doi: 10.1080/00365521.2016.1190399
- 85.** Yang H, He X, Zheng Y, et al. Down-regulation of asparagine synthetase induces cell cycle arrest and inhibits cell proliferation of breast cancer. *Chem Biol Drug Des*. 2014;84(5):578–584. doi: 10.1111/cbdd.12348
- 86.** Sircar K, Huang H, Hu L, et al. Integrative molecular profiling reveals asparagine synthetase is a target in castration-resistant prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012;180(3):895–903. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.030
- 87.** Li H, Zhou F, Du W, et al. Knockdown of asparagine synthetase by RNAi suppresses cell growth in human melanoma cells and epidermoid carcinoma cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016;63(3):328–333. doi: 10.1002/bab.1383
- 88.** Apfel V, Begue D, Cordo V, et al. Therapeutic Assessment of Targeting ASNS Combined with L-Asparaginase Treatment in Solid Tumors and Investigation of Resistance Mechanisms. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021;4(1):327–337. doi: 10.1021/acspsci.0c00196

## ОБ АВТОРАХ

### \* Кисляк Илья Александрович;

адрес: Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

ORCID: 0000-0002-6042-9795;

e-mail: kislyal.ilya.98@mail.ru

### Покровская Марина Владимировна, канд. биол. наук;

ORCID: 0009-0008-2726-3632;

e-mail: ivan1190@yandex.ru

### Жантурина Дарья Юрьевна;

ORCID: 0009-0005-6521-3220;

e-mail: dashazh@gmail.com

### Покровский Вадим Сергеевич, д-р мед. наук;

ORCID: 0000-0003-4006-9320;

eLibrary SPIN: 4552-1226;

e-mail: v.pokrovsky@ronc.ru

## AUTHORS' INFO

### \* Il'ya A. Kislyak;

address: 6 Miklukho-Maklaya street, 117198 Moscow, Russian Federation;

ORCID: 0000-0002-6042-9795;

e-mail: kislyal.ilya.98@mail.ru

### Marina V. Pokrovskaya, Cand. Sci. (Bio.);

ORCID: 0009-0008-2726-3632;

e-mail: ivan1190@yandex.ru

### Darya Yu. Zhanturina;

ORCID: 0009-0005-6521-3220;

e-mail: dashazh@gmail.com

### Vadim S. Pokrovsky, MD, Dr. Sci. (Med.);

ORCID: 0000-0003-4006-9320;

eLibrary SPIN: 4552-1226;

e-mail: v.pokrovsky@ronc.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author