

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»**

На правах рукописи

Або Кура Луай

**Механизм действия и противоопухолевая активность фармакологических пар
Clostridium novyi C115H метионин–гамма-лиазы и сульфоксидов S-алкил-
замещенного L-цистеина**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

1.5.4. Биохимия

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

Научные руководители:
Доктор медицинских наук **В.С. Покровский**
Кандидат химических наук **Е.А. Морозова**

**Москва
2023**

Оглавление

Оглавление	2
Сокращения и условные обозначения.....	6
Введение	8
Актуальность темы исследования	8
Степень разработанности темы исследования	9
Цель и задачи исследования	12
Научная новизна.....	13
Теоретическая и практическая значимость работы.....	13
Положения, выносимые на защиту	14
Апробация результатов	14
Структура диссертации	15
Публикации.....	16
Глава 1. Использование <i>S. novyi</i> метионин- γ -лиазы как ферментного компонента фармакологической пары [фермент + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина].....	17
1.1. Фармакологические пары.....	17
1.1.1. Концепция пролекарства.....	17
1.1.2. Использование пролекарств в онкологии.....	18
1.1.3. Фармакологические пары [фермент + пролекарство].....	21
1.1.4. Адресная доставка лекарств	22
1.2. Метионин- γ -лиаза — ферментный компонент фармакологической пары	27
1.2.1. Биохимическая характеристика метионин- γ -лиазы	27

1.2.2. Метиониновая зависимость опухолевых клеток	31
1.2.3 Антипролиферативная активность метионин- γ -лиазы	32
1.2.4. Комбинированная терапия с использованием метионин- γ -лиазы.....	34
1.2.5. Биохимическая характеристика мутантных форм МГЛ.....	35
1.3. Сульфоксиды — пролекарственный компонент фармакологической пары	38
1.3.1. Сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина у разных видов растений рода <i>Allium</i>	38
1.3.2. Фармакологические свойства аллицина	40
1.3.3. Фармакологические пары [C115H МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина]	46
Глава 2. Материалы и методы.....	49
2.1. Изученные противоопухолевые агенты.....	49
2.2. Реактивы.....	49
2.3. Аминокислотная последовательность рекомбинатных <i>Clostridiaceae</i> МГЛ	50
2.4. Выделение и очистка <i>C. novyi</i> C115H метионин - γ -лиазы	51
2.4.1. Трансформация клеток <i>E.coli</i> BL21 плазмидой содержащей ген C115H МГЛ.....	51
2.4.2. Выращивание биомассы	51
2.4.3. Определение активности C115H МГЛ.....	52
2.4.4. Осаждение нуклеиновых кислот	52
2.4.5. Хроматография на ДЕАЕ-сефарозе	53

2.4.6. Определение концентрации и удельной активности очищенных ферментов	53
2.4.7. Удаление эндотоксинов из полученных ферментных препаратов	54
2.4.8. Спектральные характеристики С115Н МГЛ	54
2.4.9. Определение чистоты выделенного фермента (электрофорез в ПААГ)	54
2.5. Получение и характеристика комплекса <i>S. novyi</i> С115Н МГЛ с дайдзеином.....	55
2.6. Кинетические параметры реакций β -элиминирования конъюгатов С115Н МГЛ-Dz.....	56
2.7. Оценка цитотоксичности фармакологических пар С115Н МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил -цистеина <i>in vitro</i>	56
2.7.1. Цитотоксичность С115Н МГЛ-Dz в присутствии S-алк(ен)ил-L-цистеина сульфоксидов	57
2.7.2. Цитотоксическая активность дипропилтиосульфидата, образуемого фармакологической парой [С115Н МГЛ + пропиин]	58
2.8. Изучение изменения экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза при применении фармакологической пары [С115Н МГЛ-Dz + пропиин].....	60
2.9. Изучение изменения клеточного цикла [С115Н МГЛ-Dz + пропиин]	60
2.10. Оценка противоопухолевой эффективности <i>in vivo</i>	61
2.11. Статистическая обработка.....	63
Глава 3. Характеристика С115Н метионин- γ -лиазы и ее конъюгатов с дайдзеином.....	64
3.1. Выделение и очистка <i>S. novyi</i> С115Н МГЛ.....	64
3.2. Спектральные характеристики С115Н МГЛ.....	65

3.3. Синтез конъюгата <i>C. novyi</i> C115H МГЛ с дайдзеином.....	66
Глава 4. Механизм антипролиферативного действия фармакологической пары C115H метионин-γ-лиазы и ее конъюгатов с дайдзеином с сульфоксидами S-алк(ен)ил-цистеина	68
4.1. Цитотоксическая активность компонентов фармакологической пары	68
4.2. Оценка изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла	71
4.3. Изучение изменения маркеров апоптоза	73
Глава 5. Изучение противоопухолевого эффекта <i>in vivo</i> на подкожных ксенографтах опухолей человека у иммунодефицитных мышей	75
5.1. Оценка противоопухолевой эффективности <i>in vivo</i>	75
5.1.1. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака молочной железы SKBR3	75
5.1.2. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака поджелудочной железы человека Panc1 и MIA-PaCa2	76
5.1.3. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака толстой кишки SW620 и HT29	78
5.1.4. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака предстательной железы 22Rv1	80
5.2. Оценка переносимости лечения у мышей BALB/c nude.....	81
Глава 6. Обсуждение полученных результатов	82
Выводы	89
Благодарности.....	90
Литература	91

Сокращения и условные обозначения

ADEPT	антитело-направленная ферментативная пролекарственная терапия
GPER	мембранный рецептор эстрогена (GPR30, GPER1)
Hcy	L-гомоцистеин
IC₅₀	концентрация, ингибирующая рост клеток в культуре на 50%
IgG	иммуноглобулин G
IgM	иммуноглобулин M
k_{cat}	каталитическая константа
K_m	константа Михаэлиса
LB	среда Лурия-Бертани
МГЛ	метионин–гамма-лиаза
T_{1/2}	период полувыведения
МТТ	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиумбромид
PBS	фосфатно-солевой буферный раствор
V_{ср}	средний объем опухоли
АТФ	аденозинтрифосфат
БСА	бычий сывороточный альбумин
в/б	внутрибрюшинно
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ	D,L-дитиотреитол
ДМСО	диметилсульфоксид
ЛПС	липополисахарид
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЭГ	полиэтиленгликоль
ПФ	пиридоксаль-5'-фосфат
ТРО	торможение роста опухоли

Введение

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования остаются одной из наиболее значимых проблем медицины в настоящее время. Злокачественные опухоли являются второй причиной смертности в мире и, вероятно, в будущем поднимутся на первое место [1]. Несмотря на значительные государственные и индустриальные инвестиции и многочисленные фундаментальные открытия, рак, особенно по сравнению с другими распространёнными заболеваниями, не поддается излечению. Недавние исследования показали, что в последние годы смертность от онкологических заболеваний в мире снизилась [2]–[4]. Однако причины такого снижения, прежде всего, заключаются в расширении спектра профилактических мероприятий: резком сокращении курения, изменении образа жизни, улучшении ранней диагностики. Только небольшая доля этого снижения может быть объяснена улучшением результатов лечения, особенно неблагоприятным остаётся прогноз при распространённых формах рака [5]. Классические противоопухолевые препараты представляют собой алкилирующие агенты, антиметаболиты, ингибиторы митоза и проявляют свою активность, нарушая матричные биосинтезы и деление клетки. Их эффект зависит в первую очередь от повышенной скорости пролиферации раковых клеток, но в то же время в отношении опухолевых клеток не селективен. Длительное применение цитостатиков приводит к летальному повреждению неопухолевых пролиферирующих клеток. Показано, что их использование у пациентов с высокой опухолевой нагрузкой приводит к непродолжительной ремиссии, сопровождается прогрессированием опухолевого процесса, селекцией более злокачественных и мультирезистентных клонов. Следовательно, существует потребность в

новых подходах к разработке противоопухолевых препаратов со сниженной токсичностью и улучшенными терапевтическими характеристиками [6]. Пролекарственная терапия (англ. prodrug therapy) предлагает альтернативный подход к созданию противоопухолевых лекарственных препаратов. Пролекарственная терапия подразумевает использование фармакологически инертных соединений, которые могут быть преобразованы в активные действующие вещества *in vivo*, ферментативно или неферментативно, и оказывают терапевтическое воздействие в виде образовавшихся уже внутри организма метаболитов. Ключевым методическим подходом к разработке пролекарств является корректировка физико-химических свойств известных соединений, обладающих противоопухолевой активностью, с целью улучшения их фармакокинетических характеристик, снижения токсичности, побочных эффектов и продления активности, повышения селективности и оптимизации лекарственной формы [7].

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время для лечения злокачественных новообразований все чаще применяются схемы комбинированной лекарственной терапии. Особое значение приобретают токсические свойства исследуемых препаратов и возможность повышения их эффективности без опасности суммирования токсических эффектов. Одним из возможных направлений создания новых лекарственных препаратов являются так называемые фармакологические пары: использование пролекарства и фермента, который способен в определенных условиях метаболизировать пролекарство с образованием активного метаболита, обладающего противоопухолевой активностью. В этом случае возможно избежать «наложения» токсических эффектов двух различных действующих веществ, а также при введении компонентов в

различные сроки и различными путями можно добиться относительно избирательной активации этого вещества в опухолевой ткани. Принцип действия фармакологических пар схож с принципом действия фотодинамической терапии: действующее вещество может быть избирательно активировано в опухолевой ткани под действием видимого света определённой длины волны. Однако, в отличие от фотодинамической терапии, использование химической активации может позволить лечить опухоли в глубоко залегающих тканях.

В последние несколько лет в лаборатории химических основ биокатализа ИМБ им. В.А. Энгельгардта проводится изучение физико-химических свойств ферментов, разрушающих L-метионин, в качестве противоопухолевых препаратов. В лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей (до 2022 года — лаборатории комбинированной терапии опухолей) ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ выполняются исследования противоопухолевой активности ферментов, разрушающих L-метионин, на моделях опухолей животных и человека.

Метионин–гамма-лиаза (КФ 4.4.1.11, МГЛ) является пиридоксаль-5'-фосфат-зависимым ферментом, который катализирует реакции γ -элиминирования L-метионина, β -элиминирования L-цистеина и его S-замещенных производных. Антипролиферативное действие МГЛ связывают с разрушением необходимого для роста злокачественных клеток L-метионина и, соответственно, органической серы и лабильной метильной группы S-аденозилметионина, необходимой для метилирования полимерных молекул нуклеиновых кислот и белков.

В лаборатории химических основ биокатализа ИМБ им. В.А. Энгельгардта была выделена рекомбинантная *Clostridium novyi* МГЛ и

получена её мутантная форма с заменой цистеина 115 на гистидин (C115H)¹ [8]. C115H МГЛ не катализирует типичную для нативной МГЛ реакцию γ -элиминирования L-метионина, но может превращать сульфоксиды S-алк(ен)ил-замещенного L-цистеина в цитотоксические тиосульфиды, и её можно использовать в ферментной пролекарственной терапии как компонент фармакологической пары [C115H МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина]. Самый известный тиосульфид — диаллил дитиосульфид (аллицин, биологически активное вещество чеснока, образуется при разрушении клеток чеснока в результате реакции β -элиминирования аллиина, катализируемой аллииназой). Аллицин обладает противомикробными, противовирусными, противоопухолевыми свойствами. Однако аллицин крайне реакционноспособное и нестабильное соединение, будучи введённым в кровь, он исчезает из кровотока в течение нескольких минут. Кроме того, из-за своей способности быстро реагировать с остатками цистеина тиоловых групп белков, аллицин также может оказывать токсическое действие на клетки млекопитающих. Для минимизации токсического действия аллицина были получены комплексы аллииназы с дайдзеином (природным фитоэстрогеном), обеспечивающим направленную доставку к опухолевым клеткам, экспрессирующим мембранные белки, связывающие дайдзеин, и исследован противоопухолевый эффект образующегося *in situ* аллицина при введении аллиина в кровоток.

В этой связи представляется актуальным изучить противоопухолевый эффект фармакологических пар [C115H МГЛ + сульфоксиды S-алкил-L-цистеина]. Преимущество таких фармакологических пар обусловлено тем,

¹ Здесь и далее нумерация, соответствующая аминокислотным остаткам МГЛ из *C. freundii*.

что образующиеся алкилтиосульфиды, в отличие от аллицина, устойчивы в физиологических условиях.

Цель и задачи исследования

Цель работы — изучение механизма действия и противоопухолевой активности фармакологических пар *S. novyi* [C115H метионин- γ -лиазы + сульфоксиды S-алкил-L-цистеина].

Задачи:

1. Получение в препаративных количествах C115H метионин- γ -лиазы *S. novyi* (C115H МГЛ) и её комплексов с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz).
2. Определение параметров стационарной кинетики реакций β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина (S-метил-L-цистеина (метиин), S-этил-L-цистеина (этиин), S-пропил-L-цистеина (пропиин), S-аллил-L-цистеина (аллиин) и γ -элиминирования L-метионина, катализируемых C115H МГЛ и C115H МГЛ-Dz.
3. Оценка цитотоксической активности фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина] на панели опухолевых клеток *in vitro*.
4. Оценка изменения маркёров апоптоза и изучение распределения клеток по фазам клеточного цикла при ко-инкубации с фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин].
5. Оценка противоопухолевого эффекта фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] на моделях опухолей человека с различной экспрессией мембранных рецепторов к эстрогенам у мышей Balb/c nude.

Научная новизна

- ◆ Впервые определены параметры стационарной кинетики реакций β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина (S-метил-L-цистеина (метиин), S-этил-L-цистеина (этиин), S-пропил-L-цистеина (пропиин), S-аллил-L-цистеина (аллиин) и γ -элиминирования L-метионина, катализируемые *C. novyi* C115H МГЛ и C115H МГЛ-Dz.
- ◆ На культурах клеток эмбриональной почки человека HEK-293, плаценты человека, рака предстательной железы человека PC3, 22Rv1 и DU145, рака молочной железы MCF7, SKBR3 и T47D, рака поджелудочной железы MIA-PaCa2 и Panc1, рака толстой кишки SW620, COLO 205, HT29 и HCT116 впервые показано наличие цитотоксической активности фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина].
- ◆ На моделях ксенографтов рака предстательной железы человека 22Rv1, рака молочной железы SKBR3, рака поджелудочной железы MIA-PaCa2 и Panc1, рака толстой кишки SW620 и HT29 впервые показано наличие достоверного противоопухолевого эффекта фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксид S-пропил-L-цистеина].

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования *in vitro* и *in vivo* позволяют определить новые возможности для изучения фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина], а также открывают новые перспективы для использования фармакологических пар в терапии онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Ковалентное связывание дайдзеина с молекулой C115H МГЛ не оказывает существенного влияния на ферментативную активность белка. Параметры стационарной кинетики реакций β -элиминирования сульфоксидов S-алк(-ен)ил-L-цистеина и γ -элиминирования L-метионина, катализируемые C115H МГЛ и C115H МГЛ-Dz, сопоставимы.
2. Конъюгат C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(-ен)ил-L-цистеина оказывает цитотоксическое действие на исследуемые опухолевые клеточные линии. Наибольший эффект показан для конъюгата C115H МГЛ-Dz в присутствии S-пропил-L-цистеина (пропиин) ($IC_{50} < 17,4 \mu M$). Дипропилтиосульфидат, образуемый фармакологической парой [C115H МГЛ + пропиин] обладает высокой антипролиферативной и цитотоксической активностью в культурах клеток линий MCF7, SKBR3, T47D, MIA-PaCa2, Panc1, SW620, COLO205, HT29, HCT116, 22Rv1, DU145 и PC3 (IC_{50} варьирует в диапазоне от 15,03 до 66,36 μM).
3. Клетки 22Rv1 после воздействия фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] погибают по механизму апоптоза.
4. На моделях ксенографтов SKBR3, HT29, Panc1, MIA-PaCa2, и 22Rv1 фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост опухолей при ТРО = 89%, 51%, 67%, 50%, и 70%, соответственно.

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих конференциях:

1. Седьмая Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Москва, 10–12 октября 2021 г.
2. Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной онкологии», Ростов-на-Дону, 25 августа 2022 г.
3. XXII ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-вузы “Биохимическая физика”, Москва, 14–15 ноября 2022 г.
4. Школа по молекулярной фармакологии «Young Scientists’ School in Molecular Pharmacology», Университет Сириус, 5–7 декабря 2022 г.
5. XVII Всероссийская научно-практическая конференция им. А.Ю. Барышникова с международным участием «Новые перспективные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы», г. Москва, 20–21 апреля 2023 г.
6. VIII Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», г. Санкт-Петербург, 24–27 апреля 2023 г.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3 глав с описанием результатов исследований, главы «Обсуждение результатов», выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 188 источников. Диссертация иллюстрирована 13 рисунками, 4 схемами и 5 таблицами.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, среди которых 5 статьи в журналах, рецензируемых в Scopus Q1/Q2 и рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Глава 1. Использование *S. novyi* метионин– γ -лиазы как ферментного компонента фармакологической пары [фермент + сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина]

1.1. Фармакологические пары

1.1.1. Концепция пролекарства

Многие вещества, имеющие выраженный эффект *in vitro*, проявляют низкую активность *in vivo*. Это может быть связано с различными факторами, такими как недостаточная абсорбция из места введения, быстрый метаболизм, выведение и медленное проникновение непосредственно в место действия [9], [10]. Другим существенным недостатком часто оказывается высокая токсичность [11]. Одним из возможных подходов для минимизации этих негативных свойств является создание пролекарства — неактивного соединения, которое биотрансформируется в организме в активное вещество, проникает к месту действия и оказывает желаемый терапевтический эффект [12].

Создание пролекарств направлено на усиление эффекта противоопухолевой терапии и повышение селективности действия вещества на опухолевые клетки по сравнению со здоровыми клетками при одновременном снижении токсичности [13]. Селективная доставка пролекарств в ткани имеет большой потенциал для повышения эффективности и безопасности препарата. Для достижения этой цели были, например, получены пролекарства, которые используют специфические биохимические особенности опухолевых клеток, такие, как низкий pH, состояние гипоксии и повышенные уровни специфических ферментов [14]. В продолжение этой концепции в настоящее время развиваются два направления исследований: (1) направленная доставка препаратов, при

которой пролекарство доставляется в клетки или ткани-мишени при помощи специфических ферментов или рецепторов на клеточной поверхности, (2) специфическое высвобождение, при котором пролекарство распространяется по всему организму, но активируется ферментами с преимущественной локализацией в опухолевых клетках или тканях-мишенях [15]. В дополнение к фармакофорной группе, которая непосредственно отвечает за фармакологический эффект, должна присутствовать группа, обеспечивающая перенос молекулы в кровотоке и транспорт к органам-мишеням [16] [17].

Одним из инновационных вариантов пролекарств являются конъюгаты действующих веществ с пептидами, полимерами или антителами, нацеленными на специфические мишени определённых клеток, что открывает новые возможности для таргетной терапии [18] [19].

В качестве примеров ферментов, которые можно использовать для фармакологических пар [фермент + пролекарство] можно привести β -лактамазы (разрушают β -лактамное кольцо и образуют активные действующие вещества) [20], тимидинфосфорилаза (необходима для метаболизма 5-фторурацила) [21] и карбоксипептидазы G_2 (CPG₂ отщепляет концевую глутаминовую кислоту амидов с образованием производных азотистого иприта) [22] и т. п.

1.1.2. Использование пролекарств в онкологии

Одним из первых примеров высокоэффективных и безопасных пероральных фторпиримидинов, внедрённых в онкологическую практику, является капецитабин. Капецитабин — пролекарство, которое активируется под действием тимидинфосфорилазы в опухолевой ткани и оказывает на неё избирательное цитотоксическое действие. Капецитабин не оказывает цитотоксического действия *in vitro*, в организме он превращается в 5-

фторурацил (ФУ). Установлено, что активность тимидинфосфорилазы в первичных опухолях колоректального происхождения в 4 раза выше, чем в здоровых тканях [23]. Как следствие, после применения капецитабина у больных раком толстой кишки концентрация 5-фторурацила в опухоли оказывается в 3,2 раза выше, чем в прилежащих здоровых тканях, а избирательная активация капецитабина в опухолевой ткани позволяет избежать системного действия 5-фторурацила на здоровые клетки [23].

ФУ является противоопухолевым агентом для лечения солидных злокачественных новообразований, включая рак головы и шеи, молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, печени, мочеполового и желудочно-кишечного трактов [24]. Комбинированная терапия ФУ с лучевой терапией улучшает выживаемость пациентов по сравнению с монотерапией. ФУ необходимо вводить внутривенно из-за его переменной абсорбции в желудочно-кишечном тракте и быстрой деградации [25]. Тегафур был разработан в 1967 г. как первое пероральное пролекарство ФУ. Исследование фазы I у пациентов с раком желудочно-кишечного тракта выявило преимущества и недостатки использования этого препарата. Дальнейшие исследования тегафура были ограничены высокой неврологической токсичностью препарата [26].

UFT-1 — смесь тегафура (фторафура) и урацила в молярном соотношении 1:4. Как известно, тегафур является пролекарством, который в печени метаболизируется при участии дигидропиримидиндегидрогеназы. Но этот фермент используется и для распада урацила, концентрация которого после введения UFT-1 в несколько раз больше концентрации тегафура. В результате концентрация ФУ в плазме оказывается выше, и дальнейший его метаболизм идет по пути фосфорилирования и образования активных против опухолевых клеток метаболитов.

Флударабин (2-фтор-ара-АМФ) в организме человека быстро дефосфорилируется до 2-фтор-ара-аденозина, который, захватываясь клетками, фосфорилируется дезоксицитидинкиназой до активного трифосфата (2-фтор-ара-АТФ). Этот метаболит ингибирует рибонуклеотидредуктазу, ДНК-полимеразу, ДНК-праймазу и ДНК-лигазу, вследствие чего угнетается синтез ДНК. Флударабин обладает противоопухолевой активностью при остром миелобластном лейкозе, лимфолейкозах и неходжкинских лимфомах. Нежелательные побочные эффекты флударабина включают миелосупрессию (включая нейтропению, тромбоцитопению и анемию), инфекции (включая пневмонию), и лихорадку [27].

Иринотекан после введения в организм активируется в печени путём гидролиза, катализируемого карбоксиэстеразами (CES1, CES2), с высвобождением более активного метаболита SN-38. В опухолевых клетках SN-38 ингибирует топоизомеразу I. Схемы химиотерапии, включающие иринотекан, широко используются для лечения рака толстой кишки, мелкоклеточного рака лёгкого и других солидных опухолей. Недостатком иринотекана является высокая токсичность, выраженная межиндивидуальная фармакокинетическая вариабельность и быстрая инактивация ферментом уридинфосфат-глюкуронозил трансферазой [28].

Липосомальный иринотекан представляет собой инкапсулированную в липосомы форму иринотекана для внутривенного введения, которая была разработана для преодоления фармакологических и клинических ограничений традиционной (нелипосомной) формы препарата. Липосомальный иринотекан в комбинации с 5-фторурацилом и лейковорином был одобрен в нескольких странах мира для лечения рака поджелудочной железы [29].

Ифосфамид после внутривенного введения превращается в активное вещество (4-гидроксиифосфамид) при помощи фосфоамидазы в печени и в опухолевой ткани. Ифосфамид вызывает миелотоксический, нейротоксический и нефротоксический эффекты и входит в состав многочисленных схем терапии солидных новообразований [30].

Таким образом, использование пролекарств, превращающихся в цитотоксические действующие вещества непосредственно в организме человека, является известным методом в терапии онкологических заболеваний.

1.1.3. Фармакологические пары [фермент + пролекарство]

Для селективной активации пролекарства в опухолевых клетках были разработаны системы [фермент + пролекарство]². Основная идея этого подхода заключается в следующем: на первом этапе в опухоль доставляют специфический фермент, на втором этапе — нетоксичное пролекарство, которое служит субстратом для фермента. При взаимодействии фермента с субстратом происходит избирательное превращение пролекарства в активный препарат в опухолевых клетках, и таким образом достигаются высокие локальные концентрации лекарства в опухоли [31]. Для того, чтобы эта стратегия работала эффективно, необходимо соблюдение следующих условий [32]:

◆ Фермент должен быть активен при физиологических значениях рН, и должен обладать высокой каталитической активностью.

² В настоящей работе фармакологические пары указаны в квадратных скобках: [X + Y], что позволяет отличить фармакологическую пару от схемы комбинированной терапии, например, препаратами с различным механизмом действия X + Y.

◆ Пролекарство должно проникать через клеточную мембрану, чтобы активироваться внутри клетки.

◆ Цитотоксичность активного метаболита должна быть максимальной, а цитотоксичность пролекарства — минимальной.

◆ Активные препараты должны хорошо проникать в соседние опухолевые клетки, не экспрессирующие фермент, чтобы обеспечить их гибель.

◆ Период полувыведения ($T_{1/2}$) действующего вещества в организме должен быть оптимальным, чтобы не были повреждены нормальные ткани.

◆ Пролекарство должно быть предпочтительным субстратом для вводимого фермента и не должно активироваться эндогенными ферментами нормальных тканей.

В связи с тем, что на поверхности опухолевых клеток и в клетках опухолевой стромы обнаруживается достаточный уровень специфических антигенов, основным фактором, определяющим возможность адресной доставки фермента или пролекарства, является выбор подходящего агента и фермента для его активации, а также подбор мишеней для направленной доставки обоих (или одного из) компонентов [33].

1.1.4. Адресная доставка лекарств

Внедрение нового препарата в клиническую практику зависит от двух основных факторов — эффективности его действия на конкретные клеточные мишени и сохранения высокого уровня активности при применении *in vivo* [34]. При разработке нового препарата часто не учитываются аспекты его доставки в клетки-мишени. Тем не менее современные знания о механизме внутриклеточного транспорта и

молекулярных мишенях на клеточной поверхности позволяют разрабатывать новые и эффективные методы адресной доставки лекарств. Использование такого подхода позволяет повысить специфичность действия препаратов, что дает возможность снизить токсичность и уменьшить эффективную концентрацию [34].

Эффективная система адресной доставки лекарств должна соответствовать нескольким принципам: (1) обеспечивать сохранность препарата в пути к месту применения, (2) предотвращать преждевременное выведение препарата из организма и его метаболизм, (3) обеспечивать длительное высвобождение препарата из «устройства» введения после достижения оптимальной концентрации на всей продолжительности действия препарата. Низкая избирательность действия, первичная и приобретённая резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим средствам являются одними из причин, существенно ограничивающих эффективность противоопухолевой химиотерапии [35].

Повышение селективности химиотерапевтических агентов возможно с помощью различных белковых векторов, изофлавонов, антител и других молекул, позволяющих доставлять химиотерапевтические агенты в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. При разработке противоопухолевых препаратов широко распространён подход с использованием гибридной конструкции типа носитель + химиотерапевтическое средство, ковалентно связанных друг с другом (конъюгат). Избирательность действия конъюгата обусловлена наличием на поверхности опухолевой клетки специфических рецепторов, «узнаваемых» антителом или векторным белком, или существенно более высокой экспрессией белков-мишеней на поверхности клеток опухолей, по сравнению с нормальными клетками [34] [36].

Известны три основных способа доставки фермента к опухолевым клеткам: (1) доставка генов, кодирующих нужный фермент, в опухолевые клетки с помощью вирусного вектора (virus-directed enzyme prodrug therapy, VDEPT), (2) доставка фермента с помощью антител (antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT), (3) метод физической трансформации генома опухолевых клеток (gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT) [37] [38].

Метод ADEPT обеспечивается присутствием на опухолевых клетках специфических антигенов. Эта технология предусматривает использование конъюгатов фермента со специфическим антителом, связанных химически или с помощью технологии рекомбинантной ДНК, что позволяет доставлять молекулы фермента непосредственно к опухолевой клетке [39] [40] [41].

Первым шагом стратегии ADEPT является введение в организм фермента, связанного с моноклональными антителами, специфичными к конкретному опухолевому антигену. Моноклональные антитела позволяют целенаправленно доставлять фермент к опухоли. Вторым шагом вводят нетоксичное пролекарство, которое избирательно метаболизируется до активного действующего вещества при участии избирательно доставленного антителом фермента [42]. Поскольку механизм высвобождения действующего вещества является каталитическим, любая молекула фермента превращает значительный объём пролекарства в соответствующее действующее вещество в опухолевой ткани, создавая высокую локальную концентрацию действующего вещества и эффективно разрушая раковые клетки [43].

Период времени между введением фермента и пролекарства может быть оптимизирован так, чтобы конъюгат накапливался только в опухолевой ткани, а не в крови и нормальных тканях, чтобы предотвратить системную токсичность при клиническом использовании [7]. Таким образом

реализуется основное преимущество использования стратегии ADEPT — достигается высокая локальная концентрация лекарства в опухолевых тканях [44].

Известно несколько важных факторов, которые следует учитывать при применении терапии ADEPT в клинике: (1) следует подбирать оптимальный интервал времени между приёмом пролекарства и антитело-связанного фермента, чтобы обеспечить выведение/метаболизм конъюгатов антитело + фермент, не связанных с опухолевыми мишенями, и избежать токсичности [46]; (2) определенные опухолевые антигены должны экспрессироваться на мембране опухолевой клетки или присутствовать в строме опухоли; (3) антитело, используемое для этого антигена, должно иметь высокое сродство (аффинность) к нему [32].

В большинстве пролекарств высвобождение лекарственного средства осуществляется путём связывания лекарственного средства с носителем с помощью спейсера, содержащего заранее определённую точку разрыва, которая позволяет лекарственному средству высвободиться в клеточной мишени. На биораспределение носителя лекарственного средства и количество действующего вещества, достигающего клетки-мишени, влияют гетерогенность опухоли, васкуляризация и экспрессия белков множественной лекарственной устойчивости. Ещё одна важная задача состоит в том, чтобы гарантировать сохранение целевых свойств носителя при изменении молекул действующего вещества [47].

Во многих статьях опубликованы данные об успешном применении цитотоксических препаратов и конъюгатов, позволяющих нацеливать агенты на опухолевые клетки или кровеносные сосуды опухоли [48]. Метод конъюгации должен соответствовать двум ключевым критериям — достижению высокой локальной концентрации конъюгата в опухолевых тканях, а также обеспечению возможности внутриклеточного расщепления

конъюгата. Структура фрагмента линкера может быть не связана с его последующим внутриклеточным расщеплением, а «независимость» препарата от вектора обеспечивается линкером значительной длины [49].

Фитоэстрогены — биологически активные соединения растительного происхождения, действующие подобно эстрогенам. Они имеют молекулярную массу и химическую структуру, близкую к человеческому эстрадиолу-17 β , и, таким образом, могут взаимодействовать с рецепторами эстрогена. К фитоэстрогенам относятся следующие группы соединений: куместаны, флавоноиды, изофлавоны и лигнаны. Наиболее изученными изофлавонами на сегодняшний день являются генистеин, дайдзеин и глицитеин, которые структурно схожи с эстроном (рис. 1). Изофлавоны, в том числе и дайдзеин, способны связываться с ядерными рецепторами эстрогенов α и β (ER α и ER β) [167][168], мембранными рецепторами эстрогена, ассоциированными с G-белком (GPER1) [169], рецепторами андрогенов (AR) [50] и рецепторами эпидермального фактора роста (HER2) [51]. Поскольку дайдзеин является агонистом рецептора эстрогена и ингибитором тирозинкиназы EGFR, он может быть эффективным при лечении различных опухолей в монотерапии [52]–[54].

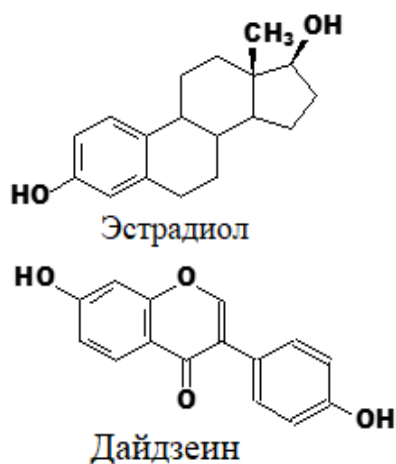


Рис. 1. Молекулярная структура 17 β -эстрадиола и дайдзеина

Цитотоксичность дайдзеина была продемонстрирована в культурах различных клеток рака яичников Caov-3, SKOV3 и OVACAR-3 со значениями IC_{50} 25, 20 и 25 мкм, соответственно [55]. Было показано, что действие дайдзеина и генистеина проявляется на культурах клеток рака предстательной железы (PC3, LNCaP и DU145) [56].

Также показана его эффективность в отношении клеток рака поджелудочной железы (MIA-PaCa2 и Panc1) [57], рака легкого [58] и меланомы [59]. В отсутствие рецепторов эстрогенов изофлавоны не влияют на клетки рака молочной железы.

Ассоциированный с G-белком рецептор эстрогена 1 (GPER1), также известный как GPR30, представляет собой недавно описанный мембранный рецептор эстрогенов, который опосредует негеномные эффекты эстрогенов, приводя к мобилизации внутриклеточного кальция и синтезу фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфата [60]. Дайдзеин является структурным аналогом природных эстрогенов и может связываться с высоким сродством с GPER1 [61].

Таким образом, изофлавоны и, в частности, дайдзеин, могут быть использованы в качестве молекул для доставки действующих веществ к опухолевым клеткам, обеспечивая их высвобождение в непосредственной близости или внутри опухолевых клеток.

1.2. Метионин- γ -лиаза — ферментный компонент фармакологической пары

1.2.1. Биохимическая характеристика метионин- γ -лиазы

Метионин- γ -лиаза (МГЛ, КФ 4.4.1.11) — пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, относящийся к IV классу ферментов, участвует в метаболизме серосодержащих аминокислот. МГЛ катализирует реакцию γ -

элиминирования L-метионина и его аналогов с образованием метилмеркаптана, α-кетобутирата и аммиака (Схема 1; А), и β-элиминирования L-цистеина и его S-замещенных производных, с образованием соответствующих меркаптанов, пировиноградной кислоты и аммиака (Схема 1; В) [62].

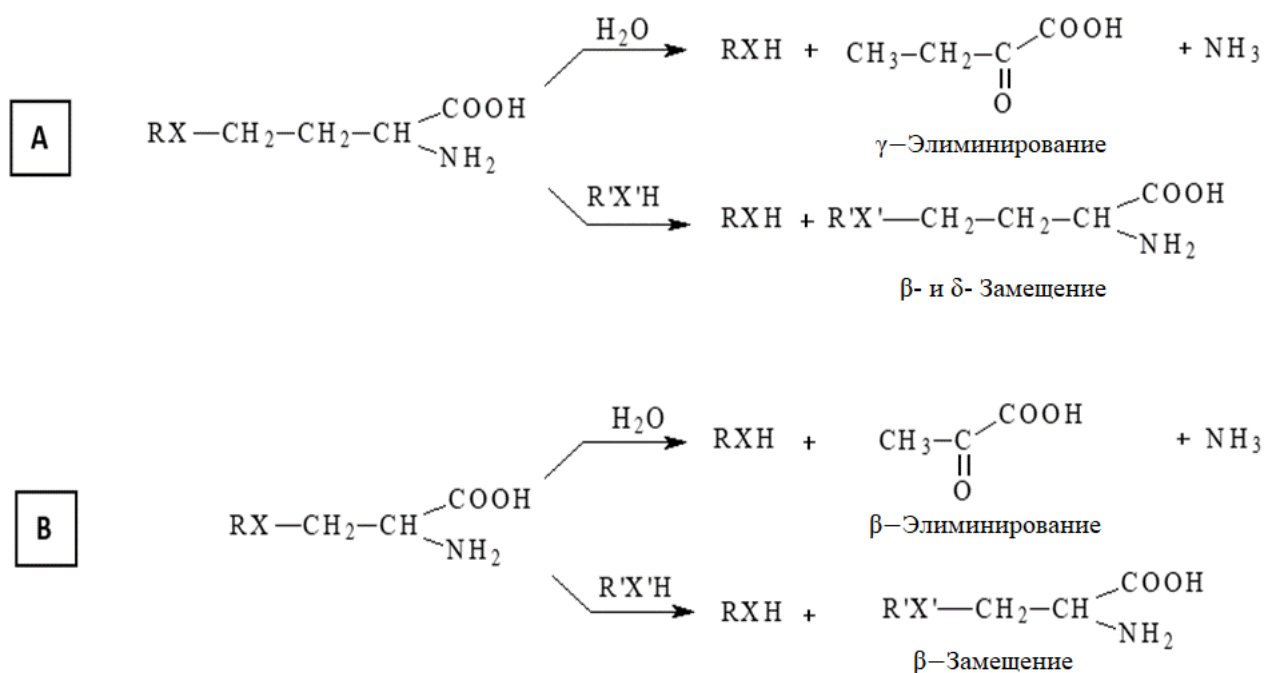


Схема 1. Реакции, катализируемые МГЛ (X = S, O или Se; X' = S или Se)

МГЛ является внутриклеточным ферментом и была выделена из многих микроорганизмов, простейших, эукариотов и грибов, включая патогенные, такие как: *Clostridium sporogenes* [63], *Pseudomonas ovalis* [64], *Citrobacter freundii* [65], *Treponema denticola* [66], *Aeromonas ssp* [67], *Entamoeba histolytica* [68], *Porphyromonas gingivalis* [69], *Trichomonas vaginalis* [70], *Arabidopsis thaliana* [71], *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus equorum* [72], *Clostridium novyi* [32] и др. Показано, что МГЛ отсутствует в клетках животных и может

служить биохимической мишенью для разработки антибактериальных препаратов, селективно действующих на прокариотические клетки [73].

Пространственная структура МГЛ была решена для фермента из *P. putida* [74], *T. vaginalis* [75], *C. sporogenes* [76], *E. histolytica* [77] и *C. freundii* [65]. Фермент принадлежит к подклассу цистатионин- β -лиазы с типом I укладки полипептидной цепи ПФ-зависимых ферментов [78]. В растворе и кристаллических формах МГЛ существует в виде тетрамера [79][80], состоящего из двух каталитически активных димеров (рис. 2).

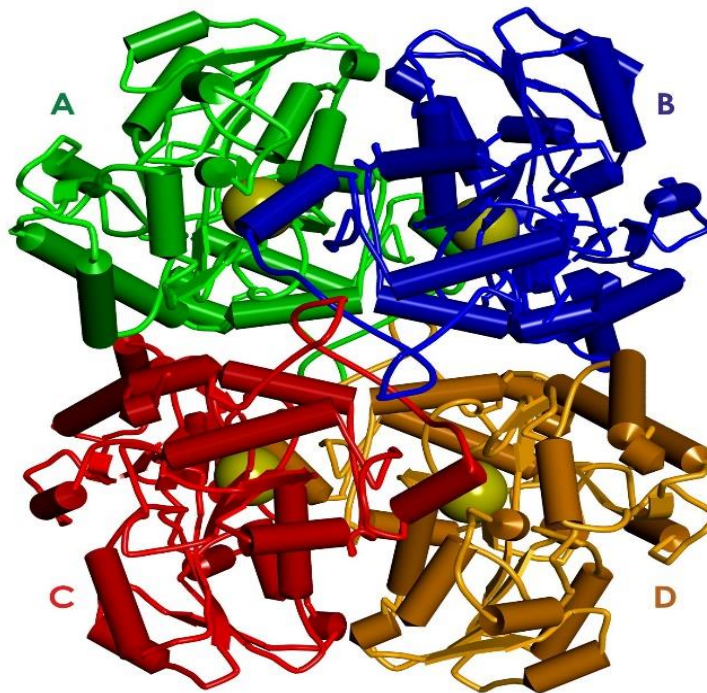


Рис.2. Тетрамерная организация МГЛ

Каждый димер образован двумя субъединицами, связанными осью симметрии двойного порядка, и включает в себя два активных центра. Каждая субъединица состоит из трех структурно и функционально различных областей: N-концевого, ПФ-связывающего и C-концевого доменов [79]. Активный центр фермента сформирован аминокислотными остатками обеих субъединиц каталитического димера и структурно схож с

активными центрами других ферментов подкласса цистатионин- β -лиаз. Аминокислотные остатки активного центра МГЛ (Tyr58, Arg60, Gly88, Tyr113, Asp185, Thr187, Ser207, Thr209 и Lys210) высококонсервативны для всех ферментов подкласса, необходимы для связывания кофактора и обеспечивают протекание ферментативной реакции [79]. ПФ образует альдиминную связь с ϵ -аминогруппой Lys210, формируя так называемый внутренний альдимин. Консервативные остатки Tyr58, Arg60, Gly88, Ser207 и Thr209 образуют водородные связи с фосфатной группой кофермента, Asp185 связан с пиридиновым кольцом ПФ солевым мостиком, при этом положение Asp185 прочно фиксируется за счёт взаимодействия с Thr187; Tyr113 находится в π -стэкинге с пиридиновым кольцом ПФ, стабилизируя его положение. Tyr113 выполняет функцию основания, акцептирующего протон от α -аминогруппы субстрата, и впоследствии действует как кислотный катализатор на стадии элиминирования метилмеркаптана в реакции γ -элиминирования L-метионина [81]. Вторым важным каталитическим остатком — Lys210 — находится от Tyr113 по другую сторону пиридинового кольца ПФ и осуществляет 1,3-прототропный сдвиг C α -протона к C4'-атому кофактора. Lys210 служит основанием, отрывающим β -протон от ряда ингибиторов и физиологического субстрата [82].

Как и активный центр МГЛ, субстрат-связывающий карман образован аминокислотными остатками обеих субъединиц каталитического димера (Phe49, Ile57, Leu61, Cys115, Val338, Leu340 и Arg374). Боковые группы Phe49, Ile57, Leu61, Leu340 образуют площадь гидрофобного контакта для метильной группы природного субстрата фермента [79], а Cys115 необходим для «распознавания» его SH-группы [83]. Arg374 строго консервативен для всего подкласса цистатионин- β -лиаз [79] и участвует в связывании карбоксильной группы субстратов и ингибиторов [84].

1.2.2. Метиониновая зависимость опухолевых клеток

L-метионин является незаменимой серосодержащей α -аминокислотной, необходимой для нормального функционирования клеток; он играет важную роль в синтезе белков, витаминов, коферментов, антиоксидантов, полиаминов и других молекул [85]. Метиониновая зависимость опухолевых клеток была замечена ещё в 1959 г. на модели карциносаркомы Уокера у крыс [86].

В 70-е годы была выявлена абсолютная потребность многих опухолевых клеток в L-метионине [75], и в последние годы публикуется всё больше работ, описывающих использование МГЛ в качестве противоопухолевого средства [79] [81]. Исследования *in vitro* продемонстрировали, что многим линиям опухолевых клеток для выживания и пролиферации необходим экзогенный L-метионин [87] [88]. Нормальные клетки могут использовать гомоцистеин для получения необходимых уровней L-метионина и поддержания интенсивности синтеза белка. По этим причинам нормальные клетки человека относительно устойчивы к экзогенному ограничению L-метионина. Истощение пула L-метионина в организме человека может быть эффективной стратегией для лечения некоторых типов рака. При истощении запасов L-метионина метионин-зависимые раковые клетки не могут делиться, и клеточный цикл останавливается в поздней фазе S/G₂ [89]. Было обнаружено, что фермент является эффективным противоопухолевым средством *in vitro* и *in vivo* и имеет потенциальную ценность при лечении болезни Паркинсона, атеросклероза и ожирения [90].

Доброкачественные опухоли костного мозга пациентов потребляют более низкие концентрации L-метионина в культуральной среде для оптимального синтеза ДНК, чем клетки пациентов с лейкозом [91].

Проточная цитометрия показала, что инкубация клеток рака предстательной железы человека линии PC-3 в течение 6 дней в питательной среде при отсутствии L-метионина вызывала их гибель. Отсутствие L-метионина приводило к накоплению ингибиторов циклинзависимых киназ p21 и p27 и ингибировало ферментативную активность циклинзависимых киназ CDK1 и CDK2. Клетки PC-3 подверглись апоптозу, на что указывает деградация ДНК при отсутствии L-метионина [92]. Некоторые клетки рака толстой кишки, рака молочной железы, рака яичника, рака предстательной железы, меланомы также демонстрировали метиониновую зависимость [93]. Пролиферация клеток рака предстательной железы человека LNCaP только частично ингибировалась в питательной среде MET⁻ HCY⁺ [92].

1.2.3 Антипролиферативная активность метионин- γ -лиазы

МГЛ значительно ингибировала пролиферацию, способствовала апоптозу клеток и индуцировала остановку клеточного цикла в S-фазе в клетках рака желудка SGC-7901 после ко-инкубации (конечная концентрация 1,25 и 2,50 mM) в течение 72 ч. С увеличением концентрации МГЛ клетки потребляют меньше глюкозы, процесс сопровождается угнетением гликолиза и уменьшением концентрации АТФ. МГЛ может ингибировать аэробный гликолиз, индуцировать апоптоз и ингибировать пролиферацию клеток SGC-7901 путём подавления активности пути PI3K/Akt, что указывает на её потенциал в качестве терапевтического агента при раке желудка [94].

В 1973 г. было опубликовано исследование эффективности *S. sporogenes* МГЛ *in vivo* на культуре мышинной мастоцитомы P815, а также было показано, что культуры клеток SEM, Molt4, Molt16, K562 и HL60 чувствительны к действию *P. putida* МГЛ [95]. Цитотоксичность МГЛ из

Aspergillus flavipes была продемонстрирована на культуре клеток рака молочной железы MCF7, печени HepG2 и предстательной железы PC3 [96].

МГЛ из *Idiomarina* обладает цитотоксическим действием в отношении клеток острого лимфобластного лейкоза SEMC7, MOLТ4 и клеток острого миелоидного лейкоза MV411 и MOLM13: значения IC₅₀ составляют 1,7; 0,3; 0,64; и 0,03 μ M, соответственно [97].

Для предотвращения иммунологических реакций и продления периода полужизни МГЛ в сыворотке была получена МГЛ, ковалентно связанная с N-гидроксисукцинимидиловым эфиром метоксиполиэтиленгликольпропионовой кислоты (M-SPA-ПЭГ-5000). На одну субъединицу белка приходилось две молекулы ПЭГ. Ферментативная активность ПЭГ-МГЛ составляла 70% неконъюгированного фермента. ПЭГ-МГЛ увеличивала время полужизни фермента в сыворотке крови крыс до ~ 160 мин по сравнению с 80 мин нативной МГЛ. ПЭГ-МГЛ снижала уровень L-метионина в сыворотке до <0,1 мкM в течение ~8 часов по сравнению с 2 часами нативной формы фермента у крыс. Помпы, содержащие 500 мг/мл ПФ, увеличивали период полувыведения холофермента ПЭГ-МГЛ в 4,5 раза с 1,5 до 7 ч. Таким образом, инфузия ПФ может продлить период истощения L-метионина под действием ПЭГ-МГЛ примерно в 10 раз в зависимости от дозы [98].

Для улучшения фармакокинетических свойств *Aspergillus flavipes* МГЛ фермент был модифицирован декстраном. Термическая стабильность конъюгатов МГЛ-декстран увеличивалась в 2 раза по сравнению с нативным ферментом. Конъюгаты МГЛ-декстран обладали более высокой устойчивостью к протеиназе К, сохраняя около 70% удельной активности по сравнению с 20% для нативного фермента. Для модифицированной декстраном МГЛ показано увеличение цитотоксической активности на различных линиях опухолевых клеток по сравнению с данными,

полученными для нативного фермента (значения IC_{50} для конъюгатов МГЛ-декстран составили 5,4, 4,5 и 13,1 μM для клеточных линий MCF-7, HEP-2 и PC-3, соответственно; значение IC_{50} для нативной МГЛ — 17,8, 27,6 и 32,8 μM соответственно). Кроме того, модификация фермента декстраном позволила увеличить время полужизни фермента в 2,3 раза по сравнению с нативной МГЛ ($T_{1/2} = 27,7$ ч для конъюгата МГЛ-декстран; $T_{1/2} = 13,3$ ч для нативного фермента) [99].

1.2.4. Комбинированная терапия с использованием метионин- γ -лиазы

Некоторые исследования показали синергетический эффект МГЛ с известными противоопухолевыми препаратами. Например, рекомбинантная МГЛ увеличивает цитотоксичность 5-фторурацила и фолиевой кислоты в клетках CCRF-CEM [100]. Эффективность нативного фермента или рекомбинантной *P. putida* МГЛ свидетельствует о широком разнообразии чувствительных трансплантируемых солидных опухолей у животных, а также человека: немелкоклеточный рак легкого (NCL-H460 и Ma44), саркома Йошида, нейробластома (LAN-1 и NMB-7), рак толстой кишки (SW620, HCT116, Colo205 и HCT15), фибросаркома HT1080, и плоскоклеточный рак (KB85 и KB31) [101] [102].

In vivo показан синергетический эффект комбинации рекомбинантной МГЛ с 5-фторурацилом, цисплатином, доксорубином, винкристином, ретровирусными (pLGFP-METSIN) или аденовирусными частицами (MET-ген/SeMET). При этом эффективность применения МГЛ в монотерапии остаётся ограниченной.

Синергетический эффект комбинации рекомбинантной *S. sporogenes* МГЛ с доксорубицином привёл к увеличению противоопухолевой активности на клетках A549 по сравнению с монотерапией. *P. putida* МГЛ

повышала эффективность 5-фторурацила *in vivo* на моделях HT-1080, HCT116, NCI-H460, KB3-I, KB8-5 и Ma44 [103].

Комбинация *P. putida* МГЛ с цисплатином дала достоверное повышение эффекта по сравнению с монотерапией и уменьшала необходимую дозу цисплатина для терапии рака толстой кишки SW620 и COLO205 [104]. Синергетический эффект рекомбинантной МГЛ с винкристином приводил к увеличению противоопухолевого эффекта на клеточной линии нейробластомы по сравнению с монотерапией [105].

Комбинация децитабина с МГЛ проводила к увеличению эффективности в сравнении с монотерапией на клеточной линии недифференцированной саркомы мягких тканей (USTS) *in vivo* [106]. К. Кавагути и соавт. показали, что синергетический эффект комбинации *P. putida* МГЛ с темозоломидом приводил к увеличению эффективности *in vivo* на моделях меланомы с мутацией BRAF V600E [107].

Цитотоксичность и противоопухолевая эффективность комбинации рекомбинантной *P. putida* МГЛ с ретровирусом рLGFP-METSN проводила к подавлению роста рака лёгкого человека H460 *in vivo* и *in vitro* [108].

Ингибирующий эффект комбинации *P. putida* МГЛ с аденовирусными частицами (MET-ген/SeMET), был более существенным, так как в отличие от монотерапии сопровождался достоверным продлением жизни мышей, следовательно, добавление МГЛ к невысокой дозе аденовирусных частиц (MET-ген/SeMET) позволяет получить терапевтический выигрыш и повысить выживаемость мышей [109].

1.2.5. Биохимическая характеристика мутантных форм МГЛ

Одним из механизмов изменения субстратной специфичности или повышения активности фермента является направленный мутагенез. Так, замена всего одной аминокислоты в активном центре может привести к

радикальному изменению свойств ферментов. Методы направленного мутагенеза используют для снижения иммуногенности (замены аминокислот в области антигенных эпитопов), оптимизации процедуры очистки фермента (замены заряженных аминокислот) или модификации механизмов регуляции активности фермента (замены аминокислот в аллостерических центрах). Некоторые аминокислотные замены приводят к полной инактивации фермента.

Замена остатка цистеина 116 на гистидин в *P. putida* МГЛ приводила к увеличению активности в реакции β -элиминирования L-цистеина и потере активности в реакции γ -элиминирования L-метионина. Замены K240R, K240M, K240I, K240N, D241R, и D241H приводили к потере активности фермента [110].

Замена остатка валина 358 на тирозин в *S. freundii* МГЛ приводила к 1,9-кратному увеличению скорости катализа и 3-кратному увеличению K_M в реакции γ -элиминирования L-метионина. Каталитическая эффективность V358Y МГЛ была близка к параметрам фермента дикого типа. Также было обнаружено, что удельная активность V358Y МГЛ в реакции γ -элиминирования L-метионина была в два раза выше, чем для МГЛ дикого типа. Исследование цитотоксической активности мутантной формы на клетках РС3, MCF7, и HT29 показало снижение значений IC_{50} для V358Y МГЛ по сравнению с ферментом дикого типа [111]. Инкапсулирование в полимерные везикулы (PISсомы) V358Y МГЛ существенно не влияло на кинетические параметры фермента в реакции γ -элиминирования L-метионина. Исследование кинетики высвобождения V358Y МГЛ из полиионных везикул показало, что в зависимости от длины полимеров, которые образуют нанокapsулу, степень высвобождения фермента составила 95%, 67%, 56% для PISсом с $n=20$, 70 и 120, где n — количество

звеньев полимерной цепи. Удельная активность ферментов внутри РИСомы не изменялась в течение 24 ч [112].

Увеличение уровня L-гомоцистеина (L-Hcy) в сыворотке крови связано с общим риском развития онкологических заболеваний и заболеваний сердца [113]. Замена остатка глутамина 349 на серин (Q349S), аланин (Q349A), аспарагин (Q349N) в *P. putida* МГЛ приводила к сохранению или увеличению активности фермента в реакциях γ -элиминирования субстратов L-метионина и L-Hcy. Мутантная форма Q349S катализировала реакцию γ -элиминирования L-Hcy со скоростью в 1,5 раза выше, по сравнению с ферментом дикого типа. Скорость реакции γ -элиминирования L-метионина для этой мутантной формы была в 0,7 раз ниже по сравнению с диким типом. Замена остатка глутамина 349 на аланин (Q349A) в МГЛ приводила к увеличению скорости катализа реакции β -элиминирования. Эти данные позволяют предположить, что Q349S можно использовать для определения концентрации L-Hcy.[114]. Замена остатка глутамина 349 на аргинин (Q349R) или лизин (Q349K) приводила к потере активности фермента в реакциях γ -элиминирования и β -элиминирования субстратов. По данным рентгеноструктурного анализа, полученным для МГЛ дикого типа, Q349 расположен рядом с остатком Arg375, который взаимодействует с карбоксильной группой субстрата. Замена остатка глутамина на аминокислоты с длинной боковой цепью нарушает это взаимодействие и влияет на связывание субстрата в активном центре фермента [114].

Для повышения эффективности катализа реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина были получены мутантные формы *S. freundii* МГЛ с заменами цистеина 115 на аланин (C115A МГЛ) или гистидин (C115H МГЛ) [115]. Мутантная форма C115H МГЛ не катализировала реакцию γ -элиминирования L-метионина. Однако,

эффективность катализа реакции β -элиминирования увеличилась. Отмечалось снижение значений k_{cat} и K_M мутантного фермента C115H МГЛ в реакции β -элиминирования метиина и аллиина по сравнению с ферментом дикого типа МГЛ. K_{cat} для этиина была на порядок выше, чем у фермента дикого типа, однако каталитическая эффективность для этиина оставалась почти такой же из-за высокого значения K_M . Эффективность катализа C115A МГЛ реакции β -элиминирования сульфоксидов S-замещённого L-цистеина оказалась значительно ниже по сравнению с ферментом C115H МГЛ [115].

1.3. Сульфоксиды — пролекарственный компонент фармакологической пары

1.3.1. Сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина у разных видов растений рода *Allium*

Чеснок (*Allium sativum*) является одним из растений, обладающих противомикробными, противовирусными, противоопухолевыми и антимуtagenными свойствами [116]–[118]. Чеснок даже в малых количествах оказывает антибактериальное действие на грамотрицательную бактерию *Helicobacter pylori* и применяется для профилактики как язвенной болезни, так и рака желудка [119] [120].

Это растение считали лечебным в Древнем Египте и Индии и использовали для терапии многих заболеваний. Несмотря на давнее использование чеснока в лекарственных целях, современная медицина каждый день открывает всё новые и новые лечебные свойства этого растения. В зубчиках чеснока содержатся фитонциды, которые под действием специфического фермента расщепляются на (диалкил/диаллил) тиосульфидаты, аммиак и пируват [121] [122].

Диаллилтиосульфат (аллицин), наиболее хорошо изученный серосодержащий компонент чеснока, образует много соединений вторичного метаболизма в желудочном соке, таких как аджоены, диоксид серы, диаллилсульфид (DAS), диаллилтрисульфид (DATS) и диаллилдисульфид (DADS) [123]. Эти вещества показали противовоспалительную, антидиабетическую, антигипертензивную, противогрибковую, противовирусную, антибактериальную и противоопухолевую активность.

Органосернистые соединения в *Alliums* подразделяются на две основные группы: (1) маслорастворимые полисульфиды; (2) водорастворимые тиосульфаты. Помимо сульфоксида S-аллил-L-цистеин (аллиин), в тканях чеснока и лука обнаружены сульфоксид S-метил-L-цистеина (метиин), S-пропил-L-цистеина (пропиин) и S-транс-1-пропенил-L-цистеина. Интересно, что лук (*Allium cepa*) не может продуцировать аллиин, но синтезирует его изомер изоаллиин [транс-S-(1-пропенил)-1-цистеинсульфоксид] [122].

Водорастворимые тиосульфаты представлены следующими группами: (1) симметричные тиосульфаты, которые образуются в результате конденсации двух молекул сульфеновой кислоты, имеющих одну и ту же алк(ен)ильную группу, или (2) асимметричные тиосульфаты, которые образуются в результате конденсации двух разных молекул сульфеновой кислоты.

Аллииназа [ЕС 4.4.1.4] — пиридоксаль-5'фосфат-зависимый гликопротеиновый фермент, который присутствует во всех видах *Allium* и катализирует реакцию β -элиминирования сульфоксидов S-алк(-ен)ил-L-цистеина с образованием пирувата, сульфеновых кислот и аммиака [124]. В тканях чеснока аллииназа находится во внутриклеточных вакуолях, а сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина находятся в цитоплазме [125]. При

нарушении целостности ткани происходит взаимодействие содержимого вакуоли и цитоплазмы, что способствует ферментативному расщеплению соответствующих сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина. Сульфеновые кислоты, полученные в результате этого каталитического процесса, конденсируются с образованием тиосульфидов (схема 2) [126].



Схема 2. Аллииназа расщепляет сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина с образованием сульфеновой кислоты, которая самопроизвольно конденсируется с образованием тиосульфидов

1.3.2. Фармакологические свойства аллицина

Аллицин является наиболее известным противоопухолевым и антибактериальным компонентом чеснока, и составляет примерно 70% от общего количества тиосульфидов, образующихся в реакции β-элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина, катализируемой аллииназой [127] [128].

Было показано, что аллицин проявляет антимикробную активность широкого спектра действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая мультирезистентные микроорганизмы. Антимикробная активность аллицина проявляется за счёт

модификации S-аллил-меркапто-тиолсодержащих белков в бактериях, индуцируя агрегацию белков, снижая уровень глутатиона, и инактивируя важнейшие ферменты. Пары аллицина проявляют антимикробную активность в отношении патогенных бактерий дыхательных путей [127]. Кроме того, показано, что местное лечение аллицином улучшает течение кожной инфекции, вызванной устойчивым к метициллину *Staphylococcus aureus*. Также было показано, что аллицин обладает антипаразитарной, противовирусной и противогрибковой активностью [129].

Разнообразные биологические эффекты аллицина могут объясняться его способностью модифицировать SH-группы белков посредством реакций тиол-дисульфидного обмена, а также его антиоксидантными свойствами, связанными с нейтрализацией H_2O_2 или изменением окислительно-восстановительных свойств Fe^{2+} [130] [131]. Взаимодействие аллицина с цистеином приводит к образованию производных S-аллила, которые можно рассматривать как общий сульфгидрильный реагент.

Клетки млекопитающих в некоторой степени защищены от вредного воздействия аллицина, поскольку присутствие внутриклеточного глутатиона нейтрализует активность аллицина. С другой стороны, эффект аллицина на многие микробные клетки оказывается критическим и, следовательно, весьма полезным для хозяина [136].

Противоопухолевая активность аллицина продемонстрирована в отношении различных типов опухолей (лейкозов, лимфомы, холангиокарциномы, опухолей желудка, печени, молочной железы, лёгкого, предстательной железы, почек, толстой кишки, эндометрия, шейки матки и мочевого пузыря) [120], [132]–[142]. Противораковые эффекты аллицина могут быть обусловлены различными механизмами: (1) защитой от повреждения ДНК, (2) индукцией гибели клеток, (3) ингибированием

клеточной пролиферации и (4) блокированием ангиогенеза и образования метастазов [143].

Хотя многие исследования показали способность аллицина индуцировать апоптоз, точные молекулярные механизмы ингибирования роста опухоли аллицином были неизвестны. Однако существует достаточно доказательств того, что ингибирующий эффект аллицина на рост опухолей тесно связан с многочисленными мишенями остановки клеточного цикла в фазе G₂/M и апоптоза. Аллицин представляет собой жирорастворимую молекулу, которая легко проникает через биомембраны и быстро реагирует с тиоловыми группами белков в опухолевых клетках. Он также снижает потенциал внешней митохондриальной мембраны, что приводит к высвобождению сигнальных факторов и индуцирует синтез про- и антиапоптотических белков. Митохондриальный апоптоз сопровождается различными клеточными изменениями, включая (1) увеличение соотношения проапоптотического белка (Bax) и антиапоптотического белка (Bcl-2), (2) стимуляцию высвобождения цитохрома C из митохондрий в цитоплазму через индукцию фактора апоптоза и некроза опухоли (TNF1 и Fas-путь), и (3) активацию фактора активации апоптотической протеазы 1 (Araf-1), фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназы P38 (МАРК), активацию C-Jun N-терминальной киназы (JNK), протеинкиназы А (РКА), апоптоза индуцирующего фактора (AIF), и индукцию выработки активных форм кислорода (АФК), каспазы-9, каспазы-3 и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP). Аллицин также ингибирует множество мишеней, включая циклины B, D, E и NF- κ B (схема 3) [145]-[156].

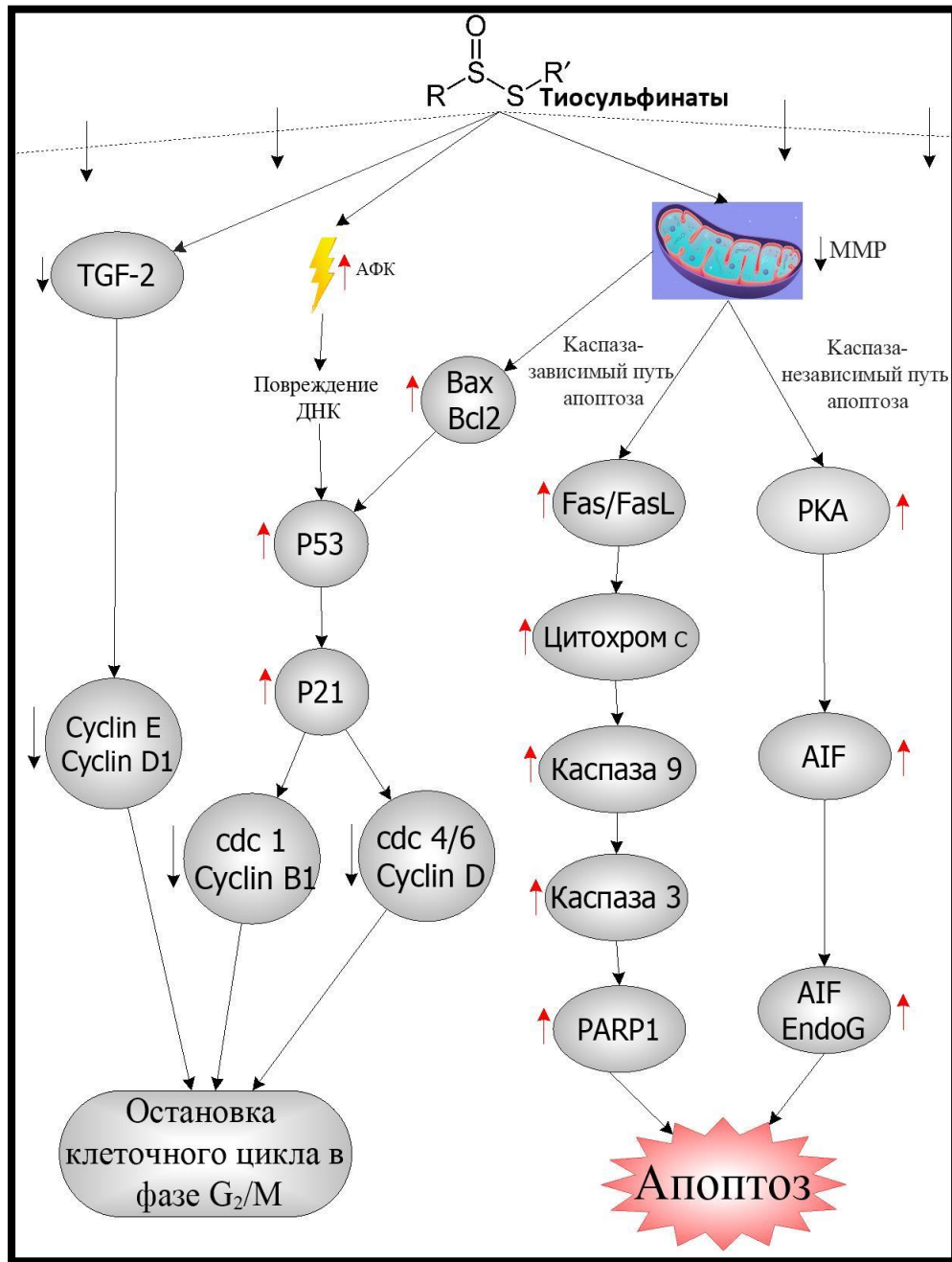


Схема 3. Механизм индукции апоптоза опухолевых клеток под действием тиосульфидов. Сокращение: PKA — протеинкиназы A; AIF — апоптоз индуцирующий фактор; АФК — активные формы кислорода; PARP — поли(АДФ-рибоза)-полимеразы; TGF-2 — трансформирующий фактор роста; EndoG — эндонуклеаза G; Fas — фактор некроза опухоли; и MMP — митохондриальный мембранный потенциал

Таким образом аллицин перспективен как потенциальный антипролиферативный агент, однако его использование в медицине лимитировано высокой реакционной способностью и нестабильностью в кровотоке. Способность аллииназы катализировать реакции β -элиминирования аллиина для образования аллицина позволяет применить концепцию пролекарства для разработки нового противоопухолевого препарата с использованием аллиина и других тиосульфидов в качестве пролекарства и локального источника тиосульфидов *in situ* [144] [145].

Инкубация клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы (MIA PaCa-2) с конъюгированным с антителом к белкам CA19-9 ферментом (аллииназой), с последующим введением свободного субстрата (аллиина), приводит к образованию аллицина *in situ*. Аллицин индуцировал экспрессию каспазы-3, фрагментацию ДНК, остановку клеточного цикла, экспрессию ингибитора циклин-зависимой киназы p21^{Waf1/Cip1}, образование АФК, истощение глутатиона и приводил к различным эпигенетическим модификациям и стимуляции апоптоза. Цитотоксическая активность фармакологической пары была продемонстрирована только на CA19-9-положительных опухолевых клетках поджелудочной железы MIA-PaCa2. Для клеточных линий, которые не экспрессировали антиген CA19-9 (рак яичника человека (OAW42), фибробласты человека (HDF), рак печени (HepG2), рак молочной железы (MCF-7) и рак предстательной железы (PC3)), цитотоксического действия фармакологической пары не наблюдалось [146].

Использование фармакологической пары [аллииназа-антитела к ErbB2 + аллиин] для направленной доставки препаратов к белкам, экспрессирующим рецепторы ErbB2, приводило к уменьшению объема опухолевой массы на модели подкожных ксенографтов рака желудка (NCI-N87). При этом другие ткани в организме благодаря инертной природе

аллиина и высокой скорости клиренса аллицина существенно не страдали. Максимальный противоопухолевый эффект был достигнут через 2 нед после начала лечения фармакологической парой. Через десять дней после окончания лечения ингибирование роста опухоли оставалось прежним. На ErbB2-отрицательных клетках 32D (гемопоэтических клеток-предшественников), используемых в качестве контроля, противоопухолевого эффекта при лечении фармакологической парой не наблюдалось [147].

Аналогичная стратегия была применена для направленной доставки препаратов к клеткам рака яичников человека при помощи природного изофлавона (дайдзеина). На моделях ксенографтов рака яичника показана колокализация конъюгата с опухолевыми клетками и оценена терапевтическая эффективность фармакологической пары [148]. Конъюгат аллииназа-дайдзеин связывался с рецепторами эстрогенов на поверхности экспрессирующих эти рецепторы опухолевых клеток. Фармакологическая пара [аллииназа-дайдзеин + аллиин] оказывала цитотоксическое действие на клеточные линии рака яичников (ES-2, MLS, и OVCAR3). Конъюгаты аллииназа-дайдзеин в отсутствие субстрата — аллиина не оказывали цитотоксического действия даже при самых высоких исследованных концентрациях на все тестируемые клетки *in vitro*. Клетки COLO 357 оказались нечувствительными к терапии фармакологической парой из-за отсутствия рецепторов, способных связывать дайдзеин [148].

Для терапии В-клеточных злокачественных новообразований был разработан новый подход с использованием аллииназы, конъюгированной с моноклональным антителом ритуксимаб, которое распознавало антиген CD20. В этом исследовании фармакологическая пара [аллииназа-ритуксимаб + аллиин] была протестирована на разных линиях лимфомы *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*. На двух клеточных линиях лимфомы (MCL and EBV)

in vivo и *in vitro*, и пяти образцах моноклеарных клеток периферической крови В-CLL пациентов (РВМС) *ex vivo*, фармакологическая пара [аллииназа-ритуксимаб + аллиин] способствовала гибели клеток, в то время как на CD20-отрицательных клетках (нейробластома (LAN-1) и нормальных Т-клетках не было обнаружено никакого эффекта [149].

Использование аллицина, образующегося *in situ* с помощью фармакологических пар [конъюгированная с антителом аллииназа + аллиин], имеет ряд преимуществ: (1) низкая токсичность аллиина и удобство его перорального приема человеком; (2) специфическая и высокая противоопухолевая активность аллицина, непрерывно продуцируемого *in situ*; (3) образование аллицина непосредственно у опухолевой клетки в сочетании с его короткой продолжительностью жизни в организме; и (4) превращение избытка аллицина в полезные производные, такие как аллилмеркаптоцистеин и аллилмеркаптоглутатион, обладающие антиоксидантной и SH-модифицирующей активностью.

Таким образом, аллииназа и аллиин являются перспективной фармакологической парой для лечения опухолевых новообразований *in situ*.

1.3.3. Фармакологические пары [С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина]

Для увеличения субстратной специфичности в реакции β -элиминирования L-цистеина и его аналогов была получена мутантная форма *C. freundii* МГЛ с заменой цистеина 115 на гистидин. Эта замена приводила к потере способности фермента к γ -элиминированию физиологического субстрата L-метионина при сохранении каталитической эффективности С115Н МГЛ в реакции β -элиминирования типичных субстратов фермента дикого типа. Показано, что С115Н МГЛ катализировала реакцию β -элиминирования сульфоксидов S-алк(-ен)ил-L-цистеина с более высокой каталитической эффективностью по сравнению с МГЛ дикого типа. Замена цистеина

115 на гистидин способствовала получению более эффективного фермента для получения тиосульфидов [154].

Антибактериальная активность фармакологических пар [*C. freundii* С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] была показана против нескольких грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий. Диаметры зон ингибирования [С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] соответствовали диаметрам зон ингибирования клинически эффективных антибиотиков (ампициллина или канамицина) в отношении *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Staphylococcus aureus* [175]. Также было показано, что антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий обладают тиосульфиды, образующиеся из фармакологических пар [*C. sporogenes* С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] в *in situ* [150].

Инкапсулирование в полимерные везикулы (РКСомы) С115Н МГЛ продлевает его время полужизни до 42 ч по сравнению с пэгелированным ферментом (3 ч). Показано, что фармакологические пары [С115Н МГЛ-РКСомы + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] *in vitro* оказывают сравнимую антибактериальную активность с фармакологическими парами, где в качестве ферментной составляющей используется неинкапсулированный фермент [112].

Лечение экспериментального сепсиса, вызванного полирезистентными штаммами *P. aeruginosa* 203-2, фармакологической парой с инкапсулированной в полиионные везикулы МГЛ [С115Н МГЛ-РКСомы + метиин], приводило к полному выздоровлению животных. Фармакологические пары, содержащие неинкапсулированную МГЛ [С115Н МГЛ + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина], не показали выраженного антибактериального эффекта по сравнению с парами, содержащими инкапсулированную С115Н МГЛ. Показано, что инкапсулирование

фермента в полиионные везикулы пролонгирует его время полужизни в кровотоке. Фармакологическая пара с ферментом, инкапсулированным в полиионные везикулы [С115Н МГЛ-РІСсомы + метиин] перспективна для разработки антибактериальных препаратов с новым механизмом действия против штамма *P. aeruginosa* 203-2 [151].

Учитывая вышеизложенные характеристики мутантного фермента С115Н МГЛ, потенциала дайдезина как средства адресной доставки молекул к клеткам, несущим определенные мембранные рецепторы, а также высокой цитотоксической активностью тиосульфидов, целью настоящего исследования стало изучение механизма действия и антипролиферативной активности фармакологических пар, включающих С115Н МГЛ и пролекарства, превращающиеся под действием фермента в цитотоксичные тиосульфиды.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Изученные противоопухолевые агенты

В работе использовали мутантную форму *S. novyi* C115H МГЛ с удельной активностью 28 ЕД/мг, полученную и выделенную в ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта». Сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина и дайдзеин-NHS были синтезированы в ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» по методу [152]–[154].

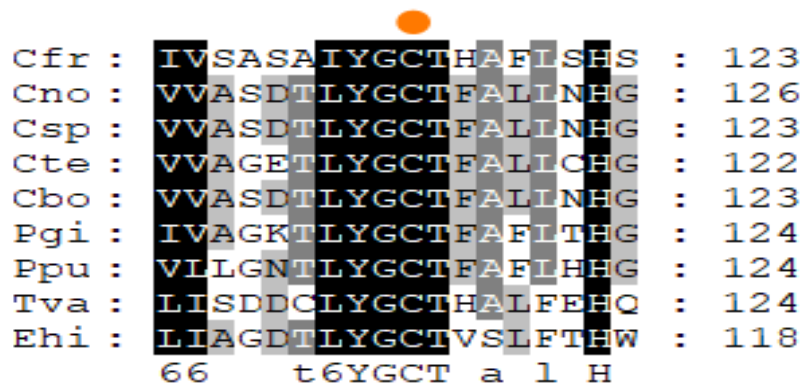
2.2. Реактивы

Плазмида с геном *S. novyi* C115H МГЛ была создана компанией «Евроген», Россия. S-метил-L-цистеин, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH) и бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) были получены в Sigma-Aldrich, Германия. 2-Нитро-5-тиобензоат (NTB) получали согласно [155]. L-глутамин, пиридоксаль-5'-фосфат (ПФ) и D,L-дитиотреитол (ДТТ) были приобретены у компании Serva, Германия. Сульфоксиды S-алк(-ен)ил-L-цистеина (S-метил-L-цистеин сульфоксид (метиин), S-этил-L-цистеин сульфоксид (этиин), S-пропил-L-цистеин сульфоксид (пропиин), S-аллил-L-цистеин сульфоксид (аллиин)) были получены, как описано ранее [153], [154]. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) была приобретена у фирмы GE Healthcare. Использована фетальная бычья сыворотка HyClone, США.; акриламид, N'N'-метиленбисакриламид, SDS, сток AA, персульфат аммония (ПСА), Трис, TEMED, EDTA, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl (Serva, Германия). Кумасси, компетентные клетки *E. coli*, канамицин, среда LB, MgSO_4 , раствор 50*5052 (глицерин, D-глюкоза, L-лактоза, H_2O), 20*NPS (H_2O , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2HPO_4), LDH, протаминсульфат, 2,4-

динитрофенилгидразин) (Sigma-Aldrich Germany). Триптон, дрожжевой экстракт, L-метионин (Fluka, Швейцария), бакто-агар («Ferak», Германия). Использованы Muse® Cell Cycle Assay kit (MCH100106), Muse® caspase 3/7 kit (MCH100108 (Merck, Германия).

2.3. Аминокислотная последовательность рекомбинатных МГЛ *Clostridiaceae*

Выравнивание известных аминокислотных последовательностей ферментов структурного подкласса цистатионин-β-лиаз показало, что остаток цистеина 115 (нумерация согласно аминокислотной последовательности МГЛ из *C. freundii*) высоко консервативен для метионин-γ-лиаз из разных микроорганизмов [79]. В семействе патогенных бактерий *Clostridiaceae* этот остаток занимает положение 114 для *C. tetani*, 115 для *C. sporogenes* и *C. botulinum*, 118 для *C. novyi* (рис. 3). В настоящей работе название мутантной формы фермента приведено согласно референтному *C. freundii* МГЛ.



```

Cfr : IVSASAIYGCTHAFLSHS : 123
Cno : VVASDTLYGCTFALLNHG : 126
Csp : VVASDTLYGCTFALLNHG : 123
Cte : VVAGETLYGCTFALLCHG : 122
Cbo : VVASDTLYGCTFALLNHG : 123
Pgi : IVAGKTLYGCTFAFLTHG : 124
Ppu : VILGNTLYGCTFAFLHNG : 124
Tva : LISDDCLYGCTHALFEHQ : 124
Ehi : LIAGDTLYGCTVSLFTHW : 118
66      t6YGCT a l H
  
```

Рис. 3. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей МГЛ из Cfr — *C. freundii* (Q84AR1), Cno — *C. novyi* (ABK61237), Csp — *C. sporogenes* (J7TA22), Cte — *C. tetani* (Q890V5), Cbo — *C. botulinum* (B1L1M5), Pgi — *P. gingivalis* (F5XBR2), Ppu — *P. putida* (P13254), Tva — *T. vaginalis* (O15565), Ehi — *E. histolytica* (Q86D28). Позиция цистеина помечена оранжевым кружком сверху выравнивания

2.4. Выделение и очистка *C. novyi* C115H метионин- γ -лиазы

2.4.1. Трансформация клеток *E. coli* BL21 плазмидой, содержащей ген C115H МГЛ

Плазмиду pET28a с геном мутантной формы C115H МГЛ из *C. novyi* (100 нг в 1 мкл) добавляли к компетентным клеткам *E. coli* BL21/DE3, инкубировали на льду 20 мин, затем инкубировали 1 мин при 42°C и снова помещали на лед на 10 мин, далее к клеткам добавляли 1 мл среды LB и помещали в качалку на 1 ч при 37°C со скоростью перемешивания 180 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 2000 об/мин. Рассеивали осадок на чашки Петри, содержащие 25 мл агара и канамицин 3%.

2.4.2. Выращивание биомассы

Биомассу выращивали на «индуцирующей» среде: 925 мл ZY среды (5 г дрожжевого экстракта, 10 г триптона, 925 мл дистиллированной воды), с добавлением 1 мл 1М MgSO₄, 20 мл 50×5052 среды (25 г глюкозы, 250 г глицерина, 100 г лактозы, 730 мл дистиллированной воды), 50 мл 20×NPS среды (66 г. (NH₄)₂SO₄, 142 г (Na₂HPO₄), 136 г KH₂PO₄, 900 мл дистиллированной воды). В качестве антибиотика использовали канамицин (30 мг/л). Выращивание клеток проводили при 37°C с перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием (5000 об/мин) при 4°C и хранили при -20°C. Из 1 л среды в среднем получали около 2 г клеточной массы.

Клетки ресуспендировали в рабочем буфере (0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 мМ ПФ, 1мМ ДТТ (дитиотреитол) и 1мМ ЭДТА). Далее клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (15–20 кГц) при охлаждении в бане до 4°C в течение 2–3 мин до получения однородного светло-желтого раствора. Затем раствор центрифугировали в

течение 30 мин при 10000 об/мин. Супернатант собирали и охлаждали до 4–6°C. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по методу Warburg and Christian [156].

Белок рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{белка}} [\text{мг/мл}] = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260},$$

где A_{260} и A_{280} — поглощение при длинах воли 260 и 280 нм.

2.4.3. Определение активности С115Н МГЛ

Удельную активность мутантной формы фермента определяли в реакции β-элиминирования, используя в качестве субстрата S-метил-L-цистеин. Измеряли скорость образования пирувата в сопряжённой реакции с лактатдегидрогеназой при 30°C по снижению поглощения NADH при 340 нм ($\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Реакционная смесь в кювете содержала 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 8,0, содержащего 0,1 мМ ПФ, 1 мМ дитиотреитола (ДТТ), 30 мМ NADH, 10 единиц лактатдегидрогеназы и 100 мМ S-метил-L-цистеина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1,0 мкм/мин пирувата. Удельную активность белка определяли по формуле:

$$\text{Удельная активность [ед/мг]} = (\text{slope } 340_{\text{нм}} / (6,22 \times C_{\text{белка}} \times V_{\text{вносимого белка}})) \times 1000,$$

где 6,22 — коэффициент молярной экстинкции NADH при 340 нм.

2.4.4. Осаждение нуклеиновых кислот

Осаждение нуклеиновых кислот в супернатанте проводили протаминсульфатом (2%), белок разводили рабочим буферным раствором до 10 мг/мл и при комнатной температуре добавляли протаминсульфат и перемешивали в течение 30 мин (протаминсульфат предварительно

растворяли в рабочем буферном растворе и вносили его по каплям). После внесения всего рассчитанного протаминасульфата смесь оставляли в темном месте при 4°С на ночь. Далее суспензию центрифугировали в течение 30 мин при 4°С при 10000 об/мин.

2.4.5. Хроматография на ДЕАЕ-сефарозе

Для очистки фермента колонку, заполненную ДЕАЕ-сефарозой, промывали дистиллированной водой, в объеме, в 10 раз превышающем объем колонки (25 мл) после этого наносили рабочий буфер (100 mM калий-фосфатный буфер, pH 8,0, содержащий 1 mM ДТТ, 0,1 mM ПФ, 1 mM ЭДТА) в 10 раз больше объема колонки. Затем наносили препарат С115Н МГЛ на колонку и ещё раз промывали рабочим буфером. Фермент элюировали ступенчатым градиентом KCl в буфере того же состава, изменяя концентрацию KCl от 0,1 M до 0,5 M. Активные фракции фермента собирали и концентрировали на центриконах (50,000 MWCO). Очищенный белок хранили при -20°С.

2.4.6. Определение концентрации и удельной активности очищенных ферментов

Концентрацию чистого фермента определяли с помощью спектрофотометра, измеряя поглощение при 278 нм и используя коэффициент поглощения 0,1% раствора С115Н МГЛ, рассчитанный, исходя из определения концентрации фермента по методу Лоури. Концентрацию белка в ходе очистки определяли по формуле:

$$C_{\text{белка}} [\text{мг/мл}] = (A_{278}/0,8) \times \text{разведение},$$

где: 0,8 — коэффициент, соответствующий значению поглощения при 278 нм.

Удельная активность очищенных ферментов была определена по реакции β -элиминирования S-метил-L-цистеина. Белок хранили без добавления глицерина при -20°C .

2.4.7. Удаление эндотоксинов из полученных ферментных препаратов

Очистку от эндотоксинов проводили трехкратной обработкой полимером для удаления эндотоксинов (Endotoxin Extractor). Содержание эндотоксинов в полученном препарате определяли при помощи LAL-теста, оно составило 0,065 единиц на 1 мг белка и не превышало допустимых значений. FDA установило максимально допустимый уровень эндотоксинов в рекомбинантных белковых продуктах не более 1 Ед/мг.

2.4.8. Спектральные характеристики C115H МГЛ

Спектры поглощения C115H холофермента снимали на спектрофотометре Cary-50 фирмы "Varian" (США). Измерения проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 8,0. Концентрация фермента составляла 1,4 мг/мл. Содержание пиридоксаль-5'-фосфата в препаратах фермента определяли в 0,1 М NaOH, используя значение молярного коэффициента поглощения ПФ ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) при 390 нм [157].

2.4.9. Определение чистоты выделенного фермента (электрофорез в ПААГ)

Чистоту полученного белка проверяли с помощью ПААГ-SDS-электрофореза по методу Лэмбли. Показано, что молекулярная масса одной субъединицы фермента составляет 43 кДа. Все растворы ПААГ были подготовлены непосредственно для заливки в форезный прибор. Готовили 2 слоя геля: (1) нижний гель (Сток АА, 1М ТРИС- рН 8,8, 10% SDS, H_2O ,

TEMED, и 40% ПСА) и (2) верхний гель (Сток АА, 1М ТРИС- рН 6,8, 10%SDS, H₂O, TEMED, и 40% СПА). Подготовленные образцы наносили в лунки с концентрацией 1мг/10 мл.

Для дальнейшей интерпретации результатов гель окрашивали красителем Кумасси. В качестве стандарта использовали смесь белков с известным молекулярным весом «Sigma».

2.5. Получение и характеристика комплекса *C. novyi* C115H МГЛ с дайдзеином

N-гидроксисукцинимидный эфир 7-(O)-карбоксиметила (дайдзеин-NHS) был синтезирован по методике [152]. Комплекс C115H МГЛ-Dz получали следующим образом: 400 мкл дайдзеин-NHS в диметилформамид (DMФА) смешивали с 400 мг C115H МГЛ (в соотношении 4/1) в 50 мл 0,05 М калий фосфатном буфере-рН 7,0, содержащем 0,1 мМ пиридоксал-5'-фосфата, 1 мМ ДТТ и 10% глицерин, смесь помещали на 4 часа в холодильник при +4°C. Далее C115H МГЛ-Dz диализовали против 0,1 М калий фосфатного буферного раствора, рН 8,0, содержащего 1мМ ДТТ и 0,1 мМ ПФ и 1 мМ ЭДТА. Не связавшиеся молекулы дайдзеина в среде удаляли четырехкратной промывкой рабочим буфером, рН 8,0. Полученные препараты хранили при -20° С.

Концентрация конъюгатов C115H МГЛ-Dz в растворе была рассчитана методом спектрофотометрии при 278 нм с использованием коэффициента поглощения $A_{1\%}^{278} = 0,8$. Удельную активность C115H МГЛ-Dz определяли в реакции β-элиминирования S-метил-L-цистеина.

Для определения количества остатков дайдзеина, связанных с ферментом, использовали методику Эрлангера [158], разработанную для определения связанных остатков стероидов в макромолекулярных стероидных конъюгатах, используя УФ-поглощение дайдзеина при 265 нм

($\varepsilon = 23262 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и поглощение С115Н МГЛ ($\varepsilon = 43000 \text{ Да}$) на той же длине волны.

2.6. Кинетические параметры реакций β -элиминирования конъюгатов С115Н МГЛ-Dz

При определении параметров стационарной кинетики *S. novyi* С115Н МГЛ с дайдзеином в реакции β -элиминирования реакционные смеси содержали 100 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0, 0,1 мМ ПФ, 1мМ ЭДТА, 1мМ ДТТ и варьируемые количества субстратов (сульфоксиды S-метил-L-цистеина или S-алк(-ен)ил-L-цистеина) от 0,1 до 32 мг/мл.

Реакционную смесь в кювете инкубировали в течение 5 мин при 30°C, реакцию инициировали добавлением 0,5 мкг С115Н МГЛ-Dz. Скорость ферментативной реакции определяли по скорости образования пирувата. Параметры стационарной кинетики (K_M , k_{cat}) определяли, применяя программу Enzfitter, с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. В расчетах использовали величину молекулярной массы субъединицы фермента, равную 43 кДа.

Расчет k_{cat} проводили по формуле:

$$K_{cat} = k_{cat} (\text{прибор}) / (\text{коэф} \times [5 \text{ мин} \times 60] \times [\text{мМ белок}]),$$

где: коэф. = 6,22

2.7. Оценка цитотоксичности фармакологических пар С115Н МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил -цистеина *in vitro*

Культуры клеток. Цитотоксическую активность фармакологических пар [С115Н МГЛ-Dz + сульфоксиды (аллиин, метиин, этиин или пропиин)] тестировали *in vitro* на клеточных линиях эмбриональной почки человека НЕК-293, плаценты человека, рака молочной железы MCF7, SRBR3 и T47D, аденокарциномы толстой кишки человека HT29, SW620, COLO205 и

НСТ116, рака поджелудочной железы человека Panc1 и MIA-PaCa2 и рака предстательной железы человека 22Rv1, DU145 и PC3. Клеточные линии были получены из банка лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клеточные культуры культивировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) или RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS (HyClone, UK), 2 mM L-глутамин, и 100 мкг/мл пенициллина, в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂ и 95% влажности).

Клеточные монослойные линии пассировали 3 раза в неделю. Для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор Версена. Рассчитывали IC₅₀.

2.7.1. Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии S-алк(ен)ил-L-цистеина сульфоксидов

Достигшие логарифмической фазы роста клетки пересеивали в 96-луночные микропланшеты с плотностью (5–10)×10³ клеток на лунку и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и концентрации 5% CO₂. Подсчет клеток проводили после обработки раствором трипанового синего (0,4%).

C115H МГЛ-Dz добавляли в двукратных серийных разведениях к преинкубированным клеткам в диапазонах концентраций от 1 до 64 μM и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C.

Не связавшиеся конъюгаты удаляли 3-кратным промыванием клеток культуральной средой DMEM или RPMI 1640 перед добавлением 1 мг/мл разных видов S-алк(ен)ил-L-цистеина сульфоксидов (аллин, этиин, метиин или пропиин).

В качестве контроля использовали клеточную культуру, которую инкубировали в питательной среде и PBS. Уровень клеточного метаболизма

по окончании периода инкубации измеряли при длине волны $\lambda=540$ нм с помощью МТТ-теста [159].

Оптическое поглощение окрашенных растворов формазана в ДМСО измеряли на планшетном спектрофотометре Multiskan MS («Labsystems», Финляндия) при помощи программного обеспечения Skanlt 6.1 RE, Thermo Scientific. Ингибирующую концентрацию, которая вызывала уменьшение количества живых клеток на 50% (IC_{50}), рассчитывали методом нелинейной регрессии.

2.7.2. Цитотоксическая активность дипропилтиосульфидата, образуемого фармакологической парой [С115Н МГЛ + пропиин]

Получение смеси [С115Н МГЛ + пропиин] (Схема 4). Смеси [С115Н МГЛ + пропиин] готовили следующим образом: краствору 0,14 ЕД/мл С115Н МГЛ в 1 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,0, содержащего 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ПФ, добавляли 20 мг пропиин и инкубировали в течение 1ч при 37 °С. Концентрацию образовавшегося дипропилтиосульфидата определяли с NТВ по методике [160].

Чтобы оценить цитотоксичность дипропилтиосульфидата *in vitro*, клетки пересеивали в 96-луночные микропланшеты в количестве $(3-8) \times 10^3$ на 24 ч. К преинкубированным клеткам добавляли смесь [С115Н МГЛ + пропиин] в диапазоне концентраций от 1 до 300 μ М (двукратное серийное разведение) и инкубировали при 37 °С в течение 72 ч. МТТ-тест проводили по методике, описанной в п. 2.6.1.

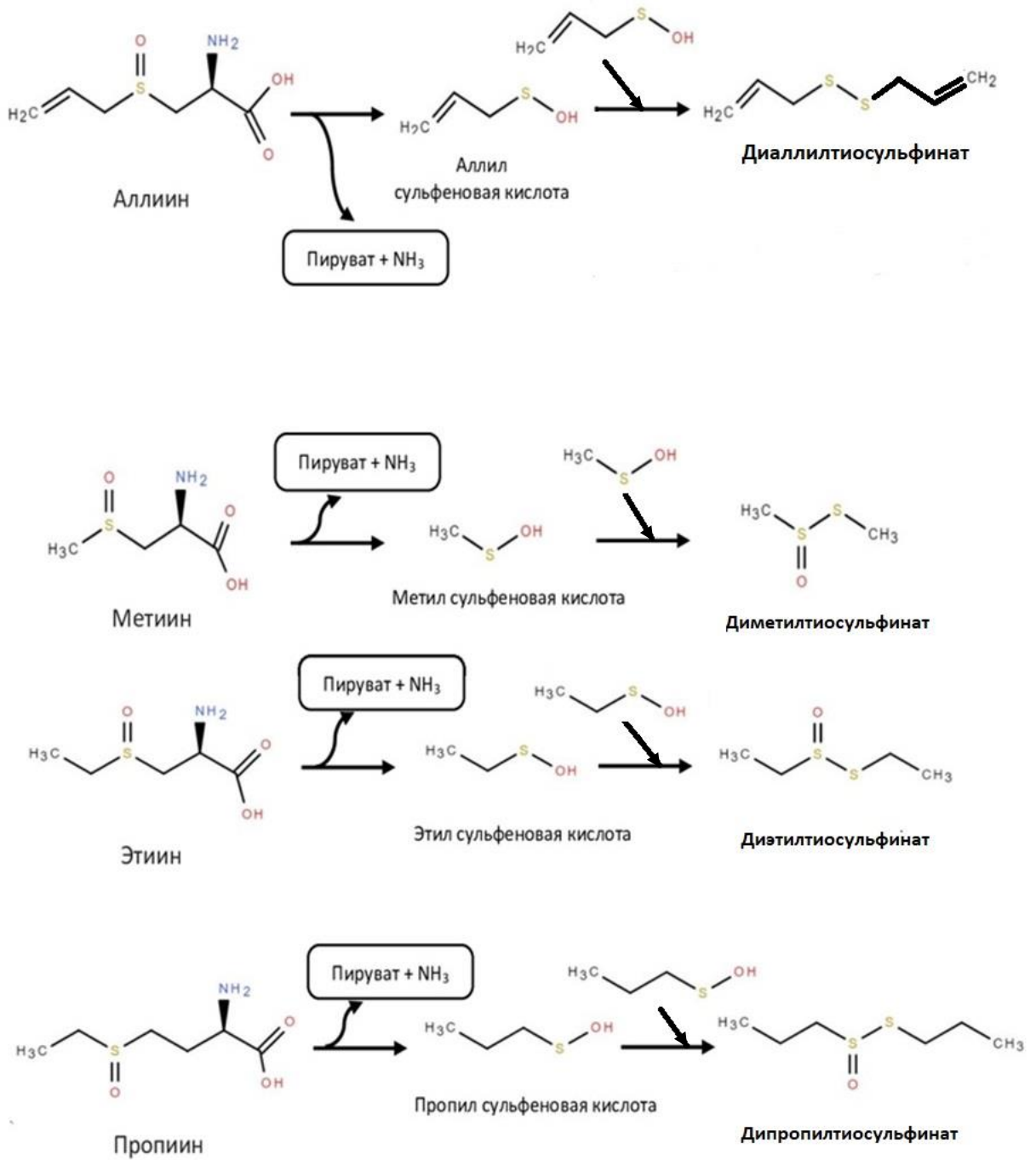


Схема 4. Ферментативное превращение сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в тиосульфиды

2.8. Изучение изменения экспрессии маркеров пролиферации и апоптоза при применении фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропин]

Культуры клеток рака предстательной железы человека линии 22Rv1 пересевали в 6-луночные планшеты с плотностью 6×10^4 клеток на лунку в 3 мл культуральной среды RPMI-1640 (Sigma, USA), содержащей 10% FBS, 100 мкг/мл пенициллина и 2 mM L-глутамин и преинкубировали при 37 °C в атмосфере 5% углекислого газа в течение суток перед добавлением тестируемых конъюгатов C115H МГЛ с дайдзеином в концентрациях (0,1, 0,4, и 0,5 μ M) и инкубировали в течение 30 мин при 5% CO₂ и 37 °C. Не связавшиеся конъюгаты удаляли трехкратным промыванием клеток средой RPMI-1640, затем добавляли пропин в концентрации 1 мг/мл и инкубировали в течение суток. После инкубации собирали взвешенные клетки. Для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор трипсина-ЭДТА 0,05% и осаждали при 1000 rpm в течение 5 мин. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов Muse[®] Caspase-3/7 kit (MCH100108, США) согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали клеточный анализатор Muse[®] Cell Analyzer (Millipore, Germany).

2.9. Изучение изменения клеточного цикла [C115H МГЛ-Dz + пропин]

Влияние тиосульфидов, образующихся из фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропин] *in situ*, на деление клеток линий SKBR3, 22Rv1, и SW620 оценивали по изменению распределения клеток по фазам клеточного цикла. Клетки инкубировали, как указано выше в течение 24 ч. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов

Muse® Cell Cycle Assay Kit согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали Muse® Cell Analyzer, анализируя не менее 2000 клеток в каждой пробе.

2.10. Оценка противоопухолевой эффективности *in vivo*

Животные. Оценку противоопухолевого эффекта фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропин] *in vivo* проводили на перевиваемых ксенографтах человека у иммунодефицитных мышей Balb/c nude. В работе использовали мышей обоего пола Balb/c nude в возрасте 6–10 нед с массой тела не менее 20 г из разведения лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Мышей Balb/c nude содержали в конвенциональном виварии при естественном освещении, регулируемой температуре воздуха (25 °С), с контролируемыми параметрами микроклимата и постоянным доступом к воде и брикетированному корму. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Опухолевые модели. Использовали перевиваемые опухоли мышей из банка опухолевых штаммов лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». В исследовании использовали ксенографты опухолей человека (подкожные гетеротрансплантаты): рака молочной железы SRBR3, аденокарциномы толстой кишки человека HT29 и SW620, рака поджелудочной железы человека Panc1 и MIA-PaCa2 и рака предстательной железы человека 22Rv1. Образцы опухолевых клеток готовили по стандартной методике. Клетки SKBR3, HT29, SW620, Panc1, MIA-PaCa2, и

22Rv1 ($7 \times 10^6 - 10^7$) были имплантированы подкожно (правый и левый бок) билатерально с матригелем (Matrigel™, 1:1).

Дозы и режимы введения препаратов. При достижении среднего объема опухоли $\sim 100 \text{ мм}^3$, мышей распределяли на 4 группы по 5 животных и начинали лечение.

Группа 1 — контроль, PBS в/б в объеме 200 мкл, через 1,5 часа введение 100 мкл PBS внутрь опухоли.

Группа 2 — введение в/б 30 Ед С115Н МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 часа введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS.

Группа 3 — аналогично группе 2, но вместо пропиина вводили PBS.

Группе 4 — вводили неконъюгированную С115Н МГЛ (30 Ед. в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS).

Введение препаратов продолжали с интервалом 24 ч в течение 10 дней. Объем опухоли и массу тела измеряли 2 раза в неделю с помощью электронного штангенциркуля и весов с ценой деления 0,1 г, соответственно. Объем опухоли в каждой временной точке определяли по формуле:

$$\text{Длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times \pi/6 \quad [161].$$

Оценка противоопухолевой активности [С115Н МГЛ-Dz + пропиин] in vivo. Противоопухолевую активность фармакологической пары [С115Н МГЛ-Dz + пропиин] оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и индексу прироста опухоли (ИПО) у экспериментальных животных по сравнению с контролем. ТРО, % оценивали по формуле:

$$\text{ТРО\%} = [(V_c - V_e) / V_c] \times 100\%,$$

где V_c — средний объем опухолей в контрольной группе, V_e — средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

Значимыми считали значения ТРО $\geq 50\%$.

Переносимость лечения в терапевтических экспериментах определяли путём измерения массы тела, оценки состояния и поведения мышей. При аутопсии павших мышей были оценены косвенные симптомы общей токсичности и наличие патологических изменений внутренних органов или гематологической токсичности (по уменьшению массы селезенки).

2.11. Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов эксперимента *in vitro* проводили с помощью пакета GraphPad Prism версии 9,0. Из нелинейной регрессии определяли IC_{50} и коэффициент детерминации модели — R^2 . Количественные данные IC_{50} представлены в виде $M \pm SD$ (среднее арифметическое и стандартное отклонение).

Статистический анализ исследований противоопухолевой активности *in vivo* проводили с использованием SPSS версии 25,0 (IBM, Нью-Йорк). Выявление различий между контрольной группой и каждой лечебной группой выполняли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. На рисунках показаны средние значения с планками погрешностей в виде стандартного отклонения стандартной ошибки средней (SEM). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. Характеристика C115H метионин-γ-лиазы и ее конъюгатов с дайдзеином

3.1. Выделение и очистка *C. novyi* C115H МГЛ

Стадии получения (выделение и очистка) *C. novyi* C115H МГЛ приведены в таблице 1. При помощи хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе были получены образцы C115H МГЛ с высокой степенью чистоты. Потерь ферментативной активности в процессе очистки практически не наблюдали, в то время как удельная активность C115H МГЛ составляла 28,0 ед/мг, что более чем в 3,5 раза превышает значение активности в супенатанте после удаления клеточного дебриса. Элюат с колонки, содержащий C115H МГЛ, концентрировали на центриконах (MWC0 50 кДа).

Таблица 1. Стадии выделения и очистки *C. novyi* C115H МГЛ

Стадия	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, Ед/мг
Озвучивание	23	48,6	-
Осаждение нуклеиновых кислот протаминсульфатом	23	40	8
ДЕАЕ-сефароза	4,5	57,85	28,48
Очистка от эндотоксинов	3,8	59,2	28,7

Определение чистоты и молекулярной массы целевого белка проводили с помощью электрофореза (ПААГ-SDS) по методу Лэммли. На электрофореграмме очищенных *C. novyi* C115H МГЛ выявлялись полосы в области 43 кДа. На рис. 4 представлены результаты (ПААГ-SDS) электрофореза и показано, что ЛПС в итоговых образцах отсутствует.

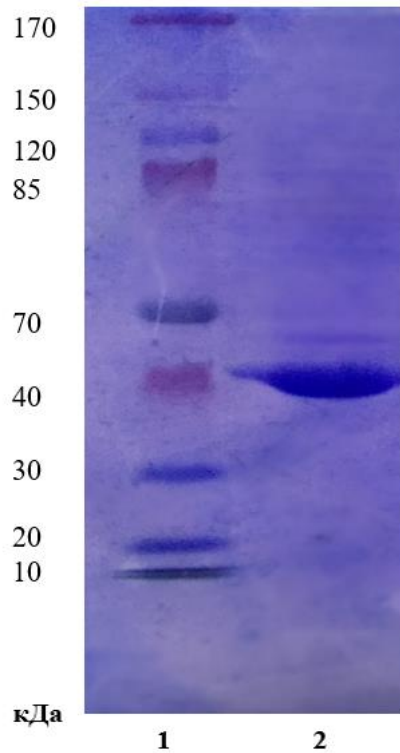


Рис. 4. SDS-ПААГ C115H МГЛ, окраска кумасси. 1 — Маркер молекулярного веса белков Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; 2 — C115H МГЛ после хроматографического этапа очистки

3.2. Спектральные характеристики C115H МГЛ

В спектре поглощения C115H МГЛ имеются максимумы при 330 нм и 420 нм (рис. 5), характерные для ПФ-зависимых ферментов, соответствующие таутомерным формам внутреннего альдимины — енолимину и кетоенамину. Содержание холофермента составило 80,2%.

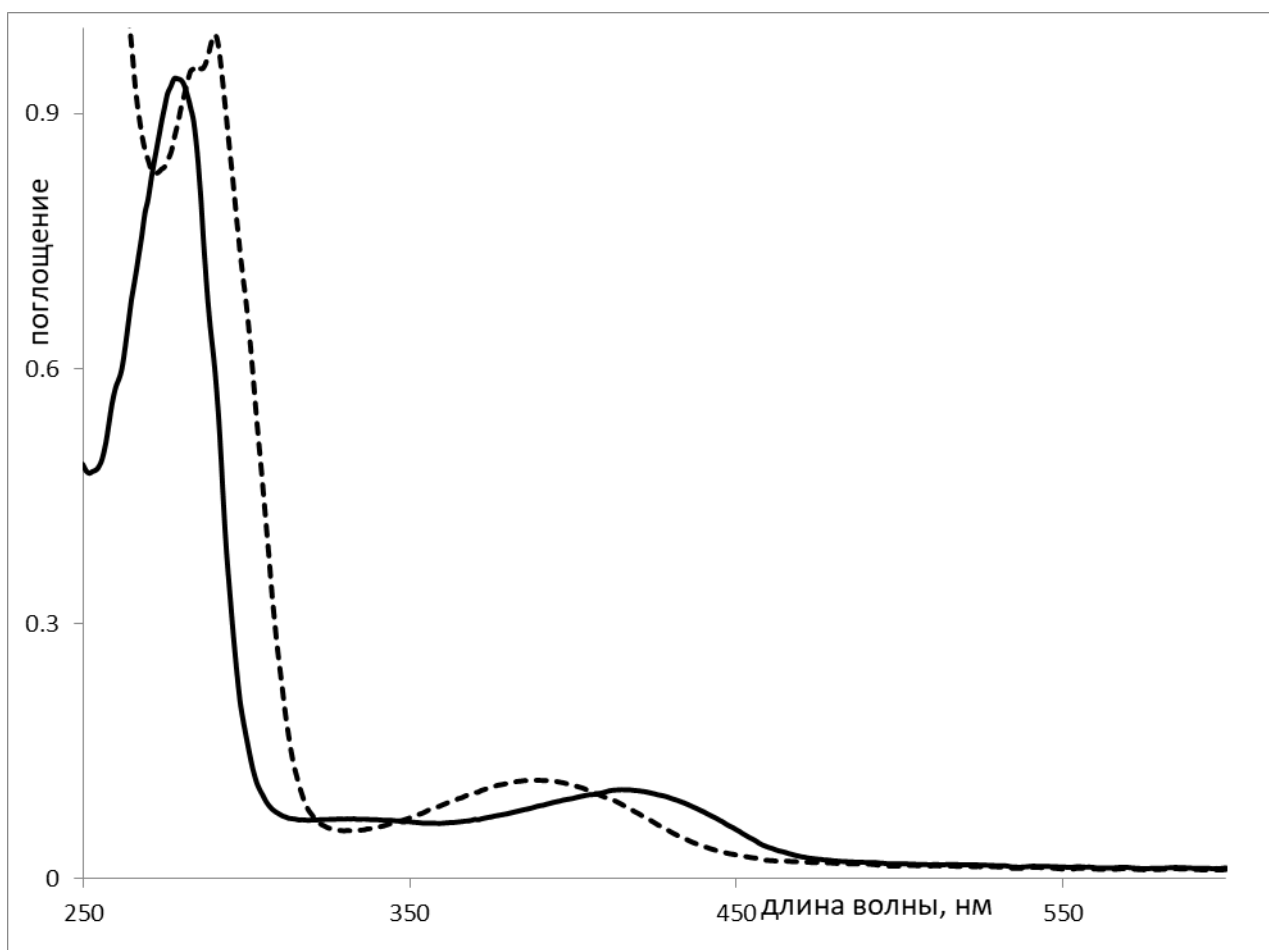


Рис. 5. Спектр поглощения C115H МГЛ в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 8,0 (непрерывная линия) и в 0,1 М NaOH (пунктирная линия)

3.3. Синтез конъюгата *S. novyi* C115H МГЛ с дайдзеином

Удельную активность комплекса C115H МГЛ с дайдзеином определяли методом спектрофотометрии при 340 нм с субстратом *S*-метил-L-цистеином, в результате удельная активность комплекса C115H МГЛ-Dz практически не менялась по сравнению с неконъюгированным ферментом. Количество молекул дайдзеина на молекулу белка составило 1,5.

Каталитическая эффективность конъюгатов C115H МГЛ-Dz и нативных ферментов *S. novyi* C115H МГЛ в реакции β-элиминирования *S*-метил-L-цистеина и сульфоксидов *S*-алк(ен)ил-L-цистеина показана в

табл. 2. Ковалентное связывание С115Н МГЛ с дайдзеином практически не влияло на стационарные параметры реакций β -элиминирования S-метил-L-цистеина и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина. Отмечалось незначительное снижение значений k_{cat} и K_M по сравнению с неконъюгированным ферментом С115Н МГЛ.

Каталитическая эффективность конъюгата в реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была близка к параметрам, определённым для нативного фермента [162].

Таблица 2. Стационарные параметры реакции β -элиминирования S-метил-L-цистеина и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина, катализируемой *C. novyi* С115Н МГЛ и С115Н МГЛ-Dz

	С115Н МГЛ**			С115Н МГЛ-Dz*		
	k_{cat} , s ⁻¹	K_M , mM	k_{cat}/K_M , (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} , s ⁻¹	K_M , mM	k_{cat}/K_M , (M ⁻¹ s ⁻¹)
S-Метил-L-цистеин	29,6	7,87	$3,8 \times 10^3$	20,8	7,1	$2,9 \times 10^3$
Аллиин	26,8	1,01	$2,6 \times 10^4$	17,9	0,65	$2,5 \times 10^4$
Метиин	6,1	1,1	$5,5 \times 10^3$	1,63	0,35	$4,6 \times 10^3$
Пропиин	28	1,63	$1,7 \times 10^4$	16,9	1,02	$1,6 \times 10^4$

* Ошибка не превышала 15%

** Данные [163].

Глава 4. Механизм антипролиферативного действия фармакологической пары C115H метионин-γ-лиазы и ее конъюгатов с дайдзеином с сульфоксидами S-алк(ен)ил-цистеина

4.1. Цитотоксическая активность компонентов фармакологической пары

Антипролиферативный эффект фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] in vitro. Направленная доставка *S. novyi* C115H МГЛ в составе фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина] для образования тиосульфидов в непосредственной близости опухолевых клеток или внутриклеточно может уменьшить токсическое действие тиосульфидов на организм.

Чтобы определить наиболее чувствительные к C115H МГЛ-Dz опухолевые линии в присутствии метиона, этиона, пропиона или аллиина, соответствующие фармакологические пары тестировали на культурах клеток опухолей человека: рака молочной железы MCF7, SRBR3 и T47D, аденокарциномы толстой кишки человека HT29, SW620, COLO205 и HCT116, рака поджелудочной железы человека Panc1 и MIA-PaCa2 и рака предстательной железы человека 22Rv1, DU145 и PC3.

Как продемонстрировано в табл. 3, наибольшей цитотоксической активностью обладает C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиона. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] не оказывала цитотоксического действия на нормальные клетки фибробластов (HEK-293) и плаценты, предположительно из-за отсутствия мембранных рецепторов эстрогенов (GPER1). Клетки MCF7 оказались максимально чувствительны к [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды], IC₅₀ конъюгата в присутствии пропиона составила 0,53 μM. Клетки Panc1 проявляли большую чувствительность к

[C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды], чем клетки 22Rv1 или HT29, со значениями IC_{50} , равными 3,88, 5,4 и 6,9 μM , соответственно. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды] не оказывала цитотоксического действия на клетки рака толстой кишки (SW620 и COLO 205), предположительно из-за отсутствия мембранных рецепторов эстрогенов. Все исследуемые клетки не проявляли чувствительности к [C115H МГЛ-Dz + PBS (без субстратов)] ($IC_{50} \geq 1600 \mu M$).

Таблица 3. Цитотоксическая активность C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(-ен)ил-L-цистеина

		IC_{50} C115H МГЛ-Dz, μM				
Клетки		Аллиин	Метиин	Этиин	Пропиин	Без субстратов
Фибробласты	HEK-293	-	-	-	ND	ND
Плацента	-	-	-	-	ND	ND
Рак молочной железы	MCF7	1,3±0,09	0,4±0,04	0,3±0,03	0,5±0,04	ND
	SKBR3	1,0±0,06	14,5±1,10	0,8±0,05	1,1±0,08	ND
	T-47D	2,1±0,18	2,8±0,23	2,2±0,16	1,9±0,18	ND
Рак толстой кишки	HT29	10,4±1,10	7,5±0,67	9,1±0,81	6,9±0,40	ND
	COLO205	ND	ND	ND	ND	ND
	SW620	ND	ND	ND	ND	ND
Рак поджелудочной железы	Panc1	4,5±0,21	5,7±0,90	5,3±0,10	3,8±0,10	ND
Рак предстательной железы	MIA-PACA2	-	-	-	6,4±0,50	ND
	22Rv1	8,6±0,08	9,8±0,98	9,9±1,20	5,4±0,20	ND
Рак предстательной железы	DU145	-	-	-	17,4±0,90	ND
	PC3	-	-	-	16,9±0,50	ND

Концентрация сульфоксидов 1 мг/мл; ND — не обнаружено;

- — не изучено

Влияние дипропилтиосульфидата на жизнеспособность опухолевых клеток in vitro. Влияние дипропилтиосульфидата, полученного в результате реакции β -элиминирования пропиона, в смеси [C115H МГЛ + пропиин] на жизнеспособность опухолевых клеток тестировали на культурах клеток различных злокачественных новообразований: MCF7, SRBR3 и T47D (рак молочной железы), HT29, SW620, COLO205 и HCT116 (рак толстой кишки), Panc1 и MIA-PaCa2 (рак поджелудочной железы), и 22Rv1, DU145 и PC3 (рак предстательной железы).

Как показано в таблице 4, все клеточные линии были чувствительны к действию дипропилтиосульфидата, IC_{50} варьирует в диапазоне от 15,03 до 66,36 μ M. Клетки MCF7 оказались максимально чувствительны к дипропилтиосульфидату, IC_{50} составило 15,07 μ M. При раке толстой кишки для клеток SW620 показано самое низкое значение IC_{50} (19,20 μ M), что указывает на высокую чувствительность к дипропилтиосульфидату по сравнению с HT29 (IC_{50} = 43,10 μ M), COLO205 (IC_{50} = 48,61 μ M) или HCT 116 (IC_{50} = 43,42 μ M). Среди клеток рака предстательной железы PC3 оказался наиболее чувствительным к действию дипропилтиосульфидата (IC_{50} = 51,20 μ M), значения IC_{50} для клеток DU145 и 22Rv1 равны 60,99 и 66,36 μ M, соответственно.

Дипропилтиосульфидат, полученный из фармакологических пар [C115H МГЛ + пропиин] оказывал цитотоксическое действие не только на разные виды опухолевых клетках, но и на нормальные клетки фибробластов (HEK-293) и плаценты, IC_{50} составило 34,23 и 42,10 μ M, соответственно.

Таблица 4. Цитотоксическая активность дипропилтиосульфидата на моделях различных опухолевых клеток

		[C115H МГЛ+пропин]
		Клетки (дипропилтиосульфидат)
		IC ₅₀ (μM)
Фибробласты	HEK-293	34,23 ± 0,21
Плацента	-	42,10 ± 0,54
Рак молочной железы	MCF7	15,03 ± 0,14
	SKBR3	60,10 ± 0,58
	T47D	51,75 ± 0,55
Аденокарциномы толстой кишки человека	HT-29	43,10 ± 0,47
	COLO205	48,61 ± 0,53
	HCT116	43,42 ± 0,48
	SW620	19,20 ± 0,20
Рак поджелудочной железы человека	Panc1	18,64 ± 0,19
	MIA-PaCa-2	62,62 ± 0,65
Рак предстательной железы человека	22Rv1	66,36 ± 0,69
	DU 145	60,99 ± 0,61
	PC3	51,20 ± 0,54

4.2. Оценка изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, находящихся на стадиях клеточного цикла G₀/G₁, S, G₂/M показал, что при

ко-инкубации с C115H МГЛ-Dz в концентрациях 0,1 и 0,4 μM в присутствии разных видов сульфоксидов клетки предстательной железы 22Rv1 делились более активно (24,7% и 29,9% в фазе G_2/M , соответственно) по сравнению с контрольной группой, где концентрация клеток в этой фазе соответствовала 19,7%, $p < 0,001$ (рис. 6). Аналогичный результат наблюдали после ко-инкубации клеток молочной железы SKBR3, с 0,1 и 0,4 μM [C115H МГЛ-Dz + пропиин]: 14,2% и 18,0% клеток в фазе G_2/M , соответственно (рис. 6). Наблюдали снижение концентрации клеток в состоянии покоя (фаза G_0/G_1): с 60,8% в контрольной группе до 55,7% (0,1 μM [C115H МГЛ-Dz + пропиин]) и 52,3% (0,4 μM [C115H МГЛ-Dz + пропиин]) в клетках 22Rv1 ($p < 0,001$) и с 71,9% в контрольной группе до 66,4% (0,1 μM [C115H МГЛ-Dz + пропиин]) и 62,9% (0,4 μM [C115H МГЛ-Dz + пропиин]) в клетках линии SKBR3 ($p < 0,001$). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, ферментативно образующийся в фармакологической паре [C115H МГЛ-Dz + пропиин], может увеличивать концентрацию клеток в фазе G_2/M .

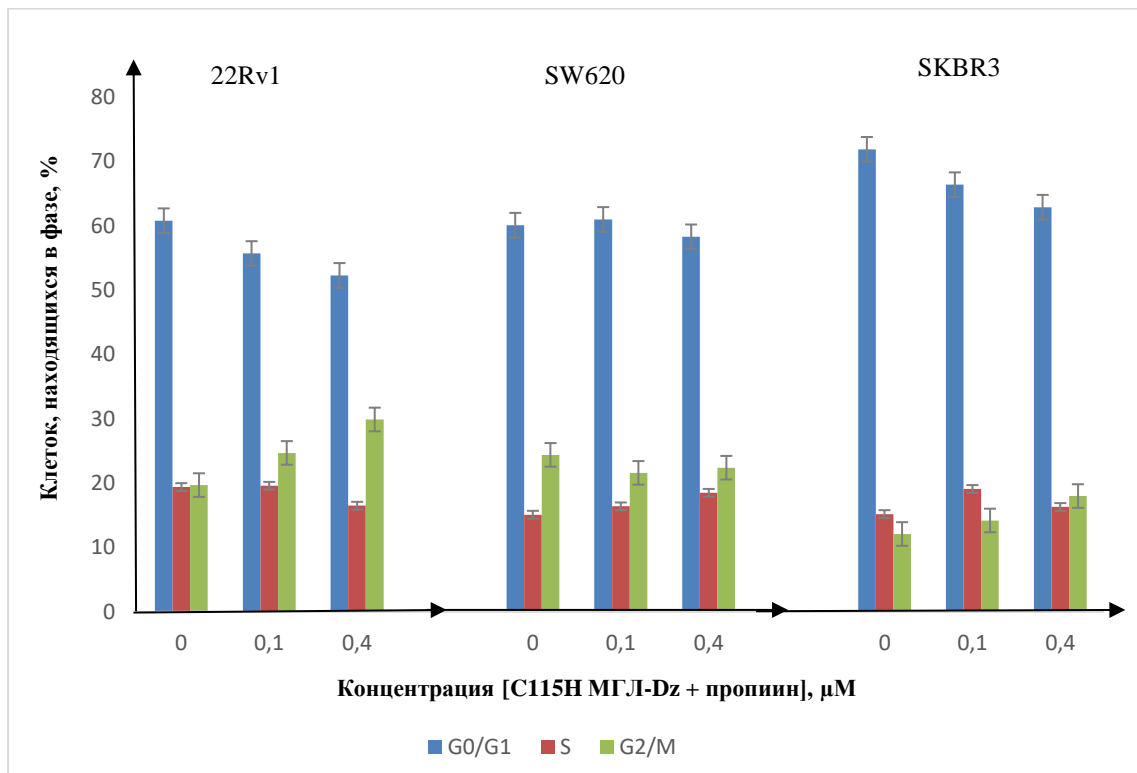


Рис. 6. Распределение клеток по фазам клеточного цикла после ко-инкубации с фармакологической парой [C115H MGL-Dz + пропиин]

4.3. Изучение изменения маркеров апоптоза

Учитывали концентрацию клеток, содержащих в цитоплазме активные каспазы 3/7, с неповрежденной и поврежденной мембраной (ранняя и поздняя фазы апоптоза, соответственно), а также погибших клеток без признаков активации каспаз (некроз или каспаза-независимый апоптоз). Как показано на Рис. 7, применение C115H MGL-Dz в различных концентрациях (0,1, 0,4, и 0,5 μM) в присутствии пропиина (1 мг/мл) приводило к дозозависимому увеличению концентрации клеток в ранней фазе апоптоза (21,22%, 19,56%, и 24,02% в клетках 22Rv1) по сравнению с контролем (<2%; $p < 0,001$). После ко-инкубации с фармакологической парой [C115H MGL-Dz + пропиин] наблюдалось увеличение популяции клеток в поздней стадии апоптоза: с 35,91% до 38,97% на линии клеток 22Rv1. Менее

2% клеточной популяции демонстрировали признаки гибели без активации каспаз во всех протестированных клеточных линиях при инкубации с [C115H МГЛ-Dz + пропиин] ($p < 0,001$). Эти результаты свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, образующийся в результате реакции β -элиминирования пропиина, катализируемой C115H МГЛ-Dz, может индуцировать апоптоз как посредством активации каспаз, так и через альтернативные пути.

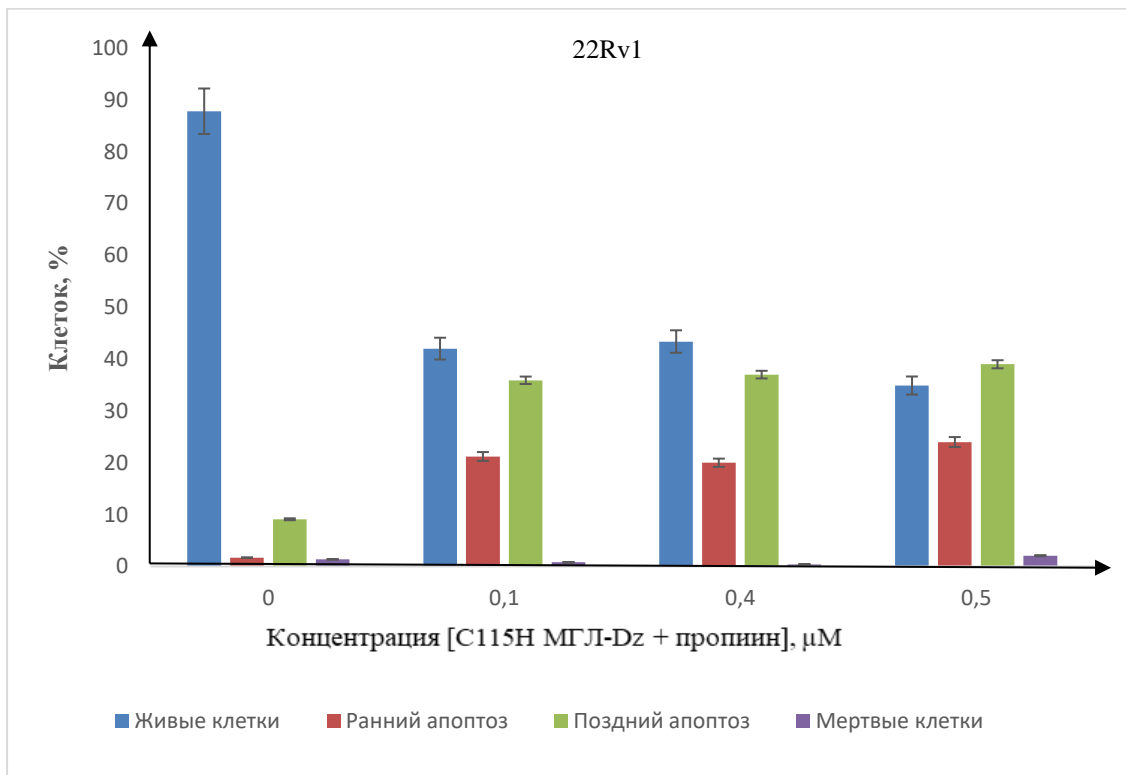


Рис. 7. Активность каспаз 3/7 при индукции апоптоза на клеточных линиях рака предстательной железы (22Rv1)

Глава 5. Изучение противоопухолевого эффекта *in vivo* на подкожных ксенографтах опухолей человека у иммунодефицитных мышей

5.1. Оценка противоопухолевой эффективности *in vivo*

На всех использованных моделях ксенографтов опухолей человека использовали одинаковую схему лечения. Животные в опытных группах получали внутрибрюшинно препарат МГЛ-Dz или МГЛ и спустя 1,5 ч пропиин интратуморально. Контрольная группа получала раствор фосфатно-солевого буфера в эквивалентных объемах. Схема лечения включала ежедневное введение препаратов в течение 10 дней.

5.1.1. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака молочной железы SKBR3

При лечении фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин] у иммунодефицитных мышей с имплантированными клетками SKBR3 наблюдали существенное уменьшение объема опухолей (Рис. 8). К 5-му дню терапии фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин] фиксировали высокий статистически значимый противоопухолевый эффект на уровне ТРО=89% ($p=0,02$). К концу лечения (10 сутки после начала терапии) ингибирующий эффект сохранялся практически на том же уровне и обеспечил ТРО=85,2% ($p=0,04$). Введение фармакологической пары с неконъюгированным ферментом [C115H МГЛ + пропиин], а также замена пропиина на PBS [C115H МГЛ-Dz + PBS] не приводили к биологически значимому торможению роста опухоли (ТРО=27,4%; $p=0,327$ и ТРО=27,8%; $p=0,327$, соответственно).

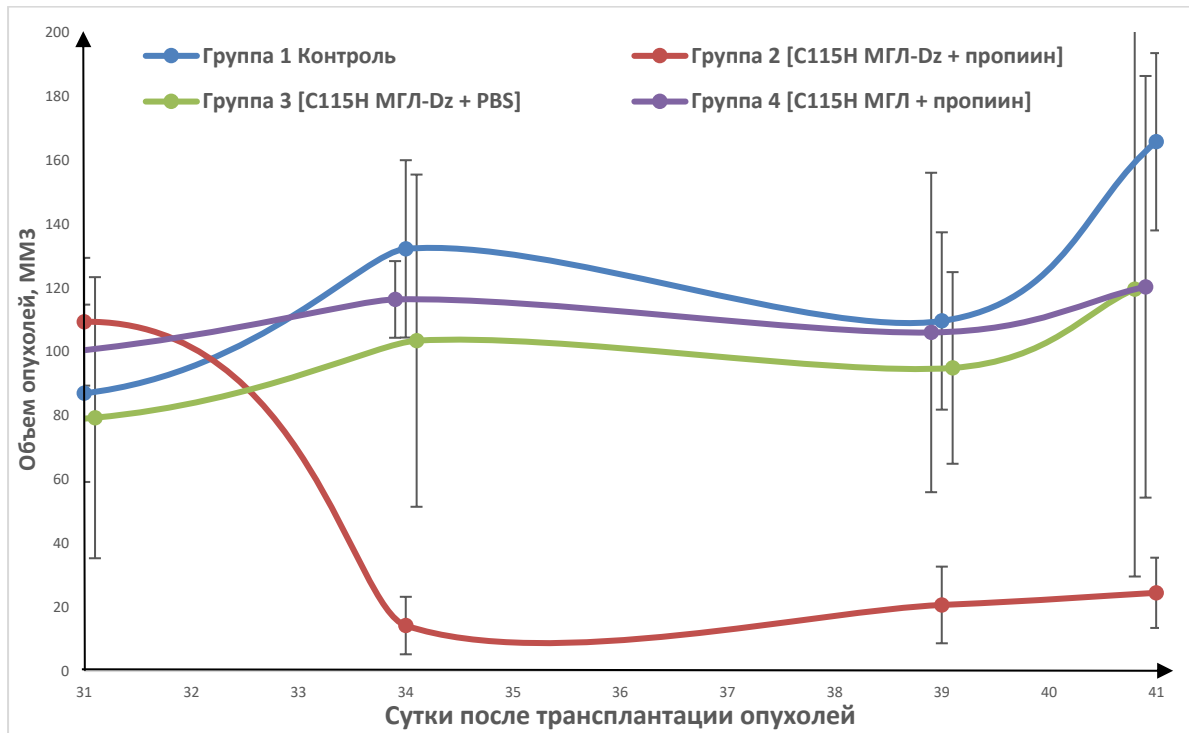


Рис. 8. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] уменьшает объем опухоли *in vivo* на модели рака молочной железы SKBR3 у мышей BALB/c nude

5.1.2. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака поджелудочной железы человека Panc1 и MIA-PaCa2

На модели Panc1 фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] оказывала значительный ингибирующий эффект по сравнению с контролем ТРО=67,5% ($p=0,004$), при этом эффект нарастал в течение всего периода лечения и был максимальным к концу наблюдения (10 сутки после начала лечения) (рис. 9). Введение животным [C115H МГЛ-Dz + PBS] не приводило к достоверному уменьшению объема опухоли по сравнению с контролем ($227,9 \pm 61,2 \text{ мм}^3$; ТРО = 48,5%; $p= 0,160$). Средний объем опухоли достигал $215,7 \pm 34,1 \text{ мм}^3$ (ТРО = 51,3%; $p= 0,462$ против

контрольной группы) в группе неконъюгированной C115H МГЛ с пропином.

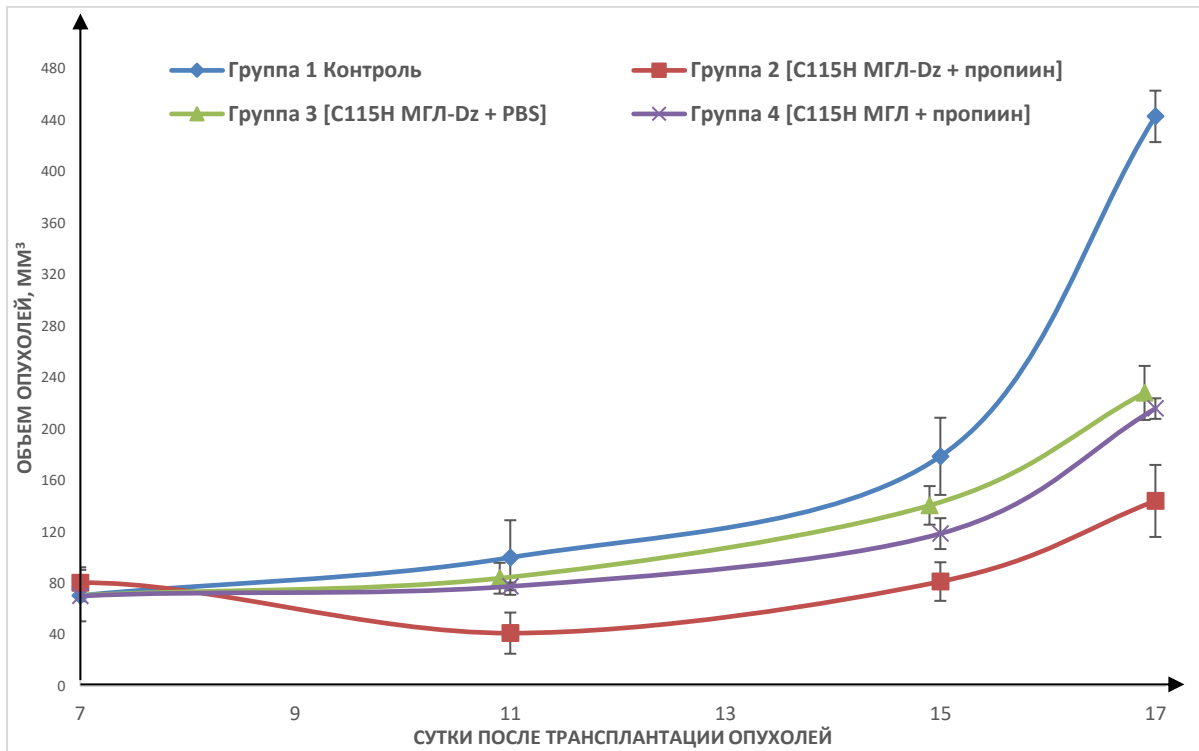


Рис. 9. Противоопухолевая активность фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин], [C115H МГЛ-Dz + PBS], и [C115H МГЛ + пропиин] на модели рака поджелудочной железы человека, Panc1 (n=20, по 5 мышей)

На модели MIA-PaCa-2 начальный объем опухоли у самок Balb/c nude, которым были имплантированы клетки, показан на рис. 10. В последний день лечения средний объем опухоли достиг $274,7 \pm 71,5$ мм³ в контроле, а при введении [C115H МГЛ-Dz + пропиин] значительно уменьшался ($138,4 \pm 44,2$ мм³; ТРО = 50%; $p = 0,011$). Введение мышам фармакологической пары [C115H МГЛ + пропиин] или [C115H МГЛ-Dz + PBS] не приводило к биологически значимому торможению роста опухоли (ТРО = 28,3%; $p = 0,439$ и ТРО = 32%, $p = 0,606$, соответственно) (рис. 10).

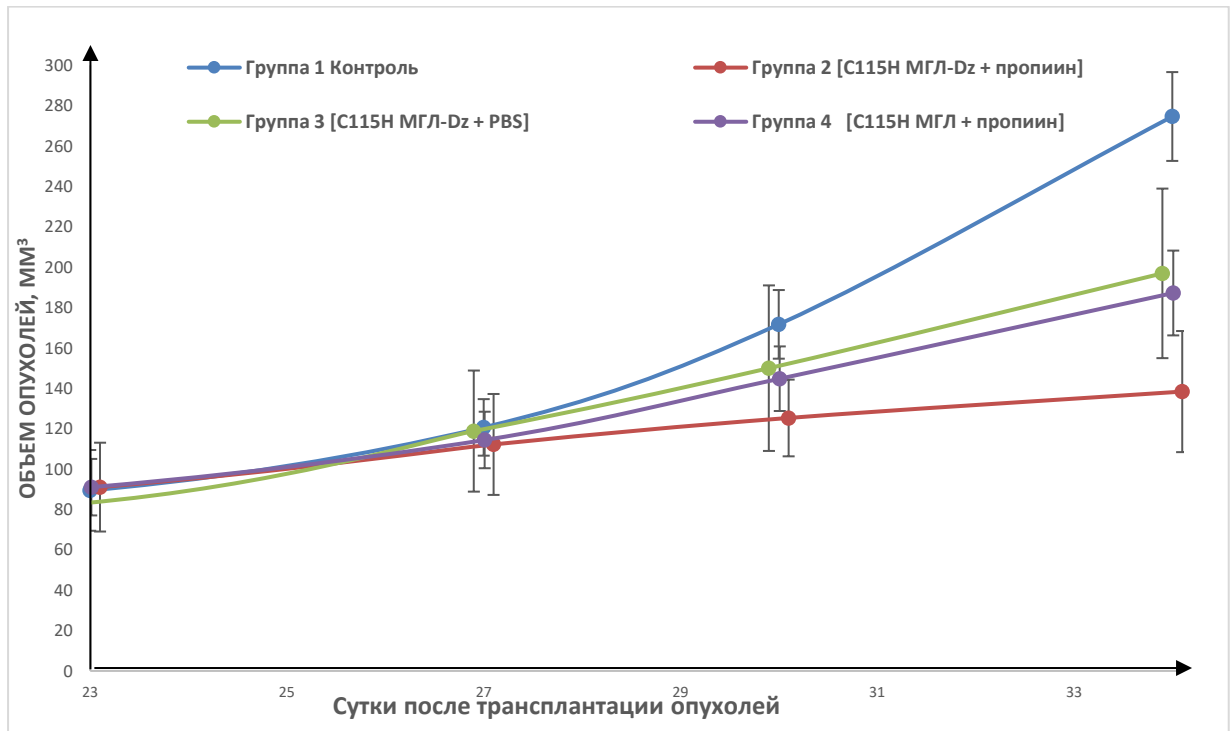


Рис. 10. Противоопухолевая активность фармакологических пар [C115H MGL-Dz + пропиин], [C115H MGL-Dz + PBS], и [C115H MGL + пропиин] на модели рака поджелудочной железы человека, MIA-PaCa2 (n=20, по 5 мышей)

5.1.3. Фармакологическая пара [C115H MGL-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака толстой кишки SW620 и HT29

У самок мышей Balb/c nude, которым были имплантированы клетки HT29, при терапии фармакологической парой [C115H MGL-Dz + пропиин] наблюдалось уменьшение объема опухолевой массы ($275,2 \pm 48,8 \text{ мм}^3$; ТРО = 51,78%; $p=0,04$) по сравнению с контролем ($570,7 \pm 114,2 \text{ мм}^3$; Рис. 11). Введение [C115H MGL + пропиин] или [C115H MGL-Dz + PBS] не вызывало значительного уменьшения объема опухоли в сопоставлении с контролем ($V_{\text{сред}} = 319,7 \pm 69 \text{ мм}^3$; ТРО = 43,97%; $p= 0,09$ и $V_{\text{сред}} = 360,9 \pm 69 \text{ мм}^3$; ТРО = 36,75%, $p= 0,11$, соответственно) (рис. 11).

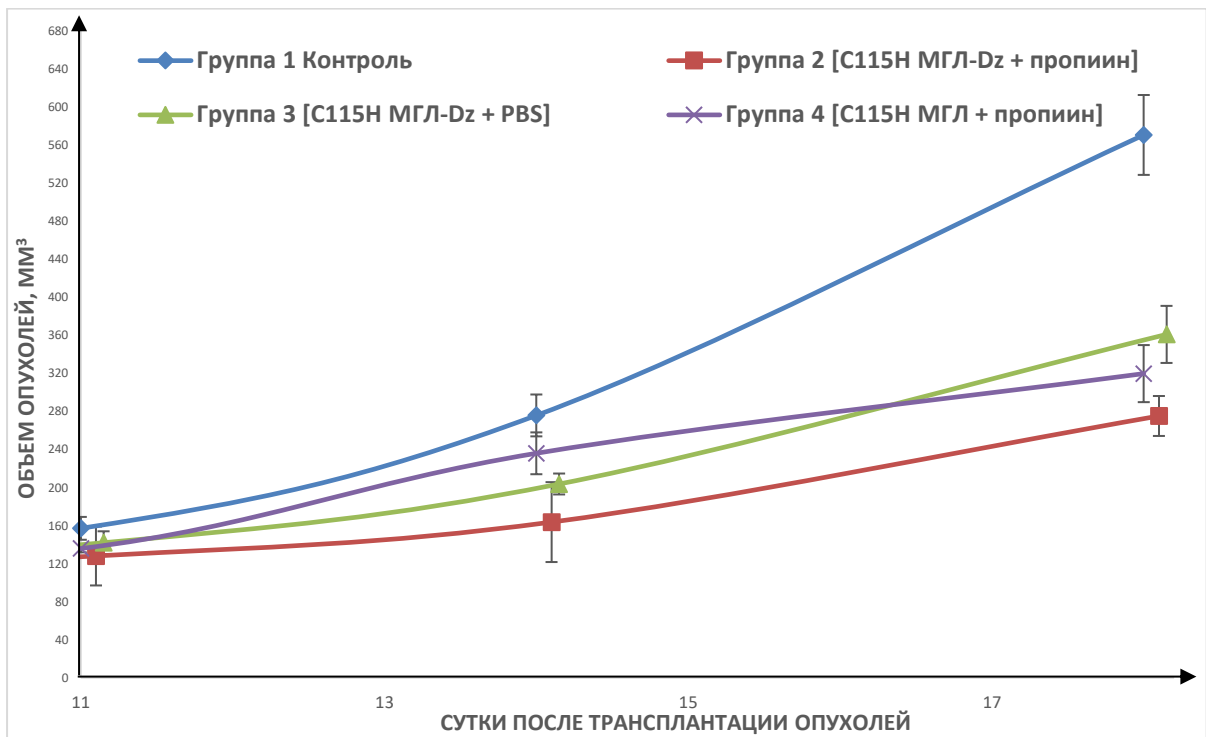


Рис. 11. Противоопухолевая активность фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин], [C115H МГЛ-Dz + PBS], и [C115H МГЛ + пропиин] на модели рака толстой кишки, HT29

На модели ксенографтов SW620 введение животным [C115H-МГЛ-Dz + пропиин] приводило к уменьшению объема опухолевой массы (ТРО = 22,07%; $p=0,12$; рис. 12) по сравнению с контролем ($V_{\text{сред}} = 219,3 \pm 27 \text{ мм}^3$). При терапии фармакологической парой [C115H МГЛ + пропиин] не приводили к биологически значимому торможению роста опухоли ($V_{\text{сред}} = 167,1 \pm 36 \text{ мм}^3$; ТРО = 23,8%; $p= 0,155$). Введение [C115H МГЛ-Dz + PBS] не приводило к достоверному уменьшению объема опухоли по сравнению с контролем ($V_{\text{сред}} = 185,4 \pm 12 \text{ мм}^3$; ТРО = 15,4%; $p= 0,258$), эффекты во всех экспериментальных группах были статистически незначимыми (рис. 12).

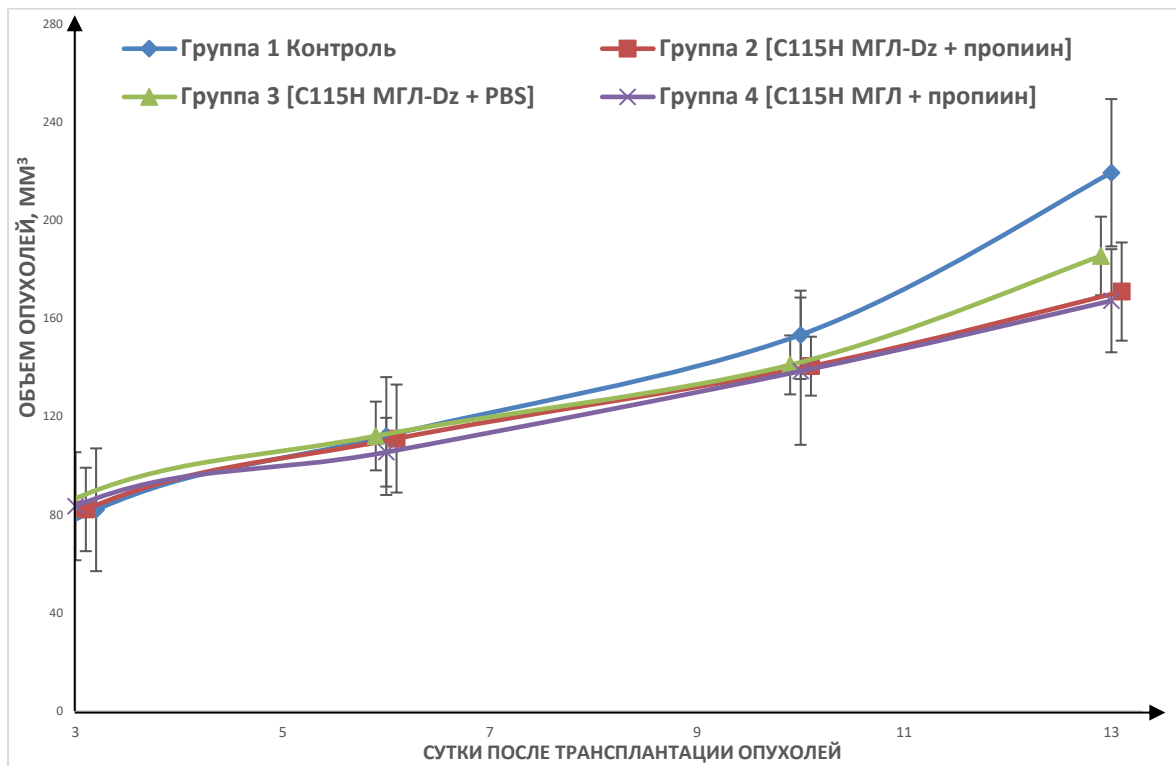


Рис. 12. Противоопухолевая активность фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин], [C115H МГЛ-Dz + PBS], и [C115H МГЛ + пропиин] на модели рака толстой кишки, SW620

5.1.4. Фармакологическая пара [C115H МГЛ-Dz + пропиин] подавляет рост ксенографтов рака предстательной железы 22Rv1

У самцов мышей Balb/c nude, которым были имплантированы клетки 22Rv1, лечение фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин] *in situ* уменьшало объем опухолевой массы (рис. 13). Введение [C115H МГЛ-Dz + пропиин] приводило к значительному уменьшению объёма опухолей ($V_{\text{сред}} = 138,5 \pm 73,3 \text{ mm}^3$; ТРО= 70%; $p = 0,043$). Введение животным фармакологической пары с неконъюгированным ферментом [C115H МГЛ + пропиин], а также фармакологической пары, где пропиин заменен на PBS [C115H МГЛ-Dz + PBS]] не приводило к достоверному уменьшению объема опухоли по сравнению с контролем (ТРО = 5 %; $p > 0,05$ и ТРО = 23,5 %; $p = 0,165$, соответственно).

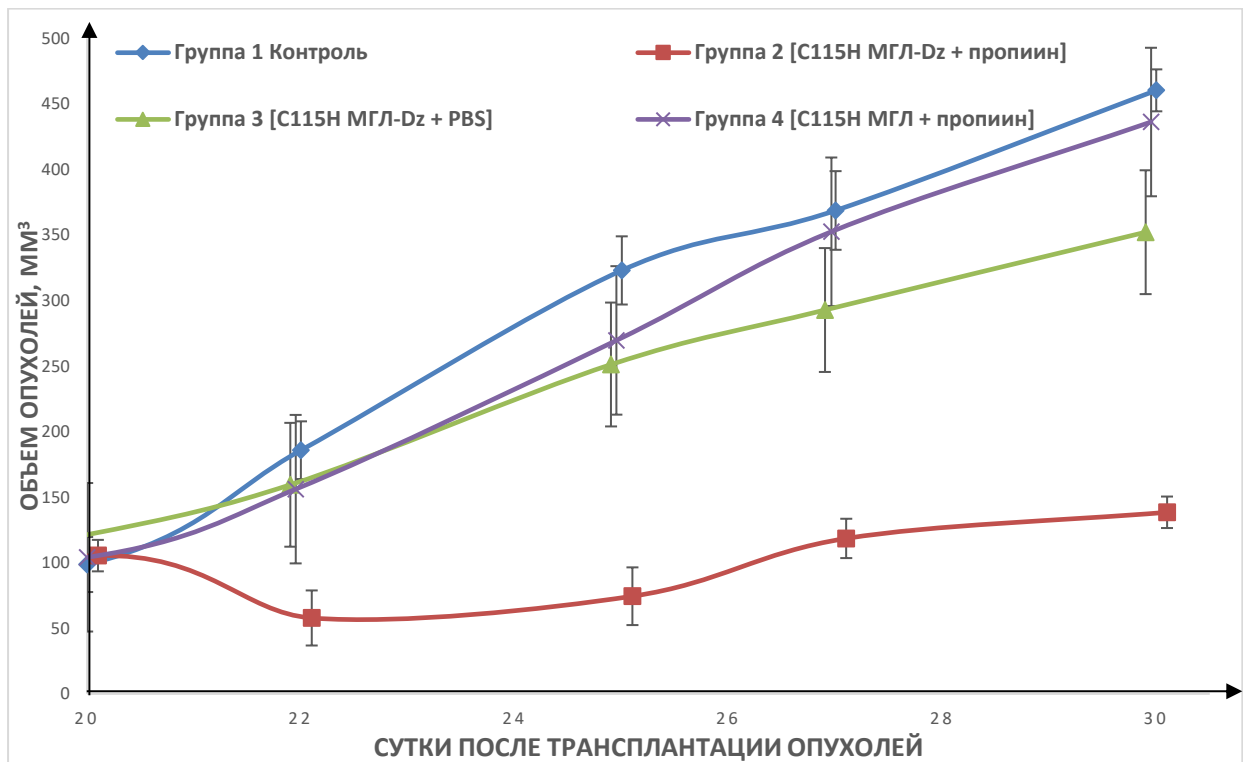


Рис. 13. Противоопухолевая активность фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин], [C115H МГЛ-Dz + PBS], и [C115H МГЛ + пропиин] на модели рака предстательной железы, 22Rv1 (n=20, по 5 самцов)

5.2. Оценка переносимости лечения у мышей BALB/c nude

Переносимость фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] у животных в терапевтических экспериментах оценивали по изменению массы тела, при этом допустимым считали уменьшение массы тела животных не более чем на 20%. При аутопсии павших мышей оценивали косвенные симптомы общей токсичности и наличие патологических изменений внутренних органов или гематологической токсичности (по уменьшению массы селезенки).

На всех исследованных моделях введение фармакологических пар [C115H МГЛ-Dz + пропиин] не вызвало значимого уменьшения массы тела по сравнению с первым днем лечения. Поведение мышей было без особенностей в течение всего периода наблюдения.

Глава 6. Обсуждение полученных результатов

Использование фармакологических пар [фермент + пролекарство] может повысить эффективность и безопасность традиционной химиотерапии рака. Молекулярный вектор (антитела, изофлавоны, и другие молекулы) переносит фермент к месту опухоли, где последний взаимодействует пролекарством, которое служит субстратом для фермента *in situ*. При этом происходит превращение пролекарства в активную цитотоксическую форму в опухолевых клетках или в непосредственной близости от них. В результате активное лекарство действует на опухолевую клетку, подавляя рост злокачественных новообразований. Несмотря на значительный объём экспериментальных исследований и ранние клинические испытания, ни одна фармакологическая пара [фермент + пролекарство] не была внедрена в клиническую практику из-за ряда недостатков. К ним относятся низкие скорости превращения пролекарства в активный препарат, низкая эффективность доставки и неспецифическая токсичность/иммуногенность.

Одними из наиболее хорошо изученных природных веществ являются тиосульфиды, выделенные из чеснока, давно известные своими противоопухолевыми, антибактериальными и противогрибковыми свойствами [116]–[118]. Аллицин составляет примерно 70% от общего количества тиосульфидов [164] [165], образующихся при механическом разрушении клеток чеснока и последующей реакции β -элиминации аллиина, катализируемой ПФ-зависимой аллииназой (схема 2) [166]. Во многих исследованиях было показано, что аллицин обладает цитотоксическими свойствами [120], [132]–[142]. Противоопухолевые свойства аллицина проявляются ингибированием роста раковых клеток, сопровождаются остановкой клеточного цикла в фазе G_2/M [167], стрессом

эндоплазматического ретикулума и апоптозом [168]. Эти механизмы, вероятно, обусловлены связыванием с тиоловыми группами белков, сдерживанием синтеза ДНК, образованием свободных радикалов. Поскольку аллицин и другие тиосульфиды окисляют тиоловые группы из ферментов и других клеточных белков, опухолевые клетки, как правило, не формируют резистентность к ним [168].

Аллицин — крайне реакционноспособное и нестабильное соединение, будучи введённым в кровь, он исчезает из кровотока в течение нескольких минут [144] [145]. Кроме того, из-за своей способности быстро реагировать с остатками цистеина тиоловых групп белков [169], аллицин может оказывать токсическое действие на клетки млекопитающих. Для минимизации токсического действия аллицина были получены комплексы аллииназы с дайдзеином для направленной доставки к опухолям.

Ранее было показано, что разные виды тиосульфидов могут быть получены с помощью фермента метионин- γ -лиазы при расщеплении сульфоксидов S-аллил-L-цистеина (аллиин), S-метил-L-цистеина (метиин), S-этил-L-цистеина (этиин), S-пропил-L-цистеина (пропиин). Эта реакция протекает как при использовании МГЛ дикого типа, так и её более эффективной мутантной формы С115Н [115].

В настоящей работе было показано, что модификация С115Н МГЛ дайдзеином практически не влияла на стационарные кинетические параметры конъюгированного фермента. Каталитическая эффективность конъюгатов в реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была близка к параметрам, определённым для нативного фермента МГЛ. Наблюдалось увеличение сродства модифицированного фермента к субстратам при незначительном снижении значений k_{cat} . Ковалентное присоединение 1,5 молекул дайдзеина к ферменту не повлияло на каталитическую активность С115Н МГЛ (см. табл. 2).

В настоящей работе оценена цитотоксическая активность тиосульфидов, образованных при помощи S115H МГЛ из разных сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина. Наибольший эффект был отмечен у дипропилтиосульфидата, образованного из сульфоксида S-пропил-L-цистеина с IC_{50} : 0,53, 1,15, 1,97, 6,9, 3,88, и 5,4 μ M для MCF7, SRBR3, T47D, HT29, Panc1, и 22Rv1, соответственно. Скорость реакции β -элиминирования сульфоксидов, катализируемой S115H МГЛ, уменьшалась в ряду пропиин > аллиин > метиин > этиин [170]. Аналогичным образом аллииназа из разных источников проявляла наибольшую активность в реакции β -элиминирования пропиина [171]. Таким образом, удлинение боковой цепи сульфоксидов приводит к увеличению скорости их расщепления, но до определённого предела, о чём свидетельствует отсутствие активности в реакции β -элиминирования с бутиином [170].

Израильские ученые первыми использовали природный дайдзеин для направленной доставки препаратов к клеткам с поверхностными эстрогеновыми рецепторами. Показано, что даунорубицин, конъюгированный с дайдзеином, связывается непосредственно с опухолевыми клетками, сохраняя свои цитотоксические эффекты и предотвращая побочные эффекты даунорубицина (например, кардиотоксичность) при лечении рака яичников [172]. Кроме того, показано использование дайдзеина в качестве носителя для направленной доставки фермента аллииназы на поверхность опухолевой клетки. Доказано специфическое связывание конъюгатов (аллииназы-дайдзеин) с рецепторами эстрогенов клеток рака яичников человека (OVCAR3) и показана терапевтическая эффективность фармакологической пары — конъюгата и субстрата, аллиина, которые *in situ* образовали аллицин, обладающий противоопухолевой активностью [148]. Благодаря структурной схожести с эстрогенами, дайдзеин является идеальным средством для

доставки лекарств к эстроген-зависимым опухолевым клеткам, гиперэкспрессирующим мембранные рецепторы эстрогенов (GPER1) [44], в частности, к клеткам рака молочной железы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы и даже в ряде случаев рака толстой кишки (табл. 5).

Таблица 5. Экспрессия рецепторов эстрогена в исследованных культурах клеток

Культуры клеток	Экспрессия рецепторов, способных связывать эстроген, на этих культурах
HEK293	<ul style="list-style-type: none"> ● GPER1⁻ [173] ● Erα⁺ [173]
SKBR3	<ul style="list-style-type: none"> ● GPER1 [174] ● ER⁻ [174]
MCF7 T-47D	<ul style="list-style-type: none"> ● GPER1 [175] ● ER⁺ [176]
HT-29	<ul style="list-style-type: none"> ● GPER1 [177] ● ER⁺ [177] ● HER2/neu⁻ [178]
SW620	<ul style="list-style-type: none"> ● Гипоэкспрессия GPER v4/v2 [179] ● ER⁺ [177] ● HER/neu⁻ [178]
Panc1	<ul style="list-style-type: none"> ● Гиперэкспрессия GPER1 [180] ● Erβ⁻ [181] ● Гипоэкспрессия HER2 [182]
MIA-PaCa2	<ul style="list-style-type: none"> ● Гипоэкспрессия GPER1 [180] ● Erβ⁺ [181] ● Гипоэкспрессия HER2 [182]
PC3	<ul style="list-style-type: none"> ● GPER1 [183] ● ER⁻ [184]

Дипропилтиосульфат, образованный при участии C115H МГЛ-Dz из пропиина *in situ*, показал высокий цитотоксический эффект на ER⁺ GPER1⁺ MCF7, ER⁻ GPER1⁺ SKBR3, ER⁺ GPER1⁺ T47D, Erβ⁺ GPER1⁺ HER2/neu⁺ HT29, ER⁻ GPER1⁺ Panc1, ER⁺ GPER1⁺ MIA-PaCa2, 22Rv1, ER⁻ GPER1⁺ DU145 и ER⁻ GPER1⁺ PC3 (IC₅₀ < 17,4 μM, см. табл. 3). Максимальный цитотоксический эффект был достигнут во всех клетках с гиперэкспрессией мембранных рецепторов эстрогенов, в то время как клетки рака толстой кишки (GPER1⁻ SW620 и Colo205), не экспрессирующие эти рецепторы, чувствительности к фармакологической паре [C115H МГЛ-Dz + пропиин] не демонстрировали.

На основании полученных данных можно выдвинуть предположение, что C115H МГЛ-Dz связывается с мембранными рецепторами эстрогенов (GPER1) на поверхности клеток, продуцируя высокую локальную концентрацию цитотоксических дипропилтиосульфатов. При лечении животных фармакологической парой [C115H МГЛ-Dz + пропиин] наблюдалось значительное уменьшение объема опухоли GPER1⁺ ER⁻ SKBR3. В клетках HT29 дайдзеин может связываться с GPER1 и/или ERβ. Кроме того, гиперэкспрессия GPER1 в клетках Panc1 позволяет дайдзеину связываться с ER⁻ Panc1 более эффективно, чем с ER⁺ MIA-PaCa2, что может объяснять полученные на клетках рака поджелудочной железы результаты. Лечение не приводило к достоверному уменьшению объема опухоли SW620 по сравнению с контролем из-за низкой экспрессии рецепторов связывания дайдзеина на поверхности клеток. В контрольных группах — [C115H МГЛ-Dz + PBS] или [C115H МГЛ + пропиин] — не наблюдалось значительного эффекта во всех протестированных клеточных линиях.

Нами было показано, что дипропилтиосульфат, образующийся из пропиина *in situ* под действием C115H МГЛ, может индуцировать

дозозависимый апоптоз как посредством активации каспаз 3/7, так и через альтернативные пути.

Другими исследованиями было подтверждено, что аллицин может индуцировать апоптоз в клетках карциномы желудка, глиобластомы, рака молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [185]. Аллицин может ингибировать пролиферацию и инвазию злокачественной опухоли (холангиокарциномы), резистентной к химиотерапии, путём ингибирования опосредованной SHP-1 передачи сигналов STAT3. *In vitro* было продемонстрировано, что чесночное масло в зависимости от дозы и продолжительности действия вызывает запрограммированную гибель клеток, остановку клеточного цикла в фазе G₂/M и другие проапоптотические активности в отношении клеток AsPC-1 [186]. Апоптоз клеток HCT-116 под действием аллицина сопровождался повышенным содержанием гиподиплоидной ДНК, снижением уровня Bcl-2, повышением уровня bax и повышенной способностью высвобождать цитохром c из митохондрий в цитоплазму. Аллицин также индуцировал транслокацию NF-E2-родственного фактора-2 (Nrf2) в ядре. Анализ репортерного гена люциферазы показал, что аллицин индуцирует активность трансактивации люциферазы, опосредованную Nrf2. Нокаут гена SiRNA Nrf2 значительно влиял на способность аллицина ингибировать пролиферацию HCT-116 [187].

Таким образом, полученные в рамках настоящей работы и других исследований результаты свидетельствуют о том, что тиосульфиды способны индуцировать апоптоз на различных моделях опухолевых клеток *in vitro*.

Из-за крайней реакционной способности и низкой стабильности аллицина, мало литературных данных о его противоопухолевых свойствах *in vivo*. На модели ксенографтов рака желудка (SGC-7901, BGC-823), рака

толстой кишки (HCT116), гепатоцеллюлярной карциномы (BEL7402, HepG2) и рака поджелудочной железы (MIA-PaCa2) было показано, что аллицин уменьшает массу и объём опухоли, стимулирует апоптоз и пролиферацию, подавляет инвазию и метастазирование, улучшает чувствительность опухоли к химиотерапии. Кроме того, было обнаружено, что аллицин повышает радиочувствительность опухоли, а также активирует CD4⁺, CD8⁺ и NK-клетки в сочетании с рекомбинантным интерлейкином-2 [188]. Исследованные в настоящей работе фармакологические пары при сохранении терапевтически ценных свойств аллицина могут обладать рядом фармакокинетических преимуществ, увеличивая привлекательность этого способа терапии.

Конъюгаты *S. novyi* C115H МГЛ-Dz могут связываться на поверхности опухолевых клеток со средней/высокой экспрессией GPER1 и при введении сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в опухоль катализировать реакцию β -элиминирования сульфоксидов с образованием тиосульфидов, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*.

Выводы

1. Получена *S. novyi* C115H метионин γ -лиаза (C115H МГЛ) и ее комплексы с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz) в препаративных количествах. Модификация C115H-МГЛ дайдзеином практически не влияла на стационарные кинетические параметры конъюгированного фермента. Каталитическая эффективность конъюгатов в реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была близкой к параметрам, определённым для нативного фермента МГЛ.
2. Фармакологические пары [C115H МГЛ-Dz + пропиин] оказались более цитотоксичными на разных культурах клеток *in vitro* по сравнению с C115H МГЛ-Dz в присутствии метиина, этиина или аллина. Наиболее чувствительны к воздействию фармакологической пары культуры клеток MCF7.
3. Дипропилтиосульфиды индуцируют апоптоз на модели рака предстательной железы 22Rv1.
4. На моделях ксенографтов рака предстательной железы человека 22Rv1, рака молочной железы SKBR3, рака поджелудочной железы MIA-PaCa-2 и Panc1, рака толстой кишки SW620 и HT29 впервые показано наличие достоверного противоопухолевого эффекта фармакологической пары [C115H МГЛ-Dz + сульфоксиды S-пропил-L-цистеина]. На модели SKBR3 ТРО_{max}=89% (5-е сутки лечения), HT29 ТРО=52%, Panc1 ТРО=67,51%, MIA-PaCa2 ТРО=50%, 22Rv1 ТРО = 70%. Наибольший противоопухолевый эффект был выявлен на моделях с большей экспрессией мембранных рецепторов эстрогенов.

Благодарности

Приношу глубокую благодарность

д.м.н. В.С. Покровскому и к.х.н. Е.А. Морозовой за научное руководство и внимание к моей работе, помощь в подготовке текста диссертации, без которых выполнение работы было бы невозможным;

проф. Т.В. Демидкиной за научное сотрудничество и всестороннюю помощь в анализе экспериментальных данных;

к.б.н. С.Ш. Каршиевой и к.б.н. Е.В. Неборак за рецензирование и помощь в подготовке окончательного варианта диссертации;

к.х.н. В.В. Куликовой за участие в работе, выделение и очистку фермента;

к.х.н. В.С. Коваль за участие в работе, синтез дайдзеина и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина;

Сотрудникам кафедры биохимии имени акад. Т.Т. Березова РУДН, сотрудникам лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, и сотрудникам лаборатории химических основ биокатализа ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН за помощь в работе.

Также хочу поблагодарить моих родителей и друзей за терпение и поддержку.

Литература

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F., “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E., “European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias,” *Ann. Oncol.*, vol. 27, no. 4, pp. 725–731, Apr. 2016, doi: 10.1093/annonc/mdw022.
- [3] Winer E, Gralow J, Diller L, Karlan B, Loehrer P, Pierce L, Demetri G, Ganz P, Kramer B, Kris M, Markman M, Mayer R, Pfister D, Raghavan D, Ramsey S, Reaman G, Sandler H, Sawaya R, Schuchter L, Sweetenham J, Vahdat L, Schilsky RL., “Clinical Cancer Advances 2008: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 5, pp. 812–826, Feb. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.21.2134.
- [4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A., “Cancer statistics, 2019,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, Jan. 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [5] Illei PB, Belchis D, Tseng LH, Nguyen D, De Marchi F, Haley L, Riel S, Beierl K, Zheng G, Brahmer JR, Askin FB, Gocke CD, Eshleman JR, Forde PM, Lin MT., “Clinical mutational profiling of 1006 lung cancers by next generation sequencing,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 57, pp. 96684–96696, Nov. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.18042.
- [6] Rueff J. and Rodrigues A.S., Eds., “Cancer Drug Resistance: Overviews and Methods,” *New York, NY: Springer New York*, vol. 1395., 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-3347-1.

- [7] Singh Y., Palombo M., and Sinko P., “Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, no. 18, pp. 1802–1826, Aug. 2008, doi: 10.2174/092986708785132997.
- [8] Morozova E., Anufrieva N., Koval V., Lesnova E., Kushch A., Timofeeva V., Solovieva A., Kulikova V., Revtovich S., Demidkina T., “Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: Two approaches to antitumor therapy,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 182, pp. 394–401, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201.
- [9] Naithani R., Huma L., Moriarty R., McCormick D., and Mehta R., “Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions,” *Anticancer Res.*, vol. 21, no. 4B, pp. 2895–2900, Aug. 2001.
- [10] Naithani R., Huma L., Moriarty R., McCormick D., and Mehta R., “Comprehensive Review of Cancer Chemopreventive Agents Evaluated in Experimental Carcinogenesis Models and Clinical Trials,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, no. 11, pp. 1044–1071, May 2008, doi: 10.2174/092986708784221403.
- [11] Chatelut E, Delord JP, Canal P., “Toxicity Patterns of Cytotoxic Drugs,” *Kluwer Acad. Publ.*, vol. 21, pp. 141-148, 2003, doi: 10.1023/a:1023565227808.
- [12] Clas S.D., Sanchez R.I., Nofsinger R., “Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges,” *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 79–87, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2013.08.014.
- [13] Mahato R., Tai W., and Cheng K., “Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 8, pp. 659–670, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2011.02.002.

- [14] He Q, Chen J, Yan J, Cai S, Xiong H, Liu Y, Peng D, Mo M, Liu Z., “Tumor microenvironment responsive drug delivery systems,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 15, no. 4, pp. 416–448, 2020, doi: 10.1016/j.ajps.2019.08.003.
- [15] Najjar A., and Karaman R., “Newly Developed Prodrugs and Prodrugs in Development; an Insight of the Recent Years,” *Molecules*, vol. 25, no. 4, p. 884, 2020, doi: 10.3390/molecules25040884.
- [16] Irby D, Du C, Li F., “Lipid–Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery,” *Mol. Pharm.*, vol. 14, no. 5, pp. 1325–1338, 2017, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01027.
- [17] Schreier S., Malheiros S.V.P., and de Paula E., “Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1508, no. 1–2, pp. 210–234, 2000, doi: 10.1016/S0304-4157(00)00012-5.
- [18] Muguruma K, Fujita K, Fukuda A, Kishimoto S, Sakamoto S, Arima R, Ito M, Kawasaki M, Nakano S, Ito S, Shimizu K, Taguchi A, Takayama K, Taniguchi A, Ito Y, Hayashi Y., “Kinetics-Based Structural Requirements of Human Immunoglobulin G Binding Peptides,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 11, pp. 14390–14397, 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b01104.
- [19] Love EA, Sattikar A, Cook H, Gillen K, Large JM, Patel S, Matthews D, Merritt A., “Developing an Antibody–Drug Conjugate Approach to Selective Inhibition of an Extracellular Protein,” *ChemBioChem*, vol. 20, no. 6, pp. 754–758, 2019, doi: 10.1002/cbic.201800623.
- [20] Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, Spencer J., “ β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century,” *J. Mol. Biol.*, vol. 431, no. 18, pp. 3472–3500, 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.

- [21] Longley D. B., Harkin D. P., and Johnston P. G., “5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 330–338, 2003, doi: 10.1038/nrc1074.
- [22] Blakey D. C., Valcaccia B. E., East S., Wright A. F., Boyle F. T., Springer C. J., Burke P. J., Melton R. G., Bagshawe K. D., “Antitumor effects of an antibody-carboxypeptidase G2 conjugate in combination with a benzoic acid mustard prodrug,” *Cell Biophys.*, vol. 22, no. 1–3, pp. 1–8, Jan. 1993, doi: 10.1007/BF03033863.
- [23] Monneret C., “Recent developments in the field of antitumour anthracyclines,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 36, no. 6, pp. 483–493, 2001, doi: 10.1016/S0223-5234(01)01244-2.
- [24] Rich T. A., Shepard R. C., Mosley S. T., “Four Decades of Continuing Innovation with Fluorouracil: Current and Future Approaches to Fluorouracil Chemoradiation Therapy,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 11, pp. 2214–2232, 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.08.009.
- [25] Milano G., Etienne M. C., Renée N., Thyss A., Schneider M., Ramaioli A., Demard F., “Relationship between fluorouracil systemic exposure and tumor response and patient survival,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 12, no. 6, pp. 1291–1295, 1994, doi: 10.1200/JCO.1994.12.6.1291.
- [26] Takiuchi H. and Ajani J. A., “Uracil-tegafur in gastric carcinoma: a comprehensive review,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 8, pp. 2877–2885, 1998, doi: 10.1200/JCO.1998.16.8.2877.
- [27] Rodriguez G., “Fludarabine phosphate: A new anticancer drug with significant activity in patients with chronic lymphocytic leukemia and in patients with lymphoma,” *Invest. New Drugs*, vol. 12, no. 2, pp. 75–92, 1994, doi: 10.1007/BF00874436.

- [28] Kciuk M., Marciniak B., and Kontek R., “Irinotecan—Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 14, p. 4919, 2020, doi: 10.3390/ijms21144919.
- [29] Messerer C. L., Ramsay E. C., Waterhouse D., Ng R., Simms E. M., Harasym N., Tardi P., Mayer L. D., Bally M. B., “Liposomal Irinotecan,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 19, pp. 6638–6649, 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0221.
- [30] Carli M., Passone E., Perilongo G., Bisogno G., “Ifosfamide in Pediatric Solid Tumors,” *Oncology*, vol. 65, no. Suppl. 2, pp. 99–104, 2003, doi: 10.1159/000073369.
- [31] Xu G. and McLeod HL., “Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 7, no. 11, pp. 3314–3324, Nov. 2001.
- [32] Тевяшова А. Н., “Создание пролекарств на основе антрациклиновых антибиотиков,” *Вестник МИТХТ*, vol. 9, no. 6, pp. 11–25, 2014.
- [33] Springer C. J., Niculescu-Duvaz I. I., “Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 26, no. 2–3, pp. 151–172, 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(97)00032-X.
- [34] Lorscheider M, Gaudin A, Nakhlé J, Veiman KL, Richard J, Chassaing C., “Challenges and opportunities in the delivery of cancer therapeutics: update on recent progress,” *Ther. Deliv.*, vol. 12, no. 1, pp. 55–76, 2021, doi: 10.4155/tde-2020-0079.
- [35] Tiwari G., Tiwari R., Sriwastawa B., Bhati L., Pandey S., Pandey P., Bannerjee S.K., “Drug delivery systems: An updated review,” *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 2, no. 1, p. 2, 2012, doi: 10.4103/2230-973X.96920.
- [36] Nauman D. A. and Bertozzi C. R., “Kinetic parameters for small-molecule drug delivery by covalent cell surface targeting,” *Biochim. Biophys. Acta*

- BBA - Gen. Subj.*, vol. 1568, no. 2, pp. 147–154, 2001, doi: 10.1016/S0304-4165(01)00211-2.
- [37] Knox R. J., “Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT)--recognizing the present limitations of gene therapy for the treatment of cancer,” *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000, vol. 2, no. 6, pp. 835–838, 2001.
- [38] Giang I., Boland E. L., Poon G. M., “Prodrug Applications for Targeted Cancer Therapy,” *AAPS J.*, vol. 16, no. 5, pp. 899–913, 2014, doi: 10.1208/s12248-014-9638-z.
- [39] Neuberger M. S., Williams G. T., Fox R. O., “Recombinant antibodies possessing novel effector functions,” *Nature*, vol. 312, no. 5995, pp. 604–608, 1984, doi: 10.1038/312604a0.
- [40] Searle F., Bier C., Buckley R. G., Newman S., Pedley R. B., Bagshawe K. D., Melton R. G., Alwan S. M., Sherwood R. F., “The potential of carboxypeptidase G₂-antibody conjugates as anti-tumour agents. I. Preparation of antihuman chorionic gonadotrophin-carboxypeptidase G₂ and cytotoxicity of the conjugate against JAR choriocarcinoma cells *in vitro*,” *Br. J. Cancer*, vol. 53, no. 3, pp. 377–384, 1986, doi: 10.1038/bjc.1986.62.
- [41] Bagshawe K. D., Sharma S. K., Springer C. J., Rogers G. T., “Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT),” *Ann. Oncol.*, vol. 5, no. 10, pp. 879–891, 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.annonc.a058725.
- [42] Bagshawe K. D., “Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 6, no. 10, pp. 1421–1431, 2006, doi: 10.1586/14737140.6.10.1421.
- [43] Zhang X., Li X., You Q., Zhang X., “Prodrug strategy for cancer cell-specific targeting: A recent overview,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 139, pp. 542–563, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.010.

- [44] Bagshawe K. D., “Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 6, no. 10, pp. 1421–1431, 2006, doi: 10.1586/14737140.6.10.1421.
- [45] Napier MP, Sharma SK, Springer CJ, Bagshawe KD, Green AJ, Martin J, Stribbling SM, Cushen N, O' Malley D, Begent RH., “Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma,” *Clin. Cancer Res.*, 6(3) pp: 765-72, 2000, PMID: 10741695.
- [46] Andrady C., “Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Challenges of Antibody- Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT),” *Biology*, p. 240.
- [47] Kratz F., Müller I. A., Ryppa C., Warnecke A., “Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy,” *ChemMedChem*, vol. 3, no. 1, pp. 20–53, 2008, doi: 10.1002/cmdc.200700159.
- [48] Kumar S, Singh S, Senapati S, Singh AP, Ray B, Maiti P., “Controlled drug release through regulated biodegradation of poly (lactic acid) using inorganic salts,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, pp. 487–497, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.033.
- [49] Zegota M. M., Wang T., Seidler C., Wah Ng D. Y., Kuan S. L., and Weil T., “‘Tag and Modify’ Protein Conjugation with Dynamic Covalent Chemistry,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, no. 8, pp. 2665–2670, Aug. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00358.
- [50] Pihlajamaa P, Zhang FP, Saarinen L, Mikkonen L, Hautaniemi S, Jänne OA., “The Phytoestrogen Genistein Is a Tissue-Specific Androgen Receptor Modulator,” *Endocrinology*, vol. 152, no. 11, pp. 4395–4405, Nov. 2011, doi: 10.1210/en.2011-0221.
- [51] Iliș M, Uifălean A, Pașca S, Dhople VM, Lalk M, Iuga CA, Hammer E., “From Proteomics to Personalized Medicine: The Importance of Isoflavone Dose and Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Cells,” *J. Pers. Med.*, vol. 10, no. 4, p. 292, Dec. 2020, doi: 10.3390/jpm10040292.

- [52] Yu Z, Li W, Liu F., “Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells,” *Cancer Lett.*, vol. 215, no. 2, pp. 159–166, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.canlet.2004.06.010.
- [53] Ahmad A, Biersack B, Li Y, Bao B, Kong D, Ali S, Banerjee S, Sarkar FH., “Perspectives on the Role of Isoflavones in Prostate Cancer,” *AAPS J.*, vol. 15, no. 4, pp. 991–1000, Oct. 2013, doi: 10.1208/s12248-013-9507-1.
- [54] Jin S, Zhang Q. Y., Kang X. M., Wang J. X., Zhao W. H., “Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway,” *Ann. Oncol.*, vol. 21, no. 2, pp. 263–268, Feb. 2010, doi: 10.1093/annonc/mdp499.
- [55] Gercel-Taylor C, Feitelson A. K., Taylor D.D., “Inhibitory effect of genistein and daidzein on ovarian cancer cell growth,” *Anticancer Res.*, vol. 24, no. 2B, pp. 795–800, Apr. 2004.
- [56] Adjakly M., Ngollo M., Boiteux J. P., Bignon Y. J., Guy L., Bernard-Gallon D., “Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 39–44, Jan. 2013.
- [57] Guo J. M., Xiao B. X., Dai D. J., Liu Q., Ma H. H., “Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells *in vitro*,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 6, p. 860, 2004, doi: 10.3748/wjg.v10.i6.860.
- [58] Shiau R. J., Chen K. Y., Wen Y. D., Chuang C. H., Yeh S. L., “Genistein and β -carotene enhance the growth-inhibitory effect of trichostatin A in A549 cells,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 49, no. 1, pp. 19–25, Feb. 2010, doi: 10.1007/s00394-009-0044-8.
- [59] Menon LG, Kuttan R, Nair MG, Chang YC, Kuttan G., “Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells,” *Nutr. Cancer*, vol. 30, no. 1, pp. 74–77, Jan. 1998, doi: 10.1080/01635589809514644.

- [60] Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI., “Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 16, no. 1, pp. 70–84, Jan. 2002, doi: 10.1210/mend.16.1.0758.
- [61] Sarkar F. H. and Li Y., “Soy Isoflavones and Cancer Prevention: CLINICAL SCIENCE REVIEW,” *Cancer Invest.*, vol. 21, no. 5, pp. 744–757, Jan. 2003, doi: 10.1081/CNV-120023773.
- [62] Tanaka H., Esaki N., and Soda K., “A versatile bacterial enzyme: l-methionine γ -lyase,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 7, no. 11, pp. 530–537, Nov. 1985, doi: 10.1016/0141-0229(85)90094-8.
- [63] Kreis W. and Hession K., “Isolation and Purification of L-Methionine- α -deamino- γ mercaptomethane-Lyase (L-Methioninase) from *Clostridium sporogenes*,” *Cancer Res.*, vol. 33, pp. 1862–1865, 1973.
- [64] Tanaka H., Esaki N., and Soda K., “Properties of L-methionine γ -lyase from *Pseudomonas ovalis*,” *Biochemistry*, vol. 16, no. 1, pp. 100–106, Jan. 1977, doi: 10.1021/bi00620a016.
- [65] Mamaeva D. V., Morozova E. A., Nikulin A. D., Revtovich S. V., Nikonov S. V., Garber M. B., Demidkina T. V., “Structure of *Citrobacter freundii* L - methionine γ -lyase,” *Acta Crystallograph. Sect. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 61, no. 6, pp. 546–549, Jun. 2005, doi: 10.1107/S1744309105015447.
- [66] Fukamachi H., Nakano Y., Okano S., Shibata Y., Abiko Y., and Yamashita Y., “High production of methyl mercaptan by l-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane lyase from *Treponema denticola*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 331, no. 1, pp. 127–131, May 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.139.

- [67] Nakayama T., Esaki N., Lee W.J., Tanaka I., Tanaka H., and Soda K., "Purification and Properties of L-Methionine γ -Lyase from *Aeromonas sp.*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 48, no. 9, pp. 2367–2369, Sep. 1984, doi: 10.1080/00021369.1984.10866502.
- [68] Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., and Nozaki T., "Identification and Characterization of Two Isoenzymes of Methionine γ -Lyase from *Entamoeba histolytica*," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 43, pp. 42717–42727, Oct. 2003, doi: 10.1074/jbc.M212414200.
- [69] Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., and Koga T., "Formation of Methyl Mercaptan from L-Methionine by *Porphyromonas gingivalis*," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 12, pp. 6912–6916, Dec. 2000, doi: 10.1128/IAI.68.12.6912-6916.2000.
- [70] Lockwood B. C. and Coombs G. H., "Purification and characterization of methionine γ -lyase from *Trichomonas vaginalis*," *Biochem. J.*, vol. 279, no. 3, pp. 675–682, Nov. 1991, doi: 10.1042/bj2790675.
- [71] Fabrice Rébeillé, Samuel Jabrin, Richard Bligny, Karen Loizeau, Bernadette Gambonne, Valérie Van Wilder, Roland Douce and Stéphane Ravanel, "Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a γ -cleavage process and leads to S -methylcysteine and isoleucine syntheses," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 42, pp. 15687–15692, Oct. 2006, doi: 10.1073/pnas.0606195103.
- [72] Bonnarme P., Psoni L., and Spinnler H. E., "Diversity of L -Methionine Catabolism Pathways in Cheese-Ripening Bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 12, pp. 5514–5517, Dec. 2000, doi: 10.1128/AEM.66.12.5514-5517.2000.
- [73] Kulikova V. V., Chernukha M. Y., Morozova E. A., Revtovich S. V., Rodionov A. N., Koval V. S., Avetisyan L. R., Kuliastova D. G., Shaginyan I. A., Demidkina T. V., "Antibacterial Effect of Thiosulfates on

- Multiresistant Strains of Bacteria Isolated from Patients with Cystic Fibrosis,” *Acta Naturae*, vol. 10, no. 3, pp. 77–80, Sep. 2018.
- [74] Kudou D, Misaki S, Yamashita M, Tamura T, Takakura T, Yoshioka T, Yagi S, Hoffman RM, Takimoto A, Esaki N, Inagaki K., “Structure of the Antitumour Enzyme L-Methionine γ -Lyase from *Pseudomonas putida* at 1.8 Å Resolution,” *J. Biochem.*, vol. 141, no. 4, pp. 535–544, Jan. 2007, doi: 10.1093/jb/mvm055.
- [75] McKie A. E., “Molecular and biochemical characterisation of Methionine γ -lyase from *Trichomonas vaginalis*,” Glasgow, 1997.
- [76] Revtovich S., Anufrieva N., Morozova E., Kulikova V., Nikulin A., and Demidkina T., “Structure of methionine γ -lyase from *Clostridium sporogenes*,” *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, vol. 72, no. 1, pp. 65–71, Jan. 2016, doi: 10.1107/S2053230X15023869.
- [77] Sato D., Karaki T., Shimizu A., Kamei R., Harada S., and Nozaki T., “Crystallization and preliminary X-ray analysis of L -methionine γ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*,” *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, vol. 64, no. 8, pp. 697–699, Aug. 2008, doi: 10.1107/S1744309108018691.
- [78] Käck H., Sandmark J., Gibson J., Schneider G., and Lindqvist Y., “Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes,” *J. Mol. Biol.*, vol. 291, no. 4, pp. 857–876, Aug. 1999, doi: 10.1006/jmbi.1999.2997.
- [79] Nikulin A., Revtovich S., Morozova E., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M., Demidkina T., “High-resolution structure of methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*,” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 64, no. 2, pp. 211–218, Feb. 2008, doi: 10.1107/S0907444907065390.
- [80] Motoshima H, Inagaki K, Kumasaka T, Furuichi M, Inoue H, Tamura T, Esaki N, Soda K, Tanaka N, Yamamoto M, Tanaka H., “Crystal Structure of

- the Pyridoxal 5'-phosphate Dependent L-Methionine γ -Lyase from *Pseudomonas putida*," *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 128, no. 3, pp. 349–354, Sep. 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022760.
- [81] Messerschmidt A, Worbs M, Steegborn C, Wahl MC, Huber R, Laber B, Clausen T., "Determinants of Enzymatic Specificity in the Cys-Met-Metabolism PLP-Dependent Enzyme Family: Crystal Structure of Cystathionine γ -Lyase from Yeast and Intrafamilial Structure Comparison," *Biol. Chem.*, vol. 384, no. 3, Jan. 2003, doi: 10.1515/BC.2003.043.
- [82] Kuznetsov N. A., Faleev N. G., Kuznetsova A. A., Morozova E. A., Revtovich S. V., Anufrieva N. V., Nikulin A. D., Fedorova O. S., Demidkina T. V., "Pre-steady-state Kinetic and Structural Analysis of Interaction of Methionine γ -Lyase from *Citrobacter freundii* with Inhibitors," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 671–681, Jan. 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.586511.
- [83] Morozova E. A., Revtovich S. V., Anufrieva N. V., Kulikova V. V., Nikulin A. D., Demidkina T.V., "Alliin is a suicide substrate of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase: structural bases of inactivation of the enzyme," *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 70, no. 11, pp. 3034–3042, Nov. 2014, doi: 10.1107/S1399004714020938.
- [84] Ревтович С. В., Е. А. Морозова, Е. Н. Хурс, Л. Н. Закомырдина, А. Д. Никулин, Т. В. Демидкина, Р. М. Хомутов, "Пространственные структуры нековалентных комплексов *citrobacter freundii* метионин- γ -лиазы с субстратами," *БИОХИМИЯ*, vol. 76, no. 5, pp. 692–700, 2011.
- [85] Davydov D.Z., Morozova E.A., Komarova M.V., Anufrieva N.V., Zavilgelsky G.B., Manukhov I.V., Demidkina T.V., Treshchalina E.M., Pokrovsky V.S., "Use of pyridoxine to increase anticancer activity of methionine-gamma-lyase in murine cancer models," *Sib. J. Oncol.*, vol. 16, no. 5, pp. 27–35, Jan. 2017, doi: 10.21294/1814-4861-2017-16-5-27-35.

- [86] Sugimura T, Birnbaum Sm, Winitz M, Greenstein Jp., “Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 81, no. 2, pp. 448–455, Apr. 1959, doi: 10.1016/0003-9861(59)90225-5.
- [87] Mecham J. O., Rowitch D., Wallace C. D., Stern P. H., Hoffman R. M., “The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 117, no. 2, pp. 429–434, Dec. 1983, doi: 10.1016/0006-291X(83)91218-4.
- [88] Lien E. C., Ghisolfi L., Geck R. C., Asara J. M. and Toker A., “Oncogenic PI3K promotes methionine dependency in breast cancer cells through the cystine-glutamate antiporter xCT,” *Sci. Signal.*, vol. 10, no. 510, p. eaa06604, Dec. 2017, doi: 10.1126/scisignal.aao6604.
- [89] Hoffman R. M. and Jacobsen S. J., “Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 77, no. 12, pp. 7306–7310, Dec. 1980, doi: 10.1073/pnas.77.12.7306.
- [90] Hoffman R. M., “Methioninase: a therapeutic for diseases related to altered methionine metabolism and transmethylation: cancer, heart disease, obesity, aging, and Parkinson’s disease,” *Hum. Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 69–80, Mar. 1997.
- [91] Tisdale M. and Eridani S., “Methionine requirement of normal and leukaemic haemopoietic cells in short term cultures,” *Leuk. Res.*, vol. 5, no. 4–5, pp. 385–394, Jan. 1981, doi: 10.1016/0145-2126(81)90013-8.
- [92] Guo H. P., Herrera H., Groce A., and Hoffman R. M., “Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 11, pp. 2479–2483, Jun. 1993.

- [93] Lu S., Pei F., and Liao M., “[Invasive urothelial carcinoma in bladder associated with bilateral benign ovarian Brenner tumor: report of a case], vol. 38, no. 7, pp. 485–486, Jul. 2009.
- [94] Xin L., Cao W. X., Fei X. F., Wang Y., Liu W. T., Liu B. Y., Zhu Z. G., “Applying proteomic methodologies to analyze the effect of methionine restriction on proliferation of human gastric cancer SGC7901 cells,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 377, no. 1–2, pp. 206–212, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.cca.2006.09.027.
- [95] Hori H., Takabayashi K., Orvis L., Carson D. A., and Nobori T., “Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptopmethane-lyase,” *Cancer Res.*, vol. 56, no. 9, pp. 2116–2122, May 1996.
- [96] El-Sayed A.S., Shouman S. A., and Nassrat H. M., “Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* l-methioninase,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, no. 4, pp. 200–210, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.06.004.
- [97] Huang K. Y., Hu H. Y, Tang Y. L., Xia F. G., Luo X. Q., Liu J. Z., “High-Level Expression, Purification and Large-Scale Production of l-Methionine γ -Lyase from *Idiomarina* as a Novel Anti-Leukemic Drug,” *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 8, pp. 5492–5507, Aug. 2015, doi: 10.3390/md13085492.
- [98] Tan Y, Sun X, Xu M, An Z, Tan X, Han Q, Miljkovic D. A., Yang M, Hoffman R. M., “Polyethylene Glycol Conjugation of Recombinant Methioninase for Cancer Therapy,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 12, no. 1, pp. 45–52, Feb. 1998, doi: 10.1006/prev.1997.0805.
- [99] El-Sayed S. A., Hassan E. A., Shindia A., Mohamed S. G., and Sitohy M. Z., “*Aspergillus flavipes* methionine γ -lyase-dextran conjugates with enhanced structural, proteolytic stability and anticancer efficiency,” *J. Mol. Catal. B*

Enzym., vol. 133, pp. S15–S24, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.molcatb.2016.11.002.

- [100] Machover D, Zittoun J, Broët P, Metzger G, Orrico M, Goldschmidt E, Schilf A, Tonetti C, Tan Y, Delmas-Marsalet B, Luccioni C, Falissard B, Hoffman R. M., “Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and folinic acid,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 61, no. 7, pp. 867–876, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0006-2952(01)00560-3.
- [101] Kokkinakis D. M., Schold S. C., Hori H., and Nobori T., “Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice,” *Nutr. Cancer*, vol. 29, no. 3, pp. 195–204, Jan. 1997, doi: 10.1080/01635589709514624.
- [102] Y. Tan, M. Xu, H. Guo, X. Sun, T. Kubota, and R. M. Hoffman, “Anticancer efficacy of methioninase *in vivo*,” *Anticancer Res.*, vol. 16, no. 6C, pp. 3931–3936, Dec. 1996.
- [103] Pokrovsky V. S., Anisimova N. Y, Davydov D. Z, Bazhenov S. V, Bulushova N.V, Zavilgelsky G. B., Kotova V. Y., Manukhov I. V., “Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts,” *Invest. New Drugs*, vol. 37, no. 2, pp. 201–209, Apr. 2019, doi: 10.1007/s10637-018-0619-4.
- [104] an Y, Sun X, Xu M, Tan X, Sasson A, Rashidi B, Han Q, Tan X, Wang X, An Z, Sun FX, Hoffman R. M, “Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 5, no. 8, pp. 2157–2163, Aug. 1999.
- [105] Goseki N., Nagahama T., Maruyama M., and Endo M., “Enhanced Anticancer Effect of Vincristine with Methionine Infusion after Methionine-depleting Total Parenteral Nutrition in Tumor-bearing Rats,” *Jpn. J. Cancer*

- Res.*, vol. 87, no. 2, pp. 194–199, Feb. 1996, doi: 10.1111/j.1349-7006.1996.tb03158.x.
- [106] Higuchi T, Han Q, Miyake K, Oshiro H, Sugisawa N, Tan Y, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Bouvet M, Singh S. R, Tsuchiya H, Hoffman R. M., “Combination of oral recombinant methioninase and decitabine arrests a chemotherapy-resistant undifferentiated soft-tissue sarcoma patient-derived orthotopic xenograft mouse model,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 523, no. 1, pp. 135–139, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.024.
- [107] Kawaguchi K, Igarashi K, Li S, Han Q, Tan Y, Kiyuna T, Miyake K, Murakami T, Chmielowski B, Nelson S. D, Russell T. A, Dry S. M., Li Y, Unno M, Eilber F. C., Hoffman R. M., “Combination treatment with recombinant methioninase enables temozolomide to arrest a BRAF V600E melanoma in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) mouse model,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 49, pp. 85516–85525, Oct. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20231.
- [108] Miki K, Xu M, An Z, Wang X, Yang M, Al-Refaie W, Sun X, Baranov E, Tan Y, Chishima T, Shimada H, Moossa A. R, Hoffman R. M. “Survival efficacy of the combination of the methioninase gene and methioninase in a lung cancer orthotopic model,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 7, no. 2, pp. 332–338, Feb. 2000, doi: 10.1038/sj.cgt.7700103.
- [109] Miki K, Xu M, Gupta A, Ba Y, Tan Y, Al-Refaie W, Bouvet M, Makuuchi M, Moossa A. R., Hoffman R. M., “Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide prodrug substrate,” *Cancer Res.*, vol. 61, no. 18, pp. 6805–6810, Sep. 2001.
- [110] Fukumoto M, Kudou D, Murano S, Shiba T, Sato D, Tamura T, Harada S, Inagaki K. “The Role of Amino Acid Residues in the Active Site of L - Methionine γ -lyase from *Pseudomonas putida*,” *Biosci. Biotechnol.*

- Biochem.*, vol. 76, no. 7, pp. 1275–1284, Jul. 2012, doi: 10.1271/bbb.110906.
- [111] Raboni S, Revtovich S, Demitri N, Giabbai B, Storici P, Cocconcelli C, Faggiano S, Rosini E, Pollegioni L, Galati S, Buschini A, Morozova E, Kulikova V, Nikulin A, Gabellieri E, Cioni P, Demidkina T, Mozzarelli A., “Engineering methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii* for anticancer activity,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1866, no. 12, pp. 1260–1270, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.bbapap.2018.09.011.
- [112] Koval V, Morozova E, Revtovich S, Lyfenko A, Chobanian A, Timofeeva V, Solovieva A, Anufrieva N, Kulikova V, Demidkina T., “Characteristics and Stability Assessment of Therapeutic Methionine γ -lyase-Loaded Polyionic Vesicles,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 1, pp. 959–967, Jan. 2022, doi: 10.1021/acsomega.1c05558.
- [113] Rehman T, Shabbir MA, Inam-Ur-Raheem M, Manzoor M. F, Ahmad N, Liu Z. W., Ahmad M. H., Siddeeg A, Abid M, Aadil R. M., “Cysteine and homocysteine as biomarker of various diseases,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 8, no. 9, pp. 4696–4707, 2020, doi: 10.1002/fsn3.1818.
- [114] Okawa A, Handa H, Yasuda E, Murota M, Kudo D, Tamura T, Shiba T, Inagaki K., “Characterization and application of l-methionine γ -lyase Q349S mutant enzyme with an enhanced activity toward l-homocysteine,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 133, no. 3, pp. 213–221, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jbiosc.2021.11.008.
- [115] Morozova E. A., Kulikova V. V., Rodionov A. N., Revtovich S. V., Anufrieva N. V., Demidkina T. V., “Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfinates,” *Biochimie*, vol. 128–129, pp. 92–98, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007.

- [116] Rouf R, Uddin SJ, Sarker DK, Islam MT, Ali ES, Shilpi JA, Nahar L, Tiralongo E, Sarker SD., “Antiviral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 104, pp. 219–234, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.08.006.
- [117] Shashikant K. N., “Studies on the antimicrobial and stimulatory factors of garlic (*Allium sativum* Linn.),” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 2, pp. 44–47, 1981.
- [118] Li Z., Le W., and Cui Z., “A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion,” *Cell Death Discov.*, vol. 4, no. 1, p. 108, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41420-018-0122-x.
- [119] Zardast M, Namakin K, Esmaelian Kaho J, Hashemi S. S., “Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test,” *Avicenna J. Phytomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 495–501, Oct. 2016.
- [120] Ma J. L., Zhang L, Brown L. M., Li J. Y., Shen L, Pan K. F., Liu W. D., Hu Y, Han Z. X., Crystal-Mansour S, Pee D, Blot W. J., Fraumeni J. F Jr, You W. C., Gail M. H., “Fifteen-Year Effects of *Helicobacter pylori*, Garlic, and Vitamin Treatments on Gastric Cancer Incidence and Mortality,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 104, no. 6, pp. 488–492, Mar. 2012, doi: 10.1093/jnci/djs003.
- [121] Stoll A. and Seebeck E., “Über die Spezifität und die Synthese mehrerer dem Alliin verwandter Verbindungen. 3. Mitteilung über *Allium*-Substanzen,” *Helv. Chim. Acta*, vol. 32, no. 3, pp. 866–876, 1949, doi: 10.1002/hlca.19490320330.
- [122] Granroth, B., “Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion and other *Allium* species,” *Ann Acad Sci Fenn*, vol. 154, p. 71, 1970.

- [123]Michael H. B., John V. P., and Linda. V. D., “Flavor components of garlic extract,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 19, no. 2, pp. 273–275, Mar. 1971, doi: 10.1021/jf60174a007.
- [124]Lancaster J. E. and Collin H. A., “Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*),” *Plant Sci Lett*, vol. 22, no. 2, pp. 169–176, 1981, doi: 10.1016/0304-4211(81)90139-5.
- [125]Lancaster J. E., and Collin H.A., “Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*),” *Plant Sci. Lett.*, vol. 22, no. 2, pp. 169–176, 1981.
- [126]Ilic D., V. Nikolic, L. Nikolic, M. Stankovic, L. Stanojevic, and Cakic M., “Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity,” *Facta Univ. - Ser. Phys. Chem. Technol.*, vol. 9, no. 1, pp. 9–20, 2011, doi: 10.2298/FUPCT1101009I.
- [127]Cavallito C. J. and Bailey J. H., “Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 66, no. 11, pp. 1950–1951, Nov. 1944, doi: 10.1021/ja01239a048.
- [128]Block E., “The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 31, no. 9, pp. 1135–1178, Sep. 1992, doi: 10.1002/anie.199211351.
- [129]Bhatwalkar S. B., Mondal R., Krishna S. B. N., Adam J. K., Govender P., Anupam R., “Antibacterial Properties of Organosulfur Compounds of Garlic (*Allium sativum*),” *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 613077, Jul. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.613077.
- [130]Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, Glozman S, Yavin E, Weiner L., “S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties,” *Biochim.*

- Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1499, no. 1–2, pp. 144–153, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0167-4889(00)00119-1.
- [131] Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L., “The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1379, no. 2, pp. 233–244, Feb. 1998, doi: 10.1016/S0304-4165(97)00104-9.
- [132] Gatt M. E., Strahilevitz J, Sharon N, Lavie D, Goldschmidt N, Kalish Y, Gural A, Paltiel O. B., “A Randomized Controlled Study to Determine the Efficacy of Garlic Compounds in Patients with Hematological Malignancies at Risk for Chemotherapy-Related Febrile Neutropenia,” *Integr. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 5, pp. 428–435, Sep. 2015, doi: 10.1177/1534735415588928.
- [133] Jin Z. Y., Wu M., Han R. Q., Zhang X. F., Wang X. S., Liu A. M., Zhou J. Y., Lu Q. Y., Zhang Z. F., Zhao J. K., “Raw Garlic Consumption as a Protective Factor for Lung Cancer, a Population-Based Case–Control Study in a Chinese Population,” *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, vol. 6, no. 7, pp. 711–718, Jul. 2013, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0015.
- [134] Ishikawa H, Saeki T, Otani T, Suzuki T, Shimosuma K, Nishino H, Fukuda S, Morimoto K., “Aged Garlic Extract Prevents a Decline of NK Cell Number and Activity in Patients with Advanced Cancer,” *J. Nutr.*, vol. 136, no. 3, pp. 816S–820S, Mar. 2006, doi: 10.1093/jn/136.3.816S.
- [135] Wu X, Shi J, Fang WX, Guo XY, Zhang LY, Liu YP, Li Z., “Allium vegetables are associated with reduced risk of colorectal cancer: A hospital-based matched case-control study in China,” *Asia Pac. J. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 5, Oct. 2019, doi: 10.1111/ajco.13133.
- [136] Dreher M. L., “Dietary Patterns and Whole Plant Foods in Aging and Disease,” *Cham: Springer International Publishing*, 2018. doi: 10.1007/978-3-319-59180-3.

- [137]Li W. Q., Zhang J. Y., Ma J. L., Li Z. X., Zhang L, Zhang Y, Guo Y, Zhou T, Li J. Y., Shen L, Liu W. D., Han Z. X., Blot W. J., Gail M. H., Pan K. F., You W. C., “Effects of Helicobacter pylori treatment and vitamin and garlic supplementation on gastric cancer incidence and mortality: follow-up of a randomized intervention trial,” *BMJ*, p. 15016, Sep. 2019, doi: 10.1136/bmj.15016.
- [138]Gail M. H. and You W. C., “A Factorial Trial Including Garlic Supplements Assesses Effect in Reducing Precancerous Gastric Lesions,” *J. Nutr.*, vol. 136, no. 3, pp. 813S-815S, Mar. 2006, doi: 10.1093/jn/136.3.813S.
- [139]Li H, Li H. Q., Wang Y, Xu H. X., Fan W. T., Wang M. L., Sun P. H., Xie X. Y., “An intervention study to prevent gastric cancer by micro-selenium and large dose of allitridum,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 117, no. 8, pp. 1155–1160, Aug. 2004.
- [140]You W. C, Brown L. M., Zhang L, Li J. Y., Jin M. L., Chang Y. S., Ma J. L., Pan K. F., Liu W. D., Hu Y, Crystal-Mansour S, Pee D, Blot W. J., Fraumeni JF J. r., Xu G. W., Gail M. H., “Randomized Double-Blind Factorial Trial of Three Treatments To Reduce the Prevalence of Precancerous Gastric Lesions,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 98, no. 14, pp. 974–983, Jul. 2006, doi: 10.1093/jnci/djj264.
- [141]Zuniga K. E., Parma D. L., Muñoz E., Spaniol M, Wargovich M, Ramirez A. G., “Dietary intervention among breast cancer survivors increased adherence to a Mediterranean-style, anti-inflammatory dietary pattern: the Rx for Better Breast Health Randomized Controlled Trial,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 173, no. 1, pp. 145–154, Jan. 2019, doi: 10.1007/s10549-018-4982-9.
- [142]Lee G. Y., Lee J. J., Lee S. M., “Antioxidant and Anticoagulant Status Were Improved by Personalized Dietary Intervention Based on Biochemical and Clinical Parameters in Cancer Patients,” *Nutr. Cancer*, vol. 67, no. 7, pp. 1083–1092, Oct. 2015, doi: 10.1080/01635581.2015.1073754.

- [143]Catanzaro E, Canistro D, Pellicioni V, Vivarelli F, Fimognari C., “Anticancer potential of allicin: A review,” *Pharmacol. Res.*, vol. 177, p. 106118, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.phrs.2022.106118.
- [144]Cai X.-J., Block E., Uden P. C., Quimby B. D., and Sullivan J. J., “Allium Chemistry: Identification of Natural Abundance Organoselenium Compounds in Human Breath after Ingestion of Garlic Using Gas Chromatography with Atomic Emission Detection,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 43, no. 7, pp. 1751–1753, Jul. 1995, doi: 10.1021/jf00055a001.
- [145]Minami T., Boku T., Inada K., Morita M., and Okazaki Y., “Odor Components of Human Breath After the Ingestion of Grated Raw Garlic,” *J. Food Sci.*, vol. 54, no. 3, pp. 763–763, May 1989, doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb04703.x.
- [146]Chhabria S. V., Akbarsha M. A., Li A. P., Kharkar P. S., and Desai K. B., “*In situ* allicin generation using targeted alliinase delivery for inhibition of MIA PaCa-2 cells via epigenetic changes, oxidative stress and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) expression,” *Apoptosis*, vol. 20, no. 10, pp. 1388–1409, Oct. 2015, doi: 10.1007/s10495-015-1159-4.
- [147]Miron T., Mironchik M., Mirelman D., Wilchek M., and Rabinkov A., “Inhibition of tumor growth by a novel approach: *in situ* allicin generation using targeted alliinase delivery,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 2, no. 12, pp. 1295–1301, Dec. 2003.
- [148]Appel E., Rabinkov A., Neeman M., Kohen F., and Mirelman D., “Conjugates of daidzein-alliinase as a targeted pro-drug enzyme system against ovarian carcinoma,” *J. Drug Target.*, vol. 19, no. 5, pp. 326–335, Jun. 2011, doi: 10.3109/1061186X.2010.504265.
- [149]Arditti F. D., Rabinkov A., Miron T., Reisner Y, Berrebi A, Wilchek M, Mirelman D., “Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor

- cells by allicin generated *in situ* using a rituximab-alliinase conjugate,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 4, no. 2, pp. 325–331, Feb. 2005.
- [150] Ануфриева Н. П., Морозова Е. А., Куликова В. В., Бажулина Н. П., Манухов И. В. Дёгтев Д. Е., Гнучих Е. Ю., Родионов А. Н., Завильгельский Г. Б., Демидкина Т. В., “Сульфоксиды – аналоги L-метионина и L-цистеина как пролекарства против грамположительных и грамотрицательных бактерий,” *АКТА NATURAE*, vol. 4, no. 27, pp. 141–148, 2015.
- [151] Morozova E, Kulikova V, Koval V, Anufrieva N, Chernukha M, Avetisyan L, Lebedeva L, Medvedeva O, Burmistrov E, Shaginyan I, Revtovich S, Demidkina T., “Encapsulated Methionine γ -Lyase: Application in Enzyme Prodrug Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 14, pp. 7782–7786, Apr. 2020, doi: 10.1021/acsomega.9b03555.
- [152] Kohen F, Gayer B, Kulik T, Frydman V, Nevo N, Katzburg S, Limor R, Sharon O, Stern N, Somjen D., “Synthesis and evaluation of the antiproliferative activities of derivatives of carboxyalkyl isoflavones linked to N-t-Boc-hexylenediamine,” *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 25, pp. 6405–6410, 2007, doi: 10.1021/jm070727z.
- [153] Morozova E. A., Kulikova V. V., Rodionov A. N., Revtovich S. V., Anufrieva N. V., Demidkina T. V., “Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfinates,” *Biochimie*, vol. 128–129, pp. 92–98, 2016, doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007.
- [154] Kulikova V, Morozova E, Rodionov A, Koval V, Anufrieva N, Revtovich S, Demidkina T., “Non-stereoselective decomposition of (\pm)-S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfinates catalyzed by C115H mutant methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*,” *Biochimie*, vol. 151, pp. 42–44, 2018, doi: 10.1016/j.biochi.2018.05.011.

- [155]Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Weiner L, Wilchek M., “A spectrophotometric assay for allicin and alliinase (Alliin lyase) activity: Reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates,” *Anal. Biochem.*, vol. 265, no. 2, pp. 317–325, 1998, doi: 10.1006/abio.1998.2924.
- [156]Layne E. “[73] Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins,” *Methods Enzymol.*, vol. 3, no. C, pp. 447–454, 1957, doi: 10.1016/S0076-6879(57)03413-8.
- [157]Peterson E. A. and Sober H. A. “Preparation of Crystalline Phosphorylated Derivatives of Vitamin B₆,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 76, no. 1, pp. 169–175, Jan. 1954, doi: 10.1021/ja01630a045.
- [158]Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., and Lieberman S., “Steroid-protein conjugates,” *J. Biol. Chem.*, vol. 228, no. 2, pp. 713–727, Oct. 1957, doi: 10.1016/S0021-9258(18)70654-6.
- [159]Bank U., Reinhold D., and Ansorge S., “Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method.,” *Allerg. Immunol. (Leipz.)*, vol. 37, no. 3–4, pp. 119–123, 1991.
- [160]Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., and Wilchek M., “A Spectrophotometric Assay for Allicin and Alliinase (Alliin lyase) Activity: Reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with Thiosulfinates,” *Anal. Biochem.*, vol. 265, no. 2, pp. 317–325, Dec. 1998, doi: 10.1006/abio.1998.2924.
- [161]Tomayko M. M. and Reynolds C. P., “Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 24, no. 3, pp. 148–154, 1989, doi: 10.1007/BF00300234.
- [162]Kulikova V. V., “Gene cloning, characterization, and cytotoxic activity of methionine γ -lyase from *Clostridium novyi*: Expression and Characterization of MGL from *C. novyi*,” *IUBMB Life*, vol. 69, no. 9, pp. 668–676, Sep. 2017, doi: 10.1002/iub.1649.

- [163]Morozova E, Anufrieva N, Koval V, Lesnova E, Kushch A, Timofeeva V, Solovieva A, Kulikova V, Revtovich S, Demidkina T., “Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: Two approaches to antitumor therapy,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 182, pp. 394–401, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201.
- [164]El-Saber Batiha G, Magdy Beshbishy A, G Wasef L, Elewa YHA, A Al-Sagan A, Abd El-Hack ME, Taha AE, M Abd-Elhakim Y, Prasad Devkota H., “Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review,” *Nutrients*, vol. 12, no. 3, p. 872, Mar. 2020, doi: 10.3390/nu12030872.
- [165]Kaye A. D., De Witt B. J., Anwar M., Smith D. E., Feng C. J., Kadowitz P. J., Nossaman B. D., “Analysis of responses of garlic derivatives in the pulmonary vascular bed of the rat,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 89, no. 1, pp. 353–358, Jul. 2000, doi: 10.1152/jappl.2000.89.1.353.
- [166]Koch HP, Lawson LD., “Garlic: The Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species.,” *HerbalGram*, no. 37, p. 64, 1996.
- [167]Jakubíková J, and Sedlák J., “Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines,” *Neoplasma*, vol. 53, no. 3, pp. 191–199, 2006.
- [168]Luo R, Fang D, Hang H, and Tang Z., “The Mechanism in Gastric Cancer Chemoprevention by Allicin,” *Anticancer Agents Med. Chem.*, vol. 16, no. 7, pp. 802–809, May 2016, doi: 10.2174/187152061666615111115443.
- [169]Miron T, Rabinkov A, Mirelman D, Wilchek M, and Weiner L., “The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1463, no. 1, pp. 20–30, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0005-2736(99)00174-1.

- [170] Kulikova V, Morozova E, Rodionov A, Koval V, Anufrieva N, Revtovich S, Demidkina T., “Non-stereoselective decomposition of (\pm)-S-alk(en)yl- L -cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfinates catalyzed by C115H mutant methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*,” *Biochimie*, vol. 151, pp. 42–44, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.biochi.2018.05.011.
- [171] Rose P, Whiteman M, Moore P. K. and Zhu Y. Z., “Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 22, no. 3, p. 351, 2005, doi: 10.1039/b417639c.
- [172] Somjen D, Katzburg S, Nevo N, Gayer B, Hodge R. P., Renevey M. D., Kalchenko V, Meshorer A, Stern N, Kohen F., “A daidzein–daunomycin conjugate improves the therapeutic response in an animal model of ovarian carcinoma,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 110, no. 1–2, pp. 144–149, May 2008, doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.033.
- [173] Kang L, Zhang X, Xie Y, Tu Y, Wang D, Liu Z and Wang Z. Y., “Involvement of Estrogen Receptor Variant ER- α 36, Not GPR30, in Nongenomic Estrogen Signaling,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 24, no. 4, pp. 709–721, Apr. 2010, doi: 10.1210/me.2009-0317.
- [174] Ma H. R., Wang J, Chen Y. F., Chen H, Wang W. S, Aisa H. A., “Icariin and icaritin stimulate the proliferation of SKBr3 cells through the GPER1-mediated modulation of the EGFR-MAPK signaling pathway,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 33, no. 6, pp. 1627–1634, Jun. 2014, doi: 10.3892/ijmm.2014.1722.
- [175] Samartzis E. P., Noske A, Meisel A, Varga Z, Fink D, Imesch P., “The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e83296, Jan. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0083296.

- [176]Ford C. H., Al-Bader M, Al-Ayadhi B, Francis I., “Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines,” *Anticancer Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 521–527, Feb. 2011.
- [177]Jacenik D., Beswick E. J., Krajewska W. M., Prossnitz E. R., “G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 25, no. 30, pp. 4092–4104, Aug. 2019, doi: 10.3748/wjg.v25.i30.4092.
- [178] Ingold Heppner B, Behrens HM, Balschun K, Haag J, Krüger S, Becker T, Röcken C., “HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma,” *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 10, pp. 1977–1984, Nov. 2014, doi: 10.1038/bjc.2014.483.
- [179]Qiu Y, Waters CE, Lewis A. E, Langman MJ, and Eggo M. C., “Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta,” *J. Endocrinol.*, vol. 174, no. 3, pp. 369–377, Sep. 2002, doi: 10.1677/joe.0.1740369.
- [180]Mesmar F, Dai B, Ibrahim A, Hases L, Jafferli M. H, Jose Augustine J, DiLorenzo S, Kang Y, Zhao Y, Wang J, Kim M, Lin C. Y, Berkenstam A, Fleming J, Williams C., “Clinical candidate and genistein analogue AXP107-11 has chemoenhancing functions in pancreatic adenocarcinoma through G protein-coupled estrogen receptor signaling,” *Cancer Med.*, vol. 8, no. 18, pp. 7705–7719, Dec. 2019, doi: 10.1002/cam4.2581.
- [181]Guo J. M., Xiao B. X., Dai D. J., Liu Q, Ma H. H., “Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells *in vitro*,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 6, p. 860, 2004, doi: 10.3748/wjg.v10.i6.860.
- [182]Komoto M, Nakata B, Nishii T, Kawajiri H, Shinto O, Amano R, Yamada N, Yashiro M, Hirakawa K., “*In vitro* and *in vivo* evidence that a combination of lapatinib plus S-1 is a promising treatment for pancreatic

- cancer,” *Cancer Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 468–473, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01405.x.
- [183] Chan Q. K., Lam H. M., Ng C. F., Lee A. Y., Chan E. S., Ng H. K., Ho S. M., Lau KM, “Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G2 cell-cycle arrest,” *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 9, pp. 1511–1523, Sep. 2010, doi: 10.1038/cdd.2010.20.
- [184] Lau K. M., LaSpina M., Long J. and Ho S. M. “Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 12, pp. 3175–3182, Jun. 2000.
- [185] Antony M. L. and Singh S. V., “Molecular mechanisms and targets of cancer chemoprevention by garlic-derived bioactive compound diallyl trisulfide,” *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 49, no. 11, pp. 805–816, Nov. 2011.
- [186] Chen H, Zhu B, Zhao L, Liu Y, Zhao F, Feng J, Jin Y, Sun J, Geng R, Wei Y., “Allicin Inhibits Proliferation and Invasion *in Vitro* and *in Vivo* via SHP-1-Mediated STAT3 Signaling in Cholangiocarcinoma,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 47, no. 2, pp. 641–653, 2018, doi: 10.1159/000490019.
- [187] Loboda A., Was H., Jozkowicz A., and Dulak J., “Janus face of Nrf2–HO-1 axis in cancer—Friend in chemoprevention, foe in anticancer therapy,” *Lung Cancer*, vol. 60, no. 1, pp. 1–3, 2008, doi: 10.1016/j.lungcan.2007.10.024.
- [188] Zhou Y, Li X, Luo W, Zhu J, Zhao J, Wang M, Sang L, Chang B, Wang B., “Allicin in Digestive System Cancer: From Biological Effects to Clinical Treatment,” *Front. Pharmacol.*, vol. 13, p. 903259, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.903259.