

ISOLATION OF THE RECOMBINANT ENZYME L-PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE FOR USING IN TARGETED THERAPY OF CANCER

Babich O.O.¹, Ivanova S.A.² (Russian Federation) Email: Babich510@scientifictext.ru

¹*Babich Olga Olegovna - Doctor of technical sciences, Associate Professor, SCIENTIFIC AND INNOVATIVE MANAGEMENT;*

²*Ivanova Svetlana Anatolievna - Doctor of Technical Sciences, Professor, DEPARTMENT OF GENERAL MATHEMATICS AND COMPUTER SCIENCE, KEMEROVO STATE UNIVERSITY, KEMEROVO*

Abstract: *this work is dedicated to the isolation and purification of recombinant L-phenylalanine-ammonia-lyase. For this, a two-stage purification scheme was developed, including the precipitation with ammonium sulfate and two chromatographic stages: metal chelate and hydrophobic. The data obtained demonstrate during hydrophobic chromatography the enzyme is eluted with two peaks. At the same time, 80% of the enzyme is eluted in the first fraction with a specific activity of 3.3 U/mg, and about 20% of the enzyme with a specific activity of 2.2 U/mg is eluted in the second fraction. The yield of the enzyme as a result of purification is about 65%.*

Keywords: *L-phenylalanine ammonia-lyase, recombinant enzyme, targeted cancer therapy, chromatography.*

ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА L-ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ С ЦЕЛЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ В ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Бабич О.О.¹, Иванова С.А.² (Российская Федерация)

¹*Бабич Ольга Олеговна – доктор технических наук, доцент, Научно-инновационное управление;*

²*Иванова Светлана Анатольевна – доктор технических наук, профессор, кафедра общей математики и информатики, Кемеровский государственный университет, г. Кемерово*

Аннотация: *данная работа посвящена выделению и очистке рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Для этого была разработана двухстадийная схема очистки, включающая осаждение сульфатом аммония и две хроматографические стадии: металлохелатную и гидрофобную. Полученные данные демонстрируют, что при гидрофобной хроматографии фермент элюируется двумя пиками.*

При этом 80% фермента элюируется в первой фракции с удельной активностью 3,3 Е/мг, а около 20% фермента с удельной активностью 2,2 Е/мг элюируется во второй фракции. Выход фермента в результате очистки составляет около 65%.

Ключевые слова: L-фенилаланин-аммоний-лиаза, рекомбинантный фермент, таргетная терапия рака, хроматография.

В настоящее время правительство России поставило задачу максимально снизить зависимость страны от импортных противоопухолевых препаратов. Приоритетное значение в решении проблемы онкологических заболеваний имеют исследования, направленные на раскрытие молекулярно-генетических механизмов функционирования препаратов, применяемых для лечения раковых больных [2, с. 4-5].

Перспективным ферментным препаратом для терапии онкологических заболеваний является L-фенилаланин-аммоний-лиаза (PAL) [1, с. 17; 4, с. 494-495]. Противоопухолевое действие препарата обусловлено снижением уровня L-фенилаланина в лейкемических опухолевых клетках, которые в отличие от нормальных клеток не способны синтезировать собственный L-фенилаланин. В результате нарушается синтез белка, а также синтез ДНК и РНК. При этом здоровые клетки не затрагиваются. Доказано, что время жизни L-аспарагиназы меньше такового для L-фенилаланин-аммоний-лиазы [2, с. 5; 3, с. 281; 5 с. 296].

Данная работа посвящена выделению и очистке рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы. Для этого была разработана двухстадийная схема очистки, включающая осаждение сульфатом аммония и две хроматографические стадии: металлохелатную и гидрофобную.

Таблица 1. Результаты очистки рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы по оптимизированной схеме

Стадия очистки	Экстракт	Осаждение сульфатаммония (25-50%)	Ni-NTA-сефароза	Гидрофобная хроматография	Гидрофобная хроматография, «хвост»
Удельная активность, Е/мг	0,280	0,824	2,215	3,314	2,231
Активность, Е/мл	2,55	16,64	11,62	12,78	4,08
Белок, мг/мл	9,33	20,18	5,23	3,91	1,83
Объем, мл	110,2	16,7	20,3	13,9	10,7

Суммарная активность, Е	282,5	274,3	233,0	175,1	42,9
Суммарный белок, мг	1025,0	331,0	102,0	53,2	19,5
Выход, %	100	97	86	59	15

Для контроля чистоты рекомбинантного фермента использовали электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия. Результаты очистки рекомбинантной PAL представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Данные, представленные в таблице 1 и на рисунке 1, свидетельствуют о том, что при гидрофобной хроматографии фермент элюируется двумя пиками. При этом 80% фермента элюируется в первой фракции с удельной активностью 3,3 Е/мг, а около 20% фермента с удельной активностью 2,2 Е/мг элюируется во второй фракции. Выход фермента в результате очистки составляет около 65%.

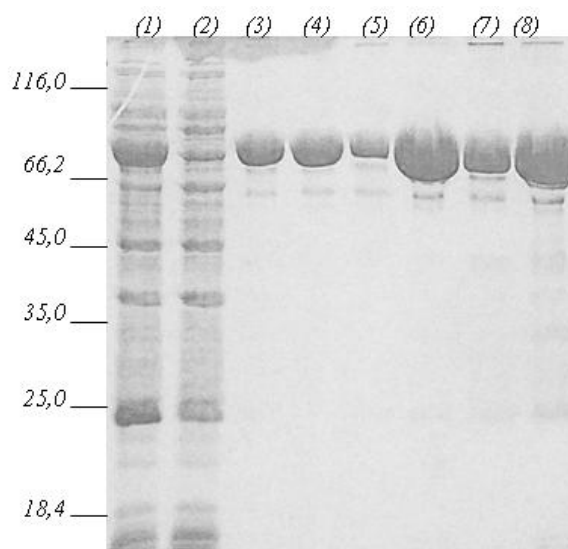


Рис. 1. Электрофоретический анализ очистки рекомбинантной L-фенилаланин-аммоний-лиазы: 1 – препарат перед нанесением на металлохелат после дробного высаливания $(NH_4)_2SO_4$ (25% и 50% насыщения), нанесено 9,5 мкг белка; 2 – просок после металлохелата; 3 и 8 – препарат после металлохелата (2,9 и 11,4 мкг белка, соответственно); 4 и 6 – объединенные фракции первого пика после фенил-сефарозы (3 и 9 мкг белка, соответственно); 5 и 7 – объединенные фракции второго пика после фенил-сефарозы (1,3 и 4,0 мкг белка, соответственно)

Работа выполнена в рамках исполнения научно-исследовательской работы, финансируемой за счет средств Стипендии Президента Российской Федерации (СП-1361.2018.4) по теме: «Разработка и практическая реализация генно-инженерных технологий получения новых лекарственных кандидатов для таргетной терапии онкологических заболеваний».

Список литературы / References

1. *Бабич О.О.* Изучение свойств ферментного препарата L-фенилаланин-аммоний-лиазы / Бабич О.О. // *Инновационные подходы и современная наука*, 2011. № 4. С. 17-20.
2. *Зборовская И.Б.* Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике / И.Б. Зборовская // *Успехи молекулярной онкологии*, 2014. Т. 1. № 2. С. 4-15.
3. *Суконко О.Г.* Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований / О.Г. Суконко, С.А. Красный. Минск: Профессиональные издания, 2012. 508 с.
4. *Cui J.* Enhanced Activity of Phenylalanine Ammonia Lyase in Permeabilised Recombinant E. coli by Response Surface Method / Cui J., Li Y., Jia S.R. // *Food science and biotechnology*, 2009. Vol. 18. № 2. P. 494-499.
5. *Wang R.F.* Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy / R.F. Wang, S.A. Rosenberg // *J Leukoc Biol.*, 1996. Vol. 60. № 3. P. 296–309.