

**Разработка продуцента противоопухолевого препарата на основе фермента
L-метионин- γ -лиазы**

Научный руководитель – Манухов Илья Владимирович

Бондарев Николай Антонович

Аспирант

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: nikolai.bondarev@phystech.edu

Н.А.Бондарев¹, И.С.Охрименко¹, В.С.Покровский³, Загрядская Ю.И, Маслов И.В., И.В.Манухов^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (МФТИ), г. Долгопрудный;

²ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ГосНИИГенетика), Москва.

³НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Онкологические заболевания занимают второе место в общей структуре смертности (после сердечно-сосудистых заболеваний) в РФ. На сегодняшний день эффективность системной лекарственной терапии в клинической онкологии остается низкой.

Неспособность клеток пролиферировать на среде, в которой отсутствует метионин, была названа «метиониновой зависимостью». Этот дефект метаболизма присущ многим типам раковых клеток человека. Диетическое удаление метионина было протестировано в лабораторных и клинических испытаниях, вызывало уменьшение роста опухолей и ингибировало метастазы. Наиболее эффективным методом снижения концентрации метионина является необратимая ферментативная деградация. Для этих целей используется L-метионин- γ -лиазу (МГЛ) — пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакцию γ -элиминирования L-метионина с образованием метилмеркаптана, α -кетомасляной кислоты и аммиака. Ранее была показана способность МГЛ снижать концентрацию метионина *in vivo* [1]. Так же фермент проявил терапевтическую активность против различных типов опухолей в мышах, блокируя клеточный цикл в S/G2 фазе, и невысокую токсичность [2]. Однако, как препарат, фермент имеет ряд недостатков. Обладая общим биохимическим действием, МГЛ лишает не только раковые, но и здоровые клетки метионина. Помимо этого, вызывает воспаление печени и иммунный ответ.

В рамках настоящей работы был создан химерный МГЛ, слитый с S3 доменом фактора роста вируса оспы, связывающимся с рецептором эпидермального ростового фактора (EGFR). Для получения химерного белка использовалась конструкция полученная ранее, в которой под контролем промотора фага T7 расположен ген *megL*, кодирующий метионин гамма лиазу из *Clostridium sporogenes* [3, 4]. В полученной в настоящей работе конструкции к гену *megL* пришта последовательность, кодирующая S3 домен, соединённый, в результате, с С-концом МГЛ через мостик из четырёх глицинов: GGGGRCSHG YTGIRCQAVVL.

Гиперэкспрессия EGFR наблюдается у многих видов опухолевых клеток (рак молочной железы, рак яичников и пр.). Предполагается, что применение разрабатываемого химерного белка МГЛ-S3 должно повысить специфичность и снизить терапевтические дозы препарата в результате локального уменьшения метионина в районе опухоли.

Химерный белок МГЛ-S3 был выделен из клеток *E.coli* после экспрессии и очищен с чистотой порядка 90%. Полученный препарат лиофилизируется и обладает удельной

метиониновой активностью, сравнимой с нативным белком МГЛ (~10-12 ед/мг). Было показано, что химерный белок задерживается на клетках SHSY-5Y и A549, которые экспрессируют EGFR, после двойной отмывки содержащего препарат буфера в отличие от нативного белка МГЛ.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, государственный контракт 6.9899.2017/8.9

Источники и литература

- 1) 1.Tan Y, Xu M, Hoffman RM. Broad selective efficacy of rMETase and PEG-rMETase on cancer cells In Vitro. // Anticancer Res. 2010. V. 30 N. 4 З. 1041-6.
- 2) 2.Lu S, Epner DE. Molecular mechanisms of cell cycle block by methionine restriction in human prostate cancer cells. // Nutr Cancer. 2009. V. 38 P:123-30
- 3) 3.Pokrovsky VS, Yu Anisimova N, Zh Davydov D, Bazhenov SV, Bulushova NV, Zavilgelsky GB, Kotova VY, Manukhov IV. Methionine gamma lyase from Clostridium sporogenes increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts. // Invest New Drugs. 2019. doi:10.1007/s10637-018-0619-4.
- 4) 4.Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu., Davydov D.Zh., Bazhenov S.V., Bulushova N.V., Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., I.V. Manukhov. Methionine dependence of cancer and aging: methods and protocols. R.M. Hoffman, Editor. Chapter 18. Methionine gamma lyase from Clostridium sporogenes increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cancer cells in vitro and human cancer xenografts. // Springer Nature. Springer Science+Business Media, LLC, Humana Press. ISBN 978-1-4939-8795-5. 2019